

**Regulation des subzellulären Transports
von HCN1-Kanälen durch assoziierte
intrazelluläre Proteine**

Dissertation
zur Erlangung der Würde des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Wiebke Wilkars

aus Kiel

Hamburg

August 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. R. BENDER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. E. KRAMER
Tag der Disputation: 25. Oktober 2013

Hamburg, den 10. Oktober 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2009 bis Mai 2013 im Institut für Neuroanatomie am Zentrum für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Roland Bender angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Roland Bender
2. Gutachter: PD Dr. Edgar Kramer

Disputation am 25.10.2013

*Die Tragödie der Wissenschaft – das Erschlagen einer
schönen Hypothese durch eine hässliche Tatsache.*

Thomas Henry Huxley (1825-95), brit. Zoologe

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	XI
Summary	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Aufbau des Nervensystems	1
1.2 HCN-Kanäle	2
1.2.1 HCN-Kanäle generieren den H-Strom (I_h)	2
1.2.2 Molekularstruktur von HCN-Kanälen	4
1.2.3 Gewebsexpression von HCN-Kanälen im Gehirn	4
1.2.4 Bedeutung der subzellulären Lokalisation von HCN-Kanälen	5
1.3 Regulation von HCN-Kanälen	7
1.3.1 Regulation durch kovalente posttranslationale Modifikationen	8
1.3.2 Regulation durch nicht-kovalente posttranslationale Modifikationen	8
1.4 TRIP8b als β-Untereinheit von HCN-Kanälen	9
1.5 Ziel der Arbeit	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Material	13
2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	13
2.1.2 Geräte.....	13
2.1.3 Software.....	14
2.1.4 Antikörper.....	15
2.1.5 Vektoren	16
2.1.6 Oligonukleotide	17
2.1.7 Organismen.....	18
2.1.7.1 Bakterien.....	18
2.1.7.2 Zelllinie.....	18
2.1.7.3 Hefestämme	19
2.1.8 Versuchstiere	19
2.1.9 Konstrukte.....	20

2.1.10	Standards.....	21
2.1.11	Kits zur Reinigung und Isolierung von DNA und RNA.....	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	22
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	23
2.2.1.3	DNA-Fragment-Isolierung.....	23
2.2.1.4	DNA-Ligation.....	23
2.2.1.5	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	24
2.2.1.6	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	24
2.2.1.7	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	25
2.2.1.8	Midipräparation von Plasmid-DNA.....	25
2.2.1.9	Glycerolkulturen.....	26
2.2.1.10	Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	26
2.2.1.11	Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung.....	26
2.2.1.12	RNA-Extraktion.....	26
2.2.1.13	cDNA-Synthese (RT-PCR).....	27
2.2.2	Yeast Two-Hybrid Screen.....	27
2.2.2.1	Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA.....	28
2.2.2.2	Yeast Two-Hybrid Library Mating.....	29
2.2.2.3	Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe.....	30
2.2.2.4	Co-Transformationen.....	31
2.2.3	Biochemische Methoden.....	31
2.2.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	31
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford.....	32
2.2.3.3	SDS-PAGE.....	32
2.2.3.3.1	Herstellung der Gele.....	33
2.2.3.4	Immunblot (Westernblot).....	34
2.2.3.5	Co-Immunpräzipitation.....	35
2.2.4	Zellbiologische Methoden.....	36
2.2.4.1	Medien und Kulturbedingungen.....	36
2.2.4.2	Passagieren von Zellen.....	37
2.2.4.3	Primäre Zellkultur.....	37
2.2.4.4	Transiente Transfektion von Zellen.....	38

2.2.4.4.1	Transfektion mit FuGENE® Transfektionsreagenz.....	38
2.2.4.4.2	Transfektion mit Effectene® Transfektionsreagenz	39
2.2.5	Immunhistochemische Methoden.....	40
2.2.5.1	Fixierung und Permeabilisierung der transfizierten Zellen	40
2.2.5.2	Immunfluoreszenz.....	40
2.2.5.3	Immunhistochemie.....	41
2.2.5.4	<i>In Situ</i> Proximity Ligation Assay (Duolink II)	42
2.2.5.5	<i>In Situ</i> Hybridisierung.....	43
2.2.6	Statistik	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Regulierung des axonalen HCN1-Transports durch spezifische TRIP8b-Isoformen	46
3.1.1	TRIP8b wird im entorhinalen Cortex altersabhängig exprimiert	49
3.1.2	TRIP8b beeinflusst isoform-spezifisch die subzelluläre HCN1-Lokalisation.....	52
3.2	Suche nach Bindungspartnern für bekannte Interaktionsmotive in der HCN1-Sequenz.....	59
3.2.1	HCN1 verfügt über ein „PY“-Motiv.....	59
3.2.2	Identifizierung und Charakterisierung der Interaktion von Nedd4-2 und HCN1 <i>in vitro</i>	60
3.2.2.1	Nedd4-2 interagiert mit HCN1 <i>in vitro</i>	60
3.2.2.2	Eingrenzung der interagierenden Domäne von HCN1	61
3.2.3	Nedd4-2 und HCN1 interagieren <i>in vivo</i>	64
3.2.3.1	Identifizierung der Interaktion von Nedd4-2 und HCN1 im Gehirn	65
3.2.3.2	Charakterisierung der Expression von Nedd4-2 im Gehirn.....	67
3.2.4	HCN1 wird durch Nedd4-2 ubiquitinyliert.....	68
3.2.5	Funktionelle Untersuchung der Interaktion von Nedd4-2 mit HCN1	70
3.3	Suche nach Interaktionspartnern für den N-Terminus von HCN1	75
3.3.1	Suche nach Bindungspartnern für den N-Terminus von HCN1 mittels eines Yeast Two-Hybrid Screens.....	75
3.3.1.1	Klonierung des Köderkonstrukts und Test auf Autoaktivierung und Toxizität..	75
3.3.1.2	Screening einer humanen Hirn cDNA-Bank	76
3.3.1.3	Bestätigung der gefundenen Interaktion mittels Co-Immunpräzipitation	78
3.3.2	Biochemische Charakterisierung der Interaktion von SNX3 mit HCN1	79

3.3.3	Charakterisierung der Expression von SNX3 im Gehirn	81
3.3.3.1	SNX3 interagiert mit HCN1 in entorhinalen Neuronen <i>in situ</i>	84
3.3.4	Untersuchung des Einflusses von SNX3 auf die Oberflächenexpression von HCN1	87
4	DISKUSSION	89
4.1	Die Regulation des axonalen Transports von HCN1 im Tractus perforans wird durch die Expression bestimmter TRIP8b-Isoformen beeinflusst	90
4.2	Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 reguliert die Oberflächenexpression von HCN1	92
4.3	HCN1 ist mit dem endosomalen Transportprotein SNX3 assoziiert.....	96
4.4	Versuch einer Synthese der vorgestellten Befunde	100
4.5	Ausblick.....	102
5	LITERATUR	104
6	ANHANG	112
6.1	Abbildungsverzeichnis	112
6.2	Tabellenverzeichnis.....	114
6.3	Publikationsverzeichnis	115
6.4	Wissenschaftlicher Werdegang.....	117
	Danksagung.....	118
	Eidesstattliche Erklärung	119

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AA	„Amino acid“ (Aminosäure)
AH109	<i>S. cerevisiae</i> -Stamm für Y2H
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
AP2	Adapter Protein 2
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
CA	Cornu ammonis
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	„Complementary DNA“
cds	„Coding sequence“
CMV	Cytomegalie-Virus
CNBD	„Cyclic nucleotide binding domain“
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DG	Gyrus dentatus
DIG	Digoxigenin
DIV	„Days <i>in vitro</i> “
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DTT	Dethiothreitol
E	Eluat
E64-d	Inhibitor lysosomaler Proteasen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Entorhinaler Cortex
ECL	„Enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„Enhanced GFP“
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERC	Endosomales Recycling-Kompartiment
et al.	„et altera“ (und andere)
FCS	fetales Kälberserum
g, kg, mg, µg	Gramm, Kilogramm, Milligramm, Mikrogramm
GABA	Gammaaminobuttersäure
Gal4	Hefespezifischer Transkriptionsfaktor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gcl	„Granule cell layer“ (Körnerzellschicht)
GFP	„Green fluorescent protein“ (Grün-fluoreszierendes Protein)
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HBSS	„Hanks Balanced Salt Solution“ (gepufferte Salzlösung)
HC	Hippocampus
HCN	„Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated (channel)“
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie

hil	Hilus
HRP	„Horseradish peroxidase“ (Meerrettich-Peroxidase)
i. p.	Intraperitoneal
ICC	Immuncytochemie
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
I _h	H-Strom; hyperpolarisations-aktivierter Strom
IHC	Immunhistochemie
iml	„Inner molecular layer“ (Innere Molekularschicht)
Inp	„Input“
IP	Immunpräzipitation
ISH	<i>In situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobasenpaar
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
K _v	Spannungsabhängige Kaliumkanäle
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Bertani-Medium
M	Mol
m, cm, mm, µm, nm	Meter, Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM, µM, nM	Molar (1 Mol/l), millimolar, mikromolar, nanomolar
mA	Milli-Ampere
MEM	„Minimal Essential Medium“
MG-132	Proteasom-Inhibitor
min	Minuten
mml	Mittlere Molekularschicht
mV	Milli-Volt
MVB	„Multi-vesicular body“
n	Anzahl
NA	Numerische Apertur
Na _v	Spannungsabhängige Natriumkanäle
Nedd4	„Neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 4“
NEM	N-Methylmaleimid
OD	Optische Dichte
oml	„Outer molecular layer“ (Äußere Molekularschicht)
P	Postnatal
p	p-Wert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„Phosphat bufferd saline“ (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PLA	„Proximity ligation assay“
PM	Plasmamembran
PX	Phox-Domäne
PY-Motiv	Prolin- und Tyrosin-reiches Motiv
QDO-Medium	„Quadrupel Dropout“-Medium
Rab8b	„Ras-related protein 8b“

RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	„Rotations per minute“
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD-Medium	„Single Dropout“-Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	„Standard error of the mean“; Standardfehler
slm	Stratum lacunosum moleculare
SNX	Sorting Nexin
sog.	sogenannt
sp	Stratum pyramidale
sr	Stratum radiatum
SSC	„Saline-sodium citrate“ (Natriumcitrat-gepufferte Kochsalzlösung)
Sub	Subiculum
Tau	Mikrotubuli-assoziiertes Protein (axonaler Marker)
TBE	„Tris-buffered saline“ (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) mit EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TM	Transmembrandomäne
TPR	„Tetratricopeptide repeat“ (Strukturmotiv)
TRIP8b	„Tetratricopeptide repeat (TPR)-containing Rab8b-interacting protein“
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TX-100	Triton X-100
u	„unit“ (Enzymeinheit)
Ubi	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
V, mV	Volt, Millivolt
w/v	„weight per volume“ (Gewicht pro Volumen)
WB	Westernblot
Well	Vertiefung
x g	Erdbeschleunigung
X- α -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-galactopyranosid
Y187	<i>S. cerevisiae</i> -Stamm für Y2H
Y2H	„Yeast Two-Hybrid“-Verfahren
YPD-Medium	„Yeast Extract Peptone Dextrose“-Medium

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Beeinflussung des subzellulären Transports von HCN1-Kanaluntereinheiten durch assoziierte intrazelluläre Proteine untersucht. HCN-Kanäle sind spannungsabhängige Ionenkanäle, die während der Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert werden und über einen Einstrom von Natriumionen zu einer Depolarisation führen. Damit bereiten sie zum einen die Nervenzelle auf die Ausbildung eines neuen Aktionspotentials vor, zum anderen wirken sie aber auch regulierend auf die verschiedenen Einflüsse, denen ein Neuron in einem neuronalen Netzwerk ausgesetzt ist. Die exakte Funktion von HCN-Kanälen ist zudem abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation. Diese kann sich in Abhängigkeit der Neuronenpopulation unterscheiden. Wichtig für die Regulation des subzellulären Transports sind posttranslationale Modifikationen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus vor allem auf nicht-kovalente posttranslationale Modifikationen gelegt, d. h. die feste Assoziation von β -Untereinheiten oder die Interaktion mit intrazellulären Transportproteinen, die regulierend auf die Oberflächenexpression oder die Degradation von Kanälen des HCN1-Typs wirken können. Diese Arbeit gliederte sich zum einen in die Untersuchung einer bereits bekannten β -Untereinheit der HCN1-Kanäle, dem Rab8b-interagierenden Protein TRIP8b, zum anderen wurden zwei bisher unbekannte Interaktionspartner von HCN1-Kanälen identifiziert: die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 und das Sorting Nexin 3, ein am Retromerkomplex beteiligtes Transportprotein. Diese drei Proteine wurden hinsichtlich ihrer Bedeutung für den subzellulären Transport von HCN1 sowohl mit zellbiologischen, als auch mit biochemischen und immunhistochemischen Methoden untersucht.

Die Untersuchung des Einflusses von TRIP8b erstreckte sich auf die beiden hauptsächlich im Gehirn exprimierten Isoformen, TRIP8b(1a-4) und TRIP8b(1a), und ihre Funktion an der Regulation des axonalen Transports von HCN1. Diese Experimente wurden am etablierten Tractus perforans-Modell durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Isoform TRIP8b(1a) den Transport von HCN1 in diesen Neuronen dahingehend beeinflusst, dass die Interaktion zu einer Steigerung der somato-dendritischen und Reduktion der axonalen HCN1-Expression führt. Für TRIP8b(1a-4) konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Die Ubiquitin E3-Ligase Nedd4-2 wurde als Protein identifiziert, das mit HCN1 über ein erweitertes "PY"-Motiv im C-Terminus der Kanäle interagiert. Die HCN1-Nedd4-2-

Interaktion führt zur verstärkten Ubiquitylierung der Kanäle und einer Veränderung des Glykosylierungsstatus. Außerdem reduziert sich in Anwesenheit von Nedd4-2 der relative Anteil von an der Zelloberfläche exprimiertem HCN1 bei gleichzeitiger Stabilisierung des internen HCN1.

Das Sorting Nexin 3 wurde als Interaktionspartner mittels eines "Yeast Two-Hybrid"-Systems identifiziert und die Interaktion im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Es handelt sich hierbei um ein Mitglied des Retromerkomplexes, welcher den Transport von endocytisierten Transmembranproteinen zum Trans-Golgi-Netzwerk vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass SNX3 und HCN1 überlappende Expressionsmuster im Gehirn aufweisen. Eine Interaktion beider Proteine konnte *in vitro* und *in situ* nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde tragen zu einem erweiterten Verständnis der Regulationsmechanismen des intrazellulären Transports von HCN1-Kanälen bei, die bisher noch weitgehend unbekannt sind. Sie bieten einen guten Ausgangspunkt zur weiteren Erforschung der komplexen Maschinerie, die die Funktion von HCN-Kanälen in Neuronen reguliert.

Summary

In this work, the influence of the intracellular binding proteins on the subcellular transport of HCN1 channel subunits was investigated. HCN channels are voltage-dependent ion channels that activate upon hyperpolarization of the plasma membrane and lead to depolarization via an inward current of mainly sodium ions thus facilitating the generation of a new action potential and regulating the properties of individual neurons, as they get different input from other cells in the neuronal network. However, the precise function of HCN channels is dependent on their subcellular localization, which can vary in different neuronal populations. Due to the fact that the mechanisms that mediate the subcellular transport of ion channels often include the association with intracellular binding proteins such as β -subunits or proteins of the cellular sorting machinery, the role of known HCN1 associated proteins, the Rab8b-associated protein TRIP8b, as well as two newly identified HCN1-binding proteins - Nedd4-2 and SNX3 - was examined in this study using cell biology, biochemical and immunohistochemical methods.

The investigation of the influence of TRIP8b focused on the two major isoforms in the brain, TRIP8b(1a-4) and TRIP8b(1a), and additionally on their functionality within the regulation of the axonal transport of HCN1. These experiments were performed by using the established perforant path model. The presence of TRIP8b(1a), but not TRIP8b(1a-4), leads to a shift of the HCN1 expression towards the somato-dendritic compartment with a simultaneous reduction of its axonal expression.

The ubiquitin E3-ligase Nedd4-2 was identified as a binding protein of HCN1 interacting via an extended PY-motif in the HCN1 C-terminus. This interaction causes the ubiquitination of HCN1 followed by subsequent proteasomal or lysosomal degradation. Nedd4-2 thus regulates the surface expression of HCN1.

Sorting Nexin 3 (SNX3) was identified as an interaction partner using the yeast two-hybrid system and the interaction was further characterized. SNX3 is a member of the retromer complex that governs the transport of endocytosed transmembrane proteins towards the trans-golgi network. It was shown that SNX3 and HCN1 have overlapping expression patterns in the brain. Interaction of both proteins could be further demonstrated *in vitro* and *in situ*.

The results presented in this work contribute to an extended understanding of regulation of the intracellular transport of HCN1 subunits that is widely unknown at the moment. The investigation and characterization of several, partially unknown interaction partners acting differently on the regulation of HCN channels provide a promising base for a further exploration of the complex machinery that govern these trafficking processes.

1 EINLEITUNG

1.1 Aufbau des Nervensystems

Das Nervensystem höherer Organismen ist ein komplexer Zellverband aus Neuronen und Gliazellen. Neurone bilden die eigentliche Funktionseinheit des Nervensystems, ihre Aufgaben sind die Verarbeitung, Speicherung und Weiterleitung von Informationen. Sie sind in einem hochkomplexen Netzwerk angeordnet, welches eine Kommunikation der Zellen untereinander ermöglicht. Um diese Aufgaben wahrnehmen zu können, sind Neurone anatomisch hochspezialisiert: Vom Zellkörper, auch Soma genannt, welches den Zellkern und die Zellorganellen enthält, gehen Dendriten und ein Axon ab. Dendriten können weit verzweigt sein und dienen der Aufnahme von Informationen von benachbarten Neuronen. Das Axon ist ein langer dünner Fortsatz, der zur Weiterleitung der Erregung dient. Vom Soma ausgehend bildet es zunächst den Axonhügel, der den Ort der Aktionspotentialbildung darstellt, um in einigem Abstand vom Soma meist von einer lipidhaltigen Myelinscheide umhüllt zu werden. Diese weist in regelmäßigen Abständen Einkerbungen auf, die als Ranviersche Schnürringe bezeichnet werden und die bedeutend für die Weiterleitung des Aktionspotentials sind. An seinem Ende zweigt sich das Axon in mehrere Axonterminalen auf, um mit kleinen Endknöpfchen, sog. Boutons, an benachbarten Neuronen Synapsen zu bilden. Die Überbrückung des synaptischen Spaltes erfolgt mithilfe von Neurotransmittern, die in der Präsynapse in Vesikeln gelagert sind und durch das eintreffende Aktionspotential freigesetzt werden. Sie diffundieren durch den synaptischen Spalt und erreichen an der Postsynapse ihre Rezeptoren, die durch die Bindung ihres Liganden die elektrische Erregung weiterleiten können.

Für die Generierung und Weiterleitung von elektrischer Erregung innerhalb eines Neurons, aber auch für die Verschaltung von Neuronen in einem hochkomplexen Netzwerk spielen Ionenkanäle eine fundamentale Rolle. Sie werden entweder durch Bindung von Liganden (ligandengesteuert) oder durch Änderung des Membranpotentials (spannungsgesteuert) aktiviert und können selbst aktivierend oder hemmend auf die Aktionspotentialbildung eines Neurons wirken, je nachdem, für welche Ionen sie permeabel sind. Feinste und vielfältige Regulationsmechanismen beeinflussen die Expression und die Verteilung von Ionenkanälen innerhalb einer Zelle, sodass einzelnen Neuronen, die eine Vielzahl von synaptischen Eingängen von benachbarten Neuronen enthalten, die Kontrolle und Begrenzung des

Reizflusses ermöglicht wird. Während die meisten spannungsgesteuerten Ionenkanäle erst durch Depolarisierung der Zellmembran aktiviert werden, gibt es Ionenkanäle, die bereits im Bereich des Ruhemembranpotentials aktiv sind und dieses durch ihre Aktivität stabilisieren. Zu diesen Kanälen gehören auch die sog. HCN („Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide gated“-)Kanäle (Clapham, 1998).

1.2 HCN-Kanäle

HCN-Kanäle gehören strukturell zur Superfamilie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle und werden vor allem in Zellen des Herzens und in Neuronen exprimiert. Sie leiten jedoch sowohl Kalium- als auch aus Natriumionen (in einem Verhältnis von 3:1 bis 5:1) und werden, anders als andere Kaliumkanäle, während der Hyperpolarisation der Zellmembran bei Potentialen zwischen -50 und -60 mV aktiviert. Aufgrund des stärkeren elektrochemischen Gradienten fließen bei diesen Membranpotentialen vor allem Natriumionen von außen nach innen und erzeugen dadurch einen depolarisierenden Einwärtsstrom, den H-Strom (I_h) (Brown et al., 1979; DiFrancesco, 1993; Pape, 1996; Kaupp and Seifert, 2001; Robinson and Siegelbaum, 2003). Ein HCN-Kanal ist tetramerisch aufgebaut, d. h., er besteht aus vier Untereinheiten, die sich so zusammenlagern, dass eine zentrale Pore entsteht, die den Durchtritt von Ionen ermöglicht. Es existieren vier verschiedene Isoformen (HCN1-4), die homo- oder heteromere Kanäle bilden. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich zum Teil deutlich in ihren Aktivierungskinetiken und Sensitivitäten gegenüber cAMP. Außerdem sind die Expressionsmuster der vier HCN-Gene im Säugetiergehirn regional unterschiedlich, wobei es aber auch zu Überlappungen kommt (Moosmang et al., 1999; Santoro et al., 2000; Baram and Santoro, 2003; Notomi and Shigemoto, 2004). Diese Parameter bilden die Grundlage für die Heterogenität des nativen I_h . Zusätzlich weisen HCN-Kanäle in Abhängigkeit der Neuronenpopulation und der exprimierten Isoformen unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen auf (Pape, 1996; Bender and Baram, 2008), was die Funktionen der HCN-Kanäle besonders vielfältig macht.

