

Aus dem Institut für Zellbiologie und Neurobiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der öffnungsabhängigen Reduktion des rHCN1-  
vermittelten  $I_h$  im HEK293 Modell

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lennart D. Barthel  
aus Berlin

Datum der Promotion: 13.12.2019



# Vorwort

Diese Dissertation wurde in dem Institut für Zellbiologie und Neurobiologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt. Die Betreuung des Dissertationsvorhabens erfolgte durch PD Dr. med. Ulf Strauß. Sämtliche Versuchsplanungen, Versuchsdurchführungen, Datenerhebungen und Auswertungen erfolgten in diesem Umfeld.

Teilweise wurden Inhalte der vorliegenden Arbeit bereits nach einem Peer-Review-Verfahren in einer englischsprachigen Fachzeitschrift veröffentlicht (Barthel L, Reetz O, Strauss U. *Use Dependent Attenuation of Rat HCN1-Mediated Ih in Intact HEK293 Cells*. Cell Physiol Biochem. 2016 May; 38(6):2079-93).

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>1 ABSTRACT</b>	<b>1</b>
1.1 DEUTSCH	1
1.2 ENGLISH	3
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1 HCN-KANÄLE	7
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER HCN-KANÄLE	8
2.3 HCN-KANALSTEUERUNG UND BEEINFLUSSENDE MODULATOREN	9
2.4 HCN-KANÄLE IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM UND DIE BIOPHYSIKALISCHEN EIGENSCHAFTEN VON $I_H$	11
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>12</b>
3.1 GERÄTE UND SOFTWARE	12
3.1.1 GERÄTE	12
3.1.2 SOFTWARE	13
3.2 LÖSUNGEN UND BLOCKSUBSTANZEN	13
3.2.1 EXTRAZELLULÄRE LÖSUNG	13
3.2.2 INTRAZELLULÄRE LÖSUNG	13
3.2.3 BLOCKSUBSTANZEN	15
3.3 PATCH-CLAMP TECHNIK	15
3.4 DATENERFASSUNG	18
3.5 ZELLKULTURTECHNIKEN	20
3.5.1 AUFBEWAHRUNG UND PASSAGIERUNG VON HEK293 ZELLEN	20
3.5.2 AUSPLATTIERUNG	21
3.5.3 EINFRIEREN VON HEK293 ZELLEN	21
3.5.4 AUFTAUEN VON HEK293 ZELLEN	21
3.5.5 BESCHICHTUNG VON DECKGLÄSERN	22
3.6 HEK293 EXPRESSIONSSYSTEM	22
3.6.1 CALCIUM-PHOSPHAT VERMITTELTEN DNA TRANSFER IN HEK293 ZELLEN	23

---

3.6.2	PIRES2-DSREDEXPRESS_RHCN1-VEKTOR	24
3.7	DATENANALYSE UND STATISTIK	26
3.7.1	DATENANALYSE	26
3.7.2	STATISTIK	27
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>28</b>
<hr/>		
4.1	IN INTAKTEN HEK293 ZELLEN VERMINDERT SICH $I_H$ NACH WIEDERHOLTER AKTIVIERUNG UNABHÄNGIG VON EINER EINFACHEN, LANGEN VORAKTIVIERUNG	28
4.2	$I_H$ WIRD DURCH MEHRFACHE AKTIVIERUNG STÄRKER REDUZIERT ALS DURCH DIE STÄRKE DER ZUVOR APPLIZIERTEN SPANNUNG UND WIRD DURCH EINEN SHIFT DER SPANNUNGSABHÄNGIGEN AKTIVIERUNG ZU WEITER NEGATIVEN POTENTIALEN BEGLEITET	36
4.3	SOWOHL HOHE INTRAZELLULÄRE cAMP-KONZENTRATIONEN ALS AUCH ERHÖHTE NATRIUMKONZENTRATIONEN IN DER PIPETTE HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE $I_H$ REDUKTION	40
4.4	DIE $I_H$ -REDUKTION BLEIBT IM WHOLE-CELL-MODUS AUS UND WIRD WAHRSCHEINLICH VON EINEM VERSATZ DER SPANNUNGSABHÄNGIGEN AKTIVIERUNG BEGLEITET	43
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>45</b>
<hr/>		
5.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	45
5.2	GATING UND KOPPLUNG	46
5.3	KANALMODULATOREN	47
5.4	ERHÖHTE INTRAZELLULÄRE $Ca^{++}$ -KONZENTRATION ALS MÖGLICHE URSACHE DER $I_H$ -REDUKTION	48
5.5	INSTANTANER STROM UND $I_H$ -REDUKTION	49
5.6	MECHANISMEN DER INAKTIVIERUNG VON ANDEREN SPANNUNGSGESTEUERTEN IONENKANÄLEN – EIN VERGLEICH	50
5.7	HCN-KANAL ASSOZIIERTE PATHOPHYSIOLOGISCHE PROZESSE	51
5.8	METHODENKRITIK	52
5.9	AUSBLICK	55
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>		<b>V</b>
<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>		<b>XVI</b>
<b>ANTEILSERKLÄRUNG AN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN</b>		<b>XVII</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>		<b>XVIII</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b>		<b>XIX</b>
<b>DANKSAGUNG</b>		<b>XX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A/D	Analog/Digital
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> ; Adenosintriphosphat
cAMP	<i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i> ; zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	<i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i> ; zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
ctrl.	<i>Control</i> ; Kontrolle (in den Abbildungen bezeichnet dies den Bezugswert)
$C_{ini}$	Initiale Kapazität
$C_m$	Zellkapazität
CNBD	<i>Cyclic nucleotide binding domain</i> ; Zyklonukleotidbindedomäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i> ; Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
et al.	<i>et alii</i> (Maskulinum); <i>et aliae</i> (Femininum); lateinisch: „und andere“
FCS	<i>Fetal calf serum</i> ; fetales Kalbsserum
HCN	<i>Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated</i> ; Durch Hyperpolarisation aktiviert und durch zyklische Nukleotide moduliert
HEK	<i>Human embryonic kidney</i> ; menschliche embryonale Nierenzellen
$I_h, I_q, I_f$	Elektrischer Strom, der durch den HCN-Kanal fließt; $I_{queer}$ und $I_{funny}$ current sind in der Literatur alternative Termini für $I_h$

---

$I_{\text{hold}}$ ; $I_{\text{holdini}}$	Haltestrom; initialer Haltestrom
$I_{\text{inst}}$	Instantane Stromkomponente von $I_h$
$I_{\text{slow}}$	Langsame Stromkomponente von $I_h$
$I_{\text{ss}}$	<i>Steady state</i> Anteil des $I_h$ (stationärer Anteil des $I_h$ )
KMeSO <sub>4</sub>	<i>Potassium methyl sulfate</i> ; Kaliummethylsulfat
mRNA; RNA	<i>Messenger RNA</i> , Boten-RNA; <i>Ribonucleic acid</i> , Ribonokleinsäure
PIP <sub>2</sub>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i> ; Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
rHCN	ratHCN ( <i>Rattus norvegicus</i> ); HCN – Kanal der Wanderratte
$R_{\text{in}}$ ; $R_{\text{inini}}$	Eingangswiderstand; initialer Eingangswiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
$R_s$ , $R_{\text{sini}}$	Serieller Widerstand; initialer serieller Widerstand
$R_{\text{tot}}$ , $R_{\text{totini}}$	Gesamtwiderstand; initialer Gesamtwiderstand
Sog.	sogenannt
sp.	<i>Species</i> ; Spezies
spHCN	<i>spermHCN of the sea urchin</i> ; HCN-Kanäle im Sperma des Seeigels
V <sub>1/2</sub>	Spannung die benötigt wird, um einen Ionenkanal halbmaximal zu aktivieren
vs.	<i>versus</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
T	Kinetische Zeitkonstante
8br-cAMP	<i>8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate</i> ; bromiertes Derivat von cAMP

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b>	Die Struktur von HCN-Kanälen	9
<b>Abb. 2</b>	Versuchsaufbau für <i>voltage-clamp</i> -Messungen	19
<b>Abb. 3</b>	Struktur des <i>pIRES2-dsRedExpress_rHCN1</i> Vektors	25
<b>Abb. 4</b>	HEK293 Zellen	26
<b>Abb. 5</b>	Beispielabbildung eines aktivierten rHCN1 vermittelten $I_h$ in der Ganzzelleableitung	27
<b>Abb. 6</b>	Die wiederholte Aktivierung von rHCN1 führt zur Verminderung der $I_h$ -Amplitude in intakten HEK293 Zellen	29
<b>Abb. 7</b>	Zeitverläufe von Eingangswiderstand ( $R_{in}$ ), serieller Widerstand ( $R_s$ ), Gesamtwiderstand ( $R_{tot}$ ), Haltestrom ( $I_{hold}$ ) und <i>Patch</i> -Kapazität ( $C$ ). Beispielhaft für <i>cell-attached</i> - und <i>whole-cell</i> -Messungen	30
<b>Abb. 8</b>	Korrelation von $I_{inst}$ und $I_{slow}$	32
<b>Abb. 9</b>	Die Reduktion von rHCN1 vermitteltem $I_h$ hängt von einem intakten Zytosol ab	33
<b>Abb. 10</b>	Die Amplitudenreduktion von $I_h$ im <i>whole-cell</i> -Modus vs. im <i>cell-attached</i> -Modus	33
<b>Abb. 11</b>	Die Reduktion von $I_h$ in Abhängigkeit zu wiederholten Aktivierungen	35
<b>Abb. 12</b>	Spannungsabhängige Aktivierung und $I_h$ -Reduktion	37
<b>Abb. 13</b>	<i>Tail</i> -Strom-Analyse	37
<b>Abb. 14</b>	Ein Versatz der spannungsabhängigen rHCN1-Aktivierung zu stärker negativen Potentialen begleitet die $I_h$ -Reduktion	39
<b>Abb. 15</b>	Die Aktivierungszeitkonstante von rHCN1 vermitteltem $I_h$ vermindert sich durch mehrfache Aktivierung	39
<b>Abb. 16</b>	Die intrazelluläre Aufsättigung von cAMP (8Br-cAMP) führt nicht zu einer Umkehrung oder einem Aufhalten der $I_h$ -Amplitudenreduktion im <i>cell-attached</i> -Modus	41
<b>Abb. 17</b>	Eine hohe extrazelluläre $Na^+$ -Konzentration hat keinen Einfluss auf die Amplitudenreduktion von rHCN1 vermitteltem $I_h$	42
<b>Abb. 18</b>	Das Ausbleiben der rHCN1- $I_h$ -Reduktion nach dem Austausch von Intrazellulärflüssigkeit und Pipettenlösung ist zeitabhängig und teilweise von einer spannungsabhängigen Hysterese begleitet	44
<b>Abb. 19</b>	Anteile des verbliebenen $I_h$ nach positivem oder negativem Vorpuls	45

# 1 Abstract

## 1.1 Deutsch

HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels*) öffnen bei hyperpolarisierenden Spannungen und haben mittels des durch die Kanalpore fließenden gemischten Kationenstroms ( $I_h$ ) Einfluss auf synaptische und dendritische Erregbarkeit, die Generierung von Aktionspotentialen sowie auf die Stabilisierung des Ruhemembranpotentials. Untersuchungen im Vorfeld dieser Arbeit ergaben, dass sich HCN1-Kanäle leichter nach einer Voraktivierung öffnen und dass eine Hyperpolarisation in intakten Säugetierzellen (HEK293) zu einer Reduktion des maximalen  $I_h$  im *cell-attached*-Modus (bei intakter Membran) führte. Im *whole-cell*-Modus (nach Eröffnung der Zellmembran) bestand keine Reduktion und ein cAMP bedingter *rundown* (eine Verminderung der Stromantwort durch Auswaschung von intrazellulärem cAMP) war nicht nachweisbar.

Diese Beobachtungen waren Ausgangspunkt der Dissertation. Es stellte sich die Frage, welche Ursachen die Reduktion des HCN1 vermittelten  $I_h$  hat. In dieser Arbeit wurden sowohl die biophysikalischen Eigenschaften des  $I_h$  nach stattgehabter Voraktivierung, der Einfluss der intrazellulären und extrazellulären Ionenverteilung auf die Stromreduktion als auch der mögliche Einfluss des Abbaus intrazellulären cAMPs auf die Reduktion von  $I_h$  untersucht. Ratten-HCN1 (rHCN1) wurde in HEK293 Zellen transfiziert und elektrophysiologische *patch-clamp*-Techniken durchgeführt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine wiederholte Kanalaktivität zu einer Reduktion von  $I_h$  führt und die Repetition der Kanalaktivierung wichtiger ist als die Stärke der Voraktivierung. Die alleinige Verlängerung der Voraktivierung führte zu keiner Reduktion von  $I_h$ . Es konnte bestätigt werden, dass für eine Amplitudenreduktion die Zellmembran intakt sein muss. Die nach der Aktivierung von  $I_h$  umgehend (instantan) auftretende Stromkomponente ( $I_{inst}$ ), weist eine weniger starke Amplitudenreduktion auf als die langsame ( $I_{slow}$ ), welche sich der schnellen Stromantwort anschließt und es besteht eine starke Korrelation zwischen  $I_{inst}$  und  $I_{slow}$ . Die Expression von HCN1-Kanälen scheint nicht nur zeitabhängig offene Kanäle zu generieren, sondern auch ständig offene. Eine Kanalöffnung ist nach stattgehabter Voraktivierung erst wieder bei stärker negativen Potentialen möglich. Die Amplitudenminderung von rHCN1 vermitteltem  $I_h$  ist wahrscheinlich durch eine Lageveränderung des Spannungssensors bedingt, da die Amplitudenreduktion primär  $I_{slow}$  betraf und sich das *Gating* nach Voraktivierung(en) zu stärker negativen Potentialen verschob. Dass eine Amplitudenreduktion nur in dem *cell-*

*attached*-Modus und nicht im *whole-cell*-Modus eintrat, weist darauf hin, dass intrazelluläre Komponenten die Regulierung von  $I_h$  mitbeeinflussen, die beim Eröffnen der Zellmembran in die Pipette ausgespült werden.

HCN-Kanäle regulieren neuronale Erregbarkeit und Aktivität und sind an übergeordneten Leistungen wie Lernen und Gedächtnis ebenso beteiligt wie an komplexen Krankheitsbildern wie der Epilepsie und Neuralgie. Das HEK293 Zellexpressionssysteme kann helfen, grundlegende Funktionen von HCN1 zu verstehen. Weiterführende *voltage-clamp*-Messungen in akut-animalischen Hirnschnitten können zudem zeigen, ob die in dieser Arbeit erhobenen Daten auch in übergeordneten Zellsystemen nachvollziehbar sind.

## 1.2 English

HCN channels (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels*) activate at hyperpolarizing voltages, and as a result of the mixed cation current ( $I_h$ ) that flows through the pores of the channel, influence the synaptic and dendritic excitability, the generation of action potentials, as well as the stabilization of the resting membrane potential. Preliminary investigations showed that HCN1 channels activate more readily after being preactivated and that hyperpolarization in intact mammalian cells (HEK293) led to a reduction of the maximum  $I_h$  in *cell-attached-mode* (when the cell membrane is intact). This reduction was not present in *whole-cell-mode* (after rupturing the cell membrane), and a cAMP-related *rundown* (a reduction of  $I_h$  by washing out the intracellular cAMP) could not be demonstrated.

These observations formed the starting point of this dissertation. The question arose as to what the causes of the reduction of the HCN1-induced  $I_h$  were. In this work, the biophysical properties of  $I_h$  after preactivation, the influence of intracellular and extracellular ion distribution on current reduction as well as the possible influence of the degradation of intracellular cAMPs on the reduction of  $I_h$  were all examined. Rat HCN1 (rHCN1) was transfected into HEK293 and electrophysiological *patch-clamp*-techniques were performed.

The results indicate that repeated channel activity leads to a reduction in  $I_h$  and the act of repetition is more important than the strength of the preactivation. A prolongation of the preactivation alone did not lead to a reduction of the  $I_h$ . It was confirmed that the cell membrane must be intact for a reduction in amplitude. The fast current component occurring immediately (instantly) after activation of  $I_h$  ( $I_{inst}$ ) exhibited a weaker amplitude reduction than the slow ( $I_{slow}$ ) which follows the fast current response, and there is a strong correlation between  $I_{inst}$  and  $I_{slow}$ . It appears that the expression of HCN1 channels not only generates time-dependent activated channels, but also permanently-activated channels. Channel activation after preactivation is only possible again after more negative potentials. The amplitude reduction of  $I_h$  is probably the result of a change in the position of the voltage sensor, since the amplitude reduction primarily affected  $I_{slow}$  and the *gating* shifted to stronger negative potentials after preactivation(s). That an amplitude reduction occurred only in the *cell-attached-mode* and not in the *whole-cell-mode* indicates that intracellular components also affect the regulation of  $I_h$  that are washed out when the cell membrane was ruptured.

HCN channels regulate neuronal excitability and activity and are involved in higher-level services such as learning and memory, as well as in complex diseases such as epilepsy and

---

neuralgia. The HEK293 cell expression system can help to understand fundamental functions of HCN1. Further *voltage-clamp*-measurements in acute animal brain slices could reveal whether the data collected in this dissertation could be reproduced in higher-level cell-systems.

## 2 Einleitung

HCN-Kanäle gehören zu der Familie der spannungsabhängigen Ionenkanäle und werden im Gegensatz zu den meisten anderen Ionenkanälen durch Hyperpolarisation aktiviert. Dadurch, dass die Kanäle bei Spannungen aktiviert werden, die in der Nähe des Ruhemembranpotentials liegen, wird durch sie die Zellmembran depolarisiert und der Membranwiderstand vermindert. Mittels des durch die HCN-Kanäle fließenden, unselektiven Kationenstroms ( $I_h$ ) wird die neuronale Erregbarkeit sowie die Aktionspotentialgenese moduliert (Velumian et al. 1997). Das Ruhemembranpotential im zentralen Nervensystem (ZNS) wird durch  $I_h$  ebenfalls entscheidend mit determiniert. Somit hat  $I_h$  Einfluss auf die Funktion übergeordneter Netzwerke und nimmt z.B. Anteil an Gedächtnisbildung und an motorischem Lernen. Nicht nur die Stärke des Stroms ist entscheidend für das Verhalten des  $I_h$  im zellulären Kontext, sondern ebenso die Aktivierungskinetik der HCN-Kanäle. HCN1 aktiviert von den vier bekannten HCN-Untereinheiten (HCN1 – 4) am schnellsten (Chen et al. 2001) und weist im Hippocampus, dem Neokortex sowie im Kleinhirn eine hohe Expressionsdichte auf (Moosmang et al. 2001; Santoro et al. 2000; Biel et al. 2009). Die Öffnung von HCN-Kanälen wird durch die Bindung von cyclischen Nukleotiden wie cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat) oder cGMP (zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat) an die C-terminale Region der intrazellulären Bindungsdomäne (CNBD; *cyclic nucleotide-binding domain*), vor allem in HCN2 und HCN4-Kanälen, ermöglicht (DiFrancesco & Tortora 1991). Der halbmaximale  $I_h$  von HCN2 und HCN4 wird in Gegenwart von cAMP bei ca. 10 bis 20 mV positiveren Membranpotentialen erreicht, wohingegen cAMP auf die Kanalöffnungskinetik und die Strom-Spannungs-Kurve von HCN1 und HCN3 nur wenig Wirkung hat (eine Verschiebung um ca. 2 – 5 mV für HCN1) (Santoro et al. 1998; Baruscotti et al. 2005; Wahl-Schott & Biel 2009; Chen et al. 2001). Hierbei hat die direkte Bindung von cAMP an die intrazelluläre CNBD-Region einen größeren unterstützenden Effekt als eine Protein-Phosphorylierung (Biel et al. 2009). Männikkö et al. (2005) konnten zeigen, dass sich in intakten Frosch-Oozyten die Öffnungswahrscheinlichkeit von HCN1 der Maus in aktiviertem Zustand zu stärker positiven Potentialen verschiebt (Zwei-Elektroden-Spannungsklemme).

Im Vorfeld dieser Dissertation konnten wir zeigen, dass eine starke Hyperpolarisation in intakten Säugetierzellen (HEK293) eine Reduktion des maximalen  $I_h$  bewirkte (rat (r)HCN1) (Battefeld et al. 2010). Dieses Phänomen war abhängig von einem intakten Zytosol (*cell-attached-Modus*). Nach Austausch des Zytosols (*whole-cell-Modus*) war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar.

Während der Etablierung des *whole-cell*-Modus wird die Zellmembran aufgerissen. Intrazelluläre Bestandteile können hierdurch aus dem Zytosol in die Pipettenlösung ausgewaschen werden. Werden Komponenten ausgewaschen, die für die Regulierung von  $I_h$  notwendig sind, kann es zu einer Amplitudenreduktion von  $I_h$  kommen. Es liegt in diesem Fall ein sogenannter *rundown* vor. Einen solchen *rundown* hatten wir initial in unseren Versuchen (Battefeld et al. 2010) zu Beginn der Messungen erwartet. Allerdings war eine Zunahme der Stromamplitude nach Etablierung des *whole-cell*-Modus eingetreten. Wir benannten diese Beobachtung somit „*run up*“. Mannikö et al. hatten 2005 beschrieben, dass eine Voraktivierung von HCN1 zu einer Amplitudenzunahme des HCN1 vermitteltem  $I_h$  führt. Wir konnten jedoch eine Reduktion des  $I_h$  nach stattgehabter Voraktivierung nachvollziehen (Battefeld et al. 2010). Diese zwei unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich des biophysikalischen Verhaltens von HCN1 vermitteltem  $I_h$  nach erfolgter Voraktivierung war Ausgangslage dieser Dissertation.

Aufgrund der Bedeutung von HCN1 für neuronale Funktionen wie z. B. für motorisches Lernen und für Gedächtnisbildung sollte in dieser Arbeit eine genauere Untersuchung der biophysikalischen Eigenschaften dieser  $I_h$ -Reduktion erfolgen.

Aufgrund der oben genannten Voruntersuchungen ergaben sich folgende Hypothesen:

1. Die  $I_h$ -Amplitude wird durch multiple, stärkere Voraktivierung kleiner.
2. Eine lange Voraktivierung hat Einfluss auf die Amplitudenabnahme von  $I_h$
3. Die Zugabe von 8br-cAMP in die Badlösung, welches im Gegensatz zu dem in den Vorarbeiten verwendeten cAMP transmembrangängig und nicht abbaubar ist, kann eine Amplitudenminderung abschwächen oder aufhalten.
4. Die  $I_h$ -Reduktion ist an hohe extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Level gekoppelt.
5. Die schnelle, instantane Stromkomponente von  $I_h$  ( $I_{\text{inst}}$ ) hat an der Amplitudenreduktion der langsamen Stromkomponente von  $I_h$  ( $I_{\text{slow}}$ ) wenig Einfluss.

## 2.1 HCN-Kanäle

Der durch Hyperpolarisation aktivierbare und durch zyklische Nukleotide modulierte, unselektive Kationenkanal HCN gehört zu der Familie der spannungssensitiven Ionenkanäle. Die Öffnung der HCN-Kanäle erfolgt durch eine Verminderung der Zellmembranspannung unter  $-55$  mV (Biel et al. 2009). HCN-Kanäle besitzen eine größere Leitfähigkeit für  $K^+$  als für  $Na^+$  (Verhältnis 4:1) sowie in geringem Maß für  $Ca^{++}$  (Wahl-Schott & Biel 2009). Das Umkehrpotential wird mit Werten zwischen  $-16$  mV (Kole et al. 2006),  $-20$  mV (DiFrancesco 1993) sowie  $-45$  mV (Battfeld et al. 2010) angegeben. Mit diesen Eigenschaften unterscheidet sich der HCN-Kanal biophysikalisch von anderen spannungsabhängigen Ionenkanälen und bildet eine eigene Untergruppe in der Superfamilie der *pore-loop* Kationenkanäle (Yu et al. 2005). Erstmals wurde der Kanal im Sinusknoten beschrieben. Dort ist er mit anderen Ionenkanälen an der Rhythmogenese beteiligt. Aufgrund der besonderen biophysikalischen Eigenschaften wurde der durch HCN-Kanäle fließende Strom des Sinusknotens  $I_f$  („*funny*“) genannt (Noma & Irisawa 1976). Inzwischen konnten HCN-Kanäle vornehmlich im Zentralen Nervensystem HCN (1-4) und im Herzen HCN (1-4) (Moosmang et al. 2001; Santoro et al. 2000) nachgewiesen werden, aber auch in anderen Geweben wie Leber, Lunge und Niere (HCN3 der Maus) sowie HCN4 in Lunge, Skelettmuskel und Testis des Menschen (Postea & Biel 2011). Die durch sie fließenden Kationenströme wurden lokalisationsunabhängig auch als  $I_q$  („*queer*“) (Halliwell & Adams 1982) bezeichnet. Als Nomenklatur wird in dieser Arbeit der aktuell in neurowissenschaftlichen Disziplinen gebräuchliche Begriff „ $I_h$ “ verwendet (Yanagihara & Irisawa 1980).

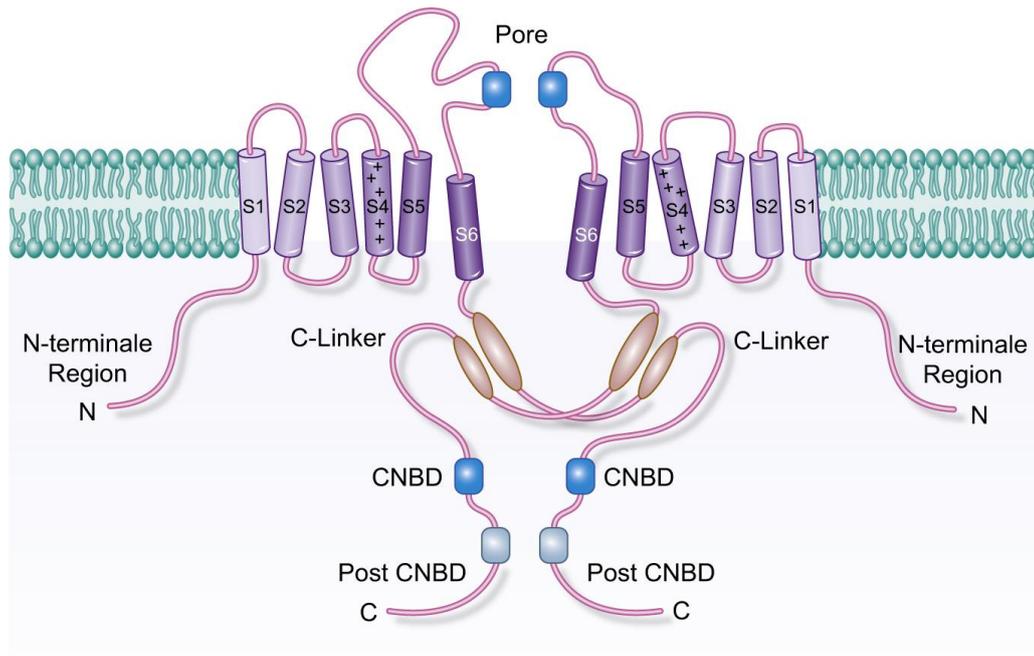
Alle HCN-Isoformen existieren im Zentralen Nervensystem (Santoro et al. 2000). HCN1 ist primär im cerebellären Kortex, Hirnstamm, Hippocampus sowie im Neokortex, Colliculus superior und in Zellen der Medulla spinalis exprimiert (Moosmang et al. 2001; Santoro et al. 2000; Biel et al. 2009). HCN2 tritt im Zentralen Nervensystem ubiquitär auf, wobei in den Kernen des Truncus cerebri und im Thalamus die größte Dichte vorliegt (Moosmang et al. 1999; Santoro et al. 2000; Notomi & Shigemoto 2004; Wahl-Schott & Biel 2009). HCN3 konnte bisher nur im Bulbus olfaktorius und in den Nuclei thalami nachgewiesen werden (Moosmang et al. 1999; Notomi & Shigemoto 2004). HCN4 ist ebenfalls im ZNS ubiquitär vertreten und in den Nuclei thalami und im Bulbus olfaktorius am stärksten exprimiert (Moosmang et al. 1999; Santoro et al. 2000; Notomi & Shigemoto 2004; Wahl-Schott & Biel 2009).

