

Zusammenfassung

Hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte (HCN-) Ionenkanäle bilden eine Familie von Ionenkanälen mit ungewöhnlichen Eigenschaften. HCN-Kanäle werden durch Hyperpolarisation des Membranpotenzials aktiviert und die Kanalaktivierung wird durch die Bindung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) moduliert. Das Wechselspiel zwischen der spannunginduzierten Aktivierung und der Ligandenbindung ist äußerst komplex: So verändert einerseits die Ligandenbindung die Spannungsabhängigkeit des Kanals und andererseits die spannungsabhängige Kanalaktivierung die Ligandenaffinität.

Dieses Wechselspiel wollte ich in meiner Arbeit genauer untersuchen. Mein Ziel war es, Bindungsereignisse einzelner Moleküle mit fluoreszenzoptischen Methoden zu verfolgen. Ich habe hierzu ein fluoreszenzierendes Analog zyklischer Nukleotide (Atto488cAMP) verwendet und dessen Bindungseigenschaften charakterisiert. An Plasmamembransheets habe ich mit TIRF-Mikroskopie die Atto488cAMP-Bindung an heterolog exprimierte HCN2-Kanäle und an isolierte Bindestellen sowohl makroskopisch als auch auf Einzelmolekülebene untersucht. Die Auswertung der Einzelmoleküldaten war kompliziert, da es auch unspezifische Bindungsereignisse gab und das Signal-zu-Rauschverhältnis nur moderat war.

Anschließend erweiterte ich den Messaufbau, um an lebenden Zellen parallel Elektrophysiologie und TIRF-Mikroskopie durchführen zu können. Mit dem Aufbau habe ich makroskopische Fluoreszenzmessungen etabliert. Aufbauend auf diesen Ergebnissen können nun die Bindungszeiten einzelner Ligandenmoleküle an HCN2-Kanälen bei vorgegebenen Membranpotenzialen studiert werden.