1.2.1 HCN-Kanäle generieren den H-Strom (I_h)

Der H-Strom (I_h ; „hyperpolarisations-aktiviert“) wurde erstmals in den späten siebziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts im Herzen beobachtet, wo er an der Ausbildung der

rhythmischen Erregung im Sinusknoten beteiligt ist (Brown et al., 1979; DiFrancesco, 1993). Einige Jahre später wurde seine Bedeutung in neuronalen Netzwerken entdeckt (Pape, 1996). I_h unterscheidet sich in seinen Eigenschaften deutlich von anderen Strömen und wurde deshalb anfangs auch als I_f („funny“) oder I_q („queer“) bezeichnet. Der langsame Einstrom von positiv geladenen Ionen führt zu einer Depolarisation der Zellmembran, die mit zunehmendem Erreichen des Ruhemembranpotentials zur Inaktivierung von I_h führt (Robinson and Siegelbaum, 2003). Eine weitere Besonderheit ist seine Sensitivität gegenüber cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches die Aktivierung des Stroms bei positiveren Potentialen ermöglicht und so das Ausmaß und die Geschwindigkeit des I_h positiv beeinflusst (DiFrancesco and Tortora, 1991). Durch die Aktivierung von I_h und die daraus resultierende Repolarisation wird in den Zellen die erneute Ausbildung eines Aktionspotentials vorbereitet, was diesem Strom auch den Namen Schrittmacher-Strom eingebracht hat. Dies ist vor allem in Zelltypen der Fall, in denen die Generierung rhythmischer Erregung wichtig ist, wie im Herzen im Sinusknoten oder in den Purkinje-Fasern, aber auch im Gehirn, wo z. B. Neurone der Relaiskerne im Thalamus oder Interneurone im Stratum oriens des Hippocampus synchronisierte rhythmische Aktivität aufweisen (McCormick and Pape, 1990; Maccaferri and McBain, 1996). Eine weitere Eigenschaft des I_h ist die Senkung des Eingangswiderstandes der Membran, sodass der Einfluss anderer Ströme auf das Membranpotential reduziert ist (Bender and Baram, 2008). I_h spielt somit bei der Aufrechterhaltung der intrinsischen neuronalen Erregbarkeit in bestimmten Neuronenpopulationen eine wichtige Rolle. Der Gesamteinfluss auf die Zelle setzt sich dabei aus einer Balance der unterschiedlichen Eigenschaften des Stromes zusammen. I_h ist aber auch in Zellen zu finden, die nicht rhythmisch aktiv sind, wie Photorezeptoren der Retina oder hippocampale CA1 Pyramidenzellen. Dort ist I_h an der Regulierung des Membranpotentials, des Eingangswiderstandes und der synaptischen Integration beteiligt, was zu einer Regulierung des Einflusses exzitatorischer oder inhibitorischer Impulse von benachbarten Zellen führt (Pape, 1996; Robinson and Siegelbaum, 2003).

Da HCN-Kanäle für die intakte Funktion neuronaler Netzwerke eine große Rolle spielen, ist es nicht verwunderlich, dass eine Beteiligung von Störungen der Expression oder Funktion der Kanäle und damit verbundene Störungen im Gleichgewicht von Hemmung und Erregung oder der Bildung von Rhythmicität an der Entstehung vieler Krankheiten wie verschiedenen

Formen der Epilepsie oder neuropathischem Schmerz nachgewiesen wurden oder vermutet werden (Chaplan et al., 2003; Robinson and Siegelbaum, 2003; Bender and Baram, 2008).

1.2.2 Molekularstruktur von HCN-Kanälen

Ein schematischer Aufbau der Molekularstruktur einer HCN-Kanal-Untereinheit ist Abbildung 1-1 zu entnehmen. Sie besteht aus sechs Transmembrandomänen, von denen die vierte positiv geladen ist und als Spannungssensor dient. Zwischen dem fünften und dem sechsten Transmembransegment befindet sich die porenformende Region, welche die Aminosäuresequenz „GYG“ beinhaltet. Diese Sequenz ist vielen Kaliumkanälen gemein und dient der Ionenselektivität. N- und C-Terminus sind cytoplasmatisch lokalisiert, wobei der C-Terminus wesentlich länger und komplexer aufgebaut ist. Er beinhaltet die Bindungsdomäne für cAMP (CNBD, „cyclo-nucleotide binding domain“), die etwa 120 Aminosäuren lang ist. Die Transmembran- und cAMP-Bindungsdomänen sind bei allen HCN-Isoformen hochkonserviert (80-90% Homologie), wohingegen die extremen N- und C-Termini nur sehr schwache Homologien aufweisen (DiFrancesco and Tortora, 1991; Gauss et al., 1998; Robinson and Siegelbaum, 2003).

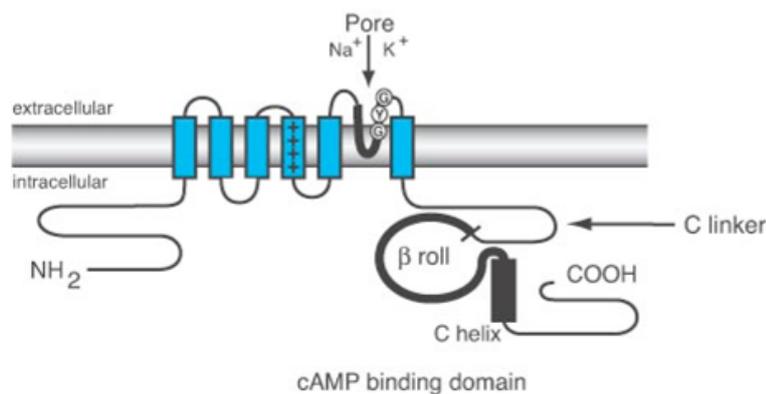


Abbildung 1-1: Struktur einer HCN-Kanal-Untereinheit.

Modifiziert nach (Robinson and Siegelbaum, 2003).

1.2.3 Gewebsexpression von HCN-Kanälen im Gehirn

Welche HCN-Isoformen in der Zelle exprimiert werden, ist abhängig von der Neuronenpopulation und dem Entwicklungsstadium (Brewster et al., 2002; Bender et al., 2007; Bender and Baram, 2008). Diese Variabilität ist eine Voraussetzung für die fein

abgestimmten Eigenschaften des I_h . Dabei ist aber meist eine gewebsspezifische Präferenz der Expression für die einzelnen Isoformen erkennbar. So wird HCN1 überwiegend in corticalen Regionen wie dem Neocortex, dem Hippocampus und im Cerebellum exprimiert. HCN3 und HCN4 sind überwiegend in subcorticalen Regionen wie dem Hypothalamus und Thalamus lokalisiert, wobei HCN3 im Gehirn generell nur sehr schwach exprimiert wird. HCN4 ist außerdem schwach im Hippocampus und im Neocortex detektierbar. HCN2 hingegen wird in verschiedenen Neuronenpopulationen, ohne strenge Begrenzung auf bestimmte Hirnregionen, exprimiert (Moosmang et al., 1999; Santoro et al., 2000; Notomi and Shigemoto, 2004). Dabei scheint die funktionelle Heterogenität des I_h in bestimmten Hirnarealen die molekulare Heterogenität der einzelnen HCN-Isoformen widerzuspiegeln. So lässt sich in CA1 Neuronen des Hippocampus, in denen vor allem HCN1 exprimiert wird, ein schnell aktivierender I_h messen, wohingegen in Neuronen der Relaiskerne im Thalamus, die einen langsam aktivierenden I_h aufweisen, vor allem die langsamer aktivierenden Isoformen HCN2 und HCN4 exprimiert werden (Santoro et al., 2000). Oftmals kommt es bei überlappenden Verteilungsmustern der einzelnen Isoformen zur Bildung heteromerer Kanäle, die eine Mischung der Eigenschaften der einzelnen Isoformen aufweisen, was die Heterogenität des I_h noch weiter erhöht (Brewster et al., 2005).

1.2.4 Bedeutung der subzellulären Lokalisation von HCN-Kanälen

Die Funktion der HCN-Kanäle hängt wesentlich von der Lokalisation innerhalb der Zelle ab. Die Kanäle können sowohl in somato-dendritischen als auch in axonalen Kompartimenten vorkommen, ihre genaue Lokalisation ist aber, ebenso wie die Ausstattung an Isoformen, abhängig von der Neuronenpopulation. In CA1 Pyramidenzellen des Hippocampus werden HCN-Kanäle vorwiegend dendritisch exprimiert (Lörincz et al., 2002; Notomi and Shigemoto, 2004; Brewster et al., 2007), während in Korbzellen, die eine Gruppe der hemmenden GABAergen Interneurone darstellen, HCN-Kanäle vornehmlich im Soma, aber auch im Axon zu finden sind (Notomi and Shigemoto, 2004; Aponte et al., 2006; Brewster et al., 2007). Die Sternzellen der Schicht II des entorhinalen Cortex hingegen zeigen eine dominante Expression von HCN-Kanälen in den Axonen (Bender et al., 2007). Abbildung 1-2 verdeutlicht diese unterschiedliche Aufteilung.

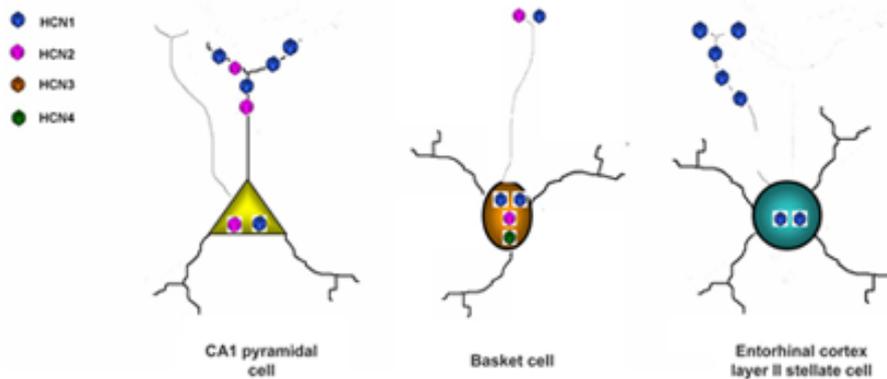


Abbildung 1-2: Subzelluläre Lokalisation der HCN-Kanäle in verschiedenen Neuronenpopulationen der Hippocampusformation

Beispielhafte Darstellung der unterschiedlichen subzellulären Lokalisation der HCN-Kanäle und deren Isoform-Spezifität; nach (Bender and Baram, 2008).

Da HCN-Kanäle aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation in den einzelnen Kompartimenten auch unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen, werden diese im Folgenden am Beispiel der Hippocampusformation genauer beschrieben:

In Dendriten haben HCN-Kanäle die Aufgabe, die Integration und Summation synaptischer Eingänge zu kontrollieren (Magee, 1998). HCN1 ist in diesem Zellkompartiment die dominante Isoform. Die Kanäle können gleichmäßig in der dendritischen Membran verteilt sein oder wie in apikalen Dendriten von CA1 Pyramidenzellen in einem Gradienten an der Zelloberfläche lokalisiert sein, der vom Soma zu den distalen Dendriten hin ansteigt (Lörincz et al., 2002). Der resultierende I_h -Gradient hat die Aufgabe, den Effekt von distalen synaptischen Eingängen zu reduzieren (Magee, 1998). Zusätzlich führt die Steigerung der Kanaldichte zu einer lokalen Erhöhung der Membranleitfähigkeit und damit zu einer Angleichung der synaptischen Summation distaler Eingänge gegenüber proximaler Eingänge (Robinson and Siegelbaum, 2003). Nolan et al. zeigten außerdem, dass diese Effekte von dendritischen HCN1-Kanälen an Lernvorgängen und der Konsolidierung von Gedächtnisleistungen beteiligt sind (Nolan et al., 2004).

Somatisch lokalisierte HCN-Kanäle sind vor allem in hippocampalen und corticalen Interneuronen zu finden, wo sie an der Regulierung von Zelleigenschaften wie der Einstellung des Ruhemembranpotentials und der allgemeinen Erregbarkeit der Zelle beteiligt sind (Lupica et al., 2001).

In Axonen wurde die Präsenz von HCN-Kanälen vor allem in den Axonterminalen beschrieben. Dort sind sie an der Modulation der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt (Aponte et al., 2006; Bender et al., 2007; Huang et al., 2011). So konnten Huang et al. kürzlich zeigen, dass präsynaptische HCN1-Kanäle in Neuronen der Schicht III des entorhinalen Cortex inhibierend auf die Freisetzung von Glutamat wirken, indem sie den für die Transmitterfreisetzung erforderlichen Calcium-Einstrom durch eine Beeinflussung spannungsabhängiger Calciumkanäle reduzieren (Huang et al., 2011). Auch Neurone der Schicht II des entorhinalen Cortex verfügen über präsynaptisch lokalisierte HCN1-Kanäle. Die Axone der dort lokalisierten Sternzellen ziehen zum Hippocampus und bilden überwiegend mit den Körnerzellen des Gyrus dentatus Synapsen, mit einem kleineren Anteil aber auch mit den Pyramidenzellen von CA3. Dieser Fasertrakt wird als Tractus perforans bezeichnet und stellt den wichtigsten afferenten Eingang des Hippocampus dar. Er besteht aus zwei Anteilen, einem medialen und einem lateralen. Der mediale Anteil hat seinen Ursprung im medialen entorhinalen Cortex und seine hauptsächliche Terminationszone in der mittleren Molekularschicht des Gyrus dentatus. In diesen Axonterminalen, nicht aber im Soma der Ursprungszellen, haben Bender et al. eine altersabhängige Expression von HCN1-Kanälen gefunden, die vom jungen zum adulten Tier drastisch abnimmt und dadurch die synaptische Plastizität während der Hippocampus-Entwicklung beeinflussen kann. Im lateralen Anteil des Tractus perforans hingegen wird HCN1 nicht exprimiert (Bender et al., 2007).

1.3 Regulation von HCN-Kanälen

Die Regulationsmöglichkeiten von HCN-Kanälen sind sehr vielfältig und beeinflussen die Aktivität der Kanäle, ihre Oberflächenexpression und ihren Transport in die verschiedenen subzellulären Kompartimente. Der bekannteste Regulationsmechanismus ist dabei die Beeinflussung der HCN-Aktivität durch cyclische Nukleotide (insbesondere cAMP) (DiFrancesco and Tortora, 1991; Zagotta et al., 2003; Biel et al., 2009). Daneben sind transkriptionelle und posttranslationale Mechanismen bei der Regulation der Isoformkomposition und der Oberflächenexpression beschrieben (Proenza et al., 2002; Tran et al., 2002; Bender and Baram, 2008; Zha et al., 2008; Lewis et al., 2010). Mit Hinblick auf den subzellulären Transport gibt es Hinweise, dass transkriptionelle Mechanismen keine wesentliche Rolle spielen und dass diese Regulation überwiegend über posttranslationale Modifikationen vermittelt wird (Bender et al., 2007). Hier unterscheidet man zwischen

kovalenten und nicht-kovalenten Modifikationen. Diese sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.

1.3.1 Regulation durch kovalente posttranslationale Modifikationen

Als kovalente Modifikationen sind für HCN-Kanäle Glykosylierungen und Phosphorylierungen beschrieben. Die Glykosylierung scheint ein aktivitätsabhängiger Prozess zu sein, der vor allem HCN1-Untereinheiten betrifft und zu einer verstärkten Bildung von Heteromeren mit HCN2 führt (Zha et al., 2008). Es ist aber auch denkbar, dass die Glykosylierung für die Lokalisation der Kanäle eine Rolle spielt (Deutsch, 2002; Hegle et al., 2010). Die Phosphorylierung betrifft ebenfalls überwiegend HCN1-Untereinheiten und kann, wie auch die Glykosylierung, durch neuronale Aktivität gesteuert werden (Poolos et al., 2006). Der Phosphorylierungsstatus beeinflusst die Aktivität von HCN1, es ist aber auch eine Beteiligung am Transport der Kanäle vorstellbar, wie er für K_v2.1-Kaliumkanäle beschrieben wurde (Misonou et al., 2004).

1.3.2 Regulation durch nicht-kovalente posttranslationale Modifikationen

Unter nicht-kovalenten posttranslationalen Modifikationen versteht man die (temporäre) Assoziation von Proteinen, die regulierend auf den Transport der Kanäle wirken. Diese lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen (Lai and Jan, 2006):

1. Sogenannte β -Untereinheiten, die relativ kanalspezifisch und dauerhaft mit den Kanaluntereinheiten assoziiert bleiben und als Bestandteil der zellulären Transportmaschinerie oder als „Anker“ in bestimmten Zellkompartimenten die subzelluläre Lokalisation der Kanäle (mit)bestimmen (Trimmer and Rhodes, 2003). Diese Untereinheiten binden an ihren Kanal über spezifische Domänen. Als Vertreter dieser Gruppe kann bei HCN-Kanälen das Rab8b-assoziierte Protein TRIP8b angesehen werden (vgl. 1.4).
2. Proteine der zellulären „Sorting“-Maschinerie, die kompartimentspezifisch die Endocytose, das „Recycling“ (also den Wiedereinbau in die Membran) und den Abbau von Membranproteinen kontrollieren und darüber regulierend auf die

subzelluläre Verteilung von Ionenkanälen einwirken können. Obwohl nicht so spezifisch wie im Fall der β -Untereinheiten, existieren auch hier charakteristische Bindungsmotive, über die bestimmte Ionenkanäle gebunden, endocytisiert und subzellulär „sortiert“ werden können (Bonifacino and Traub, 2003).

1.4 TRIP8b als β -Untereinheit von HCN-Kanälen

Das Protein TRIP8b („Tetratricopeptide repeat (TPR)-containing Rab8b-interacting protein“) ist eine assoziierte Untereinheit der HCN-Kanäle und kann als Cytoskelett-Adapterprotein deren Transport vielfältig beeinflussen (Santoro et al., 2004; Lewis et al., 2009; Santoro et al., 2009). TRIP8b unterliegt einem ausgeprägtem „Splicing“: Im Gehirn werden neun verschiedene Isoformen exprimiert, von denen drei (TRIP8b(1a), (1a-4) und (1b-2)) anteilmäßig überwiegen. Das Protein verfügt über eine lange konstante Region (Exon 5-16), der ein variabler N-Terminus vorausgeht, in dem Exon 1a oder 1b auf verschiedene Weise mit den Exonen 2-4 kombiniert werden. Dort befindet sich auch ein Bindungsmotiv für das AP2-Adapterprotein, welches an der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt ist. TRIP8b interagiert mit HCN-Kanälen an zwei Stellen: Die erste Interaktionsdomäne ist eine Sequenz in der Mitte der konservierten Region von TRIP8b, die an zwei C-terminal gelegene Regionen, die C-Linker-Region und die CNBD, von HCN-Untereinheiten bindet. Außerdem bindet die TPR („tetratricopeptide repeats“-)Proteinbindungsdomäne an die drei Aminosäuren (-SNL), die vor dem Stopcodon von HCN1, -2 und -4 liegen. Diese Interaktion stabilisiert die Assoziation von TRIP8b an die Kanaluntereinheiten (Lewis et al., 2009; Han et al., 2011; Santoro et al., 2011).

TRIP8b beeinflusst den Transport und die Aktivierungskinetik der HCN-Kanäle (Han et al., 2011). Alle Splicevarianten inhibieren die Kanalaktivierung (Santoro et al., 2009; Zolles et al., 2009), aber der Effekt auf den Membrantransport von HCN-Kanälen ist je nach exprimierter Splicevariante unterschiedlich: So führt TRIP8b(1a-4) zu einer 4-6-fachen Erhöhung der Oberflächenexpression von HCN1 in Oocyten, wohingegen TRIP8b(1a) die Oberflächenexpression um das fast 10-fache reduziert. Die dritte im Gehirn bedeutende Isoform TRIP8b(1b-2) eliminiert HCN1 fast vollständig von der Zelloberfläche (Santoro et al., 2009). Der Effekt auf den HCN1-Transport ist also abhängig von den in der jeweiligen Zelle exprimierten TRIP8b-Isoformen.

Die genaue Funktionsweise von TRIP8b ist am Beispiel der HCN1-Expression in distalen Dendriten von CA1 Pyramidenzellen in Abbildung 1-3 dargestellt. Sie verdeutlicht, dass die Interaktion von HCN1 mit TRIP8b nicht im Soma sondern erst in den Dendriten zustande kommt und dass TRIP8b am Transport von HCN1 zwischen Plasmamembran und endosomalem „Recycling“-Kompartiment (ERC) beteiligt ist. Dabei wird (isoform-spezifisch) die Balance zwischen oberflächlich exprimiertem und intrazellulärem HCN1 beeinflusst.

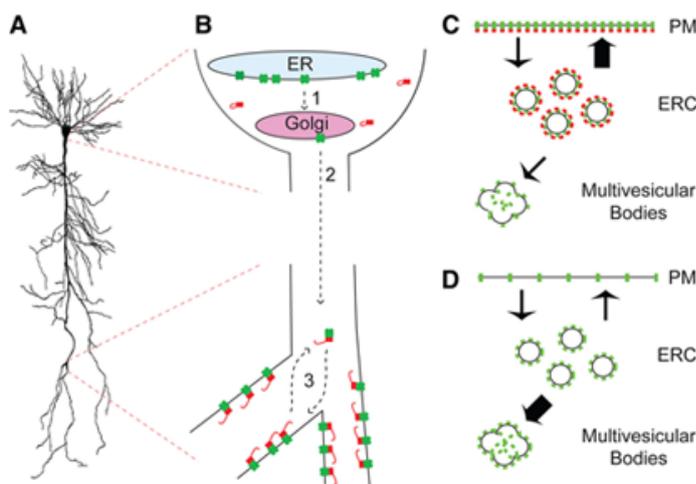


Abbildung 1-3: Schematisches Modell der Funktion von TRIP8b in CA1 Pyramidenzelle

A, Schema einer CA1 Pyramidenzelle. **B**, Schematische Vergrößerung von Soma (oben) und distalem Dendriten (unten). HCN1 (grün) wird im endoplasmatischen Reticulum (ER) exprimiert und in den distalen Dendriten transportiert, wo es zur Interaktion mit TRIP8b (rot) kommt. **C**, Schema eines distalen Dendriten einer CA1 Pyramidenzelle, in dem der Rücktransport von HCN1 (grün) vom endoplasmatischen Recyclingkompartiment (ERC) zurück an die Plasmamembran (PM) in Anwesenheit von TRIP8b (rot) gezeigt wird. **D**, Darstellung des HCN1-Transports in der TRIP8b^{-/-} Maus. Hier ist der Rücktransport von HCN1 an die Plasmamembran vermindert und der Abbau über die „Multivesicular Bodies“ erhöht; nach (Lewis et al., 2011).