Dadurch, dass HCN1-Kanäle vor allem in distalen Dendriten (primär in hippocampalen und neokortikalen Pyramidenzellen) exprimiert sind, wird die dendritische Exzitabilität direkt beeinflusst (Lorincz et al. 2002; He et al. 2014). Durch die Expression in Soma und Axonen

nehmen HCN-Kanäle, beispielsweise in Interneuronen des Hippocampus und Cerebellums, Anteil an der Modulation der Neurotransmitterfreisetzung (Bender & Baram 2008; He et al. 2014).

## 2.2 Molekularbiologische Grundlagen der HCN-Kanäle

Für Säugetiere konnten bisher vier homologe Kanal-Untereinheiten beschrieben werden (HCN1-4). HCN-Klonierungen wurden bisher von Wirbeltieren und wirbellosen Tieren durchgeführt. Für Prokaryonten hingegen fehlt bisher ein HCN-Nachweis (Biel et al. 2009). HCN-Kanäle besitzen, wie auch andere *pore-loop*-Kationenkanäle (s.u.), vier die Zellmembran durchspannende Untereinheiten (Biel et al. 2009). Jedes Monomer wird aus sechs Segmenten S1-S6 ( $\alpha$ -Helices) gebildet. Das ebenfalls für *pore-loop*-Kanäle typische, positiv geladene S4 dient als Spannungssensor (Yu & Catterall 2004). Wirkt eine hyperpolarisierende Spannung auf den HCN-Kanal, nimmt S4 eine weiter intrazellulär liegende Position ein, bei depolarisierenden Spannungen eine weiter extrazelluläre (Sigworth 1994; Long et al. 2005). Diese Lokalisationsänderungen werden wahrscheinlich mittels Zug- und Rotationsbewegungen verursacht (Chen et al. 2001; Long et al. 2005) und ermöglichen ein Schließen des Kanals bei Depolarisation und eine Öffnung bei Hyperpolarisation (Männikkö et al. 2002). Die ionenleitende glykolysierte Pore beinhaltet den Selektionsfilter, der die für *pore-loop* Kanäle typische Sequenz Glycin-Tyrosin-Glycin (GYC-motif) besitzt und zwischen S5 und S6 liegt (Doyle et al. 1998). Weiterhin zeigt jeder HCN-Kanal einen S1 vorgeschalteten NH<sub>2</sub>-Terminus sowie einen S6 nachgeschalteten COOH-Terminus. Zwischen S6 und COOH-Terminus verbindet intrazellulär ein C-Linker mit sechs  $\alpha$ -Helices A'-F' die aus ca. 120 Aminosäuren bestehende Bindungsstelle für zyklische Nukleotide (CNBD) mit S6. Während der COOH-Terminus zwischen allen HCN-Isoformen (HCN1-4) strukturell eine große Ähnlichkeit besitzt (ca. 80% - 90 % sind identisch), variiert der NH<sub>2</sub>-Terminus zwischen den Isoformen stark (Biel et al. 2009).



**Abb. 1|** Struktur von HCN-Kanälen. Ein HCN-Kanal ist ein Tetramer. Hier sind schematisch zwei Monomere dargestellt. Jedes Monomer besteht aus sechs transmembranären Segmenten. S4 beinhaltet den Spannungssensor. Zwischen S5 und S6 liegt die Pore. Das C-terminale Ende, das an S6 anschließt, beinhaltet den C-Linker sowie die CNBD-Region.

### 2.3 HCN-Kanalsteuerung und beeinflussende Modulatoren

Anders als bei CNG-Ionen-Kanälen (*cyclic nucleotide-gated*), die sich ohne den *second-messenger* cAMP nicht öffnen, unterstützen cAMP und cGMP die Öffnung des HCN-Kanals, sie sind jedoch nicht obligatorisch. Die Strom-Spannungskurve verschiebt sich beim Vorliegen von cAMP zu positiveren Potentialen (DiFrancesco & Tortora 1991). Liegt cAMP vor, wird der halbmaximale  $I_h$  von HCN2 und HCN4 bei zu 10 – 20 mV positiveren Potentialen erreicht. Einfluss auf die Kinetik der Kanalöffnung oder die Strom-Spannungskurve von HCN1 und HCN3 hat cAMP mit beispielsweise ca. 2 – 5 mV (für HCN1) nur kaum (Santoro et al. 1998; Baruscotti et al. 2005; Wahl-Schott & Biel 2009; Chen et al. 2001). Die direkte Bindung von cAMP an die intrazelluläre CNBD-Region hat hierbei einen größeren unterstützenden Effekt als eine Protein-Phosphorylierung (Biel et al. 2009). Die C-Linker-CNBD Region wirkt auf die Kanalöffnung inhibitorisch (Craven & Zagotta 2006). Dieser autoinhibitorische Effekt wird durch die Bindung von cAMP herabgesetzt (Wainger et al. 2001; Wang et al. 2001).

Der Öffnungsstatus von HCN-Kanälen wird vermutlich allosterisch vermittelt. Grundlage ist eine Konformationsänderung der CNBD-Domäne, die die cAMP-Sensitivität der Kanäle im geöffneten Zustand steigert (Zhou & Siegelbaum 2007). Männikkö et al. (2005) zeigten, dass der

Stromfluss durch aktivierte mHCN1-Kanäle (mouse HCN1, exprimiert in intakten Frosch-Oozyten) reguliert wird. Dies geschieht durch eine depolarisierende Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Kanäle. Die Versuche erfolgten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Weiterhin unterscheiden sich die Aktivierungskinetiken der HCN-Kanäle. Während HCN1 am schnellsten aktiviert, zeigen HCN2-Kanäle langsamere Kinetiken, sind jedoch schneller als HCN4 (Chen et al. 2001). HCN3 zeigt die langsamsten Aktivierungskinetiken (Ishii et al. 1999) (s.u.).

Ein cerebraler HCN-Kanalmodulator ist auch das an die intrazelluläre Kanalseite bindende TRIP8b (auch bekannt als PEX5R und PEX5Rp (Whalley 2009)), welches in mehreren Splicevarianten vorliegt. Liegt TRIP8b vor, inhibiert es die Kanalöffnung und den intrazellulären Transport (*trafficking*) von HCN und beeinflusst somit dessen Expression in der Membran. Einige Splicevarianten unterstützen eine Kanalexprimierung in der Zellmembran, wohingegen andere diese hemmen (Santoro et al. 2011).

Filamin A ist ein an dem HCN1-Kanal spezifisch wirkendes Protein, welches in HEK293 Zellen die Kanalinternalisierung Dynamin-abhängig unterstützt und so die  $I_h$  Amplitude vermindert. Mit der Internalisierung geht eine Neuverteilung der HCN1-Kanäle auf der Zellmembran einher (Noam et al. 2014).

Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 (auch als Nedd4L bekannt) ist an der Regulation von HCN1-Kanälen sowohl in *vivo* (Neocortex, Cerebellum und Hippocampus) als auch in *vitro* (HEK293 Zellen) beteiligt, indem es an eine spezifische PY-motif-Region (L/PPxY) im C-Terminus des Kanals bindet. Eine Koexpression von Nedd4-2 und HCN1 führte zu einer um 85 - 92% kleineren  $I_h$  Amplitude (in *Xenopus laevis* Oozyten) sowie zu einer reduzierten Expression von HCN1 auf der Zelloberfläche von in HEK293 Zellen (Reduktion um 34%) (Wilkars et al. 2014).

Weitere Modulatoren sind  $PIP_2$  (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), die bei HCN2-Kanälen eine Verschiebung der Strom-Spannungs-Kurve zu ca. 15 mV positiveren Potentialen bewirken (Pian et al. 2006), die aktive Proteinkinase 38 (p38), welche die Strom-Spannungs-Kurve ebenfalls zu positiveren Werten verschiebt (Poolos et al. 2006) und die Proteinkinase C (PKC), die in aktiviertem Zustand eine  $I_h$  Amplitudenverminderung bewirkt (Reetz & Strauss 2013). Aber auch eine Änderung des pH-Wertes hat Einfluss auf den  $I_h$ . Die Strom-Spannungs-Kurve verschiebt sich um bis zu 20 mV zu positiveren Potentialen bei einem pH-Wert von 9 im Vergleich zu einem pH-Wert von 6 (Wahl-Schott & Biel 2009). Eine aktuelle und umfassende Übersichtsarbeit zu HCN-Kanal Mediatoren wurde von He et al. (2014) veröffentlicht.

## 2.4 HCN-Kanäle im zentralen Nervensystem und die biophysikalischen Eigenschaften von $I_h$

In dieser Arbeit wurde die primär im ZNS exprimierte Isoform HCN1 untersucht. Im Folgenden liegt der Schwerpunkt auf den physiologischen Funktionen der HCN-Kanäle im ZNS. Über die Funktionen, die die unterschiedlichen HCN-Isoformen im kardiovaskulären System übernehmen, weise ich auf Übersichtsarbeiten von Wahl-Schott et al. (2014) und Scicchitano et al. (2012) hin. Allgemein sind biophysikalische Eigenschaften von Ionenkanälen von Umgebungsparametern abhängig (z.B. Temperatur, pH-Wert, Zelltyp und Konzentration von *second-messengern*) (Magee 1998). Somit ist es nachvollziehbar, dass in unterschiedlichen Arbeiten HCN-Charakteristika wie Spannungsabhängigkeit und Aktivierungskonstanten voneinander abweichen (Santoro et al. 2000; Wahl-Schott & Biel 2009; Battfeld et al. 2010).

Jede der vier HCN-Isoformen zeigt unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften. Die Spannung der halbmaximalen Aktivierbarkeit ( $V_{1/2}$ ) liegt für HCN1 bei ca.  $-70$  mV, für HCN2 bei ca.  $-95$  mV, für HCN3 bei ca.  $-85$  mV und für HCN4 bei ca.  $-100$  mV (Altomare et al. 2003; Stieber et al. 2005; Baruscotti et al. 2005; Wahl-Schott & Biel 2009).  $V_{1/2}$  lässt sich mit der Boltzmann-Funktion aus der für  $I_h$  typischen sigmoidalen Aktivierungskurve berechnen.

Auch die Aktivierungszeitkonstanten der HCN-Isoformen unterscheiden sich. Der in dieser Arbeit untersuchte HCN1-Kanal aktiviert von allen Isoformen am schnellsten. In der Literatur liegen unterschiedliche Angaben zu den Aktivierungszeitkonstanten für in HEK293 exprimierten HCN1 vor (z.B.: 67 ms bei  $-100$  mV (Stieber et al. 2005); 223 ms bei  $-105$  mV (Altomare et al. 2003)).

In neokortikalen Neuronen hat der  $I_h$  zum Beispiel an der Ruhemembranleitfähigkeit einen Anteil von ca. 50 % (Strauss et al. 2004). HCN-Kanäle können also den somatischen Effekt exzitatorischer und inhibitorischer Stimuli dämpfen. Eine Beteiligung liegt auch an Prozessen wie dendritischer Integration, synaptischer Transmission und oszillatorischer Aktivität in einzelnen Neuronen und übergeordneten Netzwerken vor. Die Deletion von HCN1 in Zellen des Ganglion stellatum verursachte starke Schwankungen des RMPs (Ruhemembranpotential) bei Frequenzen  $< 40$  Hz (Nolan et al. 2003; Nolan et al. 2007; He et al. 2014).

Die Amplitude von  $I_h$  ist abhängig von den intra- und extrazellulären Kationenkonzentrationen, vor allem von der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration (Ludwig et al. 1998; Biel et al. 2009). So führt vermehrtes extrazelluläres  $K^+$  zu einer größeren  $I_h$ -Amplitude (Biel et al. 2009). Auch die extrazellulären und intrazellulären  $Cl^-$ -Konzentrationen haben Einfluss auf die Kanalleitfähigkeit (Mistrík et al. 2006).  $Cl^-$  hat auf HCN2 und HCN4 vermittelten  $I_h$  deutlich stärkeren Einfluss als

auf HCN1 vermittelten  $I_h$ . Fehlt extrazelluläres  $Cl^-$ , ist die Stromamplitude von HCN2 und HCN4 vermittelten  $I_h$  um bis zu 90%, die von HCN1 generiertem  $I_h$  um 50% kleiner. Ursächlich hierfür scheinen unterschiedliche Arginin-Strukturen in der *Pore*-Region zu sein (Wahl-Schott et al. 2005).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte und Software

#### 3.1.1 Geräte

- Computer: IBM-kompatible Geräte, Betriebssystem Windows XP
- Bad- und Pipettenelektrode (Ag/AgCl Elektroden (EP05, EP1 und EP4, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA)
- Filter (Fluoreszenz) für dsRED: BP 546, FT 580, LP 590 (Carl-Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Fluoreszenzlampe (HBO 100, Carl-Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Gleichspannungsregler (Statron, 32 V / 3.2 A, Statron-Gerätetechnik GmbH, Fürstenwalde; Deutschland)
- Laborwaage (BP221S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Mikroskop, invers (Axiovert S100, Carl-Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Osmometer (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland)
- Oszilloskop (Gould20 MHz Digital Storage Type, 1425, GOULD Electronics GmbH, Eichstetten, Deutschland)
- Pipettenziehgerät (Model p-97, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA)
- Pumpe (KNF LABOPORT® N 86, KNF Neuberger AG, Balterswil, Schweiz)
- Schwingungsgedämpfter Tisch (Newport Vision IsoSTATION, Irvine, CA, USA)
- Sterilwerkbank (Air Clean Systems Inc., Raleigh, NC, USA)
- Mikromanipulator (SM-6, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland)
- Verstärker (EPC 10 USB, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland)
- Wasserbad (Inkubationsbad, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)
- Wasserdestillierer (Milli-Q- Academic Millipore, Billerica, USA)

### 3.1.2 Software

Zur Datenerfassung und Datenaufzeichnung verwendete Software:

- Patch-Master (Patch-Master software v2.23; HEKA)
- Fit-Master (Fit-Master software v.7.3-7.5; HEKA)
- Origin® 7.0, 7.5 und 8.5 (OriginLab Corp, Northampton, MA, USA)  
Software zur graphischen Darstellung von Ergebnissen und zur Erstellung weiterer Graphiken

Zur schriftlichen Bearbeitung der Arbeit:

- Corel Draw 10 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada)
- Microsoft® OfficeWord 2003-2011 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)

## 3.2 Lösungen und Blocksubstanzen

Alle Chemikalien sind in dem Labor, in dem ich die Messungen durchführte, von den Firmen Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland) und Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

### 3.2.1 Extrazelluläre Lösung

Für die  $I_h$ -Ableitungen in HEK293 Zellen habe ich eine extrazelluläre Lösung mit folgender Zusammensetzung verwendet:

NaCl (120 mM), KCl (10 mM), CaCl<sub>2</sub> (1,8 mM), MgCl<sub>2</sub> (0,5 mM), HEPES (10 mM), Glucose (10 mM), TEA (10 mM), 4-AP (2.5 mM).

Den pH-Wert von 7,4 habe ich mittels Säure-Base-Titration (NaOH und HCl) eingestellt. Für das Ansetzen der Lösung habe ich zweifach destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Toleriert habe ich eine Osmolarität zwischen 290 und 310 mOsm. Nach spätestens 7 Tagen setzte ich eine neue Lösung an. Die Lösung lagerte ich zwischen den Messungen bei +4° C. Vor Durchführung der Messungen wärmte ich die Lösung im Wasserbad auf 34° C auf.

### 3.2.2 Intrazelluläre Lösung

Für die Füllung der *Patch*-Pipetten habe ich abhängig von der Messkonfiguration verschiedene Lösungen verwendet. Für *whole-cell*-Versuche eine KMeSO<sub>4</sub> (Kaliummethylsulfat) basierte, für *cell-attached*-Versuche sowohl eine KMeSO<sub>4</sub> basierte als auch eine K<sup>+</sup>-Gluconat basierte Lösung.

KMeSO<sub>4</sub> basierte Lösung:

KMeSO <sub>4</sub>	KCl	Na- Posphokreatinin	NaCl	EGTA	HEPES	Mg <sup>2+</sup> - ATP	Tris-GTP
120 mM	10 mM	14 mM	4 mM	0,5 mM	10 mM	4 mM	0,3 mM

K<sup>+</sup>-Gluconat basierte Lösung:

K <sup>+</sup> - Gluconat	KCl	Na- Posphokreatinin	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	EGTA	HEPES	Mg <sup>2+</sup> - ATP	GTP
120 mM	10 mM	10 mM	1 mM	1 mM	11 mM	10 mM	2 mM	0,3 mM

K<sup>+</sup>-Gluconat kann zu einem Block von  $I_h$  und K<sup>+</sup> Kanälen und einem höheren Eingangswiderstand führen (Velumian et al. 1997). Aus diesem Grund habe ich für *whole-cell*-Messungen die KMeSO<sub>4</sub> basierte Lösung verwendet. Im *cell-attached*-Modus sind hingegen nur so wenige Kanäle aktiviert, dass sich in dieser Konfiguration der hemmende Effekt theoretisch nicht bemerkbar macht. Zudem ist in dieser Messkonfiguration K<sup>+</sup>-Gluconat extrazellulär. Auch haben im *cell-attached*-Modus schon geringe Leckströme einen deutlich größeren Einfluss auf die Qualität der Ableitungen als im *whole-cell*-Modus. Die Pipettenlösungen entsprachen derer, die auch in den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe verwendet wurden (Battfeld et al. 2010; Reetz & Strauss 2013), wodurch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse möglich ist. Für einige Versuche im *cell-attached*-Modus habe ich mit KMeSO<sub>4</sub> eine intrazelluläre Lösung verwendet. Hierdurch bestand die Möglichkeit nach erfolgter Ableitung in den *whole-cell*-Modus zu wechseln.

Ebenso unterstützen CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> die Bildung des *gigaseals* (Priel et al. 2007). Die Verwendung der unterschiedlichen Lösungen im *cell-attached*-Modus hatte jedoch keinen Einfluss auf die Messergebnisse. Den pH-Wert stellte ich mittels KOH auf 7,2 ein. Die Osmolarität betrug zwischen 280 und 300 mOsm. Nach Ansetzen der Lösung filterte ich diese mittels 0,2 µm Nylonfilter (Nalgene®, Nalge Nunc International Corporation, New York, USA). Durch die Aliquotierung auf 1 ml Mikroreaktionsgefäße habe ich gewährleistet, dass ich die Lösung nur einmal, direkt vor den Messungen, auftauen musste. Durch die Lagerung der Aliquots bei -20 °C ermöglichte ich die Aufrechterhaltung der ATP- und GTP-Aktivität (Poolos & Jones 2004). Während der Durchführung der Versuche legte ich die intrazelluläre Lösung auf Eis.

### 3.2.3 Blocksubstanzen

4-Aminopyridin (4-AP) ist ein nichtselektiver, reversibler Blocker spannungsaktivierter  $K^+$ -Kanäle (Kv1, *Shaker*) (Russell et al. 1994; Rasmusson et al. 1995). In dieser Arbeit gab ich 4-AP (2.5 mM) der extrazellulären HEK293 Lösung zu, um die Aktivität von HEK293 intrinsischen  $K^+$ -Kanälen (Snyders & Chaudhary 1996) während der Messungen zu unterbinden.

Tetraethylammoniumchlorid (TEA) ist ebenfalls ein Blocker spannungsaktivierter  $K^+$ -Kanäle, der auch durch  $Ca^{++}$  aktivierbare  $K^+$ -Kanäle blockt und somit das Spektrum von 4-AP ergänzt (Grissmer et al. 1993). Diesen gab ich der Lösung in einer Konzentration von 10 mM zu.

### 3.3 Patch-clamp Technik

Die *patch-clamp* Technik ist seit ihren Anfängen (Neher & Sakmann 1976) inzwischen zentrale Methode vieler elektrophysiologischer Studien. Für die Beschreibungen der Technik sei auf folgende Artikel verwiesen: Neher et al. 1978, Sakmann & Neher 1984 und Cahalan & Neher 1992.

Für die Messungen habe ich Deckgläser (1,2 mm Ø) mit rHCN1 transfizierten HEK293 Zellen in die Messkammer gelegt und stetig mit Extrazellulärlösung bei Raumtemperatur umspült. Die Lösung habe ich per Saugheberprinzip in die Messkammer durch Tygon® – R3603 Schläuche geführt und von dort mittels einer Pumpe in ein Kolbengefäß abgeleitet. Den Zufluss regulierte ich durch einen Dreiwegehahn mit nachgeschaltetem Rad (klinikübliches Infusionssystem). Die Messpipetten zog ich unmittelbar vor Gebrauch mit einem Pipettenziehgerät und Protokollen, die sich nach Art des Filaments und des Glastyps der Kapillaren richteten. Die Pipetten hatten Widerstände zwischen 1,7 und 4,9 MΩ. Jede Pipette verwendete ich für einen Patchversuch. Nachdem ich die Pipetten mit der jeweiligen Intrazellulärlösung gefüllt hatte, spannte ich diese in den Mikromanipulator ein, wobei ich auf einen niedrigen Flüssigkeitsspiegel in der Pipette und vor allem in der Messkammer achtete, da höhere Spiegel eine stärkere und längere Umladung erfordern, wodurch transiente, kapazitive Ströme größer werden. Ein in die Pipette applizierter leichter Überdruck führte zu einer ständigen, geringen Ausströmung intrazellulärer Flüssigkeit aus der Pipettenspitze. Die Ausströmung der Pipettenflüssigkeit vermindert die Gefahr, dass an der Pipettenspitze Verunreinigungen haften bleiben, wenn diese durch die Oberfläche der Messkammerflüssigkeit getaucht wird. Im Anschluss habe ich elektrische Potentiale, die durch das Eintauchen der Pipette in die Messkammerlösung entstehen, ausgeglichen. Diese *offset*-Potentiale entstehen beispielsweise durch unterschiedliche elektrische

Ladungen zwischen Pipettenspitze mit der Messkammerlösung oder durch pH-Wert-Differenzen zwischen Pipetten- und Messkammerlösung. Am meisten tragen zu den *offset*-Potentialen *liquid-junction*-Potentiale bei, die zwischen Pipetten- und Extrazellulärlösung sowie zwischen Extrazellulärlösung und Badelektrode entstehen können (Barry & Lynch 1991). Nach Erreichen des *whole-cell*-Modus bleibt dieses *offset* bestehen. Messwerte, die im *whole-cell*-Modus erhoben werden, müssen mit dem *liquid-junction*-Potential verrechnet werden. Zur Kontrolle habe ich die *offset*-Potentiale ein zweites Mal kurz vor Bildung des *gigaseals* (s.u.) korrigiert. Das Heranführen der Pipettenspitze an die Zelle ergab eine Delle in der Zellmembran (*dimpling*). Das plötzliche Ablassen des Überdrucks in der Pipette führte dazu, dass sich die Zellmembran an die Pipettenspitze legte, wodurch im Optimalfall ein sehr dichter, hochohmiger Kontakt ( $G\Omega$ ) zwischen Zelloberfläche und Pipette erreicht wurde, der *gigaseal*. Gelegentlich musste ich einen leichten Unterdruck in die Pipette applizieren, um die Bildung des *gigaseals* zu unterstützen. Nach wenigen Sekunden sollte somit ein stabiler Pipetten-Zell-Kontakt erreicht sein. In dem Fall, dass ein Unterdruck in der Pipette zur Bildung des *gigaseals* erforderlich ist, sollte dieser nach Etablierung des *gigaseals* umgehend abgelassen werden, wenn sich die Widerstände konstant zeigen, da sonst die Gefahr besteht, dass im weiteren Versuchsdurchgang die Zellmembran aufreißt. Ist der *gigaseal* etabliert, befindet sich die Messanordnung im *cell-attached*-Modus. In diesem Modus wird nur die extrazelluläre Spannung, die direkt unter der Pipette liegt (*Patch*), festgelegt. Auch die durch den Verstärker angelegte extrazelluläre Spannung unter dem *Patch* kann Einfluss auf die Zellaktivität und das Membranpotential der gesamten Zelle haben, da der vom Verstärker generierte Stromfluss, der unter dem *Patch* in die Zelle gelangt, die Zelle auch wieder verlassen muss. Hierzu muss der Zellmembranwiderstand überwunden werden, wodurch die Membran depolarisiert wird (Perkins 2006). Dies kann wiederum Einfluss auf das Membranpotential haben, wenn auch in viel geringerem Ausmaß als in den übrigen *Patch*-Konfigurationen. Wenig Einfluss auf das Ruhemembranpotential (RMP) haben die am *Patch* angelegten Potentiale in Zellen mit einer großen Oberfläche, da hier die *Patch*-Fläche im Vergleich zur restlichen Zelloberfläche sehr klein ist. Berechnet werden kann das Membranpotential unterhalb der *Patch*-Pipette ( $V_{patch-memb}$ ) aus dem Ruhemembranpotential (RMP) und dem bekannten, voreingestellten Potential des Vorverstärkers ( $V_{com}$ ). Das Ruhepotential kann aus dem Mittelwert mehrerer Einzelaufnahmen abgeschätzt werden. Jedoch ist dies nur im *current-clamp* möglich. Da ich diese Messkonfiguration in dieser Arbeit nicht verwendet habe, habe ich ein Ruhemembranpotential von  $-40$  mV (s.u.) angenommen.

Es gilt:

$$V_{patch-memb} = V_{RMP} - V_{com}$$

Die *cell-attached*-Konfiguration ist geeignet, wenn Untersuchungen erfolgen, bei denen die Integrität des Zytoplasmas erhalten bleiben soll. Nach Etablierung eines *gigaseals* ist die Diffusion von Ionen zwischen Pipetten- und Badlösung unterbrochen, wodurch stabile Messbedingungen aufrechterhalten werden können (Hamill et al. 1981). Der Anteil des Stroms, der im *voltage-clamp*-Modus durch die Zellmembran fließt und tatsächlich von der Pipettenelektrode aufgezeichnet wird, ist maßgeblich von einem stabilen *gigaseal* abhängig. Das Verhältnis zwischen Pipettenwiderstand ( $R_{pip}$ ) und *Seal*-Widerstand ( $R_{seal}$ ) beschreibt diese Abhängigkeit:

$$R_{seal} / (R_{seal} / R_{pip})$$

Eine gute Abgleichung zwischen den elektrischen Potentialen der Badlösung und der Pipettenlösung ist notwendig um Leckströme zu minimieren. Die Potentialdifferenz sollte hier nicht mehr als 1 mV betragen (Hamill et al. 1981).

