

Zusammenfassung

HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels*) sind u.a. bei der Entstehung und Regulation des Herzschlags von besonderer Bedeutung. Neben der Regulation durch zyklische Nukleotide spielt die Regulation durch Phosphorylierung eine wichtige Rolle. Die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinase II δ (CamKII δ) steuert viele Prozesse der elektromechanischen Kopplung im Herzen. Ich konnte in meiner Doktorarbeit zeigen, dass der isolierte C-Terminus des murinen HCN2-Kanals (mHCN2 CNBD), bestehend aus der CNBD (*cyclic nucleotide-binding domain*) und dem C-Linker, *in vitro* durch die CamKII δ phosphoryliert wird. Die Affinität für zyklische Nukleotide scheint durch die Phosphorylierung jedoch nicht beeinflusst zu werden: Der Austausch des phosphorylierten Serins gegen Aspartat (S641D), der den phosphorylierten Zustand simulieren soll, verändert die Affinität für das cAMP-Derivat 8-NBD-cAMP nicht. Im ganzen mHCN2-Kanal konnte ich eine Phosphorylierung an S641 nicht nachweisen. Auch die elektrophysiologische Charakterisierung weist nicht auf geänderte Eigenschaften des Kanals hin: Weder die Spannung für die halbmaximale Aktivierung noch die Aktivierungskinetik des mHCN2-Kanals wurde durch Ko-Expression mit der konstitutiv aktiven CamKII δ_2 beeinflusst. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Eigenschaften des mHCN2-Kanals nicht durch die CamKII δ beeinflusst werden.

Obwohl viel über die Struktur und Funktion von HCN-Kanälen bekannt ist, sind die molekularen Mechanismen, die die Ligandenbindung mit der Kanalöffnung verbinden, bislang nur unzureichend verstanden, da beide eng miteinander gekoppelt sind. Im Rahmen meiner Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass die isolierte mHCN2 CNBD sowohl cAMP als auch cGMP mit hoher Affinität bindet. Der K_D -Wert liegt im nanomolaren Bereich. Bei der Modulation durch zyklische Nukleotide scheint die Bildung eines tetrameren „gating rings“, bestehend aus den C-Linkern und den CNBDs der einzelnen Untereinheiten, eine wichtige Rolle zu spielen. Ich konnte zeigen, dass die mHCN2 CNBD in Abwesenheit zyklischer Nukleotide überwiegend als Monomer vorliegt; der Anteil an Dimer ist gering. Tetramere konnte ich unter diesen Bedingungen nicht nachweisen. In Anwesenheit zyklischer Nukleotide bildet sich das Tetramer. Mit Hilfe der Stopped-Flow-Technik habe ich *on*- und *off*-Raten der 8-NBD-cAMP-Bindung an die mHCN2 CNBD untersucht. Die Bindungs- und Konkurrenzexperimente zeigen einen biphasischen Verlauf. Der oligomere Zustand beeinflusst die *off*-Rate: 8-NBD-cAMP bleibt ca. 100fach länger am Tetramer gebunden als am Monomer.