Studien an TRIP8b^{-/-}-Mäusen zeigen, dass es in Abwesenheit von TRIP8b in CA1 Pyramidenzellen zu einer Abnahme des funktionellen I_h und zu einer Störung des somato-dendritischen Gradienten von HCN-Kanälen an der Zelloberfläche kommt (Lewis et al., 2011). Dennoch ist in Abwesenheit von TRIP8b I_h in den Zellen messbar, was darauf hinweist, dass noch andere Mechanismen am Transport von HCN-Kanälen beteiligt sind. Dies wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass TRIP8b im Herzen nicht exprimiert wird, also müssen auch hier andere Proteine an der Regulation des Transports beteiligt sein (Santoro et al., 2004; Lewis et al., 2011).

1.5 Ziel der Arbeit

In der Einleitung ist dargelegt worden, dass HCN-Kanäle an einer Vielzahl wichtiger neuronaler Funktionen beteiligt sind. Ihre unterschiedlichen Funktionen innerhalb der Zelle werden vor allem durch ihre subzelluläre Lokalisation bestimmt. Diese kann sich in einzelnen Neuronenpopulationen unterscheiden und wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Im Fokus dieser Arbeit stand der Einfluss nicht-kovalenter posttranslationaler Modifikationen auf diese Regulation. Dies können β -Untereinheiten oder am intrazellulären „Sorting“ beteiligte Transportproteine sein. Zwei verschiedene Fragestellungen wurden insbesondere untersucht:

Teilprojekt 1:

Hat TRIP8b einen Einfluss auf den axonalen HCN1-Transport?

Der Effekt der Interaktion mit der β -Untereinheit TRIP8b auf den dendritischen Transport von HCN1 wurde bereits beschrieben (Lewis et al., 2011; Piskorowski et al., 2011), über die Rolle von TRIP8b am axonalen Transport von HCN-Kanälen ist jedoch noch wenig bekannt. Im gut etablierten Tractus perforans-Modell (Bender et al., 2007) wurde daher in dieser Arbeit der Einfluss von TRIP8b auf den axonalen HCN1-Transport untersucht. Insbesondere die Einflüsse der verschiedenen TRIP8b-Isoformen wurden untersucht, da gezeigt werden konnte, dass sie in CA1 Pyramidenzellen unterschiedliche Effekte auf den HCN1-Transport ausüben (Piskorowski et al., 2011).

Teilprojekt 2:

Gibt es weitere Faktoren, die den Transport von HCN-Kanälen beeinflussen?

Da die bislang bekannten Befunde darauf hinweisen, dass noch andere Faktoren an der Regulation des subzellulären HCN-Transports wesentlich beteiligt sein müssen, wurden neben der funktionellen Untersuchung des bereits beschriebenen Interaktionspartners TRIP8b in dieser Arbeit auch der Versuch unternommen, weitere Interaktionspartner für HCN1 zu identifizieren. Dabei wurde der Fokus auf verschiedene strukturelle Bereiche der Kanaluntereinheit gelegt. Die Suche nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern für HCN1 gliedert sich deshalb in zwei Bereiche:

2a. Suche nach Bindungspartnern für bekannte Interaktionsmotive („PY“-Motiv) in der HCN1-Sequenz

Die Proteinsequenz der HCN1-Untereinheit wurde auf ihre Rolle hinsichtlich der Interaktion mit anderen Proteinen untersucht. Es ist bekannt, dass Transmembranproteine über kurze lineare Sequenzen in ihrer Primärstruktur verfügen, mithilfe derer der Transport innerhalb der Zelle reguliert werden kann (Bonifacino and Traub, 2003). Diese Motive dienen als Interaktionsdomänen für Proteine der intrazellulären Transportmaschinerie und regulieren somit wichtige Vorgänge wie die Internalisierung, den endosomalen Transport (Recycling) und den lysosomalen Transport (Abbau) (Bonifacino and Traub, 2003). Für Ionenkanäle wurde ein spezielles, Tyrosin basiertes Bindungsmotiv identifiziert, das sog. „PY“-Motiv. Es besteht aus der Aminosäureabfolge „PPxY“ (wobei x eine beliebige Aminosäure darstellt) (Bonifacino and Traub, 2003; Abriel and Staub, 2005). Da die HCN1-Untereinheit ebenfalls solch ein „PY“-Motiv beinhaltet, wurden zur Klärung einer möglichen Beteiligung dieses Motivs an der Regulation von HCN1 molekularbiologisch-proteinbiochemisch orientierte sowie immunhistochemische Experimente durchgeführt.

2b. Suche nach Interaktionspartnern für den N-Terminus von HCN1

Basierend auf den Erkenntnissen der spannungsabhängigen Kaliumkanalfamilie (K_v), die strukturell eng mit den HCN-Kanälen verwandt sind und deren β -Untereinheiten über den N-Terminus binden, stellte sich die Frage, ob nicht auch HCN-Kanäle über bislang unbekannte N-terminale Interaktionspartner verfügen. Zur Klärung dieser Frage wurde ein „Yeast Two-Hybrid-Screening“ für den N-Terminus von HCN1 durchgeführt. Mit diesem Verfahren lassen sich Interaktionspartner für Protein(-Fragmente) detektieren und durch anschließende, molekularbiologisch-proteinbiochemisch orientierte, experimentelle Ansätze genauer charakterisieren. Außerdem wurden auch hier immunhistochemische Methoden zur Klärung des Einflusses auf die subzelluläre HCN1-Lokalisation angewendet.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Die eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Thermo Scientific (Bremen), J. T. Baker (Deventer, Niederlande) oder BioRad (München) bezogen.

Die verwendeten Enzyme stammten, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Thermo Scientific (Bremen) und New England Biolabs (Frankfurt/Main).

Materialien für die Zellkultur wurden von den Firmen BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA), Nunc (Wiesbaden), Millipore (Schwalbach), Sarstedt (Nürnbrecht) und Greiner (Solingen) bezogen. Glasdeckplättchen für die Zellkultur wurden von den Firmen Assistent (Sondheim) und Marienfeld (Lauda-Königshofen) verwendet.

Plastikwaren, die für molekularbiologische und biochemische Arbeiten verwendet wurden, wurden zusätzlich zu den bereits genannten Firmen von Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.1.2 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresesystem:	Sub-Cell GT, BioRad, München
Binokular:	Stemi SV11, Zeiss, Jena
Chemilumineszenzkamera:	Fusion SL2, Vilber Lourmat, Eberhardzell
CO ₂ -Inkubatoren:	Heraeus Function Line, Heraeus, Hanau CB, Binder, Tuttlingen
Digitale Kamera:	AxioCam HRc, Zeiss, Jena
Elektrophoresesystem:	Mini-Protean II, BioRad, München
Geldokumentationsanlage:	Bioprint M1, Vilber Lourmat, Eberhardzell
Inkubatoren:	Memmert, Schwabach Melag Brutschrank Typ A, Melag, Berlin
Kryostat:	Microm HM560, Microm, Walldorf
Mikroskope:	Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2, Zeiss, Jena konfokales Laser Scanning Mikroskop,

	LSM Axiovert 100 Microsystem, Zeiss, Jena
	Lichtmikroskop Axiovert 25, Zeiss, Jena
Perfundiergerät:	Masterflex L/S Economy Drive, Cole Parmer, Kehl
Photometer:	Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg
	Ultrospec 3000 UV/Vis Photometer, Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Power Supply:	Electrophoresis Power Supply EPS 3501XL, Amersham, Uppsala, Schweden
	Electrophoresis constant Power Supply ECPS 3000/150, Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Rotatoren:	MacsMix Tube Rotator, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
	Stuart Rotator SB3, Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Schüttelinkubator:	TH 30, Edmund Bühler, Tübingen
Sterile Werkbank:	Hera Safe, Heraeus, Hanau
Thermocycler:	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg
	T personal, Biometra, Göttingen
Thermomixer:	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot SD:	SemiDry Transfer Cell, BioRad, München
Vortex:	Vortex Genie2; Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen:	Mettler PN 1210, Mettler-Toledo, Gießen
	Analysenwaage Sartorius AG, Göttingen
Zentrifugen:	Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg
	Heraeus Minifuge GL, Heraeus, Hanau
	Universal 32R Hettich Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen

2.1.3 Software

AxioVision 3.1	Zeiss
Bio CAPT	Vilber Lourmat
Excel 2011	Microsoft
Fusion CAPT	Vilber Lourmat

ImageJ Version 1.440	Abramoff et al., 2004
ZEN 2011	Zeiss
Photoshop CS5	Adobe
GraphPad Prism 4.00	Graphpad Software
Word 2011	Microsoft

2.1.4 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Zusammenfassung aller verwendeten Primärantikörper

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Organismus	Art	Verdünnung
anti-Actin	β -Actin	Sigma	Kaninchen	polyklonal	1:10.000 (WB)
anti-Flag (M2)	Flag-Epitop-„tag“	Stratagene	Maus	monoklonal	1:2.500 (WB)
anti-GAPDH	GAPDH	Ambion	Maus	monoklonal	1:20.000 (WB)
anti-GFP	GFP	Abcam (ab290)	Kaninchen	polyklonal	1:5.000 (WB)
anti-FK1	poly-Ubiquitinylierung	Millipore	Maus	monoklonal	1:1.000 (WB)
anti-HA (F-7)	HA-Epitop-„tag“	St. Cruz	Maus	monoklonal	1:200 (WB)
anti-HCN1	HCN1 (aa 6-24)	Millipore	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB); 1:600 (IF)
anti-HCN1 (V-17)	HCN1 (C-term.)	St. Cruz	Ziege	polyklonal	1:250 (WB) 1:600 (IF)
anti-HCN1 (N70/28)	HCN1 (aa 778-910)	NeuroMab	Maus	monoklonal	1:1.000 (IF)
anti-HCN1 (Supernatant)	HCN1 (aa 778-910)	NeuroMab	Maus	monoklonal	1:5 (IF)
anti-c-myc (9E10)	myc-Epitop-„tag“	Sigma	Maus	monoklonal	1:5.000 (WB)
anti-Nedd4-2	Nedd4-2	Abcam	Kaninchen	polyklonal	1:1.000 (WB) 1:2.000 (IF)
anti-P4D1	Ubiquitin	CST	Maus	monoklonal	1:1.000 (WB)
anti-Reelin	Reelin	Millipore	Maus	monoklonal	1:500 (IF)
anti-SNX3	SNX3	Abcam	Kaninchen	polyklonal	1:500 (WB)
anti-Tau	Tau-1	Millipore	Maus	monoklonal	1:1.000 (IF)
anti-Tau	Tau-1	Abcam	Huhn	polyklonal	1:500 (IF)
anti-TRIP8b	TRIP8b (pan)	(Shin et al., 2008)	Kaninchen	polyklonal	1:10.000 (WB); 1:10.000 (IF)
anti-TRIP8b	TRIP8b (konstant)	NeuroMab	Maus	monoklonal	1:1.000 (IF)

Tabelle 2: Zusammenfassung aller eingesetzten Sekundärantikörper

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Organismus	Verdünnung
Biotin-conjugated IgG	Goat anti-Rabbit IgG	Kaninchen IgG	Vector Laboratories	Ziege entsprechend Herstellerprotokoll

Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse IgG		Maus IgG	Molecular Probes	Ziege	1:500 (IF)
Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG		Kaninchen IgG	Molecular Probes	Ziege	1:500 (IF)
Alexa Fluor 546 Goat anti-Rabbit IgG		Kaninchen IgG	Molecular Probes	Ziege	1:500 (IF)
Cy TM 3-conjugated anti-Mouse IgG	AffiniPure Goat	Maus IgG	Jackson Immuno Research	Ziege	1:800 (IF)
Cy TM 3-conjugated anti-Rabbit IgG	AffiniPure Goat	Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research	Ziege	1:800 (IF)
Cy TM 5-conjugated anti-Rabbit IgG	AffiniPure Mouse	Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research	Maus	1:500 (IF)
Cy TM 5-conjugated anti-Rabbit IgY	AffiniPure Chicken	Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research	Huhn	1:500 (IF)
anti-Mouse peroxidase linked anti-Rabbit IgG-horseradish peroxidase linked	IgG-horseradish	Maus IgG	Abcam	Ziege	1:2.500 (WB)
anti-Goat IgG horseradish peroxidase linked		Kaninchen IgG	Thermo Scientific	Esel	1:5.000 (WB)
		Ziege IgG	St. Cruz	Esel	1:7.500 (WB)

2.1.5 Vektoren

Für die Expression von Proteinen in Hefezellen wurden die Vektoren pGBKT7 und pGADT7 (Clontech) verwendet. Die Klonierung der DNA-Fragmente in den Vektor pGBKT7 ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins mit der Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors, der Vektor pGADT7 hingegen enthält eine Nukleotidsequenz, die eine Klonierung als Fusionsprotein mit der Gal4-Bindungsdomäne ermöglicht. Dies erlaubt Interaktionsstudien in Hefezellen.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung in kultivierten eukaryotischen Zellen kamen folgende Vektoren zum Einsatz: der Expressionsvektor pGW1, der unter der Kontrolle eines CMV-Promotors die Expression von inserierten DNA-Fragmenten ermöglicht und in dieser Arbeit die cDNA von HCN1, bzw. HCN1-GFP enthielt. Weiterhin wurden für die Klonierung von Fusionsproteinen mit GFP, einem grün-fluoreszierenden Protein aus der Qualle *A. victoria*, die pEGFP-Vektoren der Firma Clontech verwendet. Diese sind in zwei Varianten erhältlich, sodass GFP an den N- oder C-Terminus der inserierten DNA-Sequenz fusioniert werden kann. Die ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten TRIP8b-Isoformen lagen in dem Vektor p(XEGFP)-c1 vor. Dieser Vektor basiert auf dem Grundgerüst des pEGFP-c1-Vektors von Clontech, aus dem das EGFP-codierende DNA-Fragment entfernt wurde. Des Weiteren wurden die eukaryotischen Expressionvektoren p3xFlag-CMV-7.1 (Sigma) und pcDNA6/myc-His (invitrogen) verwendet. Durch Klonierung der DNA-Fragmente in diese Vektoren werden in den transfizierten Zellen Fusionsproteine mit entsprechenden „tags“ exprimiert. Dabei handelt es sich um kurze Proteinsequenzen, die sich entweder N- oder C-

terminal des zu untersuchenden Proteins befinden und von gegen sie gerichteten Antikörpern spezifisch detektiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die sogenannten FLAG-Epitop- und myc-Epitop-„tags“ verwendet, gegen die monoklonale Antikörper käuflich zu erwerben sind. Für die Herstellung von RNA-Sonden für die *in situ* Hybridisierungen wurden die codierenden DNA-Fragmente in den Vektor pBluescript II KS/SK kloniert. Bei diesem Vektor befindet sich am 5'-Ende der „multiple cloning site“ eine T7 und am 3'-Ende ein T3 Promotor-Sequenz, welche die Transkription von RNA „sense“ und „anti-sense“-Sonden ermöglichen.

2.1.6 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG (Ebersberg) bezogen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammenfassung aller eingesetzten Oligonukleotide

Nr.	Konstrukt	Bezeichnung	Sequenz
1	HCN1 1-132	mHCN1_5'R1_FP	ATCAGAATTCATGGAAGGCGGGCGGCAAG
2	HCN1 1-132	mHCN1_3'Sal_RP	GCATGTCGACACCTGAAGTCACTGTACG
3	HCN1	mHCN1_aa1_Bam_FP	GCATGGATCCGCCACCATGGAAGGCGGGCGCA AACCCAAC
4	HCN1	mHCN1_aa910- sc_R1_pcDNA6_RP	GCATGAATTCATAAAATTCGAAGCAAAACGGG GTTTTTCTGC
5	HCN1Δ2-77	mHCN1_d2-77_Bam_FP	GCATGGATCCGCCACCATGCGGCAGTATGGTTT CATGCAGAGG
6	HCN1Δ2-90	mHCN1_FP_271	CTGCAGCCTGGGGTCAACAAATTCTC
7	HCN1Δ2-90	mHCN1_RP_3-pcDNA6	CATGGTGGCGGATCCGAGCTCGG
8	HCN1Δ2-110	mHCN1_FP_331	AAGGAGCAGGAAAGGGTTAAAACACTGCAG
9	HCN1Δ2-385	mHCN1_d2-385_Bam_FP	GCATGGATCCGCCACCATGATCCAGTCTTTGGA CTCTTCAAGGAGG
10	HCN1Δ67-87	mHCN1_FP_262	ACCTCCATGCTGCAGCCTGGGGTC
11	HCN1Δ67-87	mHCN1_RP_198	CGGCTCCTCTCCTCCGCCGCCGTC
12	HCN1Δ473-910	mHCN1_FP_R1_pcDNA6	TGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTG
13	HCN1Δ473-910	mHCN1_RP_1416	GAAATTGGGATCGGCGTTAGCAAAAAGAG
14	HCN1Δ610-910	mHCN1_RP_1830	GATCTCGTTCTCCTGGTTGTTGAAAACACC
15	HCN1Δ610-700	mHCN1_FP_2100	CTGGCCACACGAACTTTCCATTATGCC
16	HCN1Δ701-910	mHCN1_RP_2100	GGGGCTCTGTATAGGAGGACTGCAGAC
17	HCN1Δ801-910	mHCN1_RP_2400	CAGGTTGGTGTATGAAGGGCTTGTGTGC
18	HCN1Δ908-910	mHCN1_RP_2721	AGCAAAACGGGGTTTTTCTGCATCTGGG
19	SNX3-ISH	ISH-SNX3 for 275	GAAATGGCGGAGACGGTAGCGG
20	SNX3-ISH	ISH-SNX3 rev 1188	GTGGTGTCGTGCTCCTGCACA
21	SNX3 ms	mSNX3_R1_FP	GCATGAATTCGATGGCGGAGACGGTAGCGGAC
22	SNX3 ms	mSNX3_Sal_RP	GCATGTCGACTCAGGCATGTCTTATTTTAGATG GAGTATAGC
23	Nedd4-2 ms	Nedd4-2_ms FP_HindIII	ATGCAAGCTTATGGAGAGACCCTATACATTTAA GGATTTTC
24	Nedd4-2 ms	Nedd4-2_ms RP_Xba	ATGCTCTAGATTAATCCACACCTTCGAAGCCTT GAG

2.1.7 Organismen

2.1.7.1 Bakterien

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden die *Escherichia coli*-Stämme XL1 Blue, One Shot TOP 10 und Stbl2 eingesetzt. Die Stämme weisen folgende relevante genotypische Merkmale auf:

XL1 Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'**proAB lacI^qZΔM15TN10(Tet^r)*]

TOP 10: *F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ-*

Stbl2: *F⁻ mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1lon gyrA96 thi supE44 relA1 λ⁻ Δ(lac-proAB)*

Zur Anzucht von *E. coli* wurde folgendes Medium verwendet:

*LB (Luria Bertani)-Medium: 10 g/l NaCl
10 g/l Trypton/Pepton
5 g/l Hefeextrakt*

Zur Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium in Abhängigkeit der Antibiotikaresistenz des verwendeten Vektors entweder mit 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin versetzt.

Zur Herstellung von LB Agarplatten wurde LB Agar mit einem Gehalt von 15 g/l Agar-Agar verwendet.

2.1.7.2 Zelllinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die folgende Zelllinie verwendet:

HEK293: humane embryonale Nierenzelllinie (Graham et al., 1977)

2.1.7.3 Hefestämme

Für den „Yeast Two-Hybrid Screen“ wurden die *S. cerevisiae*-Stämme AH109 und Y187 verwendet, die sich vor allem anhand ihrer Reportergene unterscheiden. Der Stamm AH109 wurde mit dem zu untersuchenden DNA-Konstrukt transformiert, wohingegen der Stamm Y187 bereits mit einer humanen Hirn-cDNA-Bank transformiert vorlag (BD Matchmaker, Clontech). Die Stämme weisen folgende relevante genotypische Merkmale auf:

AH109: *MATa, trp1-901, leu2-3, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-LacZ MEL1*

Reportergene: HIS3, ADE2, MEL1, LacZ

Y187: *MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met-, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-LacZ MEL1*

Reportergene: MEL1, LacZ

2.1.8 Versuchstiere

Zur Präparation der entorhinalen und hippocampalen Neurone wurden neugeborene Wistar-Ratten aus der Zucht der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bezogen. Organotypische Kulturen wurden von fünf Tage alten Ratten angefertigt.

Zur Gewinnung von Proteinlysaten zur Untersuchung von Expressionsmustern mittels Immunblot oder zur Durchführung von (Co-)Immunpräzipitationen wurden Ratten verschiedener Altersstufen verwendet (P10-P90). Die Ratten wurden durch Inhalation von CO₂ narkotisiert und anschließend dekapitiert. Die Hirne wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine Lagerung des Gewebes bis zur Verwendung erfolgte bei -80 °C.

Zur Anfertigung von Hirnschnitten für immunhistochemische Untersuchungen erfolgte eine Fixierung der Hirne durch Perfusion der Tiere. Ratten (>P 90) wurden durch i.p. Injektion von Ketamin/Rompun (100 mg/kg KG Ketamin und 5 mg/kg KG Rompun (Bayer, Leverkusen) in 0,9%iger Kochsalzlösung) anästhesiert. Nach intrakardialer Anbringung der Perfusionsnadel wurden mittels eines Perfusors zunächst 0,9%ige Kochsalzlösung, gefolgt von 2,5% Paraformaldehyd (PFA) in PBS in den Blutkreislauf infundiert. Die Gehirne wurden

entnommen und für 4 h in 2,5% PFA in PBS nachfixiert. Nach Lagerung über Nacht in 25%iger Saccharoselösung bei 4 °C wurde das Gewebe ebenfalls bei -80 °C gelagert.