Der *cell-attached*-Modus ermöglicht es, Ströme im pA Bereich zu messen. Für *whole-cell*-Messungen habe ich nach Etablierung des *gigaseals* ein Haltepotential eingestellt, das ähnlich dem Haltepotential der abzuleitenden Zelle war. Dies ist notwendig, damit die Zelle nach dem Aufreißen nicht sofort depolarisiert und beschädigt wird. Für das RMP von HEK293 Zellen werden Werte zwischen ca. -30 mV und -50 mV angegeben (Galli et al. 1995; Chemin et al. 2000; Fliegert et al. 2007; Babai et al. 2010). Für die Versuche in dieser Arbeit habe ich ein RMP von -40 mV angenommen. Zum Erreichen des *whole-cell*-Modus habe ich einen diskreten aber forcierten Unterdruck in die Pipette appliziert. Hierdurch wurde der Membranfleck unter der Pipettenspitze aufgerissen und ein Kontakt zwischen Pipettenlumen und Intrazellulärraum hergestellt (*whole-cell*-Modus). Für die Kanalaktivität wichtige Zytoplasmabestandteile, wie zum Beispiel *second-messenger*, werden hierbei in die Pipette teilweise „ausgewaschen“. Es können somit Folgeeffekte wie die Verminderung der zu messenden Stromamplituden auftreten. Dieses als „*rundown*“ bezeichnete Phänomen tritt vor allem direkt nach Etablierung des *whole-cell*-Modus auf. In den für diese Arbeit erfolgten Messungen habe ich daher nach Aufreißen der Zellmembran zwei bis drei Minuten gewartet, um einen Austausch zwischen intrazellulärer Flüssigkeit und Pipettenlösung zu ermöglichen, sodass ein solcher *rundown* möglichst vor Beginn der Messungen bereits abgeschlossen war. Vor dem Start der Messprotokolle habe ich,

ausgehend vom Haltepotential, repetitiv einen Testpuls mit einer Spannung von  $-10$  mV für 50 ms angelegt (dreimal). Die Werte der drei Einzelmessungen habe ich gemittelt. Die Amplitude des Testpulses ist in der *whole-cell*-Konfiguration kleiner als in der *cell-attached*-Konfiguration, da in ersterer Anordnung der Widerstand der gesamten Membran kleiner ist als der Widerstand des Membranflecks in der *cell-attached*-Konfiguration.

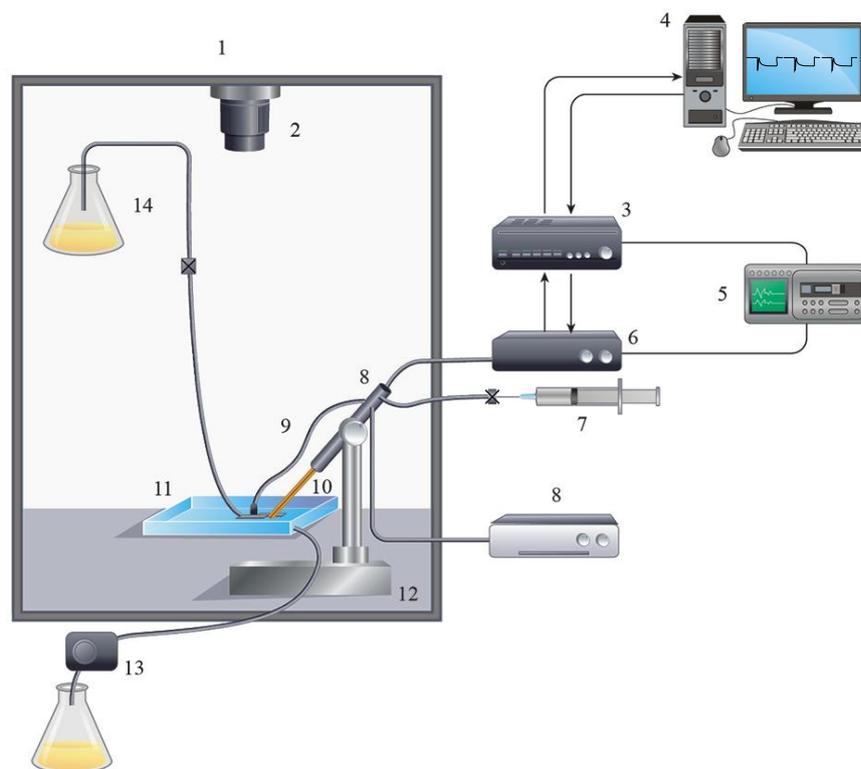
Durch den angelegten rechteckigen Testpuls war eine Stromantwort messbar, die die kapazitiven Ströme mit abbildet. Auch diese sind im *whole-cell*-Modus größer als im *cell-attached*-Modus, da die gesamte Oberfläche als Kondensator wirkt und umgeladen werden muss. Für *cell-attached*-Messungen musste ich teilweise den kapazitiven Ladestrom kompensieren (vor allem bei *Tail*-Strom-Analysen, da die Transiente sonst mit den *Tail*-Strömen interferiert hätte). Aus der kapazitiven Transiente des Testpulses können Messgrößen und Zelleigenschaften wie serieller Widerstand ( $R_s$ ) und Zellkapazität ( $C_m$ ) im *whole-cell*-Modus berechnet werden.

Im *cell-attached*-Modus können hingegen Zelleigenschaften wie Membranpotential und Zellkapazität nicht gemessen werden, da in dieser Konfiguration keine Verbindung zum Zytoplasma besteht. Es kann somit lediglich am Ende einer Messung die Zelle aufgerissen werden, um im *whole-cell*-Modus diese Zelleigenschaften zu bestimmen. Allerdings ist auch dies abhängig vom jeweiligen Versuchsdesign. Bei Messungen, die so lange erfolgten, bis kein *gigaseal* mehr vorlag, war dies nicht möglich. Normalerweise werden vor und nach den Messungen Eigenschaften wie Widerstände und Kapazität gemessen, um ggf. auftretende Veränderungen der Zellparameter zu erkennen. Dies ist folglich im *cell-attached*-Modus nur limitiert möglich. Für detaillierte Beschreibungen der Berechnung von Zellparametern sei beispielsweise auf folgende Literatur hingewiesen: Hille 2001 und Sakmann & Neher 1995.

### 3.4 Datenerfassung

In dieser Arbeit habe ich *voltage-clamp* Messungen durchgeführt. In einem geerdeten Faradayschen Käfig stand ein schwingungsfreier Tisch mit Mikroskop und Messkammer sowie die elektronisch gesteuerten Mikromanipulatoren mit Vorverstärker (Geräte siehe 3.1.1). Vor der Datenaufzeichnung habe ich auf die Wahl des „*gains*“, den Messbereich des Verstärkers, geachtet. Der Verstärker kann übersteuern, wenn Datenpunkte außerhalb seines Aufnahmebereichs liegen. Wird das *gain* verkleinert, kann diesem als „*clipping*“ bezeichneten Phänomen entgegengetreten werden. Die an der Messelektrode registrierten analogen Signale wurden über den Vorverstärker an den Hauptverstärker und von dort an den analog/digital (A/D)

Wandler weitergeleitet. Im Verstärker befand sich ein Filter, durch den Rauschüberlagerungen der analogen Signale abgeschwächt wurden. Für die vorliegende Arbeit habe ich einen Thomson-Filter (auch als Bessel-Filter bekannt) verwendet. Die Phasen werden durch den Einsatz dieses Filters nicht verändert (lineare Phase). Es kommt lediglich zu einer Impulstransformation. Hierdurch werden die Kerninformationen des analogen Signals nur minimal beeinflusst. Ein A/D Wandler tastet die analogen Werte in einer wählbaren Frequenz ab und ordnet jedem abgetasteten analogen Punkt einen diskreten Zahlenwert zu. Das Einstellen der Frequenz bestimmt, ob bei der Umwandlung Informationen verloren gehen. Liegen die Abtastpunkte zu weit auseinander, können Teile des analogen Signals „übersehen“ werden. Aus diesem Grund sollten die Abtastpunkte dichter zusammenliegen als jede zu erwartende Änderung des analogen Signals. Für diese Arbeit betrug die Abtastfrequenz mindestens 6 kHz. Die nun digitalisierten Informationen wurden vom Computer gespeichert. Zwischen Verstärker und A/D Wandler habe ich zudem parallel ein Oszilloskop geschaltet, um eine direkte fortlaufende analoge Kontrolle der Stromantworten zu gewährleisten.



**Abb. 2|** Versuchsaufbau für *voltage-clamp*-Messungen. 1. Faradayscher Käfig, 2. Lichtquelle 3. A/D Wandler, 4. Computer mit Speicher und Steuerungssoftware, 5. Oszilloskop, 6. Verstärker, 7. Luftgefüllte Spritze mit Dreiwegehahn zur Regulation des Pipettendrucks, 8. Vorverstärker und Manipulator, 9. Badelektrode, 10. Pipette mit *Patch*-Elektrode und intrazellulärer Flüssigkeit, 11. Messkammer mit hierunter liegendem inversen Mikroskop (letzteres nicht dargestellt) 12. Schwingungsfreier Tisch, 13. Absaugpumpe 14. Lösung mit reguliertem Zulauf.

## 3.5 Zellkulturtechniken

### 3.5.1 Aufbewahrung und Passagierung von HEK293 Zellen

Die HEK293 Zellen habe ich in einem Brutschrank bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in 250 ml Kulturflaschen mit einem Filtereinsatz in den Schraubverschlüssen aufbewahrt. Alle 2-3 Tage befanden sich ca. 90 % der Zellen in konfluenter Wachstumsphase und wurden dann von mir passagiert. Für molekularbiologische Versuche wird häufig eine Konfluenz von ca. 50 – 80 % abgewartet. Für elektrophysiologische Untersuchungen ist es jedoch wichtig, dass die abgeleiteten Zellen einzeln liegen, da sonst von Zelle zu Zelle unterschiedliche Parameter wie C<sub>m</sub> oder R<sub>s</sub> durch Zell-Zell-Kontakte verändert sein können. Das bedeutet jedoch auch, dass die optimale, oben genannte Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfizierung nur schwer einzuhalten ist. Bei den schnell wachsenden HEK293 Zellen kann von einer Verdopplungszeit von ~24 h ausgegangen werden (Cervera et al. 2011), wodurch die Zellen zum Zeitpunkt der Messungen zu dicht gewachsen wären. Für diese Versuche hat sich für die Ausplattierung, ausgehend von einer anschließenden Verdünnung von 1:10, eine Konfluenz von ~50 % bewährt.

Vor der Passagierung habe ich alle verwendeten Medien im Wasserbad auf 37° C vorgewärmt. Die Passagen habe ich unter einer sterilen Werkbank (3.1.1) durchgeführt. Um eine zellschonende Passage zu ermöglichen, erfolgten alle Schritte zügig und vorsichtig. Zuerst zog ich das alte Medium ab und verwarf dieses. Anschließend spülte ich die Zellen mit DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*), um abgestorbene Zellen zu lösen und mögliche Verunreinigungen aufzunehmen. Hieraufhin löste ich die Zellen mit neuem DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Serum*) mechanisch von der Flasche. Nach erfolgter Ablösung habe ich das Zell-Medium-Gemisch mehrfach mit einer 10 ml Pipette aufgenommen und wieder abgelassen. Diesen Vorgang wiederholte ich mit einer 5 ml und einer 1 ml Pipette (bis zu zwanzigmal), um eine möglichst gute Vereinzelung der Zellen zu erreichen. Im Anschluss habe ich 1 ml der Zellsuspension in ein *Falcon*-Gefäß überführt und mit frischem DMEM verdünnt (Verhältnis Zellsuspension zu Medium 1:10) und in die zuvor ausgeleerte Kulturflasche zurückgegeben. Nach 5 – 10 Passagen tauschte ich die Kulturflasche gegen eine neue aus. Die Anzahl der maximalen Passagen habe ich gering gehalten (< 30), um eine möglichst einheitliche Zellqualität zu erhalten. Mit zunehmender Anzahl der Passagen können sich Zelleigenschaften verändern, wodurch sich die Transfektionsrate verschlechtern kann.

### **3.5.2 Ausplattierung**

Die Ausplattierung von HEK293 Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen habe ich während einer normalen Passage durchgeführt. Vor der Ausplattierung zog ich das auf den Glasplättchen befindliche DPBS ab und habe darauf geachtet, dass die Deckgläser vollständig abgetrocknet waren. Anschließend vermischte ich die während einer Passage gewonnene Zellsuspension mit frischem DMEM im Verhältnis 1:10 und 1:5. Jeweils 0,5 ml der Ansätze gab ich zu den Deckgläsern, von denen jeweils eines pro Vertiefung der 24er Platten lag. Nach der jeweils ersten Ausplattierung einer Zellsuspension prüfte ich unter dem Lichtmikroskop ob die gewünschte Zelldichte vorlag.

### **3.5.3 Einfrieren von HEK293 Zellen**

Vor dem Einfrieren überprüfte ich die Zellen auf Kontamination. Die eingefrorenen Zellen waren zuvor maximal fünfmal passagiert und befanden sich in der späten log-Phase des Wachstums bei ca. 80 % Konfluenz. Einen Mediumwechsel führte ich einen Tag vor dem Einfrieren durch. Zuerst habe ich die Zellen trypsiniert (s.u.) und im Anschluss das Zellsuspensat in ein innen steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation führte ich bei 4° C für zehn Minuten bei 1000 Rotationen pro Minute durch. Das gewonnene Zellpellet habe ich in 5 ml eiskaltem DMEM und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Diese Suspension teilte ich in 1 ml Aliquote auf und legte diese für fünfzehn Minuten in den Kühlschrank, um ein Eindringen des Gefriermediums in die Zellen zu ermöglichen. Hierauf verblieben die Aliquote für ein bis zwei Tage bei -80° C. Anschließend überführte ich die Aliquote in flüssigen Stickstoff.

Für die Trypsinierung habe ich 5 ml Trypsin auf 37° C vorgewärmt und nach Spülung der Kultur mit DPBS auf die Zellen gegeben und geschwenkt. Die Kulturflasche habe ich im Anschluss eine Minute lang im Brutschrank aufbewahrt. Hiernach nahm ich die Trypsinlösung ab und beließ einen leichten Trypsinfilm auf den Zellen. Die Kulturflasche führte ich erneut in den Brutschrank. Nach ca. zehn Minuten setzte eine Mobilisation der Zellen ein. Anschließend gab ich frisches DMEM mit 10% Serum zu den Zellen und löste die Zellen mittels Pipettieren vorsichtig von der Flasche.

### **3.5.4 Auftauen von HEK293 Zellen**

1 ml Aliquote habe ich möglichst zügig dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort in ein 37° C Wasserbad überführt. Nachdem keine Eisrückstände mehr vorlagen, habe ich die Aliquote nun unter einer sterilen Werkbank in eine neue Kulturflasche gemeinsam mit 10 ml 37° C

warmen DMEM gegeben. Nach weiteren zwölf Stunden im Brutschrank wechselte ich das Medium vollständig, um DMSO-Rückstände zu entfernen. Bevor ich die erste Ausplattierung zur Transfizierung durchführte, habe ich die Zellen mindestens dreimal passagiert. Dadurch konnten sich die Zellen vom Auftauen regenerieren und eine zelltypische Wachstumsrate erreichen.

### 3.5.5 Beschichtung von Deckgläsern

Für die Ausplattierung der HEK293 Zellen verwendete ich Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser (Ø 1,2 mm). Vor der Beschichtung spülte ich die Gläser in einem Becherglas mehrfach mit zweifach destilliertem Wasser und bewahrte die Gläser in diesem Wasser für einen Tag auf. Anschließend spülte ich die Gläser mit 70 %igem Ethanol und beließ diese für einen Tag in diesem Ethanol. Es folgte eine erneute Spülung mit *Aqua bidestillata* und 70 %igem Ethanol. In dem 70 %igen Ethanol ließ ich die Gläser erneut für zwei Stunden. Eine anschließende Spülung mit 96 %igem Ethanol folgte. Im direkten Anschluss habe ich die Gläser unter der sterilen Werkbank abgeflammt. Jeweils ein Gläschen legte ich in eine Vertiefung einer 24er Platte. Nun gab ich Poly-L-Lysin hinzu und ließ dieses dort für mindestens vier Stunden. Auch längere Inkubationszeiten sind möglich, da Poly-L-Lysin keine Schichtbildung aufweist.

## 3.6 HEK293 Expressionssystem

Für diese Arbeit habe ich ein System gesucht, in dem HCN1-Kanäle möglichst isoliert abgeleitet werden können. Das Expressionssystem sollte leicht kultivierbar sein und eine hohe Transfektionsausbeute gewährleisten. Hier bot sich das für die transiente Proteinexpression weit verbreitete eukaryotische Standardsystem der HEK293 Zelllinie an. HEK293 Zellen sind von embryonalen Nierenzellen abgeleitet worden (*human embryonic kidney cells*). Originäre HEK293 Zellen wurden mit dem Adenovirus Typ 5 (E1A und E1B Genen) transformiert (Graham et al. 1977). Nach der 293ten Subkultivierung war die Zelllinie etabliert. Da HEK293 Zellen mRNA besitzen, die auch in Neuronen vorkommt, wird ein neuronaler Ursprung diskutiert (Shaw et al. 2002).

Eine umfassende Übersichtsarbeit über das HEK293 Expressionssystem, auch im Hinblick auf die Verwendung in elektrophysiologischen Laboren, wurde von Thomas & Smart (2005) veröffentlicht.

### 3.6.1 Calcium-Phosphat vermittelter DNA Transfer in HEK293 Zellen

Die Calcium-Phosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) vermittelte Transfektion ist die wohl am meisten verwendete Technik zur Einbringung von Plasmid-DNA in Zellen von Säugetieren *in vitro* (Graham & van der Eb 1973; Loyter et al. 1982). Das Hauptproblem dieser Methode für den elektrophysiologischen Experimentator ist, dass durch das  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  häufig eine Beschädigung der Zellmembran verursacht wird. Während der Zugabe des Präzipitats auf die Zellen ist auf einen normwertigen DMEM-pH-Wert sowie auf die Temperatur der Medien (Wasserbad 37° C) zu achten, da beide Parameter wahrscheinlich Einfluss auf die Stabilität des Präzipitats und somit auf die Transfektionsrate haben (Chen & Okayama 1987; Jordan et al. 1996). Die DNA habe ich erst kurz vor der Transfektion in der Hand aufgewärmt. Abhängig von der Färbung des DMEM, das Hinweis über Veränderungen des pH-Wertes gibt, habe ich entschieden, ob vor Zugabe des Präzipitats ein Mediumwechsel durchgeführt werden musste. Da dieser jedoch prinzipiell zusätzlichen mechanischen Stress für die Zellen bedeutet, habe ich den Wechsel bei farblich unauffälligem Medium und optisch unauffälligen Zellen nicht standardisiert durchgeführt.

Für die Durchführung einer Transfektion für vier Vertiefungen einer 24-er Platte habe ich folgendes Protokoll verwendet:

	4 µl Vektor (stock 1 µg/µl)
+	12,5 µl 2 M $\text{CaCl}_2$
+	83,5 µl $\text{H}_2\text{O}$ (bidest, steril)
100 µl	

Diesen Ansatz von 100 µl habe ich durch leichtes Schnipsen des Mikro-Reaktionsgefäßes vermischt. Hinzugegeben wurden folgend:

+	100 µl BBS ( <i>borate buffered saline</i> ), pH 6,9
200 µl	

Die besten Transfektionsergebnisse habe ich mit Inkubationszeiten zwischen 8 – 15 Minuten erzielt. Jeweils 50 µl des Ansatzes tröpfelte ich pro Vertiefung gleichmäßig über die Zellen. Abschließend überprüfte ich unter einem Lichtmikroskop, ob ein Niederschlag auf den Zellen zu sehen war und überführte die Zellen wieder in den Brutschrank. Die Transfektion selbst führte

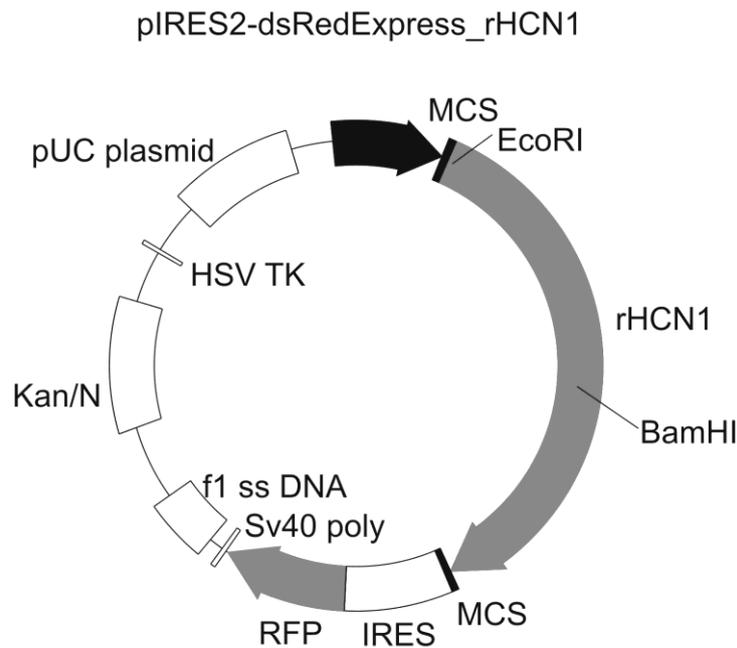
ich unter einer sterilen Werkbank bei Raumtemperatur durch. Die Zellen habe ich erst kurz vor der Zugabe des Präzipitats aus dem Brutschrank genommen.

### 3.6.2 *pIRES2-dsRedExpress\_rHCN1*-Vektor

Mittels des bicistronischen Vektors *pIRES2-DsRed-Express* kann die simultane Expression des rHCN1 Proteins und des fluoreszierenden Proteins *DsRed-Express* durchgeführt werden. *DsRed-Express* wurde von einem rot fluoreszierenden Protein *DsRed* der Scheibenanemone (*Discosoma sp.*) abgeleitet und industriell bezüglich einer verminderten Licht- und Zytotoxizität im Vergleich zum Wildtyp *DsRed*, bei einer unveränderten Konformationsstabilität gegenüber Licht, verändert (Matz et al. 1999).

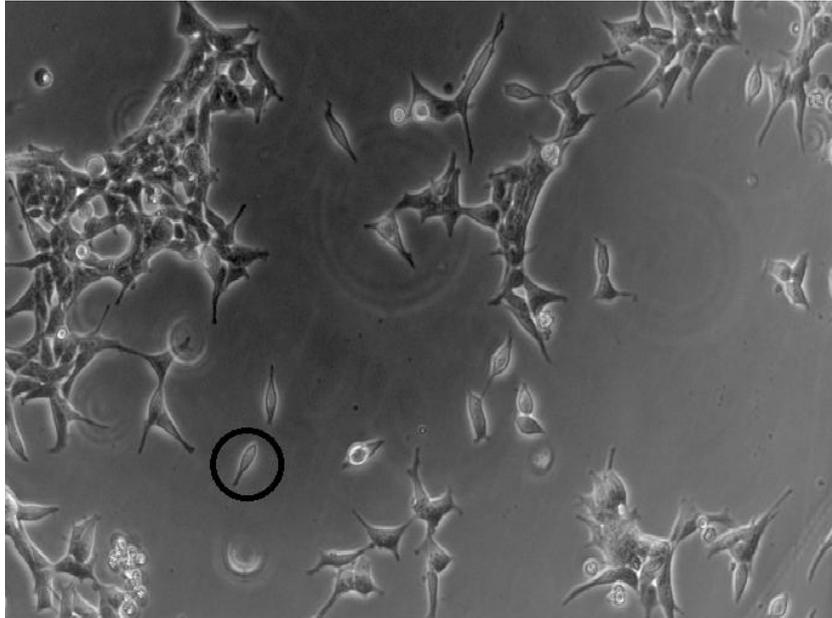
Die bicistronische Expression wird durch das Zytomegalievirus (CMV) erleichtert und durch die interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*, IRES), an der die mRNA an das Ribosom bindet, ermöglicht (Jang et al. 1990; Filbin & Kieft 2009; Pacheco & Martinez-Salas 2010; Thompson 2012). IRES liegt zwischen dem *Polylinker* (*multiple-cloning-site*, MCS) und der *DsRed-Express* Region. Sie ermöglicht eine *cap*-unabhängige Translation von *DsRed-Express*. Oberhalb der MCS liegt ein Zytomegalievirus assoziierter Promoter ( $P_{CMV IE}$ ), der die bicistronische Transkription unterstützt. Als Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) wirkt die *DsRed-Express* nachgeschaltete *SV<sub>40</sub>*-Sequenz (*simian-virus 40*) (Prasad & Rao 2005; Dean 1997). Die *pUC*-Sequenz (Vieira & Messing 1982; Messing 1983) ermöglicht eine Vektorvervielfachung in *E. coli* (*Escherichia coli*).

Wird zu den Bakterien Geneticin (G418; Wagman et al. 1974) gegeben, überleben nur jene, bei denen der Vektor erfolgreich implementiert wurde. Ermöglicht wird diese Selektion durch den Vektorabschnitt *Neo/Kan* (*neomycin/ kanamycin resistant cassette*), der mittels Phosphorylierung von G418 dessen antimikrobielle Wirkung hemmt (durch Inhibition der Proteinbiosynthese) (Davies & Jimenez 1980). Unterstützend wirkt das *HSV TK* Gen (*thymidine kinase from herpesvirus*). Informationen über den Vektor wurden teilweise dem Protokoll *No. PT4079-5, Version No. PR9Y3392 3*, der Firma *Clontech Laboratories, Inc.* Mountain View, CA, entnommen.



**Abb. 3** | Struktur des *pIRES2-dsRedExpress\_rHCN1* Vektors. MCS: *Multiple Cloning Site*; EcoRI: Endonuklease I, isoliert aus dem Stamm R von *Escherichia coli*; BamHI: Typ II Restriktionsendonuklease, isoliert aus *Bacillus amyloliquefaciens*; IRES: *Internal ribosomal entry site*; RFP: Rot fluoreszierendes Protein; SV<sub>40</sub>: *Simian Virus*; F1 ss DNA Ori: Phagemid; Kan/Neo: *Neomycin/kanamycin resistant cassette*; HSV TK poly A: *Thymidine kinase from herpesvirus*; pUC plasmid Ori: Bakteriellles Plasmid.

rHCN1 habe ich mit Labormitarbeitern mittels mRNA aus homogenisierten Gehirnen erwachsener weiblicher *Wistar*-Ratten kloniert (Details siehe Battfeld et al. 2010). Nach rHCN1 Amplifikation haben wir die Fragmente mittels *EcoRI* und *BamHI* (NEB GmbH, Frankfurt a.M., Germany) geschnitten und in den oben beschriebenen Vektor *pIRES2-dsRed-Express* zwischen *MCS*-Region und *IRES*-Sequenz eingefügt (siehe Abb. 3). Die durch PCR erhaltenen Fragmente haben wir mittels Restriktionsanalyse verifiziert. Mittels Sequenzierung konnten wir die Entität der DNA überprüfen.



**Abb. 4|** HEK293 Zellen. Für die Messungen habe ich einzeln liegende, fluoreszierende Zellen ausgewählt, die morphologisch intakt waren. Abgebildet ist ein Ausschnitt eines verwendeten Deckgläschens, auf das HEK293 Zellen plattiert wurden, welche *pIRES2-dsRed-Express* exprimierten. Die Zelle, die mit einem schwarzen Kreis markiert ist, wurde in diesem Fall für einen *patch* ausgewählt.

