

**Alexander Scholten: Charakterisierung von Hyperpolarisationsaktivierten und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (HCN-Kanäle) in der Retina und im Gehirn der Ratte.  
2001**

Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle (HCN-Kanäle) wurden elektrophysiologisch in zahlreichen Geweben lokalisiert und charakterisiert. Sie sind beteiligt an der Erzeugung und Regulation zellulärer rhythmischer Aktivierungsmuster, an der Stabilisierung des Membranpotentials und an der Verarbeitung synaptischer Signale. Mittlerweile konnten in allen untersuchten Säugetierspezies vier verschiedene HCN-Kanalgene identifiziert und in heterologen Expressionssystemen elektrophysiologisch untersucht werden. Bislang war unklar, in welchen Zellen die verschiedenen HCN-Kanaltypen exprimiert werden, ob sie heterooligomere Komplexe bilden und welche Funktionen sie in den einzelnen Zellen erfüllen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal spezifische Antikörper gegen alle vier HCN-Kanaltypen hergestellt und charakterisiert. Biochemische Analysen ergaben, daß alle vier HCN-Kanaltypen in der Rattenretina, sowie im Ratten- und Mausgehirn in glykosylierter Form vorliegen. Andere posttranslationale oder transkriptionale Modifikationen, die das Laufverhalten der Kanalproteine in Westernblot-Experimenten verändern, wurden nicht beobachtet.

Immunhistochemische Färbungen von Rattenretinaschnitten zeigten, daß sich die Expressionsmuster der vier HCN-Kanaltypen deutlich voneinander unterscheiden: In den meisten Bipolarzelltypen wurde jeweils nur ein HCN-Kanaltyp nachgewiesen. Nur in Typ 5-Zapfenbipolarzellen und einigen Ganglienzellen konnten HCN1 und HCN4 ko-lokalisiert werden. Durch Immunpräzipitation wurde untersucht, ob sich in ko-transfizierten HEK 293-Zellen oder in der Rattenretina heterooligomere HCN1/HCN4-Komplexe nachweisen lassen. Ein eindeutiger Nachweis gelang jedoch nicht. Um die Funktion der HCN-Kanäle in den verschiedenen Neuronen des Gehirns aufzuklären, wurde auch damit begonnen, die Lokalisation der HCN-Kanäle im Rattengehirn aufzuklären. Erste Färbungen von Gehirnschnitten zeigen, daß sich auch hier, ähnlich wie in der Rattenretina, die Expressionsmuster der HCN-Kanaltypen deutlich voneinander unterscheiden.

Sowohl die funktionellen Eigenschaften der verschiedenen HCN-Kanaltypen, als auch deren zelluläre und subzelluläre Lokalisation geben erste Hinweis auf die physiologische Funktion der HCN-Kanäle in den einzelnen Zelltypen. In den Zellen, in denen HCN-Kanäle exprimiert werden, kann nun gezielt nach anderen Ionenkanälen und Rezeptoren gesucht werden, die mit den HCN-Kanälen zusammenwirken könnten. Dieses Wissen würde helfen, die Funktion der HCN-Kanäle als Teil einer Signalkaskade oder anderer zellulärer Prozesse besser zu verstehen.

---

Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels (HCN-channels) have been characterized electrophysiologically in numerous tissues. They play a fundamental role in shaping the autonomous rhythmic activity of pacemaker-cells. In many neurons, HCN-channels co-determine resting potential and membrane conductance and thereby play an important role in the integrative behavior of neurons and the sensitivity to synaptic input. Recently, four different genes for HCN-channels have been identified in all mammalian species investigated. But little is known about the cellular expression pattern of HCN-channel subtypes, and their function in these cells. Moreover, it is not clear, whether or not the different subtypes form heteromeric channels.

In the present study specific antibodies against all four HCN-channel subtypes were raised. Biochemical studies revealed, that all four HCN-channel subtypes are expressed in the rat retina, and in the rat and mouse brain in glycosylated form. The sizes of deglycosylated channel proteins are in good agreement with the estimated molecular weight of the HCN-channels. Other posttranslational or transcriptional modifications, that would change the sizes of the proteins in westernblot experiments, were not detected. Immunohistochemical stainings of the rat retina showed different expression patterns for the four HCN-channel subtypes: In most bipolar celltypes only one HCN-channel subtype was detected. Only in type 5 bipolar cells and some ganglion cells HCN1 and HCN4 are co-localized

and might form heteromeric channels. Immunoprecipitation experiments were performed to detect heteromeric HCN1/HCN4-complexes in co-transfected HEK 293-cells and in the rat retina. But the results were not unequivocal. To reveal the function of HCN-channels in different brain neurons, first investigation on the cellular expression pattern of the HCN-channels in the rat brain were started. As in the retina the HCN-channel subtypes are differentially expressed.

The electrophysiological properties of the HCN-channel subtypes, as well as their cellular and subcellular localization indicate some of the physiological functions of HCN-channels in different cell types. We can now search for other ion channels or receptors, that interact with the HCN-channels. This knowledge will help to elucidate the role of HCN-channels in signal cascades or other cellular processes.