2.1.9 Konstrukte

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konstrukte sind in Tabelle 4 aufgeführt. Wie vermerkt, wurden die Plasmide HCN1, HCN1-GFP, HCN1-HA, HCN1(778-910) Y2H, TRIP8b ISH, TRIP8b(1a-4) und TRIP8b(1a) freundlicherweise von Dane M. Chetkovich, Davee Department of Neurology and Clinical Neurosciences, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4: Zusammenfassung aller eingesetzten Konstrukte

Y2H: Yeast Two-Hybrid Screen
 ISH: *In situ* Hybridisierung
 cds: coding sequence

Konstrukt	Bezeichnung	Vektor	Epitop- „tag“	Bemerkung
HCN1	mHCN1	pGW1		D. Chetkovich
HCN1-GFP	mHCN1	pGW1	GFP	D. Chetkovich
HCN1-HA	mHCN1(HA-Ex2); inserterter extrazellulärer Domäne zwischen S3 und S4	HCN1 mit pGW1 HA-		D. Chetkovich
HCN1(1-132) Y2H	N-Terminus von mHCN1 bis zum Beginn der 1. Transmembrandomäne	pGBKT7		
HCN1-myc	mHCN1	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ2-77	Deletionskonstrukt von HCN1 des variablen Anteils des N-Terminus	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ2-90	Deletionskonstrukt von HCN1 des cytoplasmatischen N-Terminus	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ2-110	Deletionskonstrukt von HCN1 des cytoplasmatischen N-Terminus	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ2-385	Deletionskonstrukt von HCN1 des cytoplasmatischen N-Terminus und Transmembrandomäne	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ67-87	Deletionskonstrukt von HCN1 des cytoplasmatischen N-Terminus	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ473-910	Deletionskonstrukt von HCN1 des cytoplasmatischen C-Terminus	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ610-910	Deletionskonstrukt von HCN1 des cytoplasmatischen C-Terminus	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ610-700	Deletionskonstrukt von HCN1 des cytoplasmatischen C-Terminus	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ701-910	Deletionskonstrukt von HCN1 des cytoplasmatischen C-Terminus	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ801-910	Deletionskonstrukt von HCN1 des cytoplasmatischen C-Terminus	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	
HCN1Δ908-910	Deletionskonstrukt von HCN1 der letzten 3 Aminosäuren	pcDNA6/ myc-His	myc, 6xHis (C-term.)	

TRIP8b ISH	rTRIP8b(Ex6-7); 320 bp Fragment aus konstanter Region zur Generierung von Sonden für ISH	pBS(SK)		D. Chetkovich
TRIP8b(1a-4)	mTRIP8b IsoA4, Splicevariante enthält Exone 1a, 4 und 5-16	p(XEGFP)-c1		D. Chetkovich
TRIP8b(1a)	mTRIP8b IsoA5, Splicevariante enthält Exone 1a und 5-16	p(XEGFP)-c1		D. Chetkovich
hSNX3	hSNX3 Isoform 2 aus Y2H	pEGFP-c2	GFP (N-term.)	
mSNX3	mSNX3	p3xFlag-CMV-7.1	3xFLAG (N-term.)	
mSNX3 ISH	mSNX3; 900 bp Fragment von cds + 3'UTR (mRNA-Sequenz bp 275-1188) zur Generierung von Sonden für ISH	pBS(KS)		
mNedd4-2-Flag	mNedd4 Isoform 2	p3xFlag-CMV-7.1	3xFLAG (N-term.)	
EGFP	EGFP	pEGFP-N3		

2.1.10 Standards

DNA Standard:	1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen 12.000, 11.000, 10.000, 9.000, 8.000, 7.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.650, 1.000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 bp
Protein Standard:	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 kDa

2.1.11 Kits zur Reinigung und Isolierung von DNA und RNA

RNA-Extraktion:	RNeasy Mini Kit, Qiagen
DNA-Aufreinigung:	QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen
Plasmid-Präparation:	GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Thermo QIAGEN HiSpeed Plasmid Midi Kit, Qiagen QIAGEN HiSpeed Plasmid Maxi Kit, Qiagen Nucleo Bond® PC100, Macherey&Nagel

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels PCR können definierte DNA-Sequenzen von einer Ursprungs-DNA (Template) mit einer thermostabilen DNA-Polymerase amplifiziert werden. Dem Reaktionsansatz müssen außerdem Oligonukleotid-Primer, Reaktionspuffer und Nukleotide zugesetzt werden. Die Verwendung von Primern, die am 5'-Ende zusätzlich zur Zielsequenz die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym tragen, ermöglichen eine spätere gerichtete Klonierung der PCR-Produkte. Für analytische Zwecke wurde die Taq-Polymerase eingesetzt. Ihr Nachteil ist ihre fehlende 3'-5'-Exonucleaseaktivität, welche verhindert, dass falsch eingebaute Nukleotide von der Polymerase erkannt und ausgetauscht werden können. Dies wird auch als „Proofreading-Aktivität“ bezeichnet. Deshalb wurde für die Synthese von PCR-Fragmenten, die in einen Vektor kloniert werden sollten, ausschließlich die „proofreading“ Phusion[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) verwendet, die eine sehr geringe Fehlerrate aufweist und erst bei hohen Temperaturen aktiv ist, was das Vorkommen von unspezifischen Produkten zusätzlich reduziert. Das Programm des Thermocyclers wurde entsprechend den Angaben des Herstellers der Polymerase verwendet, generell wurde die DNA in 30 Zyklen amplifiziert, da sich hier der Anstieg der DNA-Menge noch in der exponentiellen Phase befindet und man eine ausreichend große Menge der gewünschten DNA-Sequenzen erhält.

Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes (für Klonierungen):

Plasmid-DNA	1 ng (cDNA: 2 µl)
5x Reaktionspuffer	10 µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
Forward-Primer (10 µM)	1 µl
Reverse-Primer (10 µM)	1 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente werden aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Dazu wurden je nach erwarteter Länge der DNA-Fragmente Agarosegele mit unterschiedlicher Konzentration in 0,5x TBE (aus 10x TBE Ultrapure, USB) verwendet. Zum Beladen des Gels wurde die DNA mit 1x „Loading Dye“ (Thermo Scientific) versetzt, welches durch den Zusatz von Bromphenolblau das Fortschreiten der Auftrennung sichtbar macht. Der Nachweis der DNA-Fragmente erfolgte durch den Zusatz von Ethidiumbromid (Genaxxon Bioscience) zum Gel, das, wenn es in die doppelsträngige DNA interkaliert, unter UV-Licht fluoresziert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V.

2.2.1.3 DNA-Fragment-Isolierung

Um spezifische DNA-Fragmente zu isolieren, wurden sie nach erfolgter Auftrennung durch Gelelektrophorese auf einem UV-Tisch aus dem präparativen Agarosegel herausgeschnitten und mittels des „QIAEX II Gel Extraction Kits“ aufgereinigt. Es wurde dabei entsprechend dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Das Prinzip basiert auf einer Auflösung der Agarose bei 50 °C und der anschließend Reinigung der DNA durch eine Glasmilchsuspension in Anwesenheit eines Hochsalzpuffers. Die DNA wurde mit Tris-Puffer oder Wasser eluiert und konnte somit für anschließende Reaktionen verwendet werden.

2.2.1.4 DNA-Ligation

Ligasen sind in der Lage, in Anwesenheit von ATP die Bindung von Phosphodiesterbrücken zwischen zwei DNA-Strängen zu katalysieren. Somit können zwei DNA-Fragmente, die zuvor meist mittels Restriktionsverdau an bestimmten Stellen geschnitten wurden, neu kombiniert werden. Die Ligation stellt damit einen wichtigen Schritt bei der Klonierung eines DNA-Fragmentes in einen Vektor dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 eingesetzt. Pro 20 µl-Ansatz Ligationsansatz wurde für die Ligation von überhängenden DNA-Enden 1 u (= Weiss-Einheiten) Ligase eingesetzt, bei der Ligation von glatten DNA-Enden wurde die Ligasemenge auf 5 u erhöht. Vektor und Insert lagen im Reaktionsansatz in einem molaren Verhältnis von 1:3-1:5 vor. Der verwendete Vektor wurde zusätzlich zum vorangegangenen Restriktionsverdau mit einer alkalischen Phosphatase

(FastAP) behandelt, um die Phosphatreste an den Enden zu entfernen und so eine Religation des Vektors zu verhindern. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für 30-60 min bei Raumtemperatur. Für eine anschließende Transformation wurde der Ansatz ohne weitere Behandlung verwendet.

2.2.1.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Unter Kompetenz versteht man die Fähigkeit von Bakterien, Fremd-DNA aufzunehmen. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde die TSS-Methode verwendet. Hierfür wurden 100 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C und 225 rpm bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600\text{ nm}} = 0,3-0,4$) inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Kultur wurde 10 min bei 4.000 x g abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml eiskaltem TSS-Medium aufgenommen. Die Suspension wurde zu je 100 µl in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

TSS-Medium:

	<i>LB-Medium</i>
	<i>10% PEG 4000</i>
	<i>5% DMSO</i>
	<i>50 mM MgSO₄</i>

2.2.1.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Durch den Vorgang der Transformation wird die Plasmid-DNA in das Bakterium eingebracht und kann von diesem unabhängig von der chromosomalen DNA repliziert werden. Dafür wurden 100 µl chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µl Ligationsansatz oder 1-10 ng zirkulärem Plasmid gemischt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C durchgeführt. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 900 µl LB-Medium ohne Antibiotika zugefügt. Der Transformationsansatz wurde 60 min bei 37 °C und 225 rpm inkubiert, um eine Translation der Resistenzgene zu ermöglichen. Bei schwer zu transformierenden Konstrukten wurde anstelle des LB-Mediums SOC-Medium verwendet, welches die Transformationseffizienz der Bakterien verbessert. Die Bakteriensuspension wurde 60 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde bis auf 100 µl abgenommen. Das Bakterienpellet wurde vorsichtig im verbliebenen Medium resuspendiert und zu verschiedenen Volumina auf den dem Resistenzgen entsprechenden

Antibiotika-haltigen Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei Verwendung des Stammes Stb12 reduziert sich die Inkubationstemperatur auf 30 °C.

SOC-Medium: 2% Peptone
 0,5% Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
vor Gebrauch zufügen: 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 20 mM Glucose

2.2.1.7 Minipräparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde im analytischen Maßstab aus transformierten *E. coli*-Zellen mittels alkalischer Lyse aufgearbeitet (Birnboim and Doly, 1979). Dafür wurde ein kommerzielles Reinigungskit (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific) verwendet. Von einem Plasmid tragenden Bakterien-Klon wurde eine 3 ml-Übernachtskultur angesetzt und entsprechend dem Herstellerprotokoll aufgearbeitet. Das Prinzip basiert auf einer Lyse der Bakterien mit SDS und EDTA in Anwesenheit von NaOH. Durch Zugabe von Kaliumacetat entsteht ein schwer löslicher Komplex aus hochmolekularer genomischer DNA, denaturierten Proteinen und Zelltrümmern, der durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Der das Plasmid enthaltende Überstand wurde einer weiteren Reinigung über eine Silica-Membran unterzogen und schließlich mit 50 µl 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0, eluiert.

2.2.1.8 Midipräparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA in einem hohen Reinheitsgrad zu erhalten, wie er für die Transfektion in eukaryotische Zellen erforderlich ist, wurde entweder das Nucleo Bond®PC100-Kit (Macherey&Nagel) oder das QIAGEN HiSpeed Plasmid Kit verwendet. Ein weiterer Vorteil der Midipräparation sind die höheren Ausbeuten an DNA von über 100 µg. Die Präparation von 50-100 ml Bakteriensuspension erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Anionenaustausch-Chromatographie nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit Endotoxin-freiem TE, pH 8,0 eluiert.

2.2.1.9 Glycerolkulturen

Um Dauerkulturen anzulegen, wurde 1 ml aus einer frischen Bakterien-Übernachtskultur auf Eis mit 1 ml 100%igem Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert. 100 µl dieser Dauerkultur wurden verwendet, um eine frische Übernachtskultur anzupfen.

2.2.1.10 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen). Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml, für einzelsträngige DNA und RNA 40 µg/ml. Der Verunreinigungsgrad der DNA-Lösung durch Proteine wird über das Verhältnis der OD_{260nm} und der OD_{280nm} (Absorption der aromatischen Aminosäurereste) ermittelt. Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Durch Proteinverunreinigungen wird der Quotient zu kleineren Werten verschoben. Außerdem wurde die OD_{320nm} bestimmt, die als Korrekturfaktor für Trübungseffekte, Absorption von Pufferlösungen und gerätespezifische Einflüsse dient und von den gemessenen Absorptionen subtrahiert wurde. Über den Extinktionskoeffizienten für DNA, bzw. RNA in wässriger Lösung lässt sich mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration ermitteln, wobei V den Verdünnungsfaktor der gemessenen Lösung darstellt:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times 50 \times V \text{ [ng/}\mu\text{l]}$$

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \times V \text{ [ng/}\mu\text{l]}$$

2.2.1.11 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung

Die Durchführung aller Sequenzierungen von Plasmid-DNA erfolgte durch den Sequenzierservice Seqlab Sequencing Laboratories Göttingen GmbH.

2.2.1.12 RNA-Extraktion

Für die Isolierung von RNA aus Gewebe wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Das Gewebe wurde entweder direkt nach der Explantation aufgearbeitet oder in flüssigem

Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Aufarbeitung basiert auf der Methode von (Chomczynski and Sacchi, 1987). Dabei wurde das Gewebe in einem Guanidinisothiocyanat-haltigen Puffer in Anwesenheit von 2-Mercaptoethanol lysiert. Beide Reagenzien inhibieren die Aktivität von RNAsen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll. An die Extraktion der RNA schloss sich ein DNase-Verdau zur Eliminierung eventuell vorhandener genomischer DNA an. Die RNA wurde mit Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.13 cDNA-Synthese (RT-PCR)

Um ein DNA-Fragment mittels PCR aus einem bestimmten Gewebe amplifizieren zu können, muss die extrahierte mRNA in ihren codierenden DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden. Der Anteil von mRNA an der Gesamt-RNA beträgt zwar nur 2%, diese Menge ist aber für eine normal exprimierte mRNA als Template in einer nachfolgenden PCR ausreichend. Der Reaktionsansatz der cDNA-Synthese enthält neben dem Reaktionspuffer eine Reverse Transkriptase, ein Enzym, welches die Synthese von DNA von einem RNA-Strang als Template katalysieren kann, 1 µg der gereinigten RNA und ein Gemisch aus zwei verschiedenen Primern: Zum einen „Oligo-dT-Primer“, die aus 18 Thymidinbasen bestehen und damit am Poly-A⁺-Ende der mRNA binden können und zum anderen „Random Hexamer-Primer“, die zufällig an der RNA binden und somit einen vorzeitigen Strangabbruch vor dem proteincodierenden 5'-Ende verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) verwendet.

2.2.2 Yeast Two-Hybrid Screen

Der „Yeast Two-Hybrid Screen“ ist ein Verfahren zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen in Hefezellen (Fields and Song, 1989). Das zugrunde liegende Prinzip basiert auf einer Interaktion der DNA-Bindungsdomäne und der Aktivierungsdomäne des hefespezifischen Transkriptionsfaktors Gal4. Werden die beiden Domänen getrennt, ist der Transkriptionsfaktor inaktiv. Diese Tatsache macht man sich zunutze, indem das zu untersuchende Protein in dem Hefestamm AH109 als Fusionsprotein der Gal4-DNA-Bindungsdomäne exprimiert und durch Inkubation mit dem Hefestamm Y187, in dem Fusionsproteine einer cDNA-Bank aus dem menschlichen Hirn mit der Gal4-

Aktivierungsdomäne exprimiert werden, mit möglichen Interaktionspartnern zusammengebracht wird. Findet eine Interaktion statt, nähern sich die beiden Domänen des Gal4-Transkriptionsfaktors räumlich so weit an, dass der Transkriptionsfaktor seine Aktivität erlangt und an seinen Promotor binden kann. Dadurch wird die Transkription von Genen aktiviert, die für die Aminosäuren Adenosin und Histidin codieren, sowie eines Gens, das für die α -Galactosidase codiert. Werden die Hefezellen auf Mangelmedien ausplattiert, denen diese Aminosäuren fehlen, wachsen nur diejenigen Klone, in denen eine Interaktion stattfindet. Enthalten die Platten zusätzlich 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-galactopyranosid (X- α -Gal, Clontech) erlaubt die Expression der α -Galactosidase eine zusätzliche Selektion durch Umsetzung des X- α -Gal zu einem blauen Indolfarbstoff.

2.2.2.1 Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation der Hefezellen erfolgte durch die PEG/LiAc-Methode (Ito et al., 1983). Dabei ermöglicht das Vorhandensein eines monovalenten alkalischen Kations wie Lithium in Verbindung mit PEG, welches die Permeabilität der Zellwand erhöht, die Aufnahme von Fremd-DNA in Hefezellen. Dafür wurde von einem frischen Klon des Hefestammes AH109 eine 3 ml-Kultur in YPDA-Medium (Q Bio-Gene) angesetzt und bei 150 rpm und 30 °C bis zum Erreichen einer $OD_{600\text{ nm}} > 0,6$ inkubiert. Mit 20-50 μ l dieser Vorkultur wurden 50 ml YPDA-Medium angeimpft und über Nacht bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600\text{ nm}} 0,15-0,3$) inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 700 x g abzentrifugiert, erneut in 100 ml frischem YPDA-Medium resuspendiert und bis zu einer $OD_{600\text{ nm}} 0,4-0,5$ inkubiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und das Zellpellet mit 30 ml destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml 1,1x TE/LiAc resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 15 sec Zentrifugation bei 13.000 x g wurden die Zellen erneut in 600 μ l 1,1xTE/LiAc aufgenommen und lagen nun bereit zur Transformation vor. Dafür wurden in gekühlten 1,5 ml-Reaktionsgefäßen 100 ng Plasmid-DNA und 10 μ l Träger-DNA aus Heringssperma (die zuvor 20 min bei 100 °C denaturiert wurde) vorgelegt und mit 50 μ l kompetenten Hefezellen und 500 μ l PEG/LiAc auf dem Vortex gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30 °C und 150 rpm wurde dem Ansatz 20 μ l DMSO zugefügt und der Hitzeschock wurde für 15 min bei 42 °C durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde 15 sec bei 13.000 x g abzentrifugiert, in 1 ml YPD-Medium (ohne Zusatz von L-Adenin) resuspendiert und 90 min bei 30 °C und 150 rpm inkubiert, Die Zellen wurden erneut für 15 sec abzentrifugiert und in 1 ml 0,9%iger

NaCl-Lösung aufgenommen. Von dieser Zellsuspension werden 1:10 und 1:100-Verdünnungen hergestellt, von denen je 100 µl auf SD-Agarplatten ausplattiert wurden, denen in Abhängigkeit des transformierten Plasmids, welches für die Aminosäuren Tryptophan oder Leucin codiert, diese Aminosäuren als Selektionsmarker fehlen.

<i>YPDA (Yeast Extract Peptone Dextrose)-Medium:</i>	50 g/l YPD 0,003% L-Adenin-Hemisulfat
<i>SD/-Trp oder SD/-Leu:</i>	26,7 g/l Minimal SD Base (DOB) 0,74 g/l -Trp Dropout Supplement oder 0,69 g/l -Leu Dropout Supplement
<i>1,1x TE/LiAc:</i>	1,1 ml 10x TE, pH 7,5 1,1 ml 1 M LiAc, pH 7,5 ad 10 ml H ₂ O
<i>PEG/LiAc:</i>	8 ml 50% PEG 3350 1 ml 10x TE, pH 7,5 1 ml 1 M LiAc, pH 7,5

Zur Herstellung von Agarplatten wurde 18-20 g/l Agar-Agar zugefügt. Alle Hefemedien wurden mit Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) versetzt, um eine Kontamination mit Bakterien zu minimieren.

2.2.2.2 Yeast Two-Hybrid Library Mating

Beim "Library Mating" wird eine bereits in den Hefestamm Y187 transformierte cDNA-Bank aus dem menschlichen Hirn im Vektor pGADT7 (BD Matchmaker hBrain (in Y187), BD Biosciences), mit dem zu untersuchenden Protein(-Fragment), welches zuvor als DNA-Fragment im Vektor pGBKT7 in den Stamm AH109 transformiert wurde, zusammengebracht. Dies geschieht durch gemeinsame Inkubation beider Hefestämme. Es wurde dabei nach dem Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual (Clontech, Palo Alto, CA) vorgegangen. Dafür wird ein transformierter Klon AH109 in 50 ml SD/-Trp bis zu einer $OD_{600\text{ nm}} > 0,8$ bei 30 °C und 150 rpm inkubiert. Der Überstand wurde nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1.000 x g bis auf 5 ml abgenommen und die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Diese Kultur wurde mit 1 ml einer frisch aufgetauten "Library"-Kultur in einem 2 l-Kolben vereinigt und in 50 ml 2xYPDA über Nacht bei 30 °C und sanfter Bewegung (30 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension beim

Vorhandensein von Zygoten weitere 4 h inkubiert (Kontrolle am Phase-Kontrast-Mikroskop). Die Zellen wurden nach Zentrifugation bei 1.000 x g für 10 min in 10 ml 0,5xYFDA resuspendiert und auf ca. 50 15 cm-Platten ausgestrichen, die ein Vierfach-Mangelmedium enthielten (QDO = Quadrupel-Dropout) und zusätzlich mit X- α -Gal imprägniert wurden. Die Aminosäuren Tryptophan und Leucin codieren auf den verwendeten Plasmiden pGBKT7 und pGADT7, die Aminosäuren Adenosin und Histidin, sowie die α -Galactosidase, wurden erst durch die Bindung des kompletten Gal4-Transkriptionsfaktors an seinen Promotor exprimiert. Die Platten wurden für 8-21 Tage bei 30°C inkubiert.

SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp: 26,7 g/l Minimal SD Base (DOB)
 0,60 g/l -Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement
 + 200 μ l X- α -Gal (4 mg/ml in Dimethylformamid) pro 15 cm-
 Platte

2.2.2.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe

Um die potentiellen Interaktionspartner aus der humanen cDNA-Bank zu identifizieren, muss das entsprechende Plasmid isoliert werden. Da Hefezellen über eine starke Zellwand verfügen, müssen diese durch starkes Schütteln mit Glasperlen auf dem Laborschüttler und anschließendem Erhitzen lysiert werden. Dafür wurden 3 ml SD/-Leu-Medium mit einer Hefekolonie beimpft und für 2 Tage bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Die Suspension wurde 5 min bei 1.250 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die sedimentierten Zellen in STET-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von Glasperlen (425-600 μ m, Sigma) wurde die Suspension 5 min auf dem Laborschüttler gemischt und weitere 5 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde auf Eis abgekühlt und die Zelltrümmer wurden bei 14.000 rpm und 4 °C 10 min sedimentiert. Die DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 7,5 M NH₄-Acetat und Inkubation bei -80°C präzipitiert, 30 min bei 14.000 rpm und 4°C sedimentiert und mit dem doppelten Volumen Ethanol gewaschen. Die präzipitierte DNA wurde in destilliertem Wasser gelöst und einem weiteren Reinigungsschritt mit Hilfe des QIAEXII-Kits unterzogen, um anhaftende Bestandteile aus den Hefezellen abzutrennen. Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen) verwendet.

STET-Puffer: 8% Saccharose
 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
 50 mM EDTA, pH 8,0
 5% Triton-X 100

2.2.2.4 Co-Transformationen

Co-Transformationen wurden durchgeführt, um die im „Library Mating“ gefundenen Interaktionen zu bestätigen. Die Co-Transformationen wurden parallel mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Da sich die gleichzeitige Transformation von zwei Plasmiden als schwierig herausstellte, wurden die Plasmide aus der cDNA-Bank im Vektor pGADT7 in Hefezellen des Stammes AH109 transformiert, die bereits die zu untersuchende DNA-Sequenz oder die Kontroll-DNA-Sequenz im Vektor pGBKT7 trugen. Die transformierten Zellen wurden in einer 1:10-Verdünnung auf SD/-Leu/-Trp-Platten (Kontrolle auf Anwesenheit beider Plasmide) und QDO/X-Platten ausgestrichen, um die Interaktion durch Blaufärbung der Kolonien zu verifizieren.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

HEK293-Zellen wurden mit 5 ml 1x PBS pro 6 cm-Schale gewaschen und anschließend in 750 µl Aufschlusspuffer pro Schale aufgenommen. Wurden stringendere Reaktionsbedingungen benötigt, wurde RIPA-Puffer verwendet. Die Zellen wurden unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Schale gelöst und mittels einer 23 G-Kanüle (Braun, Melsungen) und einer Spritze durch mehrmaliges Auf- und Abziehen auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden bei 14.000 rpm für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Bei der Lyse von hippocampalen oder entorhinalen Neuronen wurde pro Well einer 6 well-Platte 50 µl Aufschlusspuffer verwendet und die Lysate von 2 Wells in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereint.

Aufschlusspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
 1% Triton X-100
 150-500 mM NaCl
 5 mM EDTA
 Complete Protease-Inhibitoren-Mix (Roche)

RIPA-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
 150 mM NaCl
 1% Nonidet™ 40

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris, pH 6,8

Elektrophoresepuffer (Lämmli-Laufpuffer): 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS

2.2.3.3.1 Herstellung der Gele

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wurde das System von BioRad verwendet, welches Glasplatten mit Spacern für 0,75 und 1,5 mm dicke Gele, sowie Käbme und Gelgießstände beinhaltet. Das Trenngel wurde entsprechend der Zusammensetzung in Tabelle 5 hergestellt und nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu schaffen. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Isopropanol dekantiert und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, in welches der Kamm für die Ausformung der Probestaschen eingesetzt wurde. Die Zusammensetzung des Sammelgels ist Tabelle 6 zu entnehmen. Die Menge des Gels war für die Herstellung von vier 0,75 mm, bzw. zwei 1,5 mm dicken Gele berechnet.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenngels

Substanz	10%	12,75%
H ₂ O	8 ml	6,2 ml
30% Acrylamid	6,6 ml	8,4 ml
Trenngelpuffer	5 ml	5 ml
10% SDS	200 µl	200 µl
10% APS	200 µl	200 µl
TEMED	8 µl	8 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung des Sammelgels

Substanz	
H ₂ O	5,5 ml
30% Acrylamid	1,7 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
10% SDS	100 µl
Bromphenolblau (gesättigte Lösung)	100 µl
10% APS	100 µl
TEMED	10 µl

2.2.3.4 Immunblot (Westernblot)

Beim Immunblot werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch Anlegen einer konstanten Spannung zwischen zwei Elektroden elektrophoretisch vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (BA85 Protran, Whatman) und durch einen gegen sie gerichteten Antikörper spezifisch nachgewiesen. Für die Elektrophorese wurde das Prinzip des „Semi-Dry Blottings“ angewendet, hierbei wurden Gel und Membran zwischen zwei mit Transferpuffer durchfeuchteten Filterpapieren zwischen den Elektroden platziert. Die Bindung der Proteine auf der Membran ließ sich durch eine Färbung mit Ponceaurot (0,1% in 5%iger Essigsäure, Sigma) überprüfen. Freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in PBS-T abgesättigt. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in 5% Milchpulver in PBS-T inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch drei Waschschritte mit PBS-T entfernt, bevor die Membran mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach anschließendem Waschen erfolgte die Entwicklung des Blots durch Inkubation mit einem „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Reagenz. Die Meerrettichperoxidase oxidierte das Luminolreagenz in Anwesenheit eines Peroxides unter Emission von Licht, welches von einer Chemilumineszenzkamera detektiert wurde. Wenn das zu detektierende Protein in größeren Mengen vorhanden oder der Primärantikörper sehr sensitiv war, wurde in dieser Arbeit das Pierce ECL-Western Blotting Substrat von Thermo verwendet, sonst wurden die Blots mit dem Immobilon Western ECL-Reagenz von Millipore inkubiert. Erforderte die Fragestellung eine quantitative Auswertung der Blots, erfolgte diese mithilfe der Software NIH Image J. Dabei wurden die Signalintensität des zu untersuchenden Proteins auf die Signalintensität eines sog. „housekeeping genes“ normiert, um Schwankungen bei der Beladung der Gele auszugleichen. Dabei handelt es sich um Proteine wie GAPDH oder β -Actin, deren Expression nicht durch eine Behandlung der Zellen oder des Gewebes beeinflusst wird. Die Signalintensitäten von Kontrollen und Experimentalansätzen wurden verglichen und in Abhängigkeit des experimentellen Ansatzes mittels eines Student's t-Test oder einer ANOVA auf Signifikanz überprüft.

Semi-Dry Transferpuffer: 25 mM Tris
 150 mM Glycin
 10% Methanol

PBS: 50 mM Na₂HPO₄
 140 mM NaCl
 Einstellung des pH-Wertes auf 7,4

PBS-T: PBS
 0,3% Tween 20

2.2.3.5 Co-Immunpräzipitation

Bei einer Co-Immunpräzipitation (Co-IP) wird zunächst ein Protein (Antigen) mittels eines spezifisch gegen ihn gerichteten Antikörpers aus einem komplexen Proteingemisch präzipitiert. Das Zielprotein und etwaige mit ihm interagierende Proteine werden im sich anschließenden Westernblot nachgewiesen. Der Antikörper für die Präzipitation ist an einer Matrix gebunden, somit kann der Antigen-Antikörper-Komplex durch Zentrifugation aus dem Proteingemisch isoliert werden. Für die Co-IP wurden entweder homogenisiertes Hirngewebe von Ratten oder Zelllysate aus HEK293-Zellen, welche die Interaktionspartner überexprimieren, verwendet. Wurde ein Antikörper eingesetzt, der direkt gegen das Zielprotein gerichtet ist, wurde dieser (abhängig von der Spezies) an Protein A- oder Protein G-Agarose gekoppelt.

Für die Co-Immunpräzipitation aus Gewebehomogenisat wurden 0,5-1 ml Lysat mit einer Proteinkonzentration von 0,5-1 mg/ml eingesetzt. Wurden Ubiquitylierungen untersucht, wurde dem Aufschlusspuffer zusätzlich 10 mM N-Ethylmaleimid (Sigma) zugesetzt, welches als Cystein-Proteaseinhibitor die Degradation von gebundenem Ubiquitin verhindert. Zunächst wurde dieses mit 40 µl EZview Protein A (bzw. G) Affinity Gel (Sigma) 45 min drehend bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen der Proteine an die Matrix herauszufiltern. Anschließend wurde das Protein A (bzw. G) Affinity Gel durch Zentrifugation (30 sec bei 4.000 rpm) sedimentiert. Dem Überstand wurden 5 µg des entsprechenden Antikörpers oder IgG-Kontrolle zugegeben und über Nacht bei 4 °C drehend inkubiert. Die IgG-Kontrolle diente als Negativkontrolle, um unspezifische Bindung der Proteine an das F_c-Fragment der eingesetzten Antikörper auszuschließen. Die Ansätze wurden nach Zugabe von 40 µl EZview Protein A (bzw. G) Affinity Gel für weitere 2-4 h „end-over-end“ bei 4 °C inkubiert und für 30 sec bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Nach sechsmaligem Waschen mit je 1 ml Aufschlusspuffer wurde das Pellet in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine durch 5-10 minütiges Denaturieren bei 95 °C von der Matrix eluiert.

Um die Interaktion von Epitop-markierten Proteinen in Zellen nachzuweisen, wurden HEK293-Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät und die entsprechenden Plasmiden mittels FuGENE[®]-Transfektionsreagenz in die Zellen eingeschleust. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zelllysate hergestellt. Dafür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 700-800 µl Aufschlusspuffer mittels eines Zellschabers aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abziehen durch eine 23G-Kanüle. Die Zelltrümmer wurden bei 14.000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Zelllysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der Proteinkomplexe erfolgte durch einen gegen das spezifische Epitop gerichteten Antikörper, der bereits an eine Matrix konjugiert vorlag. In dieser Arbeit wurden Flag-Agarose (M2; Stratagene), c-myc-Agarose (9E10, Sigma) und GFP-Trap-Agarose (ChromoTek) verwendet. Von diesen Suspensionen wurde pro Ansatz 20 µl eingesetzt, die zuvor viermal mit je 1 ml Aufschlusspuffer eingewaschen wurden (2.000 x g, 2 min, 4 °C). Die Inkubation des Proteinlysats mit dem Agarose-konjugierten Antikörper erfolgte drehend für 4 h bei 4 °C. Der immobilisierte Antigen-Antikörper-Komplex wurde bei 2.000 x g für 2 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet sechsmal mit je 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte auch hier durch Zugabe von 50 µl 2x SDS-Probenpuffer und 5-10 minütiger Inkubation bei 95 °C. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE mit anschließendem Immunblot.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Medien und Kulturbedingungen

Für die Kultivierung von HEK293-Zellen wurde „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM) verwendet, welches mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) sowie Penicillin und Streptomycin in einer Endkonzentration von 1% versetzt wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kulturgefäße stammten von den Firmen Falcon BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA), Nunc (Wiesbaden) und Sarstedt (Nürnbrecht). Primärzellen wurden in „Hanks Balanced Salt Solution“ (HBSS) präpariert und in Neurobasal A Medium, welches mit 0,5x B27, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,5 mM Glutamin supplementiert wurde, ausplattiert und kultiviert. Entorhinale Cortexneurone wurden in „Minimal Essential Medium“ (MEM), welches 10% Pferdeserum, 0,6% Glucose

und 1% Penicillin/Streptomycin enthielt, ausplattiert und später in Neurobasal A Medium überführt.

Alle Medien, Lösungen und Zusätze wurden von der Firma Gibco bezogen und waren steril. Für Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen auf Glasplättchen ausgesät, die zuvor mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin beschichtet wurden.

2.2.4.2 Passagieren von Zellen

Immortalisierte Zelllinien müssen je nach Zelldichte 2-3 mal in der Woche passagiert oder für Transfektionen in einer definierten Zellzahl neu ausgesät werden. Die Zellen wurden dafür mit PBS gewaschen und in 1 ml Trypsinlösung bei 37 °C inkubiert, bis sie sich von der Kulturschale gelöst haben. Das Enzym wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium inhibiert. Die Zellen wurden durch Trituration homogen im Medium verteilt und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in der entsprechenden Zellkonzentration neu ausgesät.

*0,25% Trypsin: 5 ml Trypsin (2,5% Stock, Gibco)
ad 50 ml PBS*

2.2.4.3 Primäre Zellkultur

Für die Präparation primärer hippocampaler bzw. entorhinaler Neurone wurden neugeborene Ratten am Tag ihrer Geburt verwendet (P0). Die Ratten wurden dekapitiert und das Gehirn entnommen. Nach sorgfältigem Abpräparieren der Meningen wurden die Hippocampi mit dem entorhinalen Cortex herausgeschnitten, einzeln präpariert und getrennt in HBSS gesammelt. Das Gewebe wurde einmal mit HBSS gewaschen und anschließend in 2 ml einer Papainlösung (20 U/ml; Sigma) 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Papain wurde durch viermaliges Waschen mit HBSS entfernt. Für die Trituration wurden 2 ml Platingmedium zugegeben und die Zellen vorsichtig mit einer feuerpolierten Pasteurpipette vereinzelt. Nachdem sich unverdaute Gewebeteile abgesetzt haben, wurde der Überstand über ein Zellsieb in ein neues 50 ml-Röhrchen dekantiert und mit Platingmedium auf 5 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte zwischen 100.000-120.000 Zellen pro Well einer 24-Well-Platte auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen ausgesät. Die hippocampalen Neurone wurden

direkt im Wachstumsmedium ausgesät, wobei nach 1 h Inkubation im Brutschrank das Medium gewechselt wurde. Die entorhinalen Neurone wurden im Platingmedium ausgesät und nach 3 h Inkubation zweimal mit PBS gewaschen und in Wachstumsmedium, welches 1xB27 enthielt, überführt.

HBSS: 50 ml HBSS (10x Stock; ohne Calcium und Magnesium, Gibco)
5,04 ml HEPES (1 M Stock, Sigma)
ad 500 ml H₂O
pH 7,3, sterilfiltrieren

Plating Medium: 5 ml Pferdeserum (Gibco)
1,5 ml 20%ige Glucoselösung (Endkonzentration 0,6%)
0,5 ml Penicillin/Streptomycin (100x Stock, Gibco)
ad 50 ml MEM (Gibco)
sterilfiltrieren

Wachstumsmedium: 0,5 ml bzw. 1 ml B27 Supplement (50x Stock, Gibco)
125 µl Glutamin (200 mM Stock, Gibco)
0,5 ml Penicillin/Streptomycin (100x Stock, Gibco)
ad 50 ml Neurobasal A (Gibco)

Papain (20 u/ml): 25 mg Papain (aus Papayalatex, Sigma)
25 ml EBSS (Earle's Balanced Salt Solution, Gibco)

Poly-L-Lysin: 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin (Sigma) in 100 mM Boratpuffer, pH 8,5

2.2.4.4 Transiente Transfektion von Zellen

2.2.4.4.1 Transfektion mit FuGENE® Transfektionsreagenz

FuGENE6 (bzw. dessen Nachfolger X-tremeGENE9; Roche) ist ein auf Lipiden basierendes nicht-liposomales Transfektionsreagenz, welches mit der DNA Komplexe bildet und so eine Einschleusung der DNA in die Zellen ermöglicht. Diese Transfektionsmethode weist eine hohe Effizienz bei geringer Zytotoxizität auf. In dieser Arbeit wurden HEK293-Zellen mit diesem Reagenz transfiziert, weil hier die für die Überexpression von Proteinen erforderliche hohe Transfektionseffizienz im Vordergrund stand. Dabei wurde entsprechend des Herstellerprotokolls vorgegangen, das vorgeschlagene Verhältnis FuGENE6-Reagenz zu µg DNA von 3:1 wurde eingehalten. Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer

Dichte von $1-1,2 \times 10^6$ Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät. Für den Transfektionsansatz wurden 200 μ l Opti-MEM (Gibco) pro 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und 6 μ l FuGENE zugegeben. Anschließend wurden 2 μ g DNA hinzugefügt, kurz auf dem Vortex gemischt und für 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Co-transfektionen wurde pro Konstrukt 2 μ g DNA eingesetzt und die FuGENE-Menge dementsprechend erhöht. Der FuGENE-DNA-Komplex wurde dann tropfenweise zu den Zellen gegeben, die sich in 5 ml Medium Medium (DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) befanden. Nach 2-3 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden bis zum Experiment bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.2.4.4.2 Transfektion mit Effectene® Transfektionsreagenz

Effectene (Qiagen) ist eine nicht-liposomale Lipid-Formulierung, die aufgrund ihrer geringen Zytotoxizität bei gleichzeitig hoher Transfektionseffizienz vor allem für die Transfektion von Primärkulturen geeignet ist. Das Prinzip basiert auf einer Kondensierung der DNA durch Zugabe eines Enhancers und der Ausbildung von DNA-haltigen Micellen nach Zugabe des Effectene-Reagenzes. Diese können von den Zellen leicht aufgenommen werden. Die hippocampalen bzw. entorhinalen Neurone wurden nach der Präparation mit 120.000 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät und entsprechend der Experimente zu unterschiedlichen Zeitpunkten transfiziert. Für einen Vierfachansatz wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 150 μ l EC-Puffer vorgelegt und mit 1,5 μ g DNA sowie 10 μ l Enhancer sorgfältig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Co-Transfektionen wurde von jeder DNA 1,5 μ g bei ansonsten unveränderten Volumina eingesetzt. Anschließend wurden 8-16 μ l Effectene zugegeben und nach erneutem Mischen für 8-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 400 μ l Wachstumsmedium wurde der Transfektionsansatz gleichmäßig auf die Zellen verteilt, die sich in 1 ml Medium befanden. Nach 1-2 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend bis zum Experiment in Wachstumsmedium inkubiert.

2.2.5 Immunhistochemische Methoden

2.2.5.1 Fixierung und Permeabilisierung der transfizierten Zellen

Nach Kultivierung und Transfektion entsprechend der Fragestellung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 4% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 10-30 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend für 10-30 min in eine Blocklösung überführt. Nach 10 min Permeabilisierung mit 0,2% TX-100 in PBS konnte mit der Inkubation der Antikörper begonnen werden.

Blocklösung: 5% FCS
 0,02% Thimerosal
 PBS

2.2.5.2 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie kann die Lokalisation zellulärer Bestandteile und die Verteilung von Proteinen innerhalb einer Zelle untersucht werden. Das nachzuweisende Protein, welches mit einem spezifischen Primärantikörper und eines gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpers markiert wird, wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittiert daraufhin längerwelliges Licht (Immunfluoreszenz). Dieses Licht kann visuell erfasst oder von einem Detektor aufgezeichnet werden. Die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht die Detektion mehrerer Proteine in einer Zelle, Voraussetzung dafür ist die Verwendung von Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies. Die Zellen wurden für mindestens 30 min bei Raumtemperatur mit PBS/5% FCS blockiert, 10 min mit 0,2% TX-100 in PBS permeabilisiert und mit den entsprechenden Primärantikörpern in PBS/5% FCS für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/0,1% TX-100 erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Alexa Fluor 488-, Cy3- oder Cy5-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:500, Molecular Probes; bzw. 1:800, Jackson Immuno Research) ebenfalls in PBS/5% FCS für 1 h bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut mehrmals gewaschen und die Zellkerne 3 min mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, 1:100.000 in PBS) angefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht mit blauer Farbe. Die Einbettung der Zellen erfolgte auf Objektträgern in „Fluorescence Mounting Medium“ (Dako).

Die Immunfluoreszenz wurde an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta in Kombination mit einem Axiovert 100 Microsystems Mikroskop, Zeiss, Jena) untersucht. Es wurde ein Plan-APOCHROMAT Öl-Immersionsobjektiv (63x/NA 1,4) verwendet. Für die Bedienung des Mikroskops, die Darstellung und die Speicherung der Bilder wurde die Software ZEN 2011 verwendet. Alle Aufnahmen für Kontrollen und Experimentalansätze innerhalb eines Experiments wurden mit denselben Aufnahmeparametern gemacht. Diese Parameter wurden so gewählt, dass schwache Fluoreszenzen sichtbar waren, starke Fluoreszenzen jedoch nicht überstrahlten. Die quantitative Auswertung der Intensitäten der Immunfluoreszenz erfolgte mit der NIH Image J Software. Für die Bestimmung der subzellulären HCN1- und TRIP8b-Lokalisationen in entorhinalen Cortexneuronen wurde ein Raster von $400 \mu\text{m}^2$ auf die Zelle gelegt, welches aus 4 Quadranten zu je $100 \mu\text{m}^2$ bestand. Die Nummerierung der Quadranten erfolgte im Uhrzeigersinn, wobei rechts unten begonnen wurde. Die Zelle wurde so ausgerichtet, dass sich Axonhügel und Axon im ersten Quadranten befanden. Für jeden Quadranten wurden die Signalintensitäten von HCN1 und TRIP8b bestimmt. Für die Auswertung des *in situ* PLA Assays wurde die Fläche der distinkten, punktförmigen Signale, die die Interaktionen von zwei Proteinen darstellen, auf die Anzahl der Zellkerne bezogen, um die durchschnittliche Anzahl an Signalen pro Zelle zu ermitteln. Um das Volumen der Zellen darstellen zu können, wurden „z-stacks“ mit einer „step-size“ von $0,8 \mu\text{m}$ verwendet. Die Höhe des erstellten Stapels richtete sich dabei nach den Ausmaßen der Zelle. Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte unter Anwendung des Student's t-Test.