## 3.7 Datenanalyse und Statistik

### 3.7.1 Datenanalyse

Abhängig vom jeweiligen Messprotokoll habe ich  $I_h$  durch unterschiedlich starke Hyperpolarisationen aktiviert. Die Stromantwort am Ende einer solchen Stimulation habe ich als *steady state* ( $I_{ss}$ ) gewertet, aus dem ich die maximale  $I_h$ -Amplitude für die jeweils angelegte Spannung berechnete.

Den zu Beginn eines Experiments von Null abweichenden Strom (Leckstrom) ( $I_{start}$ ) habe ich von  $I_{ss}$  subtrahiert und somit  $I_h$  ermittelt, wobei  $I_{start}$  in *cell-attached*-Messungen nahezu vernachlässigbar war. Für *whole-cell*-Messungen habe ich die Experimente mit  $I_{start} > 100$  pA abgebrochen. Wird eine schrittweise zunehmende Aktivierung des Stroms durchgeführt, kann der  $I_h$  durch eine als *leak subtraction* bezeichnete Extrapolation berechnet werden. Der Stromgipfel, der direkt nach Applikation einer aktivierenden Spannung auftritt, stellt den instantanen Strom dar ( $I_{inst}$ ). Als langsame Stromkomponente habe ich zudem  $I_{slow}$ , die Differenz zwischen  $I_{inst}$  und  $I_{ss}$ , berechnet.



**Abb. 5** Beispielabbildung eines aktivierten rHCN1-vermittelten  $I_h$  (Ganzzelleableitung bei  $-100$  mV; Haltepotential bei  $-40$  mV). Die senkrechten Striche geben beispielhaft die jeweiligen Cursor-Abschnitte an, zwischen denen ich die jeweiligen Stromkomponenten erfasste. Die einzelnen Datenpunkte zwischen den Cursors habe ich gemittelt und für  $I_{inst}$  den maximalen Wert aufgezeichnet. Details siehe Text.

### 3.7.2 Statistik

Die statistische Auswertung führte ich mit Origin 8.5 durch. Bei  $n < 8$  oder nicht normalverteilten Daten verwendete ich den nichtparametrischen *Wilcoxon signed rank test* für gepaarte Daten. Waren die Daten ungepaart, führte ich den *Mann Whitney U test* durch. Bei  $n \geq 8$  habe ich die Werte mittels *Shapiro-Wilk-Test* auf Normalverteilung überprüft. Lag eine Normalverteilung vor, verwendete ich den *T-Test* für gepaarte Daten. Die *Tail*-Stromamplituden berechnete ich für jede Messung einzeln, normalisierte diese und passte sie mittels der Boltzmann-Gleichung an.

$$I(V) = ([A_1 - A_2] / (1 + e^{(V - V_{1/2})/k})) + A_2$$

In den Ergebnissen ist der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die Berechnung der Zeitkonstanten der Aktivierungskinetik des  $I_h$  habe ich durch eine doppelte exponentielle Funktion angepasst:

$$y(x) = y_0 + A_1 (1 - e^{-x/\tau_1}) + A_2 (1 - e^{-x/\tau_2})$$

Hierbei ist  $\tau_1$  die schnelle und  $\tau_2$  die langsame Zeitkonstante. Die Ergebnisse habe ich als signifikant gewertet, wenn der p-Wert  $< 0,05$  war ( $< 0,05$  = signifikant (\*),  $< 0,01$  = hoch signifikant (\*\*),  $p < 0,001$  = höchst signifikant (\*\*\*)).

## 4 Ergebnisse

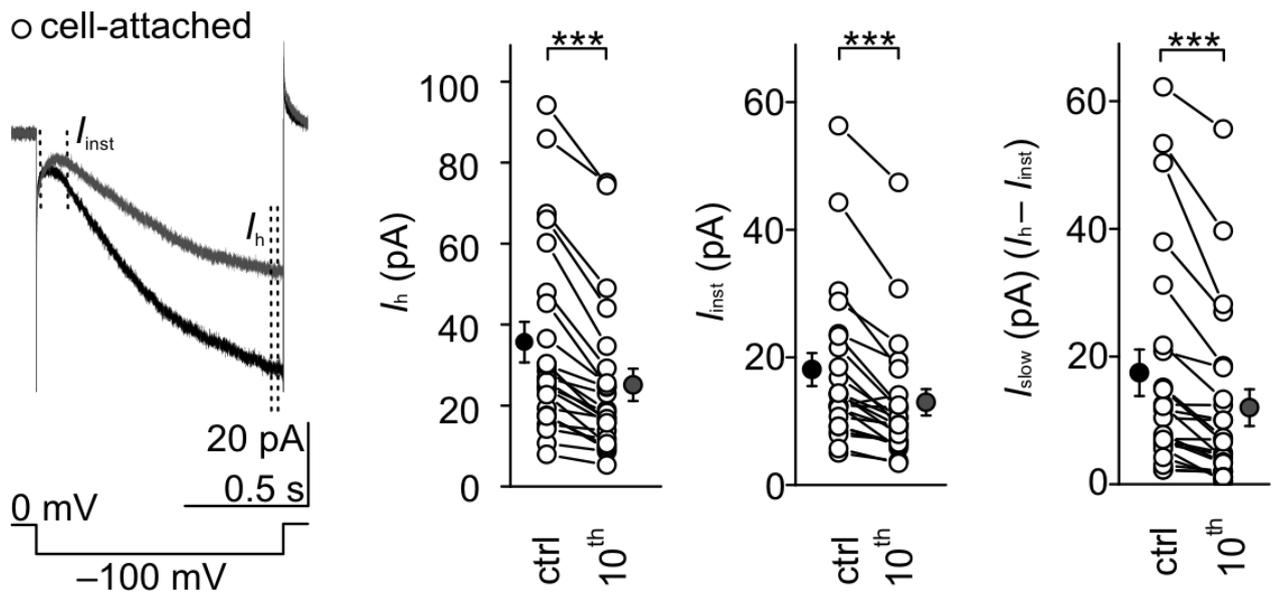
### 4.1 In intakten HEK293 Zellen vermindert sich $I_h$ nach wiederholter Aktivierung unabhängig von einer einfachen, langen Voraktivierung

Für  $I_h$ , der durch in *Xenopus* Oozyten exprimierte HCN1-Kanäle fließt, wurde ein durch Voraktivierung induzierter Versatz der spannungsabhängigen Stromantwort von bis zu +60 mV beschrieben (Männikkö et al. 2005). Wir konnten hingegen eine voraktivierungsabhängige Reduktion von durch rHCN1 fließendem  $I_h$  im HEK293 Modell zeigen (Battefeld 2010).

Zur Überprüfung der Ursachen dieser gegensätzlichen Befunde verwendete ich verschiedene Protokolle für *voltage-clamp*-Versuche. Zuerst aktivierte ich rHCN1  $I_h$  zehnmal mit einer angelegten Spannung von -100 mV im Abstand von zehn Sekunden für jeweils eine Sekunde. Das Potential der Pipette habe ich auf 0 mV determiniert (Abb.6). In diesen *cell-attached*-Messungen konnte ich nach zehn Aktivierungen eine um  $30.3 \pm 2.7\%$  verkleinerte Amplitude messen ( $n = 23$ ,  $p < 0.001$ , *Wilcoxon signed rank test*).

Unverändert blieb diese Stromreduktion auch nach 20 Aktivierungen (um  $39.4 \pm 3.4\%$  vs.  $35.8 \pm 3.2\%$ ,  $n = 9$ ,  $p = 0.1$ , *paired t test*), 30 Aktivierungen (um  $42.4 \pm 1.3\%$  vs.  $35.5 \pm 6.7\%$ ,  $n = 4$ ,  $p = 0.4$ , *Wilcoxon signed rank test*) und 50 Aktivierungen (um  $45.2 \pm 2.5\%$  vs.  $37.2 \pm 0.99\%$ ,  $n = 2$ ) im Vergleich zu dem Wert nach 10 Aktivierungen mit dem jeweiligen *Patch*.

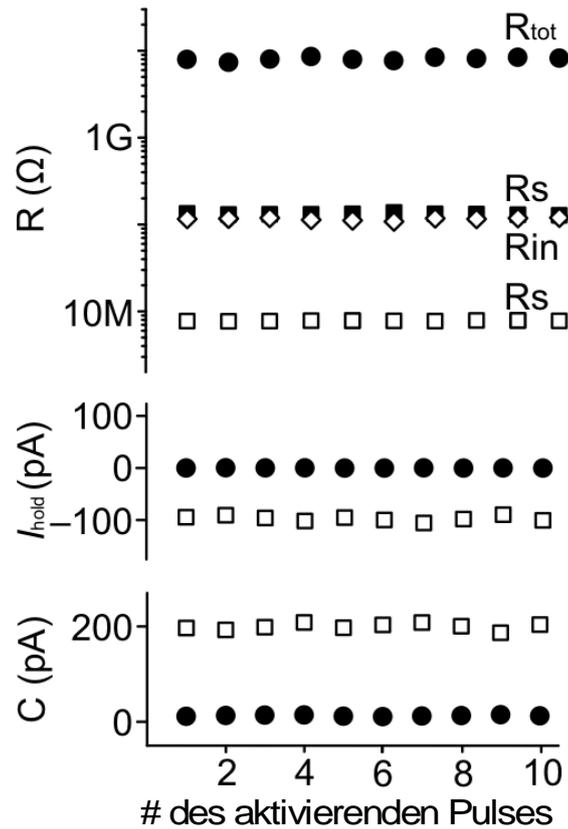
Die instantane Stromkomponente ( $I_{inst}$ ) verringerte sich ebenfalls nach zehn Aktivierungen um  $28.4 \pm 3.4\%$  ( $n = 23$ ,  $p < 0.001$ , *Wilcoxon signed rank test*), ohne weitere Reduktion nach 20 Aktivierungen (um  $34.8 \pm 5.9\%$  vs.  $35.3 \pm 4.12\%$ ,  $n = 9$ ,  $p = 0.9$ , *paired t test*), 30 Aktivierungen (um  $43.7 \pm 10.7\%$  vs.  $37.2 \pm 8.7\%$ ,  $n = 4$ ,  $p = 0.6$ , *Wilcoxon signed rank test*) oder 50 Aktivierungen (um  $39.0 \pm 17.6\%$  vs.  $23.2 \pm 7.4\%$ ,  $n = 2$ ). Die Werte deuten darauf hin, dass  $I_h$  in den meisten Ableitungen nach 10 bis 20 Kanalaktivierungen einen *steady state* erreicht hat.



**Abb. 6** | Die wiederholte Aktivierung von rHCN1 führt zur Verminderung der  $I_h$ -Amplitude in intakten HEK293 Zellen. Links: Beispielströme von durch rHCN1 vermittelten  $I_h$  im *cell-attached*-Modus, generiert durch zehnmahlige Kanalaktivierung mittels  $-100$  mV Spannungen im Abstand von 10 s. Dargestellt ist der erste (schwarz) sowie zehnte Strom (grau). Die gestrichelten Linien zeigen die Messbereiche für  $I_h$  und  $I_{inst}$ . Populationsdaten: Amplituden für die ersten (*ctrl*) und zehnten ( $10^{th}$ ) Aufnahmen.  $I_h$  (links),  $I_{inst}$  (Mitte) und  $I_{slow}$  ( $I_{slow} = I_h - I_{inst}$ ; rechts) (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).

Dass die Amplitudenreduktion von  $I_h$  ein Artefakt durch den Versuchsaufbau selbst darstellt, ist unwahrscheinlich, da sich keiner der allgemeinen Vergleichsparameter wie Kapazität ( $C_{ini} = 21.7 \pm 2.6$  pF vs.  $C_{10} = 19.8 \pm 3.01$  pF,  $n = 12$ ,  $p = 0.3$ , *Wilcoxon signed rank test*), Gesamtwiderstand ( $R_{totini} = 7.7 \pm 1.3$  G $\Omega$  vs.  $R_{10} = 8.1 \pm 1.3$  G $\Omega$ ,  $n = 12$ ,  $p = 0.5$ , *paired t test*) oder serieller Widerstand ( $R_{sini} = 16.1 \pm 2.5$  M $\Omega$  vs.  $R_{S10} = 18.7 \pm 3.0$  M $\Omega$ ,  $n = 12$ ,  $p = 0.62$ , *Wilcoxon signed rank test*) während der Messungen änderte.

Ebenso änderte sich der Haltestrom im Verlauf der Experimente nicht ( $I_{hold10} = -1.6 \pm 0.5$  pA vs.  $I_{holdini} = -1.4 \pm 0.5$  pA,  $n = 23$ ,  $p = 0.66$ , *Wilcoxon signed rank test*;  $I_{hold20} = -1.4 \pm 0.6$  pA vs.  $I_{holdini} = -1.0 \pm 0.7$  pA,  $n = 9$ ,  $p = 0.23$ , *Wilcoxon signed rank test*;  $I_{hold30} = -3.0 \pm 0.9$  pA vs.  $I_{holdini} = -2.2 \pm 1.3$  pA,  $n = 4$ ,  $p = 1$ , *Wilcoxon signed rank test*;  $I_{hold50} = -3.4 \pm 0.14$  pA vs.  $I_{holdini} = -1.3 \pm 1.5$  pA,  $n = 2$ ) (Abb. 7).



**Abb. 7** | Zeitverläufe von Eingangswiderstand ( $R_{in}$ ), serieller Widerstand ( $R_s$ ), Gesamtwiderstand ( $R_{tot}$ ), Haltestrom ( $I_{hold}$ ) und *Patch*-Kapazität ( $C$ ). Beispielhaft für *cell-attached*- und *whole-cell*-Messungen die in Abb. 10 dargestellt sind (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).

HCN-Kanäle leiten  $I_{inst}$  zusätzlich zu der umfassend charakterisierten langsamer aktivierenden Stromkomponente  $I_h$ . Wodurch  $I_{inst}$  genau entsteht, ist nicht abschließend geklärt. Es ist bekannt, dass ein „Hintergrundstrom“ nach heterogener Expression auftritt (Ishii et al. 1999; Gauss et al. 1998). Möglicherweise sind auch die biophysikalischen Eigenschaften von  $I_{inst}$  abhängig von dem jeweiligen Expressionssystem. Korrelationen der instantanen Stromkomponente mit der langsameren Stromkomponente  $I_h$  lassen vermuten, dass  $I_{inst}$  von HCN-Kanälen generiert wird. Für eine solche Annahme spricht auch das Vorliegen a) gleicher Umkehrpotentiale, b) derselben Abhängigkeit gegenüber intrazellulären  $Cl^-$  und cAMP Konzentrationen und c) der Verfügbarkeit von zusätzlichen Subuntereinheiten wie z.B. MiRP1. Für HCN2 wurden ständig offene Kanäle in verschiedenen Expressionssystemen nachgewiesen (Proenza et al. 2002; Pittoors & Van Bogaert 2015).

Dies trifft möglicherweise auch auf MausHCN1 in Oozyten zu (Henrikson et al. 2003; Xue et al. 2002; Azene et al. 2003; Azene et al. 2005). Zudem konnte ich in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen dem HCN1 vermittelten  $I_{slow}$  und der vermutlich co-vermittelten Stromkomponente  $I_{inst}$

zeigen. Diese Korrelation lässt vermuten, dass die Expression von HCN1-Kanälen nicht nur zeitabhängig Ströme generiert, sondern auch ständig offene Kanäle bedingt. Die Abschwächung der langsamen Stromkomponente  $I_{slow}$  (die Differenz zwischen  $I_h$  und  $I_{inst}$ ) war etwas stärker ( $34.0 \pm 5.1\%$ ,  $n = 23$ ,  $p < 0.001$ , *Wilcoxon signed rank test*).

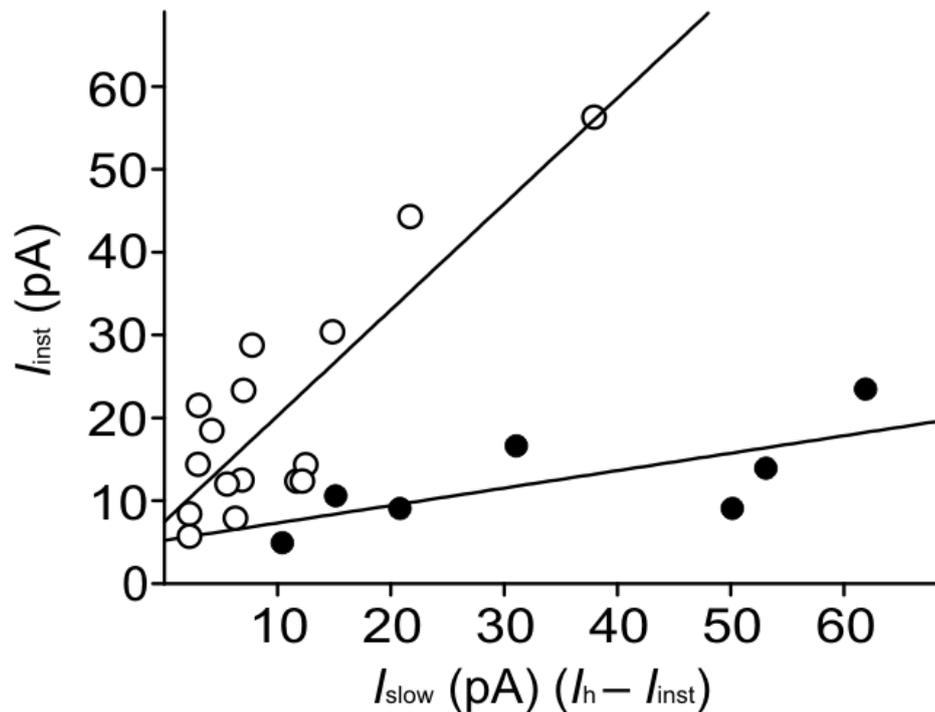
Um die Beteiligung der instantanen Stromkomponente an der Amplitudenreduktion zu ermitteln, kann diese in Relation zu  $I_{slow}$  gesetzt werden. Der  $I_{inst}$  Anteil ( $I_{inst} / I_{slow}$ ) stieg während der zehn Aktivierungen von  $1.8 \pm 0.3$  auf  $2.8 \pm 0.75$  ( $n = 23$ ,  $p = 0.23$ , *Wilcoxon signed rank test*) an.  $I_{inst}$  ist somit von der Amplitudenreduktion weniger betroffen als  $I_{slow}$ .

Noch deutlicher wird dies, wenn die Werte in zwei Gruppen aufgeteilt werden, in denen der Quotient aus  $I_{inst} / I_{slow} < 1$  („kleiner  $I_{inst}$ “,  $n = 7$ ,  $r = 0.65$ , slope = 0.19, intercept = 6.4 pA) und  $> 1$  („großer  $I_{inst}$ “,  $n = 16$ ,  $r = 0.86$ , slope = 1.3, intercept = 6.6 pA) beträgt (Abb. 8). Der Anteil von  $I_{inst}$  beträgt für die Gruppe „kleiner  $I_{inst}$ “  $I_{inst}/I_{slow} = 0.43 \pm 0.07$  vs.  $I_{inst}/I_{slow} = 0.48 \pm 0.14$  nach der zehnten Aktivierung ( $n = 7$ ,  $p = 1$ , *Wilcoxon signed rank test*) und für die Gruppe „großer  $I_{inst}$ “  $I_{inst}/I_{slow} = 2.4 \pm 0.3$  zu  $I_{inst}/I_{slow} = 3.8 \pm 1.0$  ( $n = 16$ ,  $p = 0.25$ , *Wilcoxon signed rank test*).

Der relative Anteil der schnellen Stromkomponente wird also nach mehreren Aktivierungen größer, wenn  $I_{inst}$  auch initial einen größeren Stromanteil aufweist. Dies lässt vermuten, dass Kanäle vorliegen, die sich immer in einem geöffneten Zustand befinden und auch nach mehrfacher Aktivierung geöffnet bleiben und möglicherweise keine rHCN1-Kanäle sind.

(Der Gesamtwiderstand von  $6.4 \pm 1.0$  G $\Omega$  schließt im Hintergrund bestehende Leckströme außerdem nicht aus).

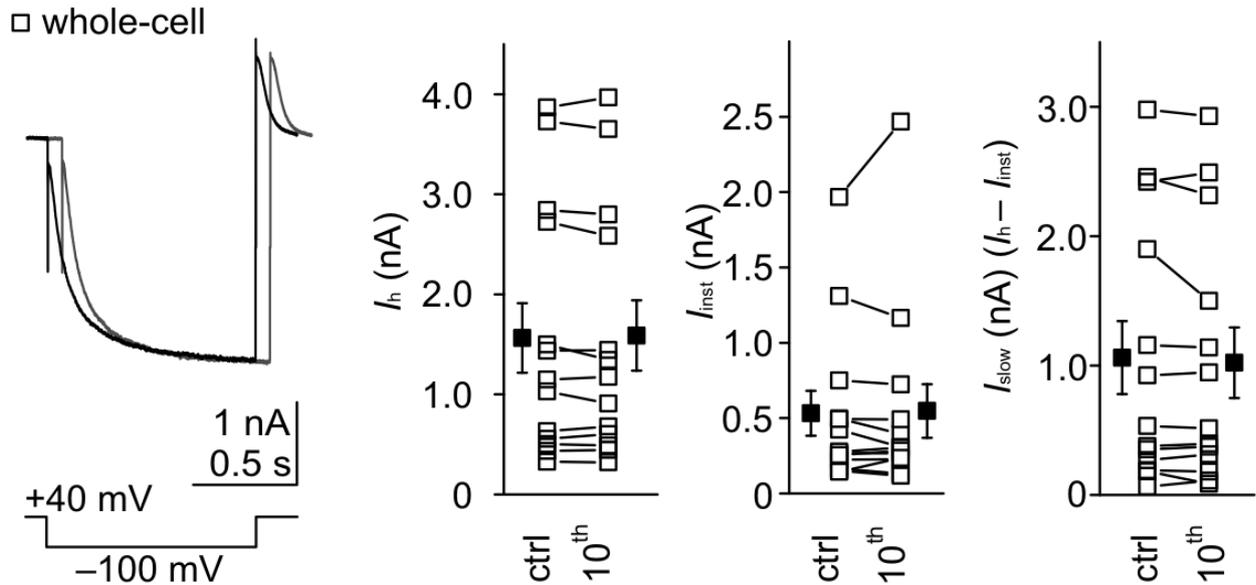
Nach einer Pause von 10 Minuten ohne Aktivierung war die Amplitudenreduktion noch vorhanden. Weder für  $I_h$  ( $I_{hini} = 33 \pm 7.5$  pA vs.  $I_{h10min} = 20.6 \pm 4.6$  pA, verbliebener  $I_h = 66.3 \pm 15.3\%$  vs.  $70.6 \pm 7.4\%$  nach den initialen 10 Aktivierungen,  $n = 3$ ) noch für  $I_{inst}$  ( $I_{instinitial} = 14.5 \pm 1.3$  pA, zu  $I_{inst10min} = 8.6 \pm 2.1$  pA, verbliebener  $I_{inst} = 47.6 \pm 6.7\%$  vs.  $61.1 \pm 7.8\%$  nach den initialen 10 Aktivierungen,  $n = 3$ ) und auch nicht für  $I_{slow}$  ( $I_{slowinitial} = 18.5 \pm 6.4$  pA vs.  $I_{slow10min} = 12.0 \pm 3.0$  pA, verbliebener  $I_{slow} = 68.3 \pm 7.6\%$  vs.  $81.4 \pm 11.6\%$  nach den initialen 10 Aktivierungen,  $n = 3$ ). Der Haltestrom zeigte sich stabil ( $I_{holdini} = -5.4 \pm 0.22$  pA vs.  $I_{hold10} = -5.7 \pm 0.23$  pA,  $n = 3$ ).



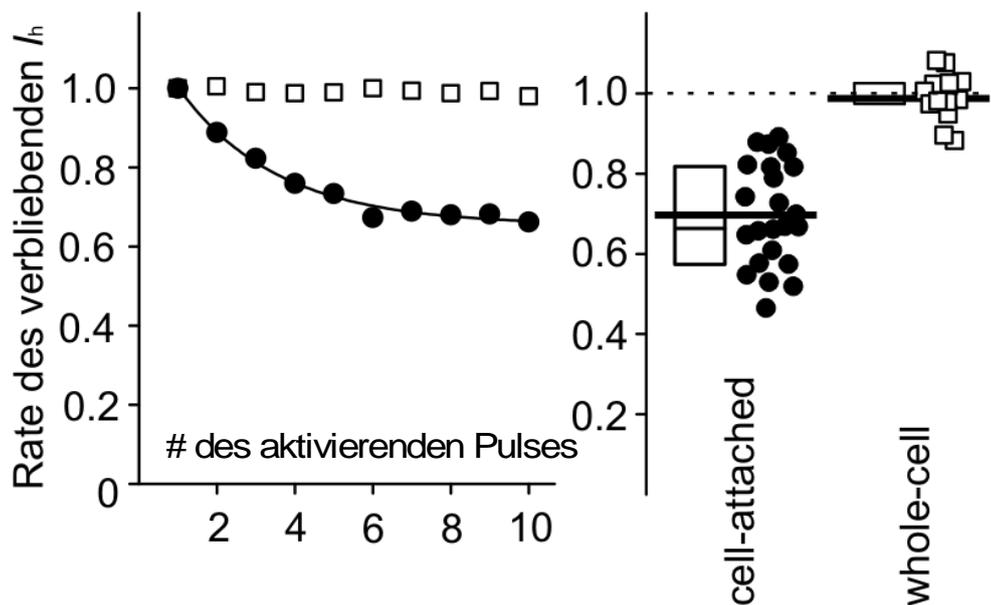
**Abb. 8** | Korrelation von  $I_{inst}$  und  $I_{slow}$ . Aufgetragen wurde die schnelle Stromkomponente  $I_{inst}$  gegen die langsame Stromkomponente  $I_{slow}$ . Es zeigt sich eine starke Korrelation zwischen diesen beiden Parametern ( $y = a + b \cdot x$ ), die auf das Vorliegen ständig offener Kanäle hinweist, die in unterschiedlichen *patches* unterschiedlich stark verteilt sind (weiße Punkte:  $I_{inst}/I_{slow} > 1$ , schwarze Punkte:  $I_{inst}/I_{slow} < 1$ ). Der Schnittpunkt mit der Y-Achse zeigt den instantanen Strom, der in HEK293 Zellen zu vermuten ist, wenn keine Expression von rHCN1 vorliegt (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).

Für Messungen, bei denen eine ausgeprägte  $I_h$ -Reduktion vorlag, war der Zeitverlauf der Amplitudenreduktion akzentuiert (ermittelt durch eine einfache exponentielle Funktion;  $\tau_{reduct} = 7.12 \pm 2.3$  Hyperpolarisationen,  $n = 14$ ).

Übereinstimmend mit früheren Versuchen (Battfeld et al. 2010) führte ein Aufreißen der Zellmembran (*whole-cell-Modus*) zu keiner Reduktion der  $I_h$ -Amplitude (verbliebener  $I_h = 0.85 \pm 1.6\%$ ,  $n = 13$ ,  $p = 0.5$ , *Wilcoxon signed rank test*; verbliebener  $I_{inst} = 0.6 \pm 6.7\%$ ,  $n = 13$ ,  $p = 0.6$ , *Wilcoxon signed rank test*; verbliebener  $I_{slow} = 1.2 \pm 7.7\%$ ,  $n = 13$ ,  $p = 0.6$ , *Wilcoxon-signed rank test*) (Abb.9).