2.2.5.3 Immunhistochemie

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Frontalschnitte von Hirnen adulter Ratten, die wie in 2.1.8 beschrieben fixiert wurden, in einer Stärke von $30 \mu\text{m}$ auf einem Kryostaten (HM 560, Microm) angefertigt. Die auf Objektträger gezogenen Schnitte wurden 20 min mit 2% PFA nachfixiert, mit PBS gewaschen und in einer Lösung aus PBS/0,3% TX-100/3% Normal Goat Serum (NGS) für 30 min blockiert. Die Schnitte wurden 24 – 48 h bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert, der in PBS/0,3% TX-100 angesetzt wurde. Nach zweimaligem Waschen für 10 min mit PBS wurden die Schnitte über Nacht mit einem gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Färbung erfolgte mithilfe des Vectastain[®] ABC-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Das Prinzip beruht auf der irreversiblen Interaktion von Biotin mit

Streptavidin, welches mit einer Peroxidase konjugiert vorliegt. Die Zugabe von 0,04% Diaminobenzidin und 0,01% H₂O₂ in PBS führte zu einer optisch kontrollierbaren Färbung der Schnitte, welche nach Erreichen der gewünschten Intensität durch Überführen der Schnitte in PBS gestoppt wurde. Anschließend wurden die Präparate durch Inkubation mit aufsteigenden Alkoholkonzentrationen (70-100% für je 5 min) dehydriert, in Xylolersatz equilibriert und in Eukitt Mounting Medium (Kindler, Freiburg) eingebettet.

Die zu untersuchenden Proteine in den Gewebeschnitten konnten ebenfalls durch Immunfluoreszenz detektiert werden. Dafür wurden die Schnitte analog zur Peroxidase-Färbung mit dem entsprechenden Primärantikörper und nach gründlichem Waschen mit einem an einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488, vgl. 2.2.5.2) für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und mit DAPI gegengefärbt. Die Schnitte wurden zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes in „Fluorescence Mounting Medium“ (Dako) eingebettet.

Die Schnitte wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2, Zeiss) untersucht, zur Betrachtung der Peroxidasefärbungen wurde die Durchlichteinheit verwendet. Aufnahmen wurden mit der AxioCam HRc (Zeiss) bei gleichbleibenden Aufnahmeparametern gemacht. Für Übersichtsaufnahmen wurden die Objektive Plan-Neofluar 10x/NA0,3 und 20x/NA0,5 verwendet, für Vergrößerungsaufnahmen wurde das Wasser-Immersionsobjektiv Plan-Neofluar 40x/NA0,75 benutzt.

2.2.5.4 *In Situ* Proximity Ligation Assay (Duolink II)

Mithilfe des „*in situ* proximity ligation assays“ (*in situ* PLA; Olink Biosciences, Uppsala, Schweden) lässt sich die Interaktion von zwei Proteinen innerhalb der Zelle detektieren (Söderberg et al., 2006). Der weitere Vorteil dieser Methode ist die Quantifizierbarkeit der Interaktion und die Bestimmung deren subzellulärer Lokalisation. Voraussetzung für die Entstehung eines messbaren Signals ist eine große räumliche Nähe von zwei Epitopen, wie man sie bei miteinander interagierenden Proteinen findet. Es handelt es sich hierbei um eine immunocytochemische Methode, bei der die fixierten Zellen nach der Permeabilisierung mit zwei gegen die zu untersuchenden Proteine gerichteten Antikörpern inkubiert wurden, welche aus unterschiedlichen Spezies stammen müssen. Die gegen die Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper tragen Modifikationen in Form von Oligonukleotiden (sog. „PLA

probes“), wobei der eine Sekundärantikörper einen „PLUS“- und der andere einen „MINUS“-Strang trägt. Durch Zugabe einer Ligase werden die beiden Oligonukleotide zu einem zirkulären DNA-Fragment vereinigt. Eine sich anschließende Amplifikationsreaktion verwendet dieses als Primer und generiert in einer Reaktion, die man als „rolling-circle amplification“ bezeichnet, in Anwesenheit von Nukleotiden mittels einer Polymerase ein repetitives, räumliches DNA-Gebilde, in welches sich ein Fluoreszenzfarbstoff durch Hybridisierung anlagern kann. Eine Interaktion wird somit als distinktes, fluoreszierendes Signal detektierbar. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der *in situ* PLA wurden an entorhinaler Dispersionskultur durchgeführt, die vor dem Experiment 14 Tage in Kultur gehalten wurde (DIV 14).

2.2.5.5 *In Situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ermöglicht die Detektion von mRNA im Gewebe. Damit kann das Vorhandensein einer mRNA in einem bestimmten Zelltyp oder in bestimmten Arealen des Hirns untersucht werden. Das Prinzip basiert auf einer Hybridisierung von zuvor durch *in vitro* Transkription hergestellten Sonden, die eine „anti-sense“-Orientierung für die zu untersuchende mRNA aufweisen und somit mit dieser unter bestimmten Reaktionsbedingungen hybridisieren können. Die Spezifität der Reaktion wurde mit der parallelen Verwendung der „sense“-Sonde kontrolliert, die dementsprechend kein Signal erzeugen sollte. Die für die Sonden codierenden DNA-Fragmente wurden zuvor in den Vektor pBluescript II kloniert. Die Herstellung der Sonden erfolgte mithilfe des „DIG RNA Labeling Kits“ (Roche Applied Sciences, Penzberg). Es wurde dabei nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Abhängig davon, ob die Transkription am T7 oder T3-Promotor beginnen sollte, wurde das Plasmid zuvor am 5'- oder am 3'-Ende des DNA-Inserts linearisiert. Der Reaktionsansatz für die Transkription enthielt neben der T3- bzw. T7-RNA-Polymerase Reaktionspuffer, RNase-Inhibitor und ein Nukleotidgemisch. Dieses beinhaltet neben normalem UTP auch Digoxigenin-markiertes UTP, welches zufällig in die RNA eingebaut wird („DIG-labeling“). Die Detektion der hybridisierten Sonden erfolgte mittels eines gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörpers, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt vorliegt. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) zusammen mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) in einer Redox-Reaktion zu einem bräunlichen Farbstoffgemisch, welches eine lichtmikroskopisch detektierbare Färbung des Gewebes ermöglicht. Alle Lösungen, die für die *in situ*

pH einstellen auf 7,5

DIG II:
100 mM Tris
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂
pH einstellen auf 9,5

2.2.6 Statistik

Für die statistische Auswertung aller in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden zunächst die Mittelwerte aus den Daten gebildet und anschließende der Standardfehler (SEM) berechnet. Dieser errechnet sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte geteilt durch die Quadratwurzel der Fallzahl (n) der Stichprobe.

Mithilfe des Student's t-Test für unverbundene Stichproben soll ermittelt werden, ob sich die durchschnittlichen Werte eines Versuches signifikant voneinander unterscheiden. Dieser Test kann allerdings nur dann Anwendung finden, wenn zwei Gruppen miteinander verglichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb auch für einige Experimente die Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Diese ermöglicht einen Vergleich der Mittelwerte für mehr als zwei Gruppen. Da mit Hilfe einer ANOVA jedoch nur festgestellt werden kann, ob es in einer Gruppe von Mittelwerten signifikante Unterschiede gibt, schloss sich an die ANOVA ein Post-hoc-Test (Tukey-Test) an, der durch paarweise Vergleiche der Mittelwerte Auskunft darüber gibt, welche Mittelwerte sich signifikant voneinander unterscheiden. Die Signifikanz wird hierbei als p-Wert bezeichnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgesetzt, was die Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner gleich 5% entspricht. Der berechnete p-Wert wurde mit dem festgelegten Signifikanzniveau verglichen. Die Prüfung dieser Signifikanz erfolgte mithilfe der Software Excel oder GraphPad Prim 4.00. War der errechnete Signifikanzwert $\leq 0,05$, so bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Regulierung des axonalen HCN1-Transports durch spezifische TRIP8b-Isoformen

Bisher konnte gezeigt werden, dass HCN1 in den Axonterminalen des medialen Tractus perforans altersspezifisch exprimiert wird (Bender et al., 2007). Der Tractus perforans ist, wie eingangs beschrieben, ein wichtiger afferenter Fasertrakt, der vom entorhinalen Cortex zum Hippocampus zieht. Die präsynaptische Expression von HCN1 nimmt jedoch mit zunehmender Entwicklung ab, obwohl die Expression der HCN1-Untereinheit im Soma unverändert bleibt (Bender et al., 2007). Es stellte sich daher die Frage, wodurch die altersabhängige Abnahme von HCN1 in den Axonterminalen reguliert wird. Für HCN-Kanäle ist eine regulierende Untereinheit bekannt: das Protein TRIP8b, welches einem intensiven alternativem Splicing unterliegt und mit seinen verschiedenen exprimierten Isoformen unterschiedliche Effekte auf den HCN1-Transport haben kann (Lewis et al., 2009; Santoro et al., 2009). Drei Isoformen werden im Gehirn bevorzugt exprimiert (TRIP8b(1a-4), (1a) und (1b-2)). Für zwei der drei am stärksten exprimierten Isoformen, TRIP8b(1a) und TRIP8b(1a-4), ist eine Beteiligung am dendritischen Transport von HCN1 beschrieben (Lewis et al., 2011; Piskorowski et al., 2011). Piskorowski et al. beschreiben außerdem, dass die Isoform TRIP8b(1a) die (artifizielle) Expression von HCN1 in Axonen von CA1 Pyramidenzellen verhindert.

Es war daher zu vermuten, dass auch die altersabhängige Expression von HCN1 in den Axonen des Tractus perforans durch TRIP8b reguliert werden könnte. Diese These wurde durch Beobachtungen von Dane Chetkovich und Zhiqiang Liu (Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago) unterstützt, die immunhistochemische Untersuchungen an TRIP8b^{-/-}- und TRIP8b(1b-2)^{-/-}-Mäusen durchführten und dabei herausfanden, dass die HCN1-Immunreaktivität in der mittleren Molekularschicht des Gyrus dentatus, der Terminationszone des medialen Tractus perforans, in den komplett TRIP8b-defizienten Mäusen deutlich erhöht war (vgl. Abbildung 3-1 e und f, Vergrößerung: j-l). Bei alleiniger Abwesenheit der TRIP8b(1b-2)-Isoform in der TRIP8b(1b-2)^{-/-}-Maus zeigte sich dieser Effekt nicht (Abbildung 3-1 h). Dies ließ vermuten, dass TRIP8b an der Verhinderung des Transports von HCN1 in die Axonterminalen des medialen Tractus perforans beteiligt ist und dass entweder TRIP8b(1a-4) oder TRIP8b(1a) die hauptsächlich beteiligten Isoformen sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fragestellung weiterverfolgt. Dabei wurde untersucht, welchen Einfluss die beiden TRIP8b-Isoformen, (1a-4) und (1a), auf die subzelluläre Verteilung von HCN1 in entorhinalen Neuronen nehmen. Außerdem wurde die Expression von TRIP8b im Tractus perforans charakterisiert. Dabei wurde der Fokus vor allem auf eine mögliche Entwicklungsabhängigkeit der Expression gelegt, da eine altersabhängige Steigerung der Expression die Theorie erhärten würde, dass die von Bender et al. (2007) gefundene Abnahme der präsynaptischen HCN1-Expression mit zunehmendem Alter durch die Interaktion mit TRIP8b beeinflusst wird.

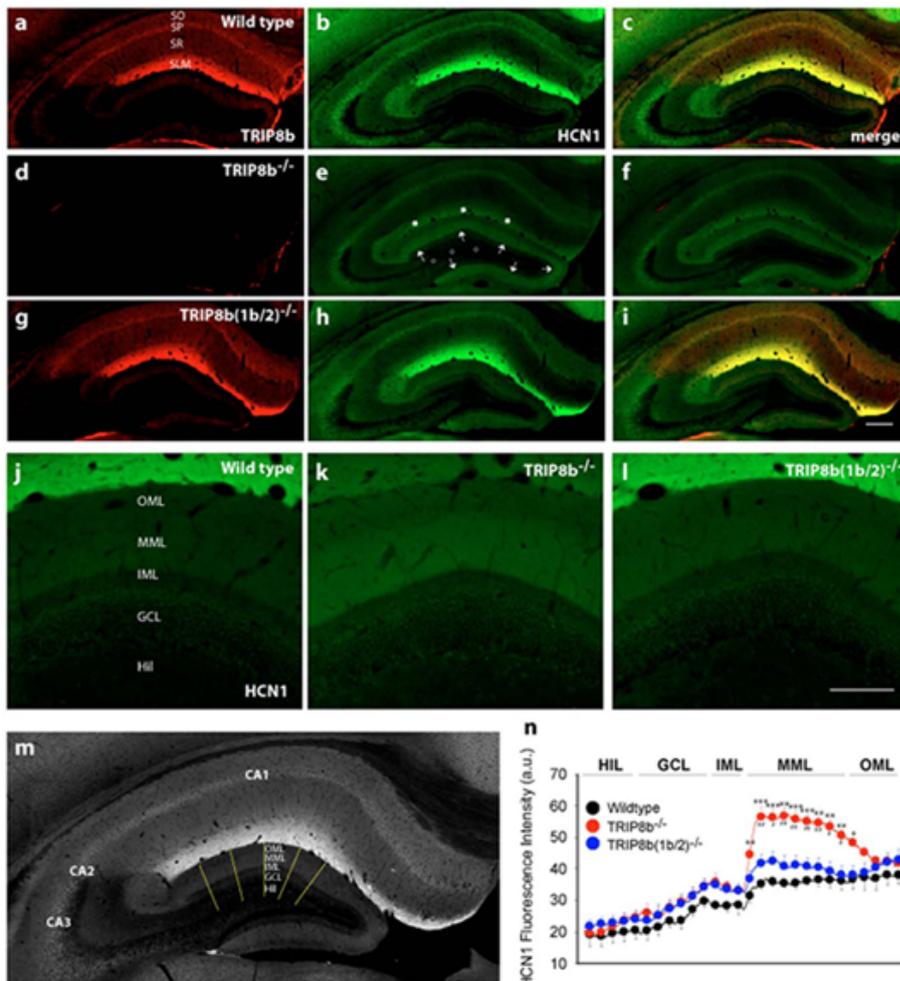


Abbildung 3-1: Effekte der TRIP8b-Isoformen auf HCN1-Lokalisation in der MML des Gyrus dentatus

Coronare Schnitte des Hippocampus von Wildtyp- und zwei verschiedenen Knockout-Mäusen (TRIP8b^{-/-} und TRIP8b(1b-2)^{-/-}) **a-c**, Immunreaktivität von TRIP8b (rot) und HCN1 (grün) im Hippocampus und Gyrus dentatus einer adulten Wildtyp-Maus. **d-f**, Veränderung der HCN1-Immunreaktivität in der TRIP8b^{-/-}-Maus: Es ist eine deutliche Abnahme der Immunreaktivität im Stratum lacunosum moleculare (SLM) zu erkennen, gleichzeitig kam es zu einer Zunahme der Immunreaktivität in der mittleren Molekularschicht (MML) des Gyrus dentatus (vgl. Vergrößerung j-l). **g-i**, In der TRIP8b(1b-2)^{-/-}-Maus wurde nur spezifisch die Expression der Isoform (1b-2), nicht aber die der hauptsächlich exprimierten Isoformen (1a-4) und (1a) ausgeschaltet. Dies spiegelt sich auch in der kaum abgeschwächten TRIP8b-Immunfluoreszenz wider. In der Abwesenheit von TRIP8b(1b-2) ist der Effekt der Verschiebung der HCN1-Immunfluoreszenz nicht zu beobachten. Balken: a-i 200 µm, j-l 50 µm. **m-n**, Quantifizierung der HCN1-Immunfluoreszenz, dargestellt als Funktion über die Distanz, gemessen vom Hilus (HIL) bis zur äußeren Molekularschicht (OML), wie in m) zu sehen. Die Auswertung (n) zeigt eine signifikant höhere HCN1-Expression in der mittleren Molekularschicht (MML) in der TRIP8b^{-/-}-Maus (rote Punkte) verglichen mit dem Wildtyp (schwarze Punkte) und der TRIP8b(1b-2)^{-/-} (blaue Punkte) (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). IML – innere Molekularschicht, GCL – Körnerzellschicht. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dane M. Chetkovich und Zhiqiang Liu zur Verfügung gestellt.

3.1.1 TRIP8b wird im entorhinalen Cortex altersabhängig exprimiert

Um zu untersuchen, ob TRIP8b den Transport von HCN1 im medialen Tractus perforans beeinflusst, wurde zunächst den Fragen nachgegangen, ob TRIP8b in den entsprechenden Zellen exprimiert wird und ob es dort einer altersabhängigen Regulation unterliegt. Da vorangegangene Arbeiten am entorhinalen Cortex (im Folgenden als EC abgekürzt) von Ratten durchgeführt wurden, wurden für diese Experimente ebenfalls Ratten verwendet. Es wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um die Expression von TRIP8b zu charakterisieren und die Altersabhängigkeit der Expression zu untersuchen:

1. Immunhistochemische Untersuchung der TRIP8b-Expression im entorhinalen Cortex
2. *In situ* Hybridisierungen zur Untersuchung der Lokalisation der TRIP8b mRNA im entorhinalen Cortex
3. Immunblot aus entorhinalem Cortex-Gewebe zur Untersuchung der Altersabhängigkeit der TRIP8b-Expression

Die immunhistochemische Untersuchung sollte die Frage klären, ob TRIP8b in den Ursprungszellen des medialen Tractus perforans, den Sternzellen in der Schicht II des medialen EC, exprimiert wird. Dafür wurde an Schnitten vom Hirn einer adulten Ratte TRIP8b durch einen polyklonalen anti-TRIP8b(pan) Antikörper, der an die konstante Region des Proteins bindet, markiert und nachfolgend durch eine Peroxidase-Reaktion visualisiert (siehe Kap. 2.2.5.3). Abbildung 3-2 zeigt die Expression von TRIP8b im medialen EC (a; Pfeile), außerdem sind deutliche Färbungen im Hippocampus zu erkennen, speziell im Subiculum und in der CA1 Region. In diesen Gebieten wird auch HCN1 ausgeprägt exprimiert (Bender et al., 2007). Außerdem sind Signale in der Schicht V des lateralen und medialen EC und im perirhinalen Cortex zu erkennen (a; Sterne). In diesen Cortexarealen ist TRIP8b wahrscheinlich in den distalen Dendriten der Pyramidenzellen lokalisiert. Eine Vergrößerung des medialen EC (b) zeigt, dass die TRIP8b-Immunreaktivität auf die Schichten I-III und V begrenzt ist, allerdings ließ sich in den äußeren Schichten durch immunhistochemische Färbung nicht weiter abgrenzen, in welchen Zelltypen TRIP8b exakt exprimiert wurde. Aus diesem Grund wurde ein mRNA-Nachweis mittels *in situ* Hybridisierung durchgeführt (siehe Kap. 2.2.5.5). Diese erbrachte, dass die TRIP8b mRNA fast ausschließlich in Schicht II und V des medialen EC lokalisiert ist (Abbildung 3-2 c). In Schicht II befinden sich die Sternzellen, die mit ihren Axonen den medialen Tractus perforans

bilden. Um zu untersuchen, ob TRIP8b auch in diesem Zelltyp exprimiert wird, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass in den Sternzellen spezifisch Reelin exprimiert wird (Varga et al., 2010). Die Hirnschnitte der *in situ* Hybridisierung wurden einer anschließenden immunhistochemischen Färbung unterzogen, in der Reelin mit einem monoklonalen anti-Reelin Antikörper und einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa Fluor 488)-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. Das Ergebnis ist Abbildung 3-2 (d-f) zu entnehmen. Man erkennt, dass die meisten TRIP8b-positiven Zellen in der Schicht II auch Reelin-positiv sind. Somit ließ sich die Hypothese bestätigen, dass TRIP8b in Zellen des medialen Tractus perforans exprimiert wird.

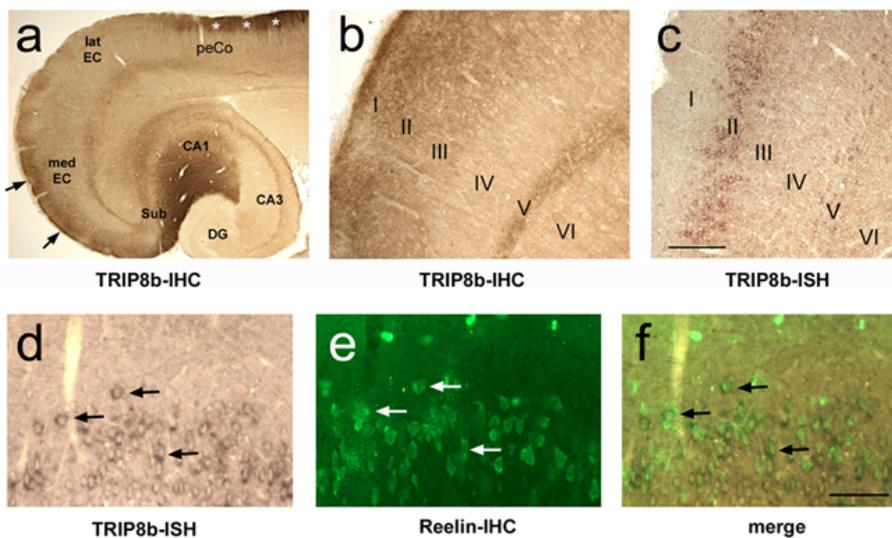


Abbildung 3-2: Expressionsanalyse von TRIP8b im entorhinalen Cortex

a, Lichtmikroskopische Aufnahmen horizontaler Schnitte eines adulten Rattenhirns zeigen Immunfärbungen von TRIP8b im Hippocampus, entorhinalen und perirhinalen Cortex. Die TRIP8b-Immunreaktivität ist in den Gebieten mit starker HCN1-Expression besonders ausgeprägt: distale Dendriten der CA1-Region, Subiculum (Sub), sowie die äußeren Schichten (I-III) des medialen EC (med EC, Pfeile). Außerdem ist eine TRIP8b-Färbung in den Pyramidenzellen der Schicht V des medialen und lateralen (lat EC) EC und in den äußeren Schichten des perirhinalen Cortex (peCo, Sterne) zu erkennen, dort spiegelt sie wahrscheinlich die dendritische Expression von TRIP8b in den Pyramidenzellen wider. **b**, Vergrößerung des medialen EC von a. Die TRIP8b-Immunreaktivität ist auf die Schichten I-III und V begrenzt, jedoch lässt sich keine deutliche Abgrenzung in den äußeren Schichten treffen. **c**, *In situ* Hybridisierung zeigt, dass TRIP8b mRNA fast ausschließlich in den Schichten II und V des medialen EC lokalisiert ist. Dies legt nahe, dass die Sternzellen in Schicht II und die Pyramidenzellen in Schicht V die Hauptquellen der TRIP8b-Immunreaktivität im medialen EC sind. **d-f**, Gemeinsame Markierung der TRIP8b mRNA (d) und des Reelin-Proteins (e) zeigt, dass viele der TRIP8b-positiven Zellen in der Schicht II des EC Reelin exprimieren (Pfeile), dies identifiziert sie als Projektionsneurone des Tractus perforans (Varga et al., 2010). Balken: 500 µm (a), 200 µm (b, c), 80 µm (d-f).

Um zu untersuchen, ob die Expression von TRIP8b altersabhängig reguliert ist, wurde entorhinales Cortexgewebe von immaturren (P10) und adulten (>P60) Ratten für einen Immunblot verwendet. Gleiche Proteinmengen wurden per SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit einem polyklonalen anti-TRIP8b(pan) Antikörper und einem polyklonalen anti-HCN1 Antikörper. Zur Standardisierung wurde Aktin verwendet, da dieses Protein während der Entwicklung konstant exprimiert wird. Das Ergebnis des Immunblots ist in Abbildung 3-3 dargestellt. Der HCN1-Antikörper erkannte zwei Banden, davon stellt die deutlich stärkere Bande bei 120 kDa das glykosylierte HCN1 dar. Der TRIP8b-Antikörper detektierte ebenfalls zwei Banden, hierbei handelt es sich um die beiden hauptsächlich exprimierten Isoformen TRIP8b(1a-4) und TRIP8b(1a). Zur Identifizierung der beiden Isoformen wurde ein Immunblot mit nativem Gewebeextrakt und Zellysaten aus HEK293-Zellen durchgeführt, die zuvor mit für die einzelnen Isoformen codierenden Plasmiden transfiziert wurden (pXEGFP-C1-TRIP8b(1a) und pXEGFP-C1-TRIP8b(1a-4)) (Abbildung 3-3 A). Die Quantifizierung der Expression in den adulten Tieren erfolgte relativ zum Expressionsniveau der immaturren Tiere, das auf 100% gesetzt wurde. Für HCN1 konnte eine nicht signifikante Zunahme der Expression ermittelt werden ($140 \pm 17\%$, $p > 0,05$), was in Einklang mit den bereits publizierten Daten steht, nach denen das HCN1-Expressionsniveau trotz abnehmender Expression in Axonen des medialen Tractus perforans während der Entwicklung nicht reduziert wurde (Bender et al., 2007). Beide TRIP8b-Isoformen zeigten jedoch eine signifikante Zunahme der Expression (TRIP8b(1a-4) $200 \pm 30\%$, bzw. TRIP8b(1a) $245 \pm 41\%$, $p < 0,01$) (Abbildung 3-3 B).

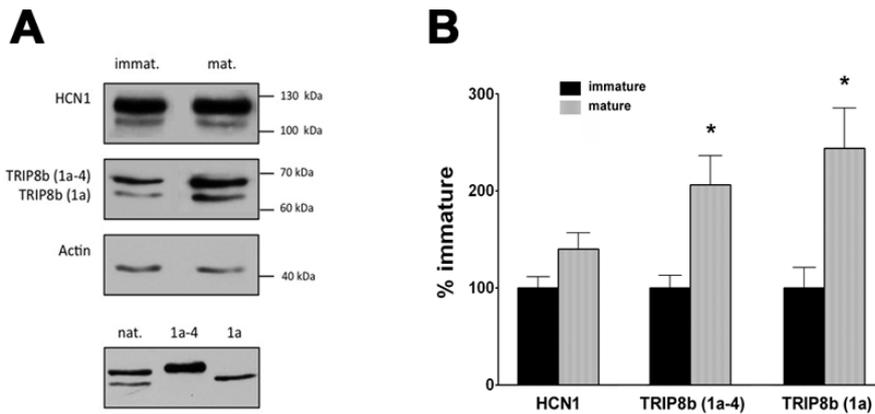


Abbildung 3-3: TRIP8b wird im entorhinalen Cortex altersabhängig exprimiert

A, Oben: Der Immunblot zeigt die Expression von TRIP8b und HCN1 im entorhinalen Cortex von immaturren (P10) und adulten (>P60) Ratten. Der TRIP8b-Antikörper erkannte zwei Banden, hierbei handelt es sich um die hauptsächlich exprimierte Isoformen (1a) und (1a-4) (ca. 65 bzw. 70 kDa), die zusammen >80% des entorhinalen TRIP8b ausmachen. Unten: Natives TRIP8b (links) ist zum Nachweis der beiden Isoformen in der TRIP8b-Doppelbande gegen TRIP8b(1a) (rechts) und TRIP8b(1a-4) (Mitte) aufgetragen. Beide Isoformen stammen aus transfizierten HEK293-Zellen. **B**, Quantitative Auswertung des Expressionsniveaus von HCN1 und den TRIP8b-Isoformen im immaturren und adulten entorhinalen Cortex. Die Daten sind auf die immature Expression, die 100% gesetzt wurde, bezogen und auf Aktin normalisiert. Das Expressionsniveau beider TRIP8b-Isoformen im adulten Tier stieg signifikant zum immaturren Tier an ($p < 0,01$), wohingegen die HCN1-Expression unverändert blieb ($p > 0,05$). $n = 3$.

Zusammenfassend bestätigten die durchgeführten Experimente, dass TRIP8b in den Ursprungszellen des medialen Tractus perforans, den Sternzellen in der Schicht II des medialen EC, exprimiert wird und seine Expression einer altersabhängigen Zunahme unterliegt. Der Immunblot aus nativem Gewebe ergab außerdem, dass überwiegend die Isoformen TRIP8b(1a-4) und TRIP8b(1a) im entorhinalen Cortex exprimiert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Grundvoraussetzung für eine altersabhängige Herunterregulation des axonalen HCN1-Transports durch TRIP8b erfüllt sind.

3.1.2 TRIP8b beeinflusst isoform-spezifisch die subzelluläre HCN1-Lokalisation

Es wurde nun in weiteren Experimenten der Einfluss der beiden Isoformen, TRIP8b(1a-4) und TRIP8b(1a), auf den subzellulären Transport von HCN1 genauer untersucht. Für diese Fragestellung wurden entorhinale Dispersionskulturen verwendet, in denen die zu untersuchenden Proteine überexprimiert wurden. Die Ratten wurden am Tag ihrer Geburt präpariert (P0), die Zellen wurden nach zwei Tagen *in vitro* (DIV 2) transfiziert. Es wurden Kulturen in diesem noch jungen Stadium gewählt, da der Fokus auf der Untersuchung der axonalen Expression der Proteine lag. Zu diesem frühen Zeitpunkt ist das axonale Netzwerk

noch nicht voll ausgebildet und der Verlauf eines einzelnen Axons lässt sich gut verfolgen. Für die Transfektion wurden Plasmide verwendet, die für ein GFP-Fusionsprotein mit HCN1 (pGW1-HCN1-GFP), TRIP8b(1a-4) (pXEGFP-TRIP8b(1a-4), das GFP wurde in diesem Plasmid durch Klonierung deletiert) oder TRIP8b(1a) (pXEGFP-TRIP8b(1a)) codieren. Nach zwei weiteren Tagen in Kultur (DIV 4) wurden die Zellen fixiert und die Proteine immunocytochemisch nachgewiesen. Für HCN1-GFP wurde die Eigenfluoreszenz des Proteins genutzt, für die TRIP8b-Isoformen wurde ein polyklonaler anti-TRIP8b(pan) Antikörper verwendet. Außerdem wurden zur Visualisierung des Axons ein gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau-1 gerichteter monoklonaler Antikörper (anti-Tau 1) verwendet. Die Immunfärbungen sind in Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5 dargestellt. Man erkennt, dass bei der Einzeltransfektion sowohl HCN1 (grün, a-c) als auch die beiden TRIP8b-Isoformen (rot, (1a-4) d-f; (1a) g-i) relativ gleichmäßig in allen Zellkompartimenten (Soma, Dendriten und Axon) exprimiert wurden (Abbildung 3-4).

Wurden HCN1 und TRIP8b(1a-4) bzw. (1a) co-transfiziert, waren die Effekte der Isoformen unterschiedlich (Abbildung 3-5). Die gemeinsame Transfektion von HCN1-GFP und TRIP8b(1a-4) schien die Expression von HCN1 nicht wesentlich zu beeinflussen. Beide Proteine konnten in allen Zellkompartimenten detektiert werden, wobei auch eine Detektion bis weit ins Axon hinein möglich war (Abbildung 3-5 a-h). Die Signalintensität beider Proteine war, bis auf eine Präferenz für das somato-dendritische Kompartiment, relativ homogen (Abbildung 3-5 r-t). Im Gegensatz dazu änderte die Co-Transfektion von TRIP8b(1a) die subzelluläre Verteilung von HCN1-GFP wesentlich (Abbildung 3-5 i-p): Es kam zu einem signifikanten Anstieg der Immunfluoreszenz im somato-dendritischen Kompartiment (Quadrant 3, Abbildung 3-5 r) verglichen mit Zellen, die mit TRIP8b(1a-4) co-transfiziert wurden (HCN1: $193 \pm 14\%$ der mittleren Signalintensität in TRIP8b(1a)-vergleichen mit $150 \pm 12\%$ in TRIP8b(1a-4)-transfizierten Zellen). Gleichzeitig kam es in den mit TRIP8b(1a)-transfizierten Zellen zu einer relativen Reduktion der Signalintensität in dem Gebiet des Axonhügels (Quadrant 1; HCN1: $29 \pm 4\%$ der mittleren Signalintensität im Vergleich zu $51 \pm 5\%$ in TRIP8b(1a-4)-transfizierten Zellen, $p = 0,02$; TRIP8b: $36 \pm 5\%$ bei TRIP8b(1a) im Vergleich zu $70 \pm 8\%$ bei TRIP8b(1a-4), $p = 0,0009$, Abbildung 3-5 r-t). Neben dieser messbaren Abnahme konnte man auch in den immunocytochemischen Färbungen erkennen, dass sowohl HCN1 als auch TRIP8b(1a) vermindert oder gar nicht mehr in den Axonen exprimiert wurden (Abbildung 3-5 m-p bzw. i-l).

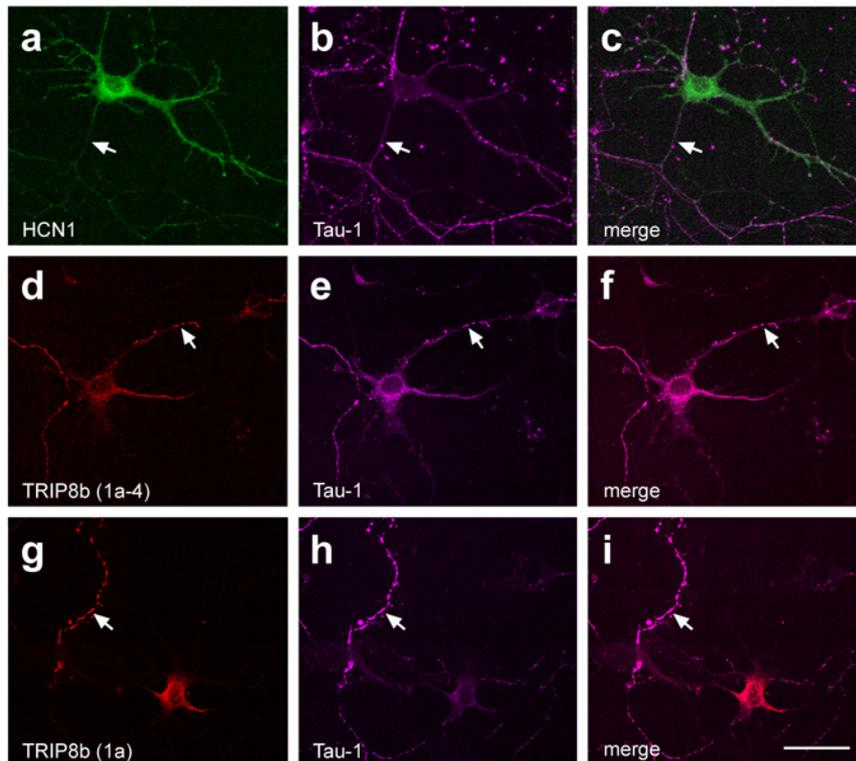


Abbildung 3-4: Expression von HCN1-GFP und TRIP8b Isoformen nach Einzeltransfektion in undifferenzierter entorhinaler Dispersionskultur

Konfokale Aufnahmen zeigen repräsentative Neurone in undifferenzierten Zellen (P0 + 4 Tage *in vitro*), die entweder mit HCN1-GFP (a-c), TRIP8b(1a-4) (d-f) oder TRIP8b(1a) (g-i) transfiziert wurden. Zur Visualisierung des Axons wurde das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau-1 immunocytochemisch markiert (b, e, h). Die Einzeltransfektion führte zur einer relativ homogenen Verteilung der überexprimierten Proteine in allen zellulären Kompartimenten, einschließlich des Axons (Pfeile). Balken: 20 μm .

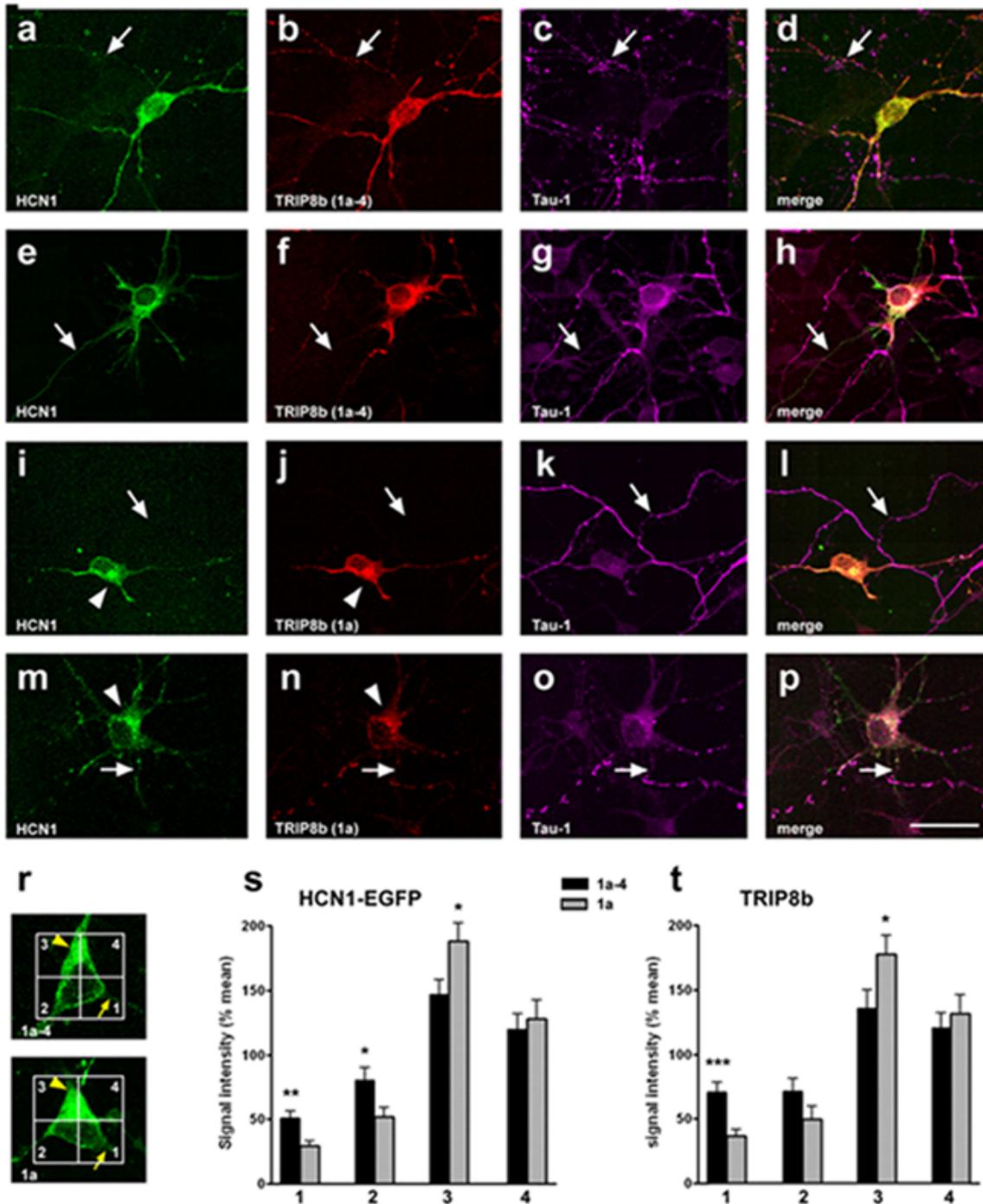


Abbildung 3-5: Expression von HCN1-GFP und TRIP8b Isoformen nach Co-Transfektion in undifferenzierter entorhinaler Dispersionskultur

a-h, Konfokale Aufnahmen zeigen repräsentative Neurone immaturer Kulturen, die HCN1-GFP (a, e) und TRIP8b(1a-4) (b, f) co-exprimieren: Die Verteilung beider Proteine ist relativ homogen und ihre Expression konnte bis weit ins Axon hinein, das mit Tau-1 markiert wurde, nachgewiesen werden (Pfeile; c, d, g, h). **i-p**, Konfokale Aufnahmen zeigen repräsentative Neurone immaturer Kulturen, die HCN1-GFP (i, m) und TRIP8b(1a) (j, n) co-exprimieren. Beide Proteine sind nicht gleichmäßig in der Zelle verteilt, sondern scheinen sich im somato-dendritischen Kompartiment anzureichern (Pfeilköpfe; i, j, m, n), wohingegen die Expression im Axon (Pfeile) niedrig ist (m-p) oder ganz fehlt (i-l). Balken: 20 µm.

r-t, Quantitative Auswertung der relativen subzellulären Verteilung der HCN1-GFP- und TRIP8b-Immunfluoreszenzen in Neuronen, die entweder mit TRIP8b(1a-4) oder TRIP8b(1a) co-transfiziert wurden. Die Fläche des Neurons wurde in vier Quadranten unterteilt (je $100 \mu\text{m}^2$), wobei der Axonhügel immer in Quadrant 1 lag (r, Pfeile). Die Signalintensität wurde für jeden Quadranten ermittelt und die Intensität wurde als Prozent des Mittelwertes aller vier Quadranten angegeben. Die Werte von TRIP8b(1a-4) und TRIP8b(1a) transfizierten Neuronen ($n = \text{je } 25$) wurden nebeneinander dargestellt. HCN1-GFP und TRIP8b zeigten eine Präferenz der Expression im somato-dendritischen Kompartiment (Quadrant 3), allerdings war die Anreicherung in Zellen, die mit TRIP8b(1a) co-transfiziert wurden, signifikant erhöht (HCN1: 193 ± 14 vs. $150 \pm 12\%$; TRIP8b: 178 ± 15 vs. $136 \pm 15\%$; $p = 0,02$ bzw. $0,04$). Im Gegensatz dazu waren die relativen Signalintensitäten im Quadrant 1, der den Axonhügel beinhaltet, in Zellen, die mit TRIP8b(1a) co-transfiziert wurden, signifikant niedriger als in Zellen, die mit TRIP8b(1a-4) co-transfiziert wurden (HCN1: 29 ± 4 vs. $51 \pm 5\%$; TRIP8b: 36 ± 5 vs. $70 \pm 8\%$; $p = 0,002$ bzw. $0,0009$)

Da HCN1 in neonatalen entorhinalen Neuronen nur in einem sehr geringen Ausmaß exprimiert wird, konnten diese Experimente nur mit überexprimiertem HCN1 durchgeführt werden. Die Expression von HCN1 in den Projektionsneuronen des Tractus perforans steigt jedoch in der zweiten bis dritten Lebenswoche deutlich an (Bender et al., 2007). Um auch zu untersuchen, welchen Einfluss die TRIP8b-Isoformen auf *endogenes* HCN1 haben, wurden daher in einem weiteren Experiment Kulturen in einem ausdifferenzierteren Stadium verwendet. Dafür wurden entorhinale Dispersionskulturen von fünf Tage alten Ratten (P5) angelegt, die an DIV 7 mit den für die TRIP8b-Isoformen codierenden Plasmiden transfiziert und an DIV10 fixiert wurden. Die Proteine wurden mit polyklonalen anti-HCN1, polyklonalen anti-Tau-1 aus Huhn und monoklonalen anti-TRIP8b Antikörpern nachgewiesen. Eine Vielzahl der Neurone exprimierte endogenes HCN1, wie Abbildung 3-6 (a und e) zu entnehmen ist. Die Transfektion von TRIP8b(1a-4) oder TRIP8b(1a) führte, wie bei den undifferenzierten Kulturen, zu einer Isoform-spezifischen Beeinflussung der HCN1-Expression: Die Überexpression von TRIP8b(1a-4) zeigte eine überwiegend gleichmäßige Expression von endogenem HCN1 und TRIP8b in allen Zellkompartimenten, auch im Axon, welches mit Tau-1 markiert wurde. Wurden die Zellen mit TRIP8b(1a) transfiziert, zeigten sowohl TRIP8b als auch HCN1 eine Steigerung der somato-dendritischen Expression, die jedoch nur für TRIP8b signifikant war (TRIP8b: Quadrant 3: 153 ± 12 in (1a)- im Vergleich zu $119 \pm 10\%$ in (1a-4)-exprimierenden Neuronen; $p = 0,04$; HCN1: Quadrant 3: 150 ± 14 in (1a)- im Vergleich zu $129 \pm 13\%$ in (1a-4)-exprimierenden Neuronen; $p = 0,24$). Die Quantifizierung wurde analog zu der der undifferenzierten Kulturen durchgeführt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass TRIP8b(1a) auch die subzelluläre Lokalisation von endogenem HCN1 beeinflusst, allerdings nicht in einem solchen Ausmaß wie beim überexprimierten HCN1-GFP in den undifferenzierten Kulturen.