**Abb. 9** | Die Reduktion von rHCN1 vermitteltem  $I_h$  hängt von einem intaktem Zytosol ab. Links ist der erste (schwarz) sowie zehnte (grau)  $I_h$  dargestellt (*whole-cell*-Konfiguration). Die Ableitungen habe ich in 10 s Abständen für jeweils 1 s bei  $-100$  mV durchgeführt, ausgehend von einem Haltepotential von  $+40$  mV. Nach Aufreißen der Zellmembran habe ich 3 min gewartet. Populationsdaten: Erster (ctrl) und zehnter ( $10^{th}$ )  $I_h$  (links), erster (ctrl) und zehnter ( $10^{th}$ )  $I_{inst}$  (Mitte) sowie erster (ctrl) und zehnter ( $10^{th}$ )  $I_{slow}$  (rechts) (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).



**Abb. 10** | Die Amplitudenreduktion von  $I_h$  im *whole-cell*-Modus vs. im *cell-attached*-Modus. Links dargestellt ist das Ausmaß der Amplitudenreduktion jeweils einer Beispielzelle im *whole-cell*-Modus (weiße Kreise) sowie im *cell-attached*-Modus (schwarze Kreise). Alle Amplituden habe ich auf den ersten Strom (Kontrolle) normiert. In beiden Konfigurationen wurde eine zehnmahlige Aktivierung für 1 s bei  $-100$  mV im Abstand von 10 s durchgeführt. Die schwarze Linie stellt einen einfachen exponentiellen *Fit* des Verlaufs der Stromreduktion über die Versuchsdauer im *cell-attached*-Modus dar. Rechts: Anteil des verbleibenden  $I_h$  nach zehn Aktivierungen. Im Gegensatz zu den *whole-cell*-Ableitungen liegt eine deutliche Amplitudenreduktion in *cell-attached*-Ableitungen vor (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).

Nach dem Aufreißen habe ich 3 min gewartet, um den Einfluss eines „run up“ (Battefeld et al. 2010) auf die Messungen auszuschließen. Das Haltepotential habe ich auf +40 mV determiniert, wodurch keine Kanal-Voraktivierung erfolgte. Nach zehn Hyperpolarisationen war die Rate des verbliebenen  $I_h$   $0.7 \pm 0.03$  ( $n = 23$ ) in *cell-attached*-Messungen und  $0.99 \pm 0.02$  in *whole-cell*-Messungen ( $n = 13$ ,  $p < 0.001$ ). Werte, die aus *cell-attached*- und *whole-cell*-Messungen berechnet sind, habe ich mittels t-Test verglichen (Abb.10).

Die Messbedingungen waren während der *whole-cell*-Messungen konstant. Dies spiegeln die Kapazität ( $C_{ini} = 162.9 \pm 67.9$  pF vs.  $C_{10} = 180.1 \pm 71.7$  pF,  $n = 13$ ,  $p = 0.3$ , *Wilcoxon signed rank test*), der Eingangswiderstand ( $R_{inini} = 509.4 \text{ M}\Omega \pm 116.1 \text{ M}\Omega$  vs.  $R_{in10} = 413.5 \text{ M}\Omega \pm 91.9 \text{ M}\Omega$ ,  $n = 13$ ,  $p = 0.1$ , *paired t test*), der serielle Widerstand ( $R_{sini} = 9.7 \pm 1.04 \text{ M}\Omega$  vs.  $R_{s10} = 9.9 \pm 1.02 \text{ M}\Omega$ ,  $n = 13$ ,  $p = 0.07$ , *Wilcoxon signed rank test*) und der Haltestrom ( $I_{holdini} = -8.5 \pm 25.5$  pA vs.  $I_{hold10} = -7.9 \pm 26.3$  pA,  $n = 13$ ;  $p = 0.09$ , *paired t test*) wider, die während der Messungen gleich blieben.

Zur Untersuchung, ob neben einer wiederholten Aktivierung auch ein einzelner, langer Vorpuls für eine  $I_h$ -Reduktion ausreicht, habe ich einen den Kanal aktivierenden Puls vorgeschaltet, der länger war als die gesamte Aktivierungszeit, die benötigt wurde, um die  $I_h$ -Amplitude auf 1/3 ( $\tau_{reduct}$ ; siehe oben) zu vermindern (z. B. 12 s). Nach einem solchen Vorpuls aktivierte ich wie in den beschriebenen Vorversuchen zehnmalig auf  $-100$  mV für 1 s. Verglichen zu einer Voraktivierung von 1 s führte die 12 s lange Voraktivierung bei  $-100$  mV zu einer leichten, aber signifikanten Reduktion der ersten nachfolgenden  $I_h$ -Amplitude (Rate des verbliebenen  $I_h$  nach 12 s Voraktivierung:  $0.84 \pm 0.03$ ,  $n = 15$  vs. 1 s Voraktivierung:  $0.94 \pm 0.01$ ,  $n = 23$ ,  $p < 0.001$ , *Mann Whitney U test*) (Abb.11).

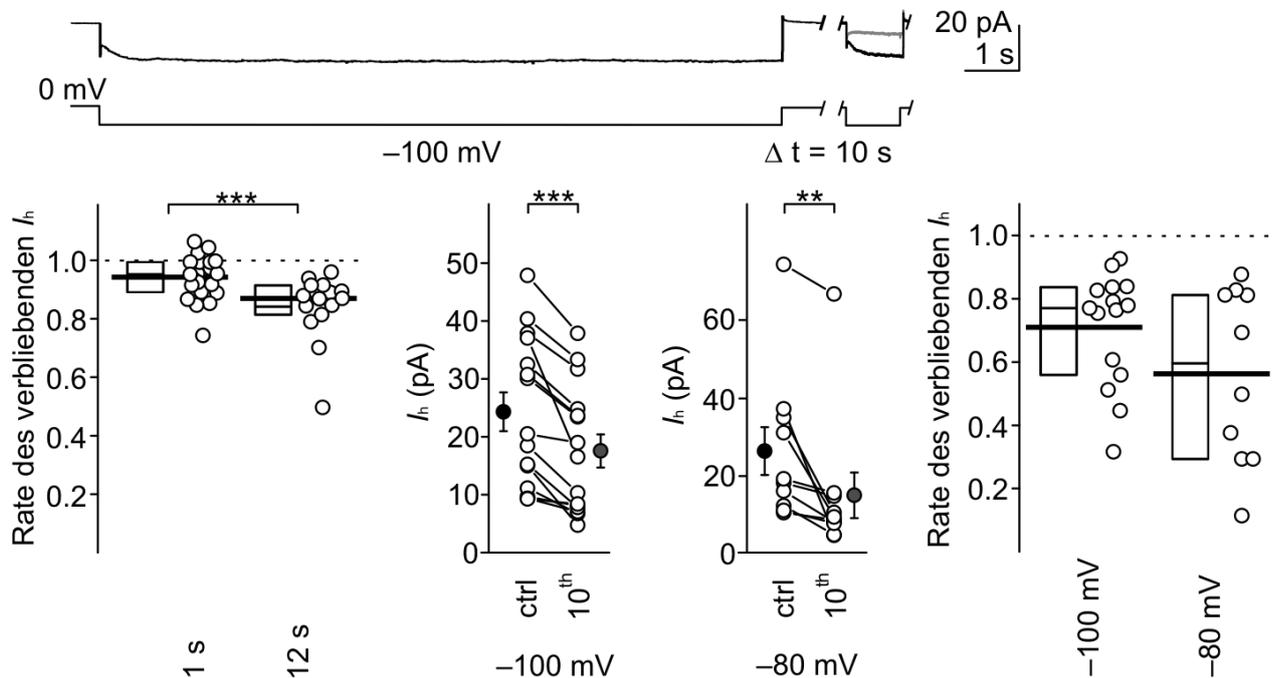
Auch die weitere Aktivierung bei  $-100$  mV führte zu einer zusätzlichen Amplitudenminderung von  $I_h$ . Diese betrug  $29.1 \pm 4.6\%$  ( $n = 15$ ,  $p < 0.001$ , *paired t test*) nach der 12 s dauernden Voraktivierung bei  $-100$  mV sowie  $43.8 \pm 8.8\%$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ , *Wilcoxon signed rank test*) bei  $-80$  mV (Abb.11).

Die Reduktion wird zusätzlich durch die Rate des verbliebenen  $I_h$  abgebildet. Dieser betrug nach  $-100$  mV Voraktivierung  $0.70 \pm 0.05$  ( $n = 15$ ) und nach der  $-80$  mV Voraktivierung  $0.56 \pm 0.08$  ( $n = 10$ ) (Abb.11), wenn die Raten des verbliebenden  $I_h$  mit denen ohne Voraktivierung verglichen wurden ( $p = 0.37$ , *Kruskal-Wallis-Test*). Auch die Anzahl der Aktivierungen, die notwendig waren, um die  $I_h$ -Amplitude um 1/3 zu vermindern ( $\tau_{reduct}$ ), war mit  $9.9 \pm 1.8$  Aktivierungen nach dem 12 s Vorpuls ( $-100$  mV,  $n = 15$ ) und mit  $7.8 \pm 2.1$  Aktivierungen ( $-80$

mV,  $n = 10$ ) ähnlich derer ohne lange Voraktivierung ( $p = 0.09$ , *Kruskal-Wallis-Test*) und somit auch unabhängig von der Stärke des Vorpuls.

Der Haltestrom war während der Messungen stabil (nach  $-100$  mV Vorpuls:  $I_{\text{holdini}} = 0.49 \pm 0.1$  pA vs.  $I_{\text{hold11}} = 0.36 \pm 0.09$  pA,  $n = 15$ ,  $p = 0.17$ , *Wilcoxon signed rank test*; nach  $-80$  mV Vorpuls  $I_{\text{holdini}} = 0.5 \pm 0.08$  pA vs.  $I_{\text{hold11}} = 0.33 \pm 0.06$  pA,  $p = 0.14$ , *paired t test*).

Die Daten deuten darauf hin, dass eine wiederholte rHCN1 Aktivierung (zum Beispiel wiederkehrende Kanalöffnungen und -schließungen) notwendig für die Amplitudenreduzierung von  $I_h$  ist.

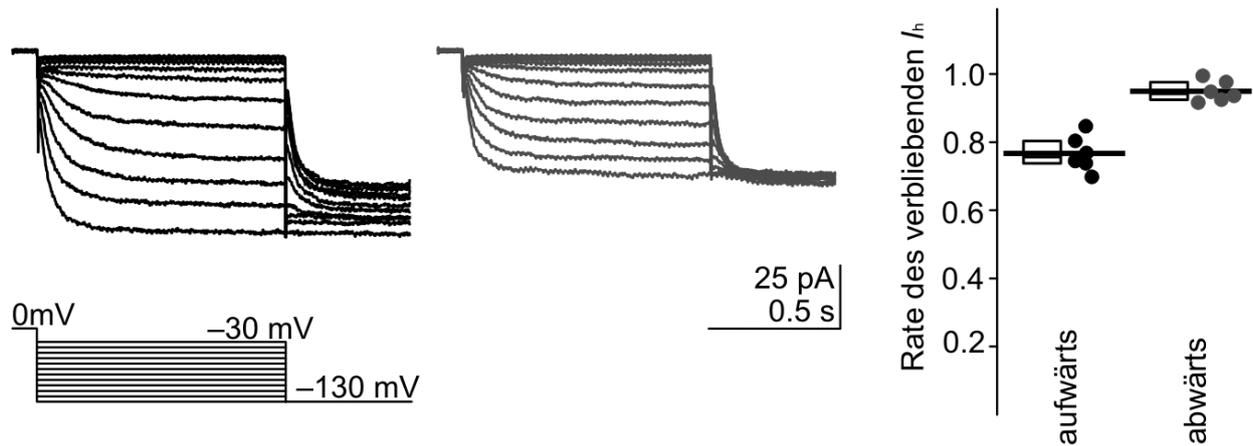


**Abb. 11** | Die Reduktion von  $I_h$  in Abhängigkeit zu wiederholten Aktivierungen. Die Reduktion von rHCN1 vermitteltem  $I_h$  hängt stärker von der wiederholten Aktivierung ab als von der angelegten Spannung. Oben: Beispielaufnahme. Nach einem 12 s langen Vorpuls ( $-100$  mV oder  $-80$  mV) habe ich im Abstand von 10s eine Aktivierung für 1 s bei  $-100$  mV durchgeführt (schwarz: erster Strom, grau: zehnter Strom). Unten: Nach einer Voraktivierung von zwölf Sekunden ist der folgende  $I_h$  stärker reduziert als nach einem nur 1 s dauernden Vorpuls (links). Jedoch ist eine weitere, signifikante Amplitudenreduktion nur durch eine weitere Kanalaktivierung zu erzielen. Diese Amplitudenreduktion fällt nach einem stärkeren Vorpuls deutlicher aus ( $-100$  mV) als nach einem schwächeren ( $-80$  mV) (Populationsdaten; erster (ctrl) und zehnter ( $10^{\text{th}}$ )  $I_h$ ). Da der Anteil des verbleibenden  $I_h$  nach einem Vorpuls von  $-100$  mV sowie von  $-80$  mV (rechts) ähnlich dem nach einem 1 s Vorpuls ist, hat die Länge der Voraktivierung auf das Ausmaß der Amplitudenminderung weniger Einfluss als die wiederholte Aktivierung (Abb. Modifiziert nach Barthel et al. 2016).

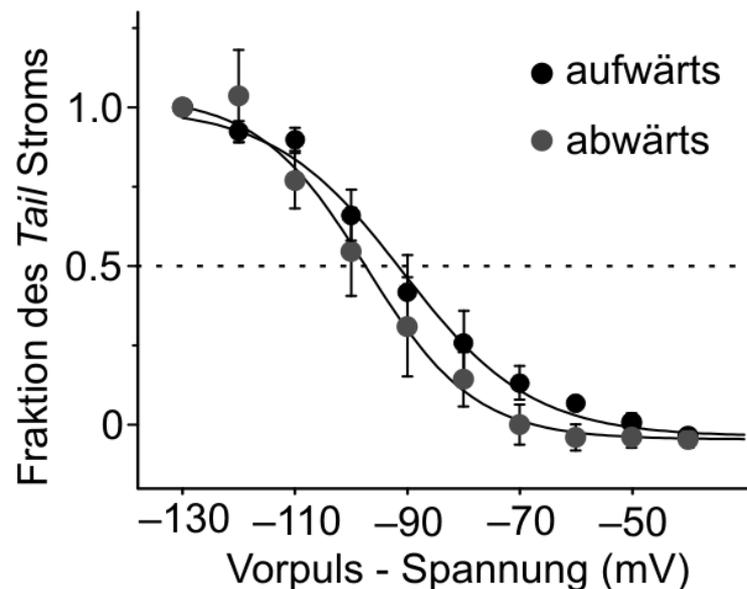
## 4.2 $I_h$ wird durch mehrfache Aktivierung stärker reduziert als durch die Stärke der zuvor applizierten Spannung und wird durch einen *shift* der spannungsabhängigen Aktivierung zu weiter negativen Potentialen begleitet

Die Öffnung von HCN-Kanälen ist spannungsabhängig (Wahl-Schott & Biel 2009). Verschiedene Spannungen könnten die Reduktion von  $I_h$  unterschiedlich beeinflussen, auch wenn ein langer Vorpuls, wie unter 4.1 beschrieben, nur einen geringen Einfluss auf das Verhalten von  $I_h$  hatte. Es gab erste Hinweise, dass verschieden starke Membranspannungen zu einer Amplitudenreduktion führen (Battefeld et al. 2010). Damals habe ich Spannungsfamilien von  $-30$  mV in  $10$  mV Schritten bis  $-130$  mV mit Aktivierungszeiten von  $2$  s abgeleitet. Nach jedem  $10$  mV Schritt führte ich eine Ableitung bei  $-130$  mV durch. Für die vorliegende Arbeit habe ich dieses Protokoll in umgekehrter Richtung (also von  $-130$  mV bis  $-30$  mV) durchgeführt und für eine bessere Vergleichbarkeit mit den für diese Arbeit konzipierten Versuchsreihen entsprechend angepasst ( $1$  s dauernde Spannungsschritte, nach jedem Spannungsschritt erfolgte eine Ableitung ebenfalls bei  $-130$  mV). Verglichen habe ich die erste  $-130$  mV Ableitung (nach  $-130$  mV Vorpuls) mit der letzten  $-130$  mV Ableitung (nach  $-30$  mV Vorpuls). Nach Abschluss einer Spannungsfamilie war die  $I_h$ -Amplitude um  $23.3 \pm 2.1\%$  vermindert ( $n = 6$ ,  $p < 0.05$ , *Wilcoxon signed rank test*). Dies entspricht der Reduktion nach einer zehnfachen Aktivierung bei  $-100$  mV ( $p = 0.13$ , *Mann Whitney U test*).

Die Anzahl der Aktivierungen, die  $I_h$  auf  $1/3$  reduzierten ( $\tau_{\text{reduct}}$ ), betrug  $6.2 \pm 1.6$  Hyperpolarisationen und entspricht somit der Anzahl bei einer zehnmaligen Aktivierung mit  $-100$  mV ( $p = 0.27$ , *Mann Whitney U test*). Im Anschluss an die erste Spannungsfamilie erfolgte eine zweite, diesmal wie in der Vorarbeit (Battefeld et al. 2010) von  $-30$  mV bis  $-130$  mV (Abb.12). Die nach der ersten Spannungsfamilie eingetretene und gegen Ende weitestgehend stabile  $I_h$ -Reduktion setzte sich während dieser zweiten Spannungsfamilie fort ( $5.1 \pm 1.2\%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0.05$ , *Wilcoxon signed rank test*). In Abb. 12 ist zudem der Anteil des verbliebenen  $I_h$  für die jeweiligen Spannungsfamilien dargestellt. Im Gegensatz zu der anfänglichen Vermutung (Battefeld et al. 2010) deuten die hier vorliegenden Daten darauf hin, dass die Stärke des Vorpulses für die Reduktion von rHCN1 vermitteltem  $I_h$  weniger entscheidend ist als die Aktivierung selbst. Würde die Stärke des Vorpulses allein die  $I_h$ -Reduktion bestimmen, wäre nach der (fast maximalen) Aktivierung bei  $-130$  mV eine weitere Reduktion von  $I_h$  nicht mehr möglich.



**Abb. 12** | Spannungsabhängige Aktivierung und  $I_h$ -Reduktion. Die Spannung des Vorpulses hat auf die Verminderung des  $I_h$  keinen Einfluss solange eine den Kanal aktivierende Spannung angelegt ist. Links: Beispielströme von rHCN1 vermitteltem  $I_h$  einer Spannungsfamilie (*cell-attached-Modus*). Ich habe Spannungsschritte von  $-130$  mV bis  $-30$  mV („aufwärts“, schwarz) und im Anschluss von  $-30$  mV bis  $-130$  mV („abwärts“, grau) angelegt. Nach jedem einzelnen Spannungsschritt habe ich  $I_h$  für  $0.5$  s auf  $-130$  mV vollständig aktiviert. Rechts dargestellt ist der Anteil des verbliebenen  $I_h$  der  $-130$  mV Ableitungen, die nach den Vorpulsen aufgenommen wurden. Zu beachten ist, dass alle Ströme auf dem maximalen Strom der jeweiligen Spannungsfamilie normiert sind. Während der zweiten Spannungsfamilie war die Stromreduktion somit deutlich kleiner (graue Kreise) (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).

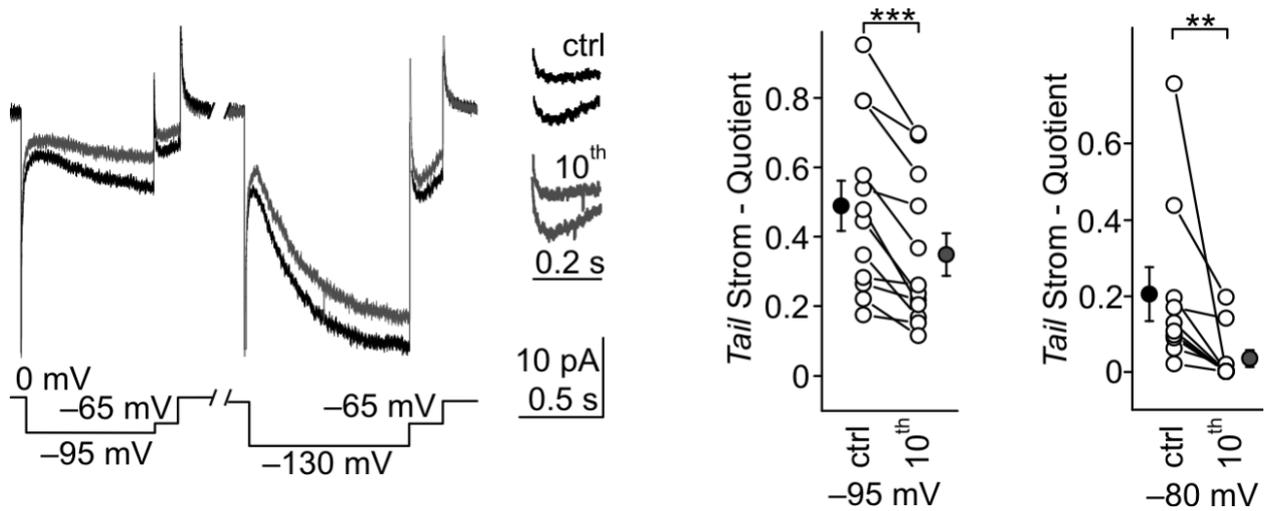


**Abb. 13** | Tail-Strom-Analyse. Für die Bestimmung der Spannung, die benötigt wird, um  $I_h$  halbmaximal zu aktivieren ( $V_{1/2}$ ), habe ich eine herkömmliche Tail-Strom-Analyse für die Spannungsfamilien (Abb. 12) durchgeführt. Für jede Familie normierte ich die Tail-Ströme auf den jeweils größten (für jeden Versuch einzeln) und trug diese gegen den entsprechenden Vorpuls auf. Im Anschluss führte ich einen Fit mittels Boltzmann-Gleichung durch. Für die Berechnung der  $V_{1/2}$  habe ich für jede einzelne Zelle  $V_{1/2}$  ermittelt und anschließend den Mittelwert gebildet (Wert im Text). Für die Abbildung errechnete ich hingegen die Mittelwerte der normierten Werte für jeden einzelnen Spannungsschritt und trug diese auf. Die schwarzen Kreise geben die Mittelwerte der normierten Werte für die aufsteigende Spannungsfamilie an (während der  $I_h$  Verminderung), die grauen Kreise die Mittelwerte der normierten Werte der absteigenden Spannungsfamilie (nach  $I_h$  Verminderung) (jeweils  $n = 6$ ) (Abb. modifiziert Barthel et al. 2016).

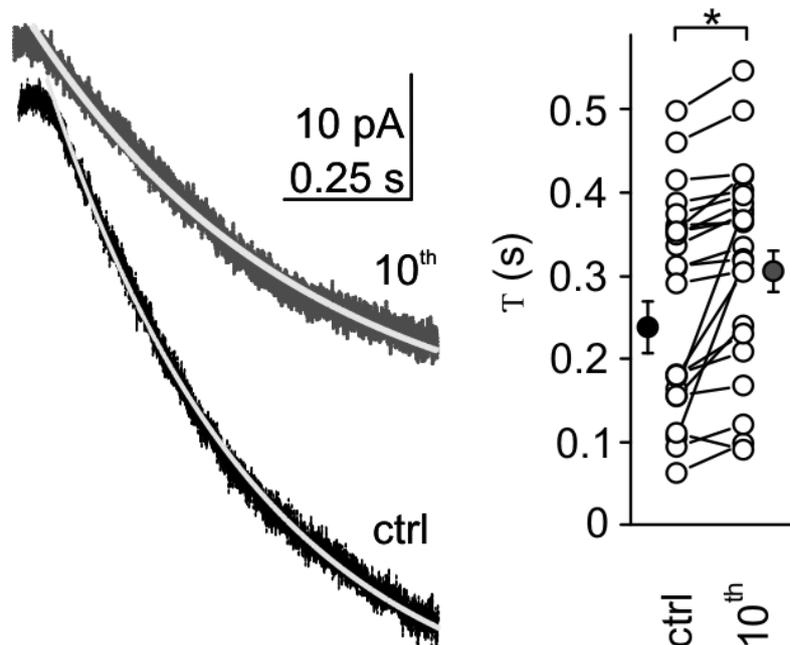
Der Haltestrom änderte sich weder während der ersten ( $I_{\text{holdini}} = 1.3 \pm 0.2 \text{ pA}$  vs.  $I_{\text{hold11}} = 1.2 \pm 0.2$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.68$ , *Wilcoxon signed rank test*), noch während der Durchführung der zweiten Spannungsfamilie ( $I_{\text{holdini}} = 1.2 \pm 0.3 \text{ pA}$  vs.  $I_{\text{hold11}} = 1.0 \pm 0.2 \text{ pA}$ ,  $n = 6$ ,  $p = 0.4$ , *Wilcoxon signed rank test*).

Vorarbeiten geben Hinweis darauf, dass die Aktivierung von  $I_h$  die spannungsabhängige Öffnung von rHCN1 beeinflusst. Eine herkömmliche *Tail-Strom-Analyse* ergab, dass die Spannung, die benötigt wird, um 50% des maximalen  $I_h$  zu generieren ( $V_{1/2}$ ), während der Reduktion  $-92.4 \text{ mV}$  (Battfeld et al. 2010) und nachdem die Reduktion eingetreten war,  $-96 \text{ mV}$  betrug (Reetz & Strauss 2013). Es wurde eine *Tail-Strom-Analyse* für beide Spannungsfamilien durchgeführt, jeweils für denselben *Patch*, wie in Abb. 13 gezeigt. Die  $V_{1/2}$  betrug  $-89.4 \pm 3.7 \text{ mV}$  während und  $-94.4 \pm 4.6 \text{ mV}$  nach der Reduktion von  $I_h$  ( $n = 6$ ,  $p = 0.09$ , *Wilcoxon signed rank test*) (Abb. 13).

Es ist möglich, dass jeder einzelne Spannungsschritt das rHCN1-*gating* beeinflusst und somit eine herkömmliche *Tail-Strom-Analyse* die spannungsabhängige Aktivierung von  $I_h$  ungenau darstellt. Ursache könnte beispielsweise ein Versatz der Strom-Spannungs-Kurve zu stärker negativen Potentialen sein, die während der Durchführung einer Spannungsfamilie eintritt. Zur Verminderung solcher Einflüsse wurde die Anzahl der Aktivierungen auf zwei beschränkt. Erstere erfolgte bei  $-95 \text{ mV}$  ( $\sim V_{1/2}$ ), die zweite bei  $-130 \text{ mV}$  ( $V_{\text{max}}$ ). Verglichen wurde das Verhältnis der *tail-current*-Ableitungen (gemessen bei  $-65 \text{ mV}$ ) vor und nach der Stromreduktion. In dem Fall, dass die Spannungsabhängigkeit von rHCN1 von einer wiederholten Aktivierung unbeeinflusst bleibt, würde das *tail-current*-Verhältnis gleich bleiben. Es zeigte sich jedoch in diesen Experimenten das Gegenteil, nämlich eine Verminderung des Verhältnisses ( $0.49 \pm 0.07$  gegenüber  $0.35 \pm 0.06$ ,  $n = 12$ ,  $p < 0.001$ , *paired t test*) (Abb. 14). Auch für eine Messreihe, bei der die Spannung der ersten Aktivierung  $-80 \text{ mV}$  betrug, zeigte sich eine Tendenz zur Verminderung des Verhältnisses ( $0.2 \pm 0.07$ , gegenüber  $0.03 \pm 0.02$ ,  $n = 10$ ,  $p = 0.01$ , *Wilcoxon signed rank test*). Die Halteströme waren über die Versuche unverändert (erste Aktivierung bei  $-95 \text{ mV}$ :  $I_{\text{holdini}} = 0.24 \pm 0.2 \text{ pA}$  vs.  $0.25 \pm 0.13 \text{ pA}$ ,  $n = 12$ ,  $p = 0.98$ , *paired t test*; bei  $-80 \text{ mV}$ :  $I_{\text{holdini}} = 0.12 \pm 0.22 \text{ pA}$  vs.  $-0.08 \pm 0.21$ ,  $n = 10$ ,  $p = 0.08$ , *Wilcoxon signed rank test*).



**Abb. 14** Ein Versatz der spannungsabhängigen rHCN1-Aktivierung zu stärker negativen Potentialen begleitet die  $I_h$ -Reduktion.  $I_h$  habe ich zuerst mittelstark bei  $-95$  mV, in einer weiteren Messreihe bei  $-80$  mV, und im Anschluss an jeweils beide Messreihen bei  $-130$  mV voll aktiviert. Nach jeder Aktivierung führte ich eine Tail-Strom-Ableitung bei  $-65$  mV durch. Dieses Protokoll habe ich zehnmal wiederholt. Zur Überprüfung, ob eine mehrfache Aktivierung eine Änderung der rHCN1 spannungsabhängigen Aktivierung bewirkt, habe ich den Quotienten aus zweitem und erstem Tail-Strom der ersten Ableitung (schwarz) und der zehnten Ableitung (grau) gebildet. Rechts sind die Quotienten als Populationsdaten für beide Messreihen dargestellt (erster (ctrl) und zehnter ( $10^{\text{th}}$ )) (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).



**Abb. 15** Die Aktivierungszeitkonstante von rHCN1 vermitteltem  $I_h$  verminderte sich durch zehnfache Aktivierung auf  $-100$  mV. Links sind zwei Beispielströme mit jeweiligen einfachen exponentiellen Funktionen (helle Linien) und rechts die Populationsdaten der Aktivierungszeitkonstanten ( $\tau$ ) über den Versuchsverlauf (erster (ctrl) und zehnter ( $10^{\text{th}}$ )) abgebildet (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).

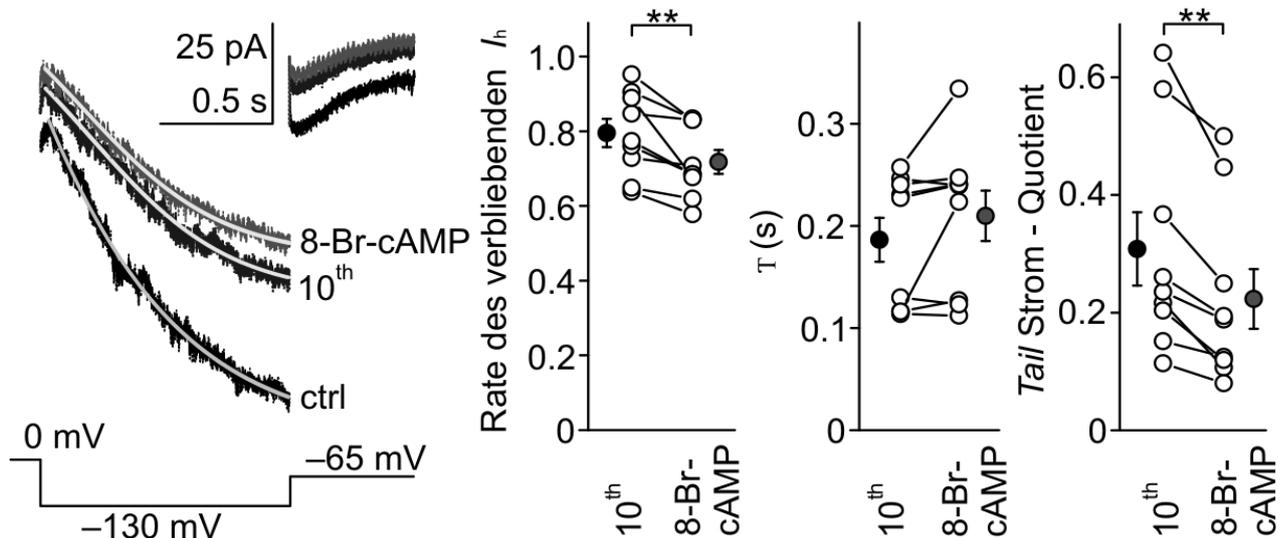
Übereinstimmend zu dem Versatz der spannungsabhängigen Aktivierung von rHCN1 zu stärker negativen Potentialen verlangsamte sich die Aktivierungskinetik von  $I_h$  (ein weiterer spannungsabhängiger Parameter) signifikant im *cell-attached*-Modus (von  $\tau = 268.9 \pm 26.7$  ms zu  $\tau = 317.1 \pm 25.3$  ms,  $n = 23$ ,  $p < 0.001$ , *paired t test*) (Abb. 15), jedoch nicht im *whole-cell*-Modus (von  $\tau = 180.9 \pm 42.0$  zu  $\tau = 159.1 \pm 33.2$  ms,  $n = 13$ ,  $p = 0.17$ , *Wilcoxon signed rank test*) nach zehn aufeinanderfolgenden Messungen.

Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass ein Versatz der Strom-Spannungs-Kurve zu stärker negativen Potentialen die Reduktion von  $I_h$  begleitet und möglicherweise die Reduktion selbst mit beeinflusst.

### **4.3 Sowohl hohe intrazelluläre cAMP-Konzentrationen als auch erhöhte Natriumkonzentrationen in der Pipette haben keinen Einfluss auf die $I_h$ Reduktion**

Die in dieser Arbeit untersuchte Amplitudenreduktion von rHCN1  $I_h$  - nach mehrfacher Voraktivierung - ist ähnlich der von HCN2 und HCN4, wenn geringe cAMP-Konzentrationen vorliegen: Es werden stärker negative Potentiale benötigt, um eine wiederkehrend gleich große  $I_h$ -Amplitude zu erhalten. Die Aktivierungskonstante von  $I_h$  vergrößert sich und die Amplitude des maximalen  $I_h$  ist vermindert (Baruscotti et al. 2005; Craven & Zagotta 2006). Diese Ähnlichkeit führt zu der Frage ob der Verlust von cAMP Ursache der in dieser Arbeit beobachteten Amplitudenminderung ist, auch wenn HCN1 durch cAMP nur gering moduliert wird. Eine wiederkehrende Öffnung der Kanäle könnte zu einem Verbrauch von cAMP führen. Nachdem ich  $I_h$  durch einen Puls bei  $-95$  mV und folgendem  $-130$  mV Puls (jeweils 1 s) im Abstand von 10 s für zehn Wiederholungen aktivierte (*cell-attached*-Modus), gab ich transmembrangängiges und nicht abbaubares cAMP (8Br-cAMP, 100  $\mu$ M) in die Badlösung. Die Amplitudenreduktion von  $I_h$  konnte hierdurch jedoch nicht umgekehrt werden (Abb. 16). Im Gegenteil, trotz intrazellulär erhöhtem 8Br-cAMP stellte sich eine weitere  $I_h$ -Reduktion durch weitere Aktivierung ein (von  $39.3 \pm 12.5$  pA zu  $33.9 \pm 9.6$  pA,  $n = 9$ ,  $p < 0.01$ , *Wilcoxon signed rank test*). Die Reduktion wurde von einem Versatz der spannungsabhängigen Aktivierung von rHCN1 begleitet. Dies wird durch die Verkleinerung der *Tail*-Strom-Quotienten nach der Zugabe von 8Br-cAMP abgebildet (von  $0.3 \pm 0.06$  zu  $0.2 \pm 0.05$ ,  $n = 9$ ,  $p < 0.01$ , *Wilcoxon signed rank test*). Die Aktivierungszeitkonstante betrug  $\tau = 186.3$  ms nach durch wiederkehrende

Aktivierung induzierte  $I_h$ -Verminderung und  $\tau = 209.8 \pm 24.6$  ms nach der Aufsättigung mit 8Br-cAMP ( $n = 9$ ,  $p = 0.07$ , *Wilcoxon signed rank test*) (Abb. 16). Die Halteströme blieben über die Versuche gleich ( $I_{holdini} = 0.37 \pm 0.21$  pA vs.  $I_{hold8Br-cAMP} = 0.17 \pm 0.19$  pA,  $p = 0.28$ , *paired t test*).

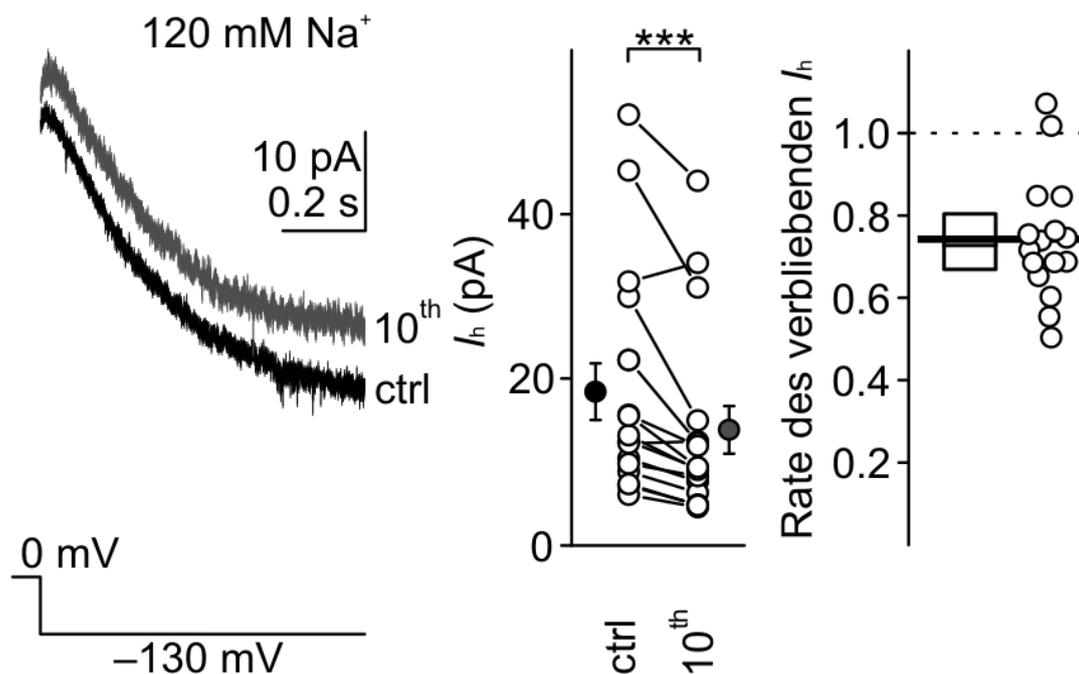


**Abb. 16** | Die intrazelluläre Aufsättigung von cAMP (8Br-cAMP) führt nicht zu einer Umkehrung oder einem Aufhalten der  $I_h$ -Amplitudenreduktion im *cell-attached*-Modus. Links: Beispielströme, die bei einem Potential von  $-130$  mV abgeleitet wurden. Kontrollstrom (schwarz) nach Etablierung des *cell-attached*-Modus; zehnte Aktivierung ( $10^{\text{th}}$ ) (dunkelgrau), Ableitung nach Aufsättigung mit 8Br-cAMP (hellgrau). Zuvor wurde, wie in Abb.14 gezeigt, eine Aktivierung mit  $-95$  mV durchgeführt und nach beiden Aktivierungen ein *Tail*-Strom bei  $-65$  mV gemessen. Die Aufnahmen wurden im Abstand von 10 s durchgeführt. Nach dem Einwaschen von 8Br-cAMP wurde 3 min gewartet, bevor eine erneute Ableitung erfolgte. Die durchgehenden hellen Linien über den Beispielströmen geben jeweils eine einfache exponentielle Funktion an. Die linken Populationsdaten zeigen den Anteil des verbleibenden  $I_h$  im Vergleich zum Kontrollstrom. Die mittleren Populationsdaten zeigen die Aktivierungskonstanten ( $\tau$ ) von  $I_h$  für die zehnte Aufnahme ohne und die erste Aufnahme mit 8Br-cAMP bei  $-130$  mV. Die rechten Populationsdaten zeigen den Quotienten der  $-65$  mV *Tail*-Ströme, ebenfalls für die zehnte Aufnahme ohne und die erste Aufnahme mit 8Br-cAMP (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).

$I_h$  kann durch wiederholte Aktivierung geblockt werden, ohne dass ein Versatz der spannungsabhängigen Aktivierung eintritt, wenn hohe extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Level vorliegen (Pittoors & Van Bogaert 2015). Auch wenn sich die Messtechnik von der für diese Arbeit verwendeten grundlegend unterscheidet (HCN2 Expression in *Xenopus* Oozyten sowie Zweielektroden-Spannungsklemme), sollte der Einfluss einer hohen extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration (in der Pipette) auf  $I_h$  untersucht werden. Die bisherigen Versuche wurden mit hoher  $\text{K}^+$ -Konzentration in der Pipette durchgeführt. Nun füllte ich für *cell-attached*-Aufnahmen die Messpipette mit einer Lösung mit hoher  $\text{Na}^+$ -Konzentration (120 mM). Hierdurch sollte der Einfluss anderer Ionen, insbesondere von  $\text{K}^+$ , vermieden werden. Hohe  $\text{K}^+$ -Spiegel verändern

Aktivierungskinetiken und Permeabilitätseigenschaften von HCN-Kanälen (Macri et al. 2002; Azene et al. 2003). Die Kanalaktivierung führte auch mit hoher extrazellulärer  $\text{Na}^+$ -Konzentration zu einer Verminderung von rHCN1 vermitteltem  $I_h$ . Für die Messungen verwendete ich dasselbe Protokoll wie für die 8Br-cAMP-Messungen (Abb. 17). Die  $I_h$ -Reduktion war mit  $25.8 \pm 3.7\%$  ( $n = 16$ ,  $p < 0.001$ , *Wilcoxon rank test*) gleich derer, die eintrat, wenn  $\text{K}^+$  das führende Kation in der Pipette war ( $p = 0.38$ , T-Test). Ebenfalls verlangsamte sich die Aktivierungszeitkonstante von  $275.6 \pm 36.0$  ms auf  $331.2 \pm 37.9$  ms,  $p < 0.001$ ,  $n = 16$ , *paired t test*). Auch dieser Anstieg der Konstante entsprach jener, wenn  $\text{K}^+$  das führende Kation außerhalb der Zellmembran auf dem *Patch* war ( $25.2 \pm 6.6\%$  vs.  $29.1 \pm 10.3\%$ , vergleichend,  $p = 0.8$ , *Mann Whitney U test*).

Zusammenfassend ändert sowohl die Erhöhung des intrazellulären cAMP, als auch ein Austausch des führenden extrazellulären Kations nichts an der vorpulsinduzierten Amplitudenminderung von rHCN1 vermitteltem  $I_h$ .

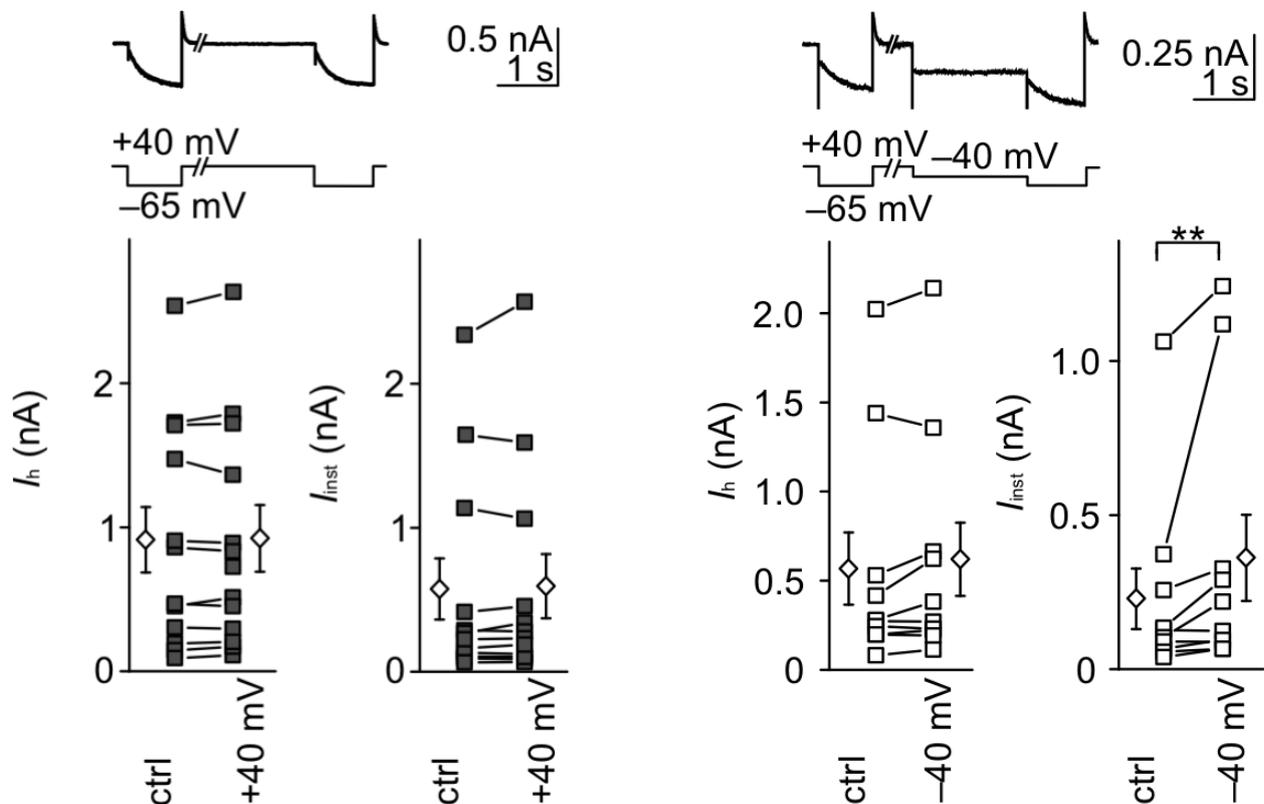


**Abb. 17** | Eine hohe extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration hat keinen Einfluss auf die Amplitudenreduktion von rHCN1 vermitteltem  $I_h$ . Links sind zwei Beispielströme aufgetragen, die bei  $-130\text{mV}$  und einer Konzentration von  $120\text{ mm Na}^+$  in der Pipette abgeleitet wurden. Die Populationsdaten zeigen die Reduktion der Stromamplitude zwischen erster (ctrl.) und zehnter ( $10^{\text{th}}$ ) Ableitung. Rechts ist der Anteil des verbliebenen  $I_h$ , ebenfalls nach erster und zehnter Ableitung, dargestellt (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).

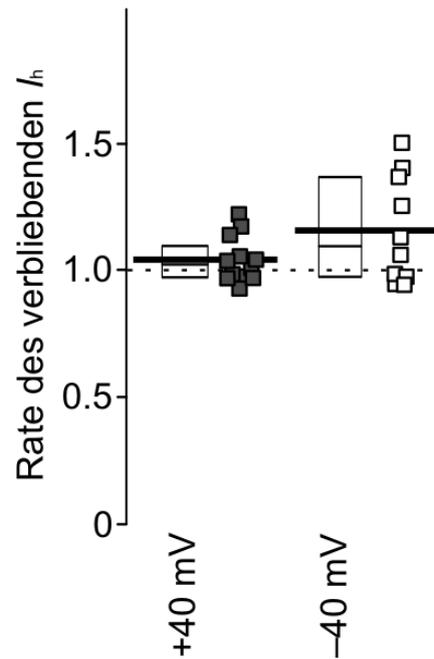
#### 4.4 Die $I_h$ -Reduktion bleibt im *whole-cell*-Modus aus und wird wahrscheinlich von einem Versatz der spannungsabhängigen Aktivierung begleitet

Es ist bekannt, dass spHCN-Kanäle eine spannungsabhängige Hysterese während der Öffnung durchlaufen, die von einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung begleitet wird, wenn zuvor hyperpolarisierende, den Kanal aktivierende Potentiale angelegt wurden (Männikkö et al. 2005). Wenn eine Änderung des Haltepotentials zu einem Versatz der spannungsabhängigen Kanalaktivierung führt, kann dies mit einer Reduktion von  $I_h$  einhergehen. Konformationsänderungen des Kanals scheinen mit der  $I_h$ -Reduktion einherzugehen. Möglicherweise ist eine Wiederöffnung der Kanäle notwendig, um diese Konformationsänderung wieder aufzuheben. Interessant ist zudem, ob der Amplitudenanstieg von rHCN1- $I_h$ , der nach der Etablierung des *whole-cell*-Modus eintritt (Battfeld et al. 2010), durch den Austausch des Zytosols mit der Pipettenlösung bedingt ist oder durch eine Änderung der HCN-Konformation. Wobei letztere wiederum Folge des Zytosolaustausches sein kann. Für die hier durchgeführten Versuche habe ich das Haltepotential im *whole-cell*-Modus auf +40 mV geklemmt, um eine Kanalvoraktivierung zu verhindern und applizierte moderate Spannungen, die den rHCN1 jedoch aktivierten (-65 mV), um mögliche Begleiteffekte, die mit einer starken Hyperpolarisation einhergehen (z.B. eine Spannungshysterese), zu vermeiden. Nach dem Aufreißen der Zellmembran (Etablierung des *whole-cell*-Modus) habe ich zwei bis drei Minuten gewartet, damit ein ausreichender Austausch zwischen Pipetten- und Intrazellulärflüssigkeit stattfinden konnte und der in dieser Phase auftretende schnelle Anstieg von  $I_h$  (Battfeld et al. 2010) vor Beginn der Messungen abgeschlossen war. Weitere drei Minuten wartete ich zwischen beiden -65 mV Ableitungen. Unter diesen Bedingungen änderte sich weder die  $I_h$ -Amplitude ( $I_{hini} = 905.9 \pm 227.3$  pA gegenüber  $I_{hsecond} = 915 \pm 231.2$  pA,  $n = 12$ ,  $p = 0.56$ , *paired t test*) noch die  $I_{inst}$ -Amplitude ( $I_{instini} = 572 \pm 212.7$  pA gegenüber  $I_{instsecond} = 591.7 \pm 223.5$  pA,  $n = 12$ ,  $p = 0.8$ , *Wilcoxon signed rank test*) (Abb. 18). Die Aktivierungszeitkonstanten der beiden  $I_h$ -Ableitungen waren unverändert ( $\tau_{actfirst} = 347.3 \pm 57$  ms gegenüber  $\tau_{actsecond} = 329.6 \pm 45.4$  ms,  $n = 12$ ,  $p = 0.68$ , *paired t test*). Die Halteströme blieben über die Versuchsdauer gleich ( $I_{holdini} = 1.13 \pm 0.95$  pA gegenüber  $I_{holdsecond} = 1.2 \pm 1.0$  pA,  $n = 12$ ,  $p = 0.43$ , *Wilcoxon signed rank test*). Interessanterweise führte ein unterschwelliger Vorpuls (Battfeld et al. 2010) bei -40 mV (für 2 s), der der zweiten -65 mV Ableitung vorgeschaltet war, zu einer Amplitudensteigerung von  $I_h$  ( $I_{hini} = 568.2 \pm 202.3$  pA gegenüber  $I_{hsecond} = 619.4 \pm 205.1$  pA,  $n = 10$ ,  $p = 0.13$ , *Wilcoxon signed rank test*) und zu einem Anstieg von  $I_{inst}$  ( $I_{instini} = 230.8 \pm 98$  pA gegenüber  $I_{instsecond} =$

$363.6 \pm 139.6$  pA,  $n = 10$ ,  $p < 0.01$ , *Wilcoxon signed rank test*) (Abb. 18). Ich konnte ebenfalls eine signifikante Zunahme der Aktivierungszeitkonstante von  $I_h$  messen ( $\tau_{act-40mV} = 386.9 \pm 52.6$  ms gegenüber  $\tau_{act-40mV} = 282 \pm 31.1$  ms,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ , *paired t test*). Die Daten stimmen mit denen überein, die für eine spannungsabhängige Hysterese für HCN-Kanäle beschrieben wurde (Männikkö et al. 2005). Der Haltestrom blieb über die Versuche unverändert ( $I_{holdini} = 52.9 \pm 12.4$  pA. gegenüber  $I_{holdsecond} = 66.0 \pm 13.9$  pA,  $n = 10$ ,  $p = 0.06$ , *paired t test*). Zusammenfassend führt das Aufreißen der Zellmembran im *whole-cell*-Modus zu dem Ausbleiben der  $I_h$ -Reduktion und zu einer teilweisen spannungsabhängigen Hysterese von rHCN1. Der Vergleich der Raten des verbliebenen  $I_h$  zwischen den Versuchen mit einem Vorpuls von +40 mV und -40 mV unterstützt diesen Ansatz ( $1.04 \pm 0.03$ ,  $n = 12$  und  $1.15 \pm 0.07$ ,  $n = 10$ ) (Abb. 19).



**Abb. 18** | Das Ausbleiben der rHCN1- $I_h$ -Reduktion nach dem Austausch von Intrazellulärflüssigkeit und Pipettenlösung ist zeitabhängig und teilweise von einer spannungsabhängigen Hysterese begleitet. Oben: Beispielströme von im *whole-cell*-Modus aufgenommenen rHCN1 vermitteltem  $I_h$ . Nach der Etablierung des *whole-cell*-Modus wurde 3 min gewartet. Das Haltepotential habe ich auf +40 mV determiniert und  $I_h$  für 1s bei -65 mV aktiviert. Im Anschluss wartete ich erneut 3 min bei +40 mV und für die letzten 2 s in einem abgeänderten Protokoll bei -40 mV, bevor eine erneute Aktivierung bei -65 mV erfolgte (siehe Pulsprotokolle unter den Beispielströmen). Die Populationsdaten von  $I_h$  und  $I_{inst}$  wurden nach dem Haltepotential von jeweils +40 mV für die erste (ctrl) und zweite (+40 mV) Ableitung aufgenommen (grauer Datensatz, links) oder nach einem Haltepotential von +40 mV für die erste (ctrl) und nach einem Haltepotential von -40 mV für die zweite Ableitung (-40 mV) (weißer Datensatz, rechts) (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).



**Abb. 19** | Anteile des verbliebenen  $I_h$  nach positivem oder negativem Vorpuls. Verglichen sind die Anteile des verbliebenen  $I_h$ , nachdem vor dem zweiten Puls entweder +40 mV (grauer Datensatz) oder -40 mV (weißer Datensatz) angelegt wurden (Abb. modifiziert nach Barthel et al. 2016).

## 5 Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit lagen unterschiedliche Daten bezüglich des Einflusses eines voraktivierenden Vorpulses auf  $I_h$  vor. In dieser Arbeit sollte im HEK293 Expressionssystem untersucht werden, ob und welche biophysikalischen Eigenschaften des rHCN1 vermittelten  $I_h$  durch wiederkehrende Voraktivierung beeinflusst werden. Die Daten weisen darauf hin, dass eine wiederholte Kanalaktivierung zu einer Reduktion von  $I_h$  führt, wenn die Membran intakt ist und ausbleibt, wenn die Kontinuität der Zellmembran gestört ist. Des Weiteren ist die Spannung der Voraktivierung für die  $I_h$ -Reduktion von geringerer Bedeutung als die Kanalaktivierung selbst. Die Verminderung der Amplitude von rHCN1 vermitteltem  $I_h$  geht wahrscheinlich mit einer Lageveränderung des Spannungssensors einher, da langsame Komponenten von  $I_h$  eine stärkere Reduktion zeigten als die instantane Stromkomponente und sich das *gating* zu stärker negativen Potentialen verschob, wenn eine Voraktivierung erfolgte. cAMP hat auf die  $I_h$ -Reduktion ebenso wenig Einfluss wie der Austausch des primären extrazellulären Kations und das Ausbleiben der  $I_h$ -Reduktion im *whole-cell*-Modus ist teilweise auf eine spannungsbedingte

Hysterese zurückzuführen. Letzteres deutet darauf hin, dass eine Kanalvoraktivierung zu einer Konformationsänderung des Spannungssensors S4 von rHCN1 führt (Männikkö et al. 2002).

## 5.2 Gating und Kopplung

Dass die Verminderung der  $I_h$ -Amplitude auch durch die intrazelluläre Aufsättigung mit 8Br-cAMP nicht umkehrbar oder aufzuhalten gewesen ist, kann auf das allgemein geringe Ansprechen von HCN1 auf cAMP zurückgeführt werden (Wainger et al. 2001). Das Vorliegen von cAMP hebt den inaktivierten Status wahrscheinlich nicht auf, sondern unterstützt das Gleichgewicht zwischen geschlossenem-aktiviertem und offenem Status (Shin et al. 2004). Im Gegensatz zu HCN2-Kanälen (Shin et al. 2004) war die Reduktion des rHCN1 vermittelten  $I_h$  nicht umkehrbar und akkumulierte darüber hinaus im weiteren Versuchsverlauf. Wenn ein Entkoppeln (*uncoupling*) oder ein Auseinanderdriften (*slippage*) zwischen Spannungssensor und Kanal-Tor der durch Voraktivierung induzierten rHCN1- $I_h$ -Reduktion zugrunde liegen, sind diese möglicherweise nicht vorübergehend. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die rHCN1  $I_h$ -Reduktion durch die Tendenz zu einem (wieder)-Schließen des intrazellulären Aktivierungs-Tors hervorgerufen wird und hierdurch eine Abnahme der Spannungssensibilität eintritt, ähnlich wie in HCN2 und spHCN (Shin et al. 2004).

Auch dass eine Reduktion von  $I_h$  während der Aktivierung von rHCN1 eintritt (also während Ionen durch die Kanalpore fließen) spricht dafür, dass Mechanismen, wie zum Beispiel eine veränderte Kanalsteuerung, für die Reduktion von  $I_h$  ursächlich sind. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten weisen darauf hin, dass eine Beteiligung der äußeren Pore an der Amplitudenminderung von  $I_h$  unwahrscheinlich ist, da dieser Effekt in *whole-cell*-Messungen ausbleibt und somit wahrscheinlich von intrazellulären Faktoren abhängt. Die Ergebnisse stimmen zudem mit der Annahme überein, dass die HCN-Pore an *gating*-Mechanismen beteiligt ist (Azene et al. 2003; Azene et al. 2005). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Konformationsänderung der rHCN1-Tertiärstruktur oder eine Membraninsertion der Kanäle stattfindet. Auch kann die Kanalpore selbst einer Strukturänderung unterliegen.

Interessanterweise ist die in der vorliegenden Arbeit beschriebene  $I_h$ -Verminderung ähnlich derer, die für spHCN-vermittelten  $I_h$  gezeigt wurde (ebenfalls im HEK293 Expressionssystem und voraktivierungsabhängig) (Shin et al. 2004). In den für die vorliegende Arbeit verwendeten Protokollen folgten die Vorpulse jedoch nicht direkt auf die Testpulse. Auch waren die Vorpulse

deutlich kürzer und  $I_h$  aktivierte langsamer. Ebenso hatte cAMP keinen Einfluss auf die Reduktion von  $I_h$ .

### 5.3 Kanalmodulatoren

Es sind viele Kanalmodulatoren bekannt, die auf HCN-Kanäle wirken (He et al. 2014, Einleitung). Neben intrazellulären Metaboliten (DiFrancesco & Tortora 1991; Pian et al. 2006) haben auch kovalent bindende Modulatoren (Zong et al. 2005; Zha et al. 2008; Jung et al. 2010) sowie auxiliäre Bestandteile (Santoro et al. 2009; Lewis et al. 2009; Noam et al. 2014) Einfluss auf die HCN-Aktivität. Das Fehlen einer Amplitudenreduktion im *whole-cell*-Modus lässt vermuten, dass intrazelluläre Bestandteile wie Kanalmodulatoren an der Alteration von  $I_h$  beteiligt sind, die während der Ganzzelleableitungen entweder in die Pipette ausgewaschen oder in anderer Weise beeinflusst werden. Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 ist endogen in HEK293 Zellen exprimiert und führt zu einer Abnahme der Zellmembranexprimierung von HCN1 in HEK293 Zellen, zu einer Amplitudenreduktion von  $I_h$  in *Xenopus leavis* Oozyten sowie zu einem Versatz der Strom-Spannungs-Kurve zu stärker negativen Potentialen (Wilkars et al. 2014). Die wiederholte Aktivierung könnte zu einer Konformationsänderung von rHCN1 führen, wodurch eine Bindung von Nedd4-2 an die PY-motif-Region begünstigt wird, und der Kanalproteinkomplex in der Folge verstärkt ubiquitiniert und weniger glykosiliert wird. Eine Ubiquitinierung der Kanäle reguliert wahrscheinlich die Anzahl der Kanäle, die in der Zellmembran lokalisiert sind (Hardel et al. 2008). Zudem könnten Änderungen der rHCN1-Glykosilierung Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit und das Kanal-*gating* haben, wenn sich die Anzahl elektrisch geladener Zuckermoleküle ändert. Hierdurch könnten veränderte Wechselwirkungen mit dem extrazellulären elektrischen Feld auftreten. Letzteres wurde bisher nur für bestimmte Natrium-Kanäle gezeigt (Tyrrell et al. 2001). An der Reduktion von  $I_h$  hat möglicherweise auch Filamin A Anteil. Das Protein ist an der Verankerung von Transmembranproteinen in das Aktin-Zytoskelett beteiligt (Gravante et al. 2004). Hyperpolarisierende Potentiale können zu einer verstärkten Interaktion zwischen HCN1 und Filamin A führen, wodurch HCN1 erst bei stärker negativen Spannungen aktiviert und die Aktivierungskinetik von  $I_h$  herabgesetzt wird (Gravante et al. 2004). Des Weiteren wird HCN1 durch Filamin A selektiv und reversibel internalisiert und endosomal akkumuliert (Noam et al. 2014). Filamin A liegt in HEK293 Zellen endogen vor (Bachmann et al. 2006). Eine Beteiligung des Hilfsproteins TRIP8b an der Amplitudenreduktion von  $I_h$  scheint hingegen weniger

wahrscheinlich. TRIP8b wird zwar durch elektrische Aktivität beeinflusst und führt in aktiviertem Zustand ebenfalls zu einem Versatz der Strom-Spannungs-Kurve von HCN-Kanälen zu stärker negativen Potentialen sowie zu einer Verlangsamung der Aktivierungszeit der Kanäle (He et al. 2014; Santoro et al. 2009), jedoch wird TRIP8b in HEK293 Zellen nicht endogen exprimiert. In *in vivo* oder in neuronalen Systemen könnten die Funktionen dieser Proteine noch komplizierter sein, wie zum Beispiel durch Interaktionen mit anderen Proteinen oder der genannten Proteine untereinander.

#### **5.4 Erhöhte intrazelluläre $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration als mögliche Ursache der $I_h$ -Reduktion**

Ein  $\text{Ca}^{++}$ -Einstrom durch geöffnete rHCN1-Kanäle könnte an der Reduktion von  $I_h$  beteiligt sein (Yu et al. 2004), auch wenn der Anteil von  $\text{Ca}^{++}$  am  $I_h$  mit  $0.6 \pm 0.002$  % sehr gering ist (HCN4, exprimiert in HEK293 Zellen (Yu et al. 2004)). Das Ausmaß der Amplitudenreduktion sollte mit einer starken Änderung der Aktivierungszeitkonstante von  $I_h$  einhergehen, dies war jedoch in den vorliegenden Experimenten nicht der Fall. Ein Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$  durch Einstrom oder aber auch durch die Freisetzung von  $\text{Ca}^{++}$  aus intrazellulären Speichern (oder beides) kann zu einer Aktivierung von Phospholipasen und Proteasen führen (Caro & Cederbaum 2002; Trump & Berezsky 1996), die einen Abbau von rHCN1 fördern könnten.

Denkbar wäre eine Aktivierung der PKC. Die PKC wird in HEK293 Zellen endogen exprimiert (Kawasaki et al. 2010) und führt zu einer Reduktion von rHCN1 vermitteltem  $I_h$  (Reetz & Strauss 2013). Diese Reduktion ist unter bestimmten Voraussetzungen von einem Versatz der spannungsabhängigen Aktivierung von  $I_h$  zu stärker negativen Potentialen begleitet (He et al. 2014). Für die in dieser Arbeit beschriebene Reduktion von  $I_h$  scheint eine Beteiligung der PKC jedoch unwahrscheinlich, da die Spannungsabhängigkeit von rHCN1 in HEK293 Zellen durch einen PKC-Anstieg unbeeinflusst war (Reetz & Strauss 2013).

HCN-Kanäle sind als Schrittmacherströme an der Rhythmogenese in unterschiedlichen Zellsystemen des ZNS wie z.B. in GABA-ergen Neuronen des medialen Septums (Kocsis & Li 2004; Xu et al. 2004) oder thalamocorticalen Neuronen (Jahnsen & Llinás 1984; Llinás & Jahnsen 1982; McCormick & Pape 1990; He et al. 2014) beteiligt. Sie verursachen bei Aktivierung eine Depolarisation der Zellmembran. Für thalamocorticale Neuronen konnte gezeigt werden, dass diese Depolarisation zu einer Aktivierung von  $\text{Ca}^{++}$ -Kanälen führt, die sich schon bei niedrigen Potentialen öffnen. Die Öffnung dauert mehrere zehntel Millisekunden,

wodurch eine Salve von Aktionspotentialen gefeuert wird. Währenddessen ist der  $I_h$  inaktiv, wodurch eine tiefe Hyperpolarisation am Ende der  $Ca^{++}$ -Kanalöffnung entsteht und die Ausgangssituation erreicht wird (He et al. 2014). Aufgrund dieses Modells ist es denkbar, dass durch die Öffnung von  $Ca^{++}$ -Kanälen eine dauerhafte Inaktivierung der rHCN1-Kanäle eintritt. Es wäre interessant zu erheben, ob durch die wiederholte Aktivierung von rHCN1 begleitend ausreichend häufig  $Ca^{++}$ -Kanäle geöffnet werden, um diesen hemmenden Effekt zu generieren.

## 5.5 Instantaner Strom und $I_h$ -Reduktion

Die Kinetik des  $I_h$  zeigt einen spannungsunabhängigen und schnell einsetzenden  $I_{inst}$ , der unmittelbar vor  $I_{slow}$  gemessen werden kann.

Diese instantane Stromkomponente beeinflusst vermutlich wesentlich die Funktion des HCN-Stroms in Neuronen und Muskelzellen. Es wird vermutet, dass der instantane Strom durch eine Beschleunigung von De- und Repolarisation die Erregbarkeit von Neuronen determiniert (Proenza & Yellen 2006). In der Literatur werden verschiedene Ansätze zur Erklärung von  $I_{inst}$  genannt. Er wird als Leckstrom (Proenza et al. 2002), als ein vor der maximalen  $I_h$  Amplitude einsetzender Strom, der einer Hysterese unterliegt (Männikkö et al. 2005), sowie als ein Residuum unvollständiger Kanalinaktivierung (Mistrík et al. 2006) beschrieben.

Es wird diskutiert ob zellintrinsische, molekularbiologische (Proenza et al. 2002) oder externe Faktoren, wie Voraktivierung und Aktivierungsdauer (Männikkö et al. 2005), oder eine Kombination aus beidem (Mistrík et al. 2006) das Auftreten von  $I_{inst}$  beeinflussen. In HCN2-Deletionsversuchen konnte kein instantaner Strom nachgewiesen werden und Mutationen in der S4-Domäne, dem Spannungssensor, hatten keinen Einfluss auf  $I_{inst}$  (Proenza et al. 2002).

Auch in dieser Arbeit konnte eine Abhängigkeit von  $I_{inst}$  und  $I_{slow}$  gezeigt werden (starke Korrelation zwischen  $I_{inst}$  und  $I_{slow}$ ). Dies bestärkt die Ergebnisse von Proenza et al. (2002). Ebenfalls übereinstimmend ist der Erklärungsansatz, dass durch die Expression von rHCN1 ständig offene Kanäle (Leckströme) vorliegen. Wie unter Kapitel 5.2 beschrieben, scheint es nicht unwahrscheinlich, dass ein *uncoupling* an der Alteration von  $I_h$  beteiligt ist. Der fehlende Einfluss von S4-Mutationsversuchen auf  $I_{inst}$  unterstützt diese Annahme. Männikkö et al. (2005) vermuten, dass durch Stärke und Länge der Voraktivierung eine Konformationsänderung von HCN eintritt, die zur Genese von  $I_{inst}$  führt. Eine lange Voraktivierung führte in *whole-cell*-Ableitungen zu einem Anstieg von  $I_{inst}$ . Zudem war die Amplitude von  $I_{inst}$  nach repetitiver Aktivierung um bis zu 50% größer als in der Kontrollmessung (Mistrík et al. 2006).

Interessanterweise blieb ein signifikanter Amplitudenanstieg von  $I_{\text{inst}}$  in HCN-Kanälen mit schneller Kinetik (HCN1 und HCN2) aus. In dieser Arbeit hingegen führte eine unterschwellige Voraktivierung ( $-40$  mV) zu einem Anstieg von  $I_{\text{inst}}$  in *whole-cell*-Ableitungen. Der maßgebliche Unterschied in den Versuchsdurchführungen bestand darin, dass in dieser Arbeit ein Haltepotential von  $+40$  mV gewählt wurde, um eine Kanalaktivierung zu vermeiden. Die Ableitung von  $I_{\text{h}}$  erfolgte bei moderaten  $-65$  mV. Mistrík et al. (2006) determinierten hingegen ein Haltepotential von  $-54$  mV, das bereits zu einer Voraktivierung von HCN führte, wodurch der instantane Strom möglicherweise schon anstieg, bevor die eigentliche Ableitung von  $I_{\text{inst}}$  und  $I_{\text{h}}$  bei (stark hyperpolarisierenden)  $-154$  mV erfolgte. Der Vergleich der beiden Datensätze deutet darauf hin, dass die schnelle Stromkomponente durch die Stärke der Voraktivierung beeinflusst wird, jedoch auf die Reduktion der langsamen Stromkomponente keinen Einfluss hat.

## 5.6 Mechanismen der Inaktivierung von anderen spannungsgesteuerten Ionenkanälen – ein Vergleich

Ionenkanäle zeigen eine Tendenz zu verminderter Aktivität, wenn aktivitätssteigernde Faktoren zunehmen (Bähring & Covarrubias 2011). Diese Inaktivierung von (liganden-) und spannungsgesteuerten Ionenkanälen wird auf molekulare Strukturänderungen zurückgeführt. In  $\text{Na}^+$ -Kanälen beispielsweise liegt ein Aktivierungs-Tor (*a*-Tor) vor, das sich schrittweise öffnet, wenn ein depolarisierendes Potential erreicht wird. Ein zweites Inaktivierungs-Tor (*i*-Tor) ist hingegen im Ruhezustand des Kanals geöffnet und schließt nach erfolgter Depolarisation verzögert (Armstrong 2006). Die eigentliche Kanalinaktivierung ist mit dem Spannungssensor verlinkt. Erst nach teilweiser oder vollständiger Aktivierung des *a*-Tors ist über den Spannungssensor eine Aktivierung des *i*-Tors möglich (Armstrong & Bezanilla 1977; Armstrong 2006). Eine Inaktivierung des Kanals tritt ein, wenn das *a*-Tor stärker geöffnet ist als das *i*-Tor. Ist eine Inaktivierung eingetreten, fließt durch den Kanal kein Strom mehr. Findet eine Repolarisation statt, schließt sich das *i*-Tor erneut und die Ausgangskonfiguration wird erreicht (Armstrong 2006).

Dieses Modell ist teilweise auf HCN-Kanäle übertragbar. Wie oben diskutiert, ist eine Beteiligung des Spannungssensors an der  $I_{\text{h}}$ -Reduktion denkbar. Eine mehrfache Aktivierung von rHCN könnte, ähnlich wie für die  $\text{Na}^+$ -Kanäle, zu einer schrittweisen Öffnung eines Anteils der Kanalpore führen. Eine inaktivierende Komponente wird im Verlauf mit dieser zunehmenden Öffnung aktiv, vermittelt über den Spannungssensor. Hierbei scheint,

entsprechend der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse, die Stärke der jeweiligen Membranhypervolarisation keinen Einfluss zu haben. In den vier Konformationen, die spannungsgesteuerte Ionenkanäle einnehmen können (ruhend, teilaktiviert, geöffnet und geschlossen), fließen nur während des geöffneten Status Ionen. Im teilaktivierten Zustand fließen demnach keine Ionen, der Kanal zeigt jedoch eine verstärkte Bereitschaft, in einen geöffneten Zustand überzugehen. Aus dem inaktivierten Zustand heraus öffnen sich die Ionenkanäle nur schwer erneut, auch wenn eine Teilaktivierung vorliegt (Bähring & Covarrubias 2011). Das Ausbleiben der Freisetzung von der  $I_h$ -Reduktion in den hier gezeigten Versuchen ist mit diesem Modell kongruent. Die rHCN1-Kanäle würden demnach einen inaktivierten Zustand einnehmen. Bähring und Covarrubias vermuten, dass ein „physikalischer Verschluss“ der ionenselektiven Pore Ursache der fehlenden Ionenleitfähigkeit ist.

Auch dieser Erklärungsansatz würde mit der in dieser Arbeit genannten Vermutung übereinstimmen, dass intrazelluläre Kompartimente an dem Schließen von rHCN1 beteiligt sind. Für spannungsgesteuerte Kanäle ist weiterhin bekannt, dass eine mittelstarke Voraktivierung zu einer ausgeprägten Kanalinaktivierung und positivere Voraktivierungen zu einer inkompletten Kanalinaktivierung führen. Da in dieser Arbeit die Länge des Vorpulses und die spannungsunabhängige, wiederholte Kanalöffnung mehr Einfluss auf die  $I_h$ -Reduktion hatten, als die Stärke der Voraktivierung selbst, scheint ein weiterer spannungsunabhängiger Mechanismus an der Kanalinaktivierung beteiligt zu sein.

## 5.7 HCN-Kanal assoziierte pathophysiologische Prozesse

Wie unter „2.4.1“ geschildert, partizipieren HCN-Kanäle in einer Vielzahl wichtiger physiologischer Prozesse. Ihre Dysregulation und somit ein im neuronalen Kontext fehlerhaft wirkender  $I_h$  hat somit an einer Vielzahl von Pathophysiologien Anteil.

In CA1 Neuronen der Ratte konnte eine verminderte Expression von HCN1-mRNA nach Pyrexie-induzierten Konvulsionen nachgewiesen werden, wohingegen die Dichte von HCN2-mRNA erhöht war (Brewster et al. 2002). In *Layer-III*-Zellen des entorhinalen Kortex lag eine Reduktion von HCN1 und HCN2 vor, nachdem mittels Kainat eine Epilepsie pharmakologisch induziert wurde. Die dendritische Erregbarkeit war begleitend erhöht, wodurch eine erhöhte Aktionspotentialfrequenz trotz hyperpolarisierenden Membranspannungen vorlag (Shah et al. 2004). Auch konnte im Ratten-Modell (*Wistar Albino Glaxo / Rijswijk – WAG/Rij*) (Meeren et al. 2002; Coenen & Van Luijtelaar 2003) eine verminderte Expression von HCN1 in

neokortikalen Neuronen der *Layer* II und III nachgewiesen werden. Der  $I_h$  zeigte hierbei außerdem langsamere Aktivierungskonstanten und eine Verminderung der Amplitude (Strauss et al. 2004).

Diese Beobachtungen sind im Hinblick auf die in dieser Arbeit erhobenen Daten interessant. Unter Kapitel 5.3 habe ich diskutiert, dass das Fehlen einer Amplitudenreduktion im *whole-cell*-Modus vermuten lässt, dass intrazelluläre Bestandteile wie Kanalmodulatoren an der Alteration von  $I_h$  beteiligt sind. Es wäre interessant, zunächst im Zell-Modell die tatsächliche Dichteverteilung von HCN1-Kanälen zu ermitteln und im Anschluss, nach induzierter Amplitudenreduktion, erneut zu untersuchen. Das ist prinzipiell ein schwieriges Unterfangen, da die Transfektionsraten gemittelt werden müssten und hohe n-Zahlen erforderlich wären, um annähernd repräsentative Ergebnisse zu erhalten. Wenn HCN2 anderen biophysikalischen/molekularbiologischen Grundsätzen unterliegt als HCN1, könnte hier ein Ansatz gefunden sein, weshalb Brewster et al. (2002) keine Dichteminderung von HCN2 nachvollziehen konnten.

Auch an anderen klinisch interessanten Prozessen wie der Verarbeitung des neuropathischen und inflammatorischen Schmerzes (Young et al. 2014) sind HCN-Kanäle beteiligt. Beschrieben wurde auch eine Beteiligung von HCN-Kanälen auf den posttraumatischen Verlauf einzelner Neurone nach Schädel-Hirn-Traumata (SHT) (Deng und Xu 2011). Übergeordnete Funktionen wie Lernen und Gedächtnis sind eng mit der Funktionsfähigkeit von HCN-Kanälen verknüpft. Eine Abwesenheit der in dieser Arbeit untersuchten HCN1-Isoform zeigte in Knockout-Mäusen eine fehlerhafte Verarbeitung von Informationen, die zur regelrechten Bildung des motorischen Gedächtnisses oder zum motorischen Lernen notwendig sind (Nolan et al. 2004; Nolan et al. 2003).

Detaillierte Beschreibungen über spezifische HCN-Kanal-assoziierte pathophysiologische Prozesse wurden von Herrmann et al. (2015), Postea & Biel (2011) und Benarroch (2013) veröffentlicht.

## 5.8 Methodenkritik

Mit transfizierten HEK293 Zellen habe ich in dieser Arbeit ein in elektrophysiologischen Laboren weit verbreitetes Expressionsmodell verwendet. Prinzipiell sind HEK293 Zellen einfach zu kultivieren (Thomas & Smart 2005) und mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation lässt sich Fremd-DNA valide in die Zellen implementieren (Jordan et al. 1998). Für elektrophysiologische Untersuchungen ist die Qualität der Zellmembran von größerer Bedeutung als für viele

molekularbiologische Aufbereitungen der Zellen, da bei letzteren die Zellen häufig ohnehin zerstört werden. Allein das Einschleusen von Fremd-DNA kann jedoch schon Artefakte in elektrophysiologischen Ableitungen hervorrufen, da das Calcium-Phosphat-Präzipitat toxisch auf die Zellmembran wirkt (Dudek et al. 2001). Eine für valide elektrophysiologische Messungen ausreichende Zell- und Transfektionsqualität zu erhalten, kann ein zeitaufwändiges Unterfangen sein.

Vergleichende Messungen in Zellsystemen, die die in dieser Arbeit untersuchten HCN1-Kanäle bereits physiologisch exprimieren, werden keinen sicheren Hinweis darauf geben können ob durch die in dieser Arbeit erfolgten Transfektionen Messartefakte entstanden sind, da diese Zellsysteme andere Grundeigenschaften aufweisen (wie zum Beispiel unterschiedliche Zytosolzusammensetzungen und Zellarchitekturen). Hohe Expressionslevel (Vogel et al. 2006) ermöglichen trotz der oben genannten Hürden im Allgemeinen eine ausreichend qualitative Stromableitung.

Es ist bekannt, dass Ströme, die von in HEK293 Zellen exprimierten Kanälen generiert werden, zu Beginn von *whole-cell*-Messungen eine instabile Phase zeigen. Thomas und Smart (2005) diskutieren, dass möglicherweise eine Agonisten-induzierte Internalisation der Rezeptoren, eine Mobilisation der Rezeptormoleküle innerhalb der Membran oder ein Austausch von Intrazellulärbestandteilen hierfür Grundlage sind. Phänomene wie ein *rundown* oder *run up* (Battefeld et al. 2010) sind nach der Etablierung des *whole-cell*-Modus beschrieben. Wie bereits dargelegt, wurde in dieser Arbeit versucht, diese möglichen initialen Stromalterationen durch eine Wartezeit von zwei bis drei Minuten nach dem Aufreißen der Zellmembran nicht in die Messungen einfließen zu lassen. In dieser Zeit ggf. eintretende Änderungen der Zelleigenschaften, die Einfluss auf die weiteren Ableitungen haben könnten, sind jedoch im Detail nicht nachvollziehbar.

Ein in HEK293 Zellen vorliegender endogener, auswärtsgerichteter  $K^+$ -Strom kann mittels Blockern (siehe Lösungen und Blocksubstanzen) einfach gehemmt werden.

Die Ableitung der Ströme erfolgte bei einer Raumtemperatur von ca. 23°C. Hierdurch können die gemessenen Ströme kleiner als bei physiologischen Temperaturen sein. Ebenso wird die Aktivierungskinetik der Ströme beeinflusst. Der Vorteil des HEK293 Expressionssystems entgegen *in vivo*-Versuchen ist, dass eine weitestgehend isolierte Untersuchung von rHCN1 vermitteltem  $I_h$  möglich ist. Jedoch liegen auch in diesem System neben externen Einflussgrößen (wie z.B. Temperatur und pH-Wert) systemintrinsische Störfaktoren vor.

In HEK293 Zellen werden endogenen TRPM4-Kanäle (nichtselektiv, Kationen leitend) exprimiert, die über steigende intrazelluläre  $Ca^{++}$ -Level aktiviert werden. Für die halbmaximale Aktivierung

von TRPM4 reicht bereits eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration von  $61.9 \pm 3.5 \mu\text{M}$  (Amarouch et al. 2013). Wie unter Kapitel 5.4 diskutiert, kann die wiederholte Aktivierung von rHCN1 zu der Erhöhung intrazellulärer  $\text{Ca}^{++}$ -Level führen. Da TRPM4 für  $\text{Ca}^{++}$  nicht durchlässig ist, kann in der Folge eine Depolarisation der Zelle eintreten (Launay et al. 2002), wodurch  $I_h$  beeinflusst werden könnte. Jedoch konnte ich in dieser Arbeit keine Änderung des Haltestroms beobachten. TRPM4-Kanäle werden durch 4-AP und TEA nicht geblockt. Interessanterweise blocken mikromolare intrazelluläre ATP-Konzentrationen TRPM4-Kanäle (Nilius et al. 2004). Sollte durch mehrfache rHCN1-Aktivierung der intrazelluläre Verbrauch von ATP steigen, würde somit auch die Aktivität von TRPM4 gesteigert werden. Es ist bisher nicht bekannt ob der TRPM4-Kanalblocker 9-Phenanthrol Auswirkungen auf HCN-Kanäle hat (Nilius & Flockerzi 2014). 9-Phenanthrol wurde in dieser Arbeit nicht verwendet.

Limitierungen der *patch-clamp*-Technik können durch ein Entkoppeln der Plasmamembran mit dem Zytoskelett entstehen. Der Unterdruck, der zur Etablierung des *whole-cell*-Modus nötig ist, oder der Überdruck, der beim *dimpling* (Eindellung der Zellmembran während des Zuführens der Glaskapillare auf die Zellmembran) entsteht, kann zu morphologischen oder funktionellen Änderungen der Zelleigenschaften führen (Hamill & McBride 1997). Hamill und McBride diskutieren, dass die Mechanosensitivität der Ionenkanäle durch eine solche Entkopplung verändert werden kann. Die Entkopplung von Plasmamembran und Zytoskelett ist prinzipiell auch im *cell-attached*-Modus während der Etablierung des *Patches* möglich. Der weiter oben genannte *rundown* scheint als Ursache der  $I_h$  Reduktion unwahrscheinlich zu sein. Dies ist jedoch nicht gänzlich ausschließbar, da sich keine Regeneration der Amplitudenreduktion einstellte.

Im unwahrscheinlichen Fall, dass ein *rundown* doch Anteil an der Verminderung von  $I_h$  hat, ist dies nicht auf den Verlust von cAMP zurückzuführen, da eine intrazelluläre Aufsättigung mit 8Br-cAMP keinen Einfluss auf die Regression von  $I_h$  hatte. Es ist zudem unwahrscheinlich, dass neben cAMP der Verlust anderer rHCN1-Energielieferanten ursächlich für die Amplitudenminderung ist. Im *cell-attached*-Modus wird nur ein kleiner Membranfleck umgeladen. In diesem kleinen Areal der Zellmembran lag in diesen Versuchen nur eine (relativ kleine) Anzahl von  $466 \pm 82$  rHCN1-Kanälen vor, wenn davon ausgegangen wird, dass die Stromstärke von  $I_h$  durch einen einzelnen Kanal 88 fA beträgt (Kole et al. 2006). Interessanterweise wurde eine Reduktion von  $I_h$  in *Xenopus Oozyten*, die natürlicherweise hohe cAMP Level besitzen, nicht beobachtet (Männikkö et al. 2002)

## 5.9 Ausblick

Da HCN-Kanäle wichtige Regulatoren neuronaler Erregbarkeit sind und leichte Änderungen ihrer Funktion Einfluss auf neuronale Aktivität haben, ist eine Verbindung zu neuronalen Erkrankungen sehr wahrscheinlich (Nava et al. 2014; Herrmann et al. 2007; Huang et al. 2009; Nolan et al. 2003). Eine Depolarisation durch NMDA- oder AMPA-Rezeptoren führt zu einer erhöhten Membraninsertion von HCN (Noam et al. 2010). Die durch Hyperpolarisation induzierte Reduktion stellt möglicherweise einen Gegenmechanismus von  $I_h$  dar. Mögliche strukturelle Unterschiede der HCN-Untereinheiten *in vivo* erschweren die Durchführung und Interpretation von Studien in Neuronen. Das in dieser Arbeit verwendete HEK293 Zellexpressionssystem kann daher hilfreich sein, in einem umschriebenen Modell diese grundlegenden Funktionen von HCN1 zu verstehen. Mutationsversuche der PY-motif-Region von Nedd4-2 in Kombination mit GFP (*green fluorescence protein*) können Aufschluss geben ob eine Beteiligung von Nedd4-2 an der Reduktionsbeteiligung von  $I_h$  vorliegt und *voltage-clamp*-Messungen in akuten Hirnschnitten (Maus, Ratte) können zeigen ob die in dieser Arbeit erhobenen Daten auch in übergeordneten Zellsystemen nachvollziehbar sind.

## Literaturverzeichnis

- Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M, DiFrancesco D. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol.* 2003 Jun;549(Pt 2):347-59.
- Amarouch M.-Y, Syam N, Abriel H. Biochemical, single-channel, whole-cell patch clamp, and pharmacological analyses of endogenous TRPM4 channels in HEK293 cells. *Neurosci Lett.* 2013 Apr;541:105-10.
- Armstrong CM. Na channel inactivation from open and closed states. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov;103(47): 17991–17996.
- Armstrong CM, Bezanilla F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol.* 1977 Nov;70(5):567-90.
- Azene EM, Sang D, Tsang SY, Li RA. Pore-to-gate coupling of HCN channels revealed by a pore variant that contributes to gating but not permeation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Feb;327(4):1131-42.
- Azene EM, Xue T, Li RA. Molecular basis of the effect of potassium on heterologously expressed pacemaker (HCN) channels. *J Physiol.* 2003 Mar;547(Pt 2):349–356.
- Babai N, Kanevsky N, Dascal N, Rozanski GJ, Singh DP, Fatma N, Thoreson WB. Anion-sensitive regions of L-type CaV1.2 calcium channels expressed in HEK293 cells. *PLoS One.* 2010 Jan;5(1):e8602.
- Bachmann AS, Howard JP, Vogel CW. Actin-binding protein filamin A is displayed on the surface of human neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* 2006 Dec;97(12):1359-65.
- Bähring R, Covarrubias M. Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. *J Physiol.* 2011 Feb;589(Pt 3):461-79.
- Barry PH, Lynch JW. Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol.* 1991 Apr;121(2):101-17.
- Barthel L, Reetz O, Strauss U. Use Dependent Attenuation of Rat HCN1-Mediated I<sub>h</sub> in Intact HEK293 Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2016 Jun;38(6):2079-93.
- Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol Ther.* 2005 Jul;107(1):59-79.
- Battefeld A, Bierwirth C, Li YC, Barthel L, Velmans T, Strauss U. I<sub>h</sub> “run-up” in rat neocortical neurons and transiently rat or human HCN1-expressing HEK293 cells. *J*

- Neurosci Res. 2010 Nov;88(14):3067-78.
- Benarroch EE. HCN channels: function and clinical implications. *Neurology*. 2013 Jan;80(3):304-10
- Bender RA, Baram TZ. Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks. *Prog Neurobiol*. 2008 Nov;86(3):129-40.
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev*. 2009 Jul;89(3):847-85
- Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ. Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci*. 2002 Jun;22(11):4591-9.
- Cahalan M, Neher E. Patch clamp techniques: an overview. *Methods Enzymol*. 1992 Feb;207:3-14.
- Caro AA, Cederbaum AI. Role of calcium and calcium-activated proteases in CYP2E1-dependent toxicity in HEPG2 cells. *J Biol Chem*. 2002 Jan;277(1):104-13.
- Cervera L, Gutiérrez S, Gòdia F, Segura MM. Optimization of HEK 293 cell growth by addition of non-animal derived components using design of experiments. *BMC Proc*. 2011 Nov;5 Suppl8:P126.
- Chemin J, Monteil A, Briquaire C, Richard S, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P. Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS Lett*. 2000 Jul;478(1-2):166-72.
- Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*. 1987 Aug;7(8):2745-52.
- Chen J, Mitcheson JS, Tristani-Firouzi M, Lin M, Sanguinetti MC. The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep;98(20):11277-82.
- Coenen AM, Van Luijtelaar EL. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet*. 2003 Nov;33(6):635-55.
- Craven KB, Zagotta WN. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol*. 2006 Mar;68:375-401.
- Davies J, Jimenez A. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am J Trop Med Hyg*. 1980 Sep;29(5 Suppl):1089-92.
- Dean DA. Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res*. 1997 Feb;230(2):293-302.
- Deng P, Xu ZC. Contribution of Ih to Neuronal Damage in the Hippocampus after Traumatic

- Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma*. 2011 Jul;28(7):1173-83.
- DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:455-72.
- DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*. 1991 May;351(6322):145-7.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 1998 Apr;280(5360):69-77.
- Dudek H, Ghosh A, Greenberg ME. Calcium phosphate transfection of DNA into neurons in primary culture. *Curr Protoc Neurosci*. 2001 May;Chapter3:Unit3.11.
- Filbin ME, Kieft JS. Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 Jun;19(3):267-76.
- Fliegert R, Glassmeier G, Schmid F, Cornils K, Genisyuerk S, Harneit A, Schwarz JR, Guse AH. Modulation of Ca<sup>2+</sup> entry and plasma membrane potential by human TRPM4b. *FEBS J*. 2007 Feb;274(3):704-13.
- Galli A, DeFelice LJ, Duke BJ, Moore KR, Blakely RD. Sodium-dependent norepinephrine-induced currents in norepinephrine-transporter-transfected HEK-293 cells blocked by cocaine and antidepressants. *J Exp Biol*. 1995 Oct;198(Pt 10):2197-212.
- Gauss R, Seifert R, Kaupp UB. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*. 1998 Jun;393(6685):583-7.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977 Jul;36(1):59-74.
- Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973 Apr;52(2):456-67.
- Gravante B, Barbuti A, Milanesi R, Zappi I, Viscomi C, DiFrancesco D. Interaction of the pacemaker channel HCN1 with filamin A. *J Biol Chem*. 2004 Oct;279(42):43847-53.
- Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol*. 1993 Oct;102(4):601-30.
- Halliwel JV, Adams PR. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res*. 1982 Oct;250(1):71-92.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981 Aug;391(2):85-100.
- Hamill OP, McBride DW. Induced membrane hypo/hyper-mechanosensitivity: a limitation of

- patch-clamp recording. *Annu Rev Physiol.* 1997 Mar;59:621-31.
- Hardel N, Harmel N, Zolles G, Fakler B, Klöcker N. Recycling endosomes supply cardiac pacemaker channels for regulated surface expression. *Cardiovasc Res.* 2008 Jul;79(1):52-60.
- He C, Chen F, Li B, Hu Z. Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol.* 2014 Jan;112:1-23.
- Henrikson CA, Xue T, Dong P, Sang D, Marban E, Li RA. Identification of a Surface Charged Residue in the S3-S4 Linker of the Pacemaker (HCN) Channel That Influences Activation Gating. *J Biol Chem.* 2003 Apr;278(16):13647-54.
- Herrmann S, Schnorr S, Ludwig A. HCN channels-modulators of cardiac and neuronal excitability. *Int J Mol Sci.* 2015 Jan;16(1):1429-47.
- Herrmann S, Stieber J, Ludwig A. Pathophysiology of HCN channels. *Pflugers Arch.* 2007 Jul;454(4):517-22.
- Hille B. *Ion-Channels-of-Excitable-Membranes.* 3th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.; 2001.
- Huang Z, Walker MC, Shah MM. Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis. *J Neurosci.* 2009 Sep;29(35):10979–10988.
- Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem.* 1999 Apr;274(18):12835-9.
- Jahnsen H, Llinás R. Ionic basis for the electro-responsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro. *J Physiol.* 1984 Apr;349:227-47.
- Jang SK, Pestova TV, Hellen CU, Witherell GW, Wimmer E. Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme.* 1990;44(1-4):292-309.
- Jordan M, Köhne C, Wurm FM. Calcium-phosphate mediated DNA transfer into HEK-293 cells in suspension: control of physicochemical parameters allows transfection in stirred media. *Transfection and protein expression in mammalian cells. Cytotechnology.* 1998 Jan;26(1):39–47.
- Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* 1996 Feb;24(4):596–601.
- Jung S, Bullis JB, Lau IH, Jones TD, Warner LN, Poolos NP. Downregulation of dendritic HCN channel gating in epilepsy is mediated by altered phosphorylation signaling. *J Neurosci.*

- 2010 May; 30(19):6678–6688.
- Kawasaki T, Ueyama T, Lange I, Feske S, Saito N. Protein kinase C-induced phosphorylation of Orail regulates the intracellular Ca<sup>2+</sup> level via the store-operated Ca<sup>2+</sup> channel. *J Biol Chem*. 2010 Aug;285(33):25720–25730.
- Kocsis B, Li S. In vivo contribution of h-channels in the septal pacemaker to theta rhythm generation. *Eur J Neurosci*. 2004 Oct;20(8):2149-58.
- Kole MH, Hallermann S, Stuart GJ. Single I<sub>h</sub> channels in pyramidal neuron dendrites: properties, distribution, and impact on action potential output. *J Neurosci*. 2006 Feb;26(6):1677-87.
- Launay P, Fleig A, Perraud AL, Scharenberg AM, Penner R, Kinet JP. TRPM4 Is a Ca<sup>2+</sup>-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization. *Cell*. 2002 May;109(3):397-407.
- Lewis AS, Schwartz E, Chan CS, Noam Y, Shin M, Wadman WJ, Surmeier DJ, Baram TZ, Macdonald RL, Chetkovich DM. Alternatively spliced isoforms of TRIP8b differentially control h channel trafficking and function. *J Neurosci*. 2009 May;29(19):6250-65.
- Llinás R, Jahnsen H. Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro. *Nature*. 1982 Jun;297(5865):406-8.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*. 2005 Aug;309(5736):903-8.
- Lorincz A, Szatmáry B, Szirtes G. The mystery of structure and function of sensory processing areas of the neocortex: a resolution. *J Comput Neurosci*. 2002 Nov-Dec;13(3):187-205.
- Loyter A, Scangos GA, Ruddle FH. Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Jan;79(2):422-6.
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*. 1998 Jun;393(6685):587-91.
- Macri V, Proenza C, Agranovich E, Angoli D, Accili EA. Separable gating mechanisms in a Mammalian pacemaker channel. *J Biol Chem*. 2002 Sep;277(39):35939-46.
- Magee JC. Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 1998 Oct;18(19):7613-24.
- Männikkö R, Pandey S, Larsson HP, Elinder F. Hysteresis in the voltage dependence of HCN channels: conversion between two modes affects pacemaker properties. *J Gen Physiol*. 2005 Mar;125(3):305-26.
- Männikkö R, Elinder F, Larsson HP. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion

- channels gated by opposite voltages. *Nature*. 2002 Oct;419(6909):837-41.
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol*. 1999 Oct;17(10):969-73.
- McCormick DA, Pape HC. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol*. 1990 Dec;431:291-318.
- Meeren HK, Pijn JP, Van Luijtelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci*. 2002 Feb;22(4):1480-95.
- Messing J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol*. 1983;101:20-78.
- Mistrík P, Pfeifer A, Biel M. The enhancement of HCN channel instantaneous current facilitated by slow deactivation is regulated by intracellular chloride concentration. *Pflugers Arch*. 2006 Sep;452(6):718-27.
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem*. 2001 Mar;268(6):1646-52.
- Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem*. 1999 Jul-Aug;380(7-8):975-80.
- Nava C, Dalle C, Rastetter A, Striano P, de Kovel CG, Nabbout R, Cancès C, Ville D, Brilstra EH, Gobbi G, Raffo E, Bouteiller D, Marie Y, Trouillard O, Robbiano A, Keren B, Agher D, Roze E, Lesage S, Nicolas A, Brice A, Baulac M, Vogt C, El Hajj N, Schneider E, Suls A, Weckhuysen S, Gormley P, Lehesjoki AE, De Jonghe P, Helbig I, Baulac S, Zara F, Koeleman BP; EuroEPINOMICS RES Consortium, Haaf T, LeGuern E, Depienne C. De novo mutations in HCN1 cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet*. 2014 Jun;46(6):640-5.
- Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 1976 Apr;260(5554):799-802.
- Neher E, Sakmann B, Steinbach JH. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch*. 1978 Jul;375(2):219-28.
- Nilius B, Prenen J, Janssens A, Voets T, Droogmans G. Decavanadate modulates gating of TRPM4 cation channels. *J Physiol*. 2004 Nov;560(Pt 3):753-65.
- Nilius B, Flockerzi V. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*. 2th ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.

- Noam Y, Ehrengruber MU, Koh A, Feyen P, Manders EM, Abbott GW, Wadman WJ, Baram TZ. Filamin A promotes dynamin-dependent internalization of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated type 1 (HCN1) channels and restricts  $I_h$  in hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 2014 Feb;289(9):5889-903.
- Noam Y, Zha Q, Phan L, Wu RL, Chetkovich DM, Wadman WJ, Baram TZ. Trafficking and surface expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 2010 May;285(19):14724-36.
- Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, Buhl DL, Santoro B, Gibbs E, Vronskaya S, Buzsáki G, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A. A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell*. 2004 Nov;119(5):719-32.
- Nolan MF, Dudman JT, Dodson PD, Santoro B. HCN1 channels control resting and active integrative properties of stellate cells from layer II of the entorhinal cortex. *J Neurosci*. 2007 Nov;27(46):12440-51.
- Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, Santoro B, Yin D, Thompson RF, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A. The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell*. 2003 Nov;115(5):551-64.
- Noma A, Irisawa H. Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflugers Arch*. 1976 Jun;364(1):45-52.
- Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of  $I_h$  channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2004 Apr;471(3):241-76.
- Pacheco A, Martinez-Salas E. Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J Biomed Biotechnol*. 2010 Dec;2010:458927
- Perkins KL. Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. *J Neurosci Methods*. 2006 Jun;154(1-2):1-18.
- Pian P, Bucci A, Robinson RB, Siegelbaum SA. Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP2. *J Gen Physiol*. 2006 Nov;128(5):593-604.
- Pittoors F, Van Bogaert PP. HCN2 channels: a permanent open state and conductance changes. *J Membr Biol*. 2015 Feb;248(1):67-81.
- Poolos NP, Bullis JB, Roth MK. Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci*. 2006 Jul;26(30):7995-8003.
- Poolos NP, Jones TD. Patch-clamp recording from neuronal dendrites. *Curr Protoc Neurosci*.

- 2004 Nov;Chapter 6:Unit 6.19.
- Postea O, Biel M. Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Nov 18;10(12):903-14.
- Prasad TK, Rao NM. The role of plasmid constructs containing the SV40 DNA nuclear-targeting sequence in cationic lipid-mediated DNA delivery. *Cell Mol Biol Lett.* 2005 Feb;10(2):203-15.
- Priel A, Gil Z, Moy VT, Magleby KL, Silberberg SD. Ionic Requirements for Membrane-Glass Adhesion and Giga Seal Formation in Patch-Clamp Recording. *Biophys J.* 2007 Jun;92(11):3893-900.
- Proenza C, Angoli D, Agranovich E, Macri V, Accili EA. Pacemaker channels produce an instantaneous current. *J Biol Chem.* 2002 Feb;277(7):5101-9.
- Proenza C, Yellen G. Distinct populations of HCN pacemaker channels produce voltage-dependent and voltage-independent currents. *J Gen Physiol.* 2006 Feb;127(2):183-90.
- Rasmusson RL, Zhang Y, Campbell DL, Comer MB, Castellino RC, Liu S, Morales MJ, Strauss HC. Molecular Mechanisms of K<sup>+</sup> Channel Blockade: 4-Aminopyridine Interaction with a Cloned Cardiac Transient K<sup>+</sup> (Kv1.4) Channel. *Adv Exp Med Biol.* 1995;382:11-22.
- Reetz O, Strauss U. Protein kinase C activation inhibits rat and human hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel (HCN)1--mediated current in mammalian cells. *Cell Physiol Biochem.* 2013 Apr;31(4-5):532-41.
- Russell SN, Publicover NG, Hart PJ, Carl A, Hume JR, Sanders KM, Horowitz B. Block by 4-aminopyridine of a Kv1.2 delayed rectifier K<sup>+</sup> current expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 1994 Dec;481(Pt 3):571-84.
- Sakmann B, Neher E. *Single-Channel Recording.* 2th ed. New York: Springer Science & Business Media; 1995.
- Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol.* 1984;46:455-72.
- Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell.* 1998 May;93(5):717-29.
- Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. 2000 Jul;20(14):5264-75.
- Santoro B, Hu L, Liu H, Saponaro A, Pian P, Piskorowski RA, Moroni A, Siegelbaum SA. TRIP8b regulates HCN1 channel trafficking and gating through two distinct C-terminal

- interaction sites. *J Neurosci*. 2011 Mar;31(11):4074-86.
- Santoro B, Piskorowski RA, Pian P, Hu L, Liu H, Siegelbaum SA. TRIP8b splice variants form a family of auxiliary subunits that regulate gating and trafficking of HCN channels in the brain. *Neuron*. 2009 Jun;62(6):802-13.
- Scicchitano P, Carbonara S, Ricci G, Mandurino C, Locorotondo M, Bulzis G, Gesualdo M, Zito A, Carbonara R, Dentamaro I, Riccioni G, Ciccone MM. HCN channels and heart rate. *Molecules*. 2012 Apr;17(4):4225-35.
- Shah MM, Anderson AE, Leung V, Lin X, Johnston D. Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. *Neuron*. 2004 Oct;44(3):495-508.
- Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*. 2002 Jun;16(8):869-71.
- Shin KS, Maertens C, Proenza C, Rothberg BS, Yellen G. Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: desensitization to voltage. *Neuron*. 2004 Mar;41(5):737-44.
- Sigworth FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys*. 1994 Feb;27(1):1-40.
- Snyders DJ, Chaudhary A. High affinity open channel block by dofetilide of HERG expressed in a human cell line. *Mol Pharmacol*. 1996 Jun;49(6):949-55.
- Stieber J, Stöckl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F. Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem*. 2005 Oct;280(41):34635-43.
- Strauss U, Kole MH, Bräuer AU, Pahnke J, Bajorat R, Rolfs A, Nitsch R, Deisz RA. An impaired neocortical I<sub>h</sub> is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci*. 2004 Jun;19(11):3048-58.
- Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005 May-Jun;51(3):187-200.
- Thompson SR. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol*. 2012 Nov;20(11):558-66.
- Trump BF, Berezesky IK. The mechanisms of calcium-mediated cell injury and cell death. *New Horiz*. 1996 Feb;4(1):139-50.
- Tyrrell L, Renganathan M, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Glycosylation alters *steady state* inactivation of sodium channel Nav1.9/NaN in dorsal root ganglion neurons and is developmentally regulated. *J Neurosci*. 2001 Dec;21(24):9629-37.
- Velumian AA, Zhang L, Pennefather P, Carlen PL. Reversible inhibition of IK, IAHP, I<sub>h</sub> and I<sub>Ca</sub> currents by internally applied gluconate in rat hippocampal pyramidal neurones. *Pflugers Arch*. 1997 Jan;433(3):343-50.

- Vieira J, Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. 1982 Oct;19(3):259-68.
- Vogel HG, Hock, F J, Maas J, Mayer M. *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays*. 1th ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.
- Wagman GH, Testa RT, Marquez JA, Weinstein MJ. Antibiotic G-418, a new Micromonospora-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: fermentation, isolation, and preliminary characterization. *Antimicrob Agents Chemother*. 1974 Aug;6(2):144-9.
- Wahl-Schott C, Baumann L, Zong X, Biel M. An Arginine Residue in the Pore Region Is a Key Determinant of Chloride Dependence in Cardiac Pacemaker Channels. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13694-700.
- Wahl-Schott C, Biel M. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Feb;66(3):470-94.
- Wahl-Schott C, Fenske S, Biel M. HCN channels: new roles in sinoatrial node function. *Curr Opin Pharmacol*. 2014 Apr;15:83-90.
- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*. 2001 Jun;411(6839):805-10.
- Wang J, Chen S, Siegelbaum SA. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J Gen Physiol*. 2001 Sep;118(3):237-50.
- Whalley K. Ion channels: A regulatory sidekick. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Aug;10(8):544–545.
- Wilkars W, Wollberg J, Mohr E, Han M, Chetkovich DM, Bähring R, Bender RA. Nedd4-2 regulates surface expression and may affect N-glycosylation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN)-1 channels. *FASEB J*. 2014 May;28(5):2177-90.
- Xu C, Datta S, Wu M, Alreja M. Hippocampal theta rhythm is reduced by suppression of the H-current in septohippocampal GABAergic neurons. *Eur J Neurosci*. 2004 Apr;19(8):2299-309.
- Xue T, Marbán E, Li RA. Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization. *Circ Res*. 2002 Jun;90(12):1267-73.
- Yanagihara K, Irisawa H. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch*. 1980 May;385(1):11-9.
- Young GT, Emery EC, Mooney ER, Tsantoulas C, McNaughton PA. Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated

- cyclic nucleotide-gated ion channels. *Pain*. 2014 Sep;155(9):1708-19.
- Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*. 2005 Dec;57(4):387-95.
- Yu FH, Catterall WA. The VGL-chnome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE*. 2004 Oct;2004(253):re15.
- Yu X, Duan KL, Shang CF, Yu HG, Zhou Z. Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I<sub>h</sub>) channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan;101(4):1051-6.
- Zha Q, Brewster AL, Richichi C, Bender RA, Baram TZ. Activity-dependent heteromerization of the hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide gated (HCN) channels: role of N-linked glycosylation. *J Neurochem*. 2008 Apr;105(1):68-77.
- Zhou L, Siegelbaum SA. Gating of HCN channels by cyclic nucleotides: residue contacts that underlie ligand binding, selectivity, and efficacy. *Structure*. 2007 Jun;15(6):655-70.
- 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, Biel M. A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J Biol Chem*. 2005 Oct;280(40):34224-32.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich, Lennart Barthel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Charakterisierung der öffnungsabhängigen Reduktion des rHCNI-vermittelten  $I_h$  im HEK293 Modell*“ selbstständig und nicht ohne offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung („Uniform Requirements for Manuscripts“ des ICMJE) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zur Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an zu dieser Dissertation gehörenden Publikationen entsprechen denen, die in der unten stehenden gemeinsamen Erklärung mit meinem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Lennart Barthel hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Originalarbeiten:

**Barthel L**, Reetz O, Strauss U. Use Dependent Attenuation of Rat HCN1-Mediated Ih in Intact HEK293 Cells. Cell Physiol Biochem. 2016 Jun;38(6):2079-93.

Ca. 85%. Erhebung und Organisation der Rohdaten (alle Messungen bis auf einen Datensatz von n = 12 Zellen). Auswertung aller Daten, Pflege der Zellkulturen und Durchführung der Transfektionen, Schreiben des Artikels, Versuchsdesign, Versuchsanordnung und Fragestellung gemeinsam mit meinem Betreuer PD Dr. med Ulf Strauß.

Battefeld A, Bierwirth C, Li YC, **Barthel L**, Velmans T, Strauss U. I(h) “run-up” in rat neocortical neurons and transiently rat or human HCN1-expressing HEK293 cells. J Neurosci Res. 2010 Nov;88(14):3067-78.

Ca. 5%. Erhebung und Auswertung eines Datensatzes. Review des Artikels als Mitautor vor Einreichung zu dem Journal.

---

Unterschrift, Datum und Stempel  
des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift  
des Doktoranden

## **Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationen

### Originalarbeiten

**Barthel L**, Reetz O, Strauss U. Use Dependent Attenuation of Rat HCN1-Mediated Ih in Intact HEK293 Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2016 Jun;38(6):2079-93.

Battefeld A, Bierwirth C, Li YC, **Barthel L**, Velmans T, Strauss U. I(h) “run-up” in rat neocortical neurons and transiently rat or human HCN1-expressing HEK293 cells. *J Neurosci Res.* 2010 Nov;88(14):3067-78.

## **Danksagung**

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zuerst PD Dr. med Ulf Strauß für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Vorarbeiten, der Promotion selbst sowie der Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen und für wertvolle Kommentare bei dem Erstellen der Dissertation.

Zudem meinen Kollegen der Arbeitsgruppe von PD Dr. med Ulf Strauß für die kollegiale Zusammenarbeit und nicht zuletzt auch den Kollegen des Instituts für Zellbiologie und Neurobiologie für das angenehme Arbeitsumfeld und stete Ansprechbarkeit bei Fragen rund um zellbiologische Fragestellungen, insbesondere bezüglich Zellkultur- und Transfektionstechniken.

Umfassender Dank gilt selbstverständlich auch meinen Eltern und Susann.