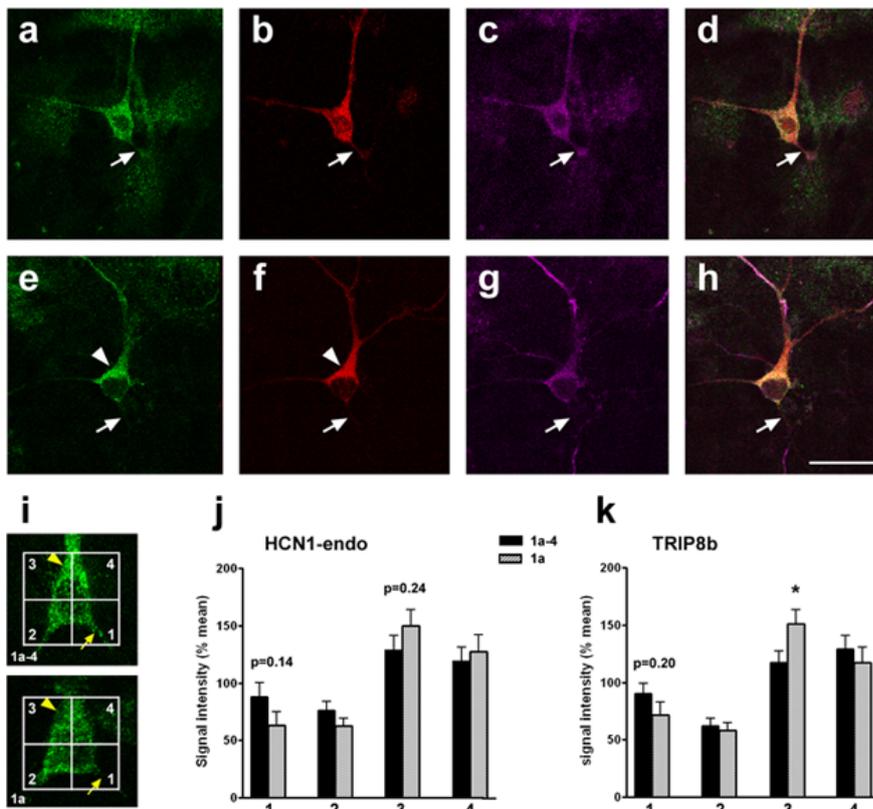


Abbildung 3-6: Expression von endogenem HCN1 und TRIP8b nach Transfektion von TRIP8b-Isoformen in differenzierter entorhinaler Dispersionskultur

a-d, Konfokale Aufnahmen zeigen repräsentative Neurone im „differenzierten“ Stadium (P5 + DIV10), die endogenes HCN1 (a) und TRIP8b(1a-4) (b) exprimieren. Die Expression beider Proteine ist relativ homogen und sowohl im Soma, in den Dendriten und im Axon (mit Tau-1 gefärbt, Pfeile c-d) zu erkennen. **e-f**, Konfokale Aufnahmen zeigen repräsentative Neurone im „differenzierten“ Stadium, die endogenes HCN1 (e) und TRIP8b(1a) (f) exprimieren. Die Expression beider Proteine kann in allen Zellkompartimenten detektiert werden (auch im Axon, Pfeile, g-h), jedoch scheint die Expression im somatodendritischen Kompartiment intensiver zu sein (Pfeilspitzen). Balken: 20 μ m. **i-k**, Quantitative Auswertung der relativen subzellulären Verteilung der endogenen HCN1- und TRIP8b-Immunfluoreszenzen in differenzierten entorhinalen Neuronen, die entweder mit TRIP8b(1a-4) oder TRIP8b(1a) transfiziert wurden (n = je 25). Die Daten von TRIP8b(1a-4)-überexprimierenden Neuronen zeigen eine relativ homogene Verteilung von HCN1 und TRIP8b in den Zellen (j, k). Im Gegensatz dazu zeigte in Neuronen, die mit TRIP8b(1a) transfiziert wurden, TRIP8b eine vorwiegend somatodendritische Expression in Quadrant 3 (153 ± 12 in 1a- vs. $119 \pm 10\%$ in 1a-4-exprimierenden Neuronen; $p = 0,04$; k). Die HCN1-Expression in diesen Neuronen zeigte einen Trend in Richtung somatodendritischer Anreicherung, der jedoch nicht signifikant war (Quadrant 3: 150 ± 14 in 1a- vs. $129 \pm 13\%$ in 1a-4-exprimierenden Neuronen; $p = 0,24$; Quadrant 1: 63 ± 12 in 1a- vs. $88 \pm 12\%$ in 1a-4-exprimierenden Neuronen; $p = 0,14$; j).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur möglichen Regulation des HCN1-Transports im medialen Tractus perforans durch TRIP8b erbrachten somit folgende Ergebnisse:

1. TRIP8b wird im medialen entorhinalen Cortex exprimiert. Es konnte insbesondere gezeigt werden, dass die Projektionsneurone des medialen Tractus perforans, die Sternzellen der Schicht II, positiv für TRIP8b sind, was auf ein Vorhandensein von TRIP8b im medialen Tractus perforans schließen lässt.
2. TRIP8b unterliegt im entorhinalen Cortex einer altersabhängigen Steigerung der Expression, die im Einklang mit der altersabhängigen Abnahme der HCN1-Expression in den Axonterminalen des medialen Tractus perforans steht.
3. Vorarbeiten deuteten auf eine Beteiligung der Isoformen TRIP8b(1a-4) oder TRIP8b(1a) an der Regulierung des HCN1-Transports im medialen Tractus perforans hin. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente an entorhinalen Dispersionskulturen zeigten einen hauptsächlichen Einfluss der Isoform TRIP8b(1a), deren Anwesenheit zu einer Steigerung der somato-dendritischen bei gleichzeitiger Reduktion der axonalen Expression sowohl von überexprimiertem als auch (in einem geringeren Ausmaß) endogenem HCN1 führte.

3.2 Suche nach Bindungspartnern für bekannte Interaktionsmotive in der HCN1-Sequenz

3.2.1 HCN1 verfügt über ein „PY“-Motiv

Ionenkanäle verfügen über eine Vielzahl potentieller Bindungsmotive. Besondere Aufmerksamkeit hat in letzter Zeit das „PY“-Motiv erhalten, welches bereits bei mehreren spannungsabhängigen Ionenkanälen identifiziert wurde, darunter auch bei den mit HCN-Kanälen verwandten spannungsabhängigen Kalium (K_v)-Kanälen (Jespersen et al., 2007; Bongiorno et al., 2011). Dieses Motiv vermittelt die Bindung von Ubiquitin-Ligasen der Nedd4/Nedd4-like Familie, die die kovalente Bindung von Ubiquitin-Resten an den Kanal katalysieren und damit dessen Internalisierung einleiten (Abriel and Staub, 2005; Bongiorno et al., 2011). Für HCN-Kanäle ist bisher weder die Existenz eines „PY“-Motivs noch die posttranslationale Modifikation der Ubiquitinylierung beschrieben worden. Eine Durchsichtung der HCN-Sequenzen ergab jedoch, dass die HCN1-Isoform im cytoplasmatischen C-Terminus über ein solches Motiv verfügt. Abbildung 3-7 stellt die genaue Sequenz dieses Motivs dar. Es handelt sich dabei um das für Ionenkanäle klassische „PPxY“-Motiv, welches sowohl in den HCN1-Sequenzen aus Maus und Ratte als auch in der humanen Sequenz vorkommt, in den anderen HCN-Isoformen aber nicht identifiziert werden konnte. Es stellte sich also die Frage, ob HCN1 mit Mitgliedern der Nedd4/Nedd4-like Proteinfamilie interagiert und diese Interaktion funktionelle Konsequenzen für die Regulation der Kanaluntereinheit hat.

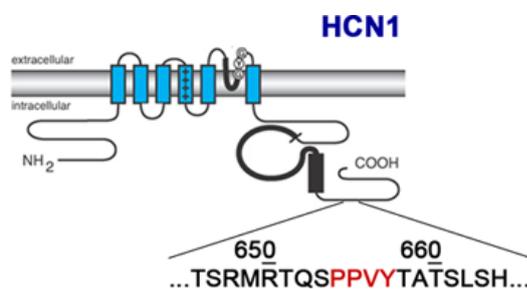


Abbildung 3-7: HCN1 verfügt über ein „PY“-Motiv

Schematische Darstellung einer HCN1-Kanaluntereinheit, modifiziert nach (Robinson and Siegelbaum, 2003). C-terminal ist ein Ausschnitt der Primärstruktur dargestellt, der die „PY“-Domäne beinhaltet („PPVY“).

3.2.2 Identifizierung und Charakterisierung der Interaktion von Nedd4-2 und HCN1 *in vitro*

Die Nedd4/Nedd4-like Proteinfamilie umfasst im Menschen neun Mitglieder (Ingham et al., 2004), die sich deutlich in ihrer Expression und ihren physiologischen Substraten unterscheiden (Donovan and Poronnik, 2012). Für die Ubiquitylierung (spannungsabhängiger) Ionenkanäle wird der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 die größte Bedeutung beigemessen (Abriel and Staub, 2005; Bongiorno et al., 2011). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch HCN1 mit Nedd4-2 interagiert. Dafür wurden Co-Immunpräzipitationen im heterologen HEK293-Zellmodell durchgeführt.

3.2.2.1 Nedd4-2 interagiert mit HCN1 *in vitro*

Um die Interaktion zwischen Nedd4-2 und HCN1 zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit p3xFlag-mNedd4-2 und pcDNA6/myc-His-mHCN1 co-transfiziert. Als Negativkontrollen dienten mit einem Konstrukt und nur dem Vektor des anderen Konstruktes co-transfizierte Zellen. Nach erfolgter Elektrophorese und Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran konnte HCN1 durch einen monoklonalen anti-myc und Nedd4-2 durch einen monoklonalen anti-Flag Antikörper nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist Abbildung 3-8 zu entnehmen. Beide Proteine wurden im gleichen Ausmaß exprimiert. Nedd4-2 co-präzipitierte schwach, aber deutlich über dem Hintergrund erkennbar, mit HCN1. HCN1 hingegen co-präzipitierte in stärkerem Ausmaß mit Nedd4-2. Beide Co-Immunpräzipitationen sind in der Abbildung durch Pfeile markiert. Dieses Experiment bestätigt, dass Nedd4-2 (*in vitro*) mit HCN1 interagiert.

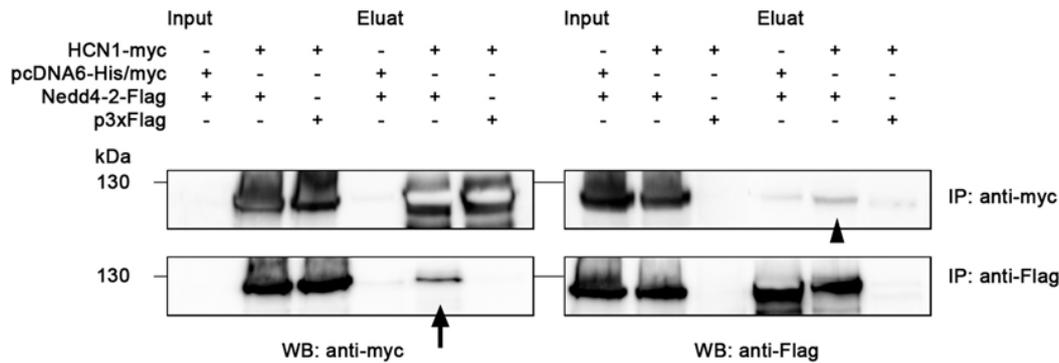


Abbildung 3-8: HCN1 und Nedd4-2 interagieren *in vitro*

HEK293-Zellen wurden transient mit Nedd4-2-Flag und HCN1-myc co-transfiziert. Als Negativkontrolle diente die Transfektion jeweils eines Konstrukts mit dem leeren Vektor des anderen Konstrukts. In parallelen Ansätzen wurde exprimiertes Nedd4-2 mittels Flag-Agarose und exprimiertes HCN1 mittels c-myc-Agarose immunpräzipitiert (IP: anti-Flag, bzw. IP: anti-myc). Präzipitierte und co-immunpräzipitierte Proteine wurden im Immunblot durch monoklonale anti-Flag und anti-myc Antikörper nachgewiesen. Als Expressionskontrolle wurde ein Aliquot der Proteinextrakte (Input) verwendet. Nedd4-2 co-präzipitiert relativ schwach mit HCN1 (Pfeilkopf), HCN1 hingegen co-präzipitiert im gegenläufigen Ansatz deutlich mit Nedd4-2 (Pfeil). Die hellen Flecken im Immunblot rühren von einer hohen Proteinkonzentration und dementsprechend raschem Verbrauch des ECL-Substrats her.

3.2.2.2 Eingrenzung der interagierenden Domäne von HCN1

Nachdem gezeigt werden konnte, dass HCN1 mit Nedd4-2 *in vitro* interagiert, wurde der Frage nachgegangen, ob diese Interaktion über die „PY“-Domäne vermittelt wird oder ob andere Domänen in der HCN1-Sequenz beteiligt sind. Dafür wurden C-terminale Deletionskonstrukte der HCN1-Untereinheit unter Verwendung des „Phusion Site Directed-Mutagenesis Kit“ (Thermo) generiert. Diese sind in Abbildung 3-9 detailliert aufgeführt. Neben dem unveränderten Fusionsprotein HCN1-myc wurden die Konstrukte strangabwärts der Cyclonucleotid-Bindungsdomäne (CNBD) modifiziert: Bei HCN1 Δ 610-910 endet die Sequenz direkt nach der CNBD, wohingegen bei HCN1 Δ 610-700 nur das „PY“-Motiv mit den umliegenden Aminosäuren entfernt wurde. Der restliche C-Terminus wurde dabei nicht verändert. Das Konstrukt HCN1 Δ 701-910 endet hinter dem „PY“-Motiv, dort fehlen die letzten 210 Aminosäuren, die auch den typischen Glutamin-„Stretch“, eine Abfolge von über 30 Glutamin-Residuen enthalten. Bei HCN1 Δ 801-910 wurden die letzten 110 Aminosäuren deletiert, bei HCN1 Δ 908-910 wurde nur das Tripeptid „SNL“, das die Bindung von TRIP8b vermittelt (Santoro et al., 2004), deletiert. Alle Deletionskonstrukte verfügten über einen myc-„tag“.



Abbildung 3-9: Übersicht der klonierten C-terminalen Deletionskonstrukte von HCN1

Schematische Darstellung der klonierten mHCN1-Konstrukte. Die Konstrukte weisen verschiedene Deletionen des cytoplasmatischen C-Terminus im Anschluss an die Transmembrandomäne (TM) und die Cyclonukleotid-Bindungsdomäne (CNBD) auf. Das „PY“-Motiv ist in rot, der davon C-terminal gelegene Glutamin-„Stretch“ (Gln) in grün dargestellt.

Mit den klonierten Konstrukten wurden Co-Immunpräzipitationen mit Nedd4-2-Flag in HEK293-Zellen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Nedd4-2-Flag und dem Vektor pcDNA6/myc-His B transfiziert, in dem die HCN1-Konstrukte vorlagen. In **Abbildung 3-10** sind die Immunblots der Co-Immunpräzipitation dargestellt. Der Immunblot der HCN1-Konstrukte (WB: anti-myc; unten) zeigt, dass alle klonierten Deletionskonstrukte exprimiert und erfolgreich präzipitiert wurden. In der mittleren Reihe sind Aliquots der eingesetzten Zellextrakte gezeigt (Input), bei denen mittels eines monoklonalen anti-Flag Antikörpers das überexprimierte Nedd4-2 sichtbar gemacht wurde. Die obere Reihe zeigt das co-immunpräzipitierte Nedd4-2. Es sind deutliche Schwankungen in der Menge des co-präzipitierten Nedd4-2 bei den verschiedenen HCN1-Mutanten zu erkennen. Die Negativkontrolle zeigt nur noch Spuren von gebundenem Nedd4-2. Das co-präzipitierte Nedd4-2 wurde, wie in **Abbildung 3-10 B** dargestellt, quantifiziert. Dabei wurde, um Schwankungen in der Transfektionseffizienz auszugleichen, das präzipitierte Nedd4-2 auf den Input normiert und ins Verhältnis zur Menge des Nedd4-2 gesetzt, welches mit der unmodifizierten HCN1-Untereinheit interagiert (entspricht 100%). Eine Deletion der letzten 300 Aminosäuren führte zu einer fast vollständigen Aufhebung der Interaktion von Nedd4-2 mit HCN1 (Reduktion auf $8 \pm 1\%$ des Kontroll-Niveaus; $p < 0,001$). Eine alleinige Deletion des „PY“-Motivs und angrenzender Aminosäuren ($\Delta 610-700$) führte zwar ebenfalls zu einer

Abnahme der Interaktion, die aber interessanterweise nicht das Niveau der $\Delta 610-910$ -Mutante erreichte ($53 \pm 12\%$; $p < 0,03$). Das $\Delta 701-910$ -Konstrukt, welches das „PY“-Motiv noch enthielt, reduzierte die Interaktion überraschenderweise in stärkerem Ausmaß als es bei der $\Delta 610-700$ -Mutanten der Fall war ($31 \pm 7\%$; $p < 0,01$), was darauf schließen lässt, dass nicht allein das „PY“-Motiv, sondern darüber hinausgehende, strangabwärts gelegene Motive an der Bindung von Nedd4-2 an der HCN1-Untereinheit beteiligt sein müssen. Die Region zwischen den Aminosäuren 701-800 scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Sie enthält Serin-, Prolin- und Threonin-reiche Segmente, die als atypische Nedd4-2-Bindungsmotive dienen könnten (Sudol and Hunter, 2000; Gasser et al., 2010). Die beiden Konstrukte $\Delta 801-910$ und $\Delta 908-910$ führen hingegen zu keiner Reduktion der Interaktion, was die Vermutung bestätigt, dass die Bindung von Nedd4-2 an HCN1 von den Aminosäuren 610-800, die sowohl das „PY“-Motiv als auch weitere, für die Interaktion mit Nedd4-2 günstige Aminosäuren beinhalten, abhängt. Interessanterweise scheint die Deletion der letzten drei Aminosäuren ($\Delta 908-910$) sogar zu einer Zunahme der Menge des interagierenden Nedd4-2 zu führen ($160 \pm 26\%$, $p = 0,10$).

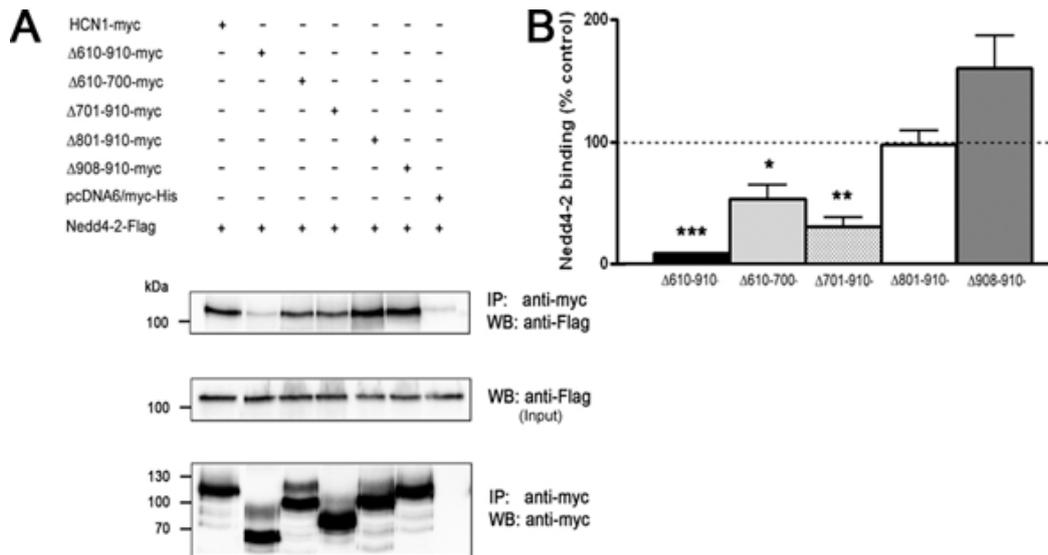


Abbildung 3-10: Nedd4-2 benötigt für die Interaktion mit HCN1 zwei verschiedene Motive

A, Co-Immunpräzipitationen von verschiedenen HCN1-myc-Deletionskonstrukten und Nedd4-2-Flag aus HEK293-Zellen. Die HCN1-Konstrukte wurden mittels c-myc-Agarose immunpräzipitiert. Dargestellt ist das co-immunpräzipitierte Nedd4-2 Protein (oben). Als Ladekontrolle dienten Aliquots der eingesetzten Zellextrakte (Input), die eine gleichmäßige Transfektion von Nedd4-2 zeigen (Mitte). Der untere Blot zeigt die präzipitierten HCN1-Konstrukte. **B**, Quantitative Auswertung der Interaktion von Nedd4-2 mit den verschiedenen HCN1-Deletionskonstrukten. Der Anteil des co-immunpräzipitierten Nedd4-2 wurde auf den „Input“ normiert, um Schwankungen in der Transfektionseffizienz auszugleichen. Als Kontrolle diente die Interaktion von Nedd4-2 mit dem unmodifizierten HCN1 Protein (100%, gestrichelte Linie). Eine Deletion der letzten 300 Aminosäuren des HCN1 Proteins (Δ610-910) führt zu einer fast vollständigen Aufhebung der Nedd4-2-Bindung (8±1% des Kontroll-Niveaus; p<0,001). Die Bindung von Nedd4-2 an HCN1 ist aber nicht allein vom Vorhandensein des „PY“-Motivs abhängig (Δ610-700, 53±12%; p=0,03), sondern wird auch bei einer Deletion der Aminosäuren 701-910 deutlich reduziert (Δ701-910, 31±7%; p<0,01). Die letzten 110 Aminosäuren haben hingegen keinen Einfluss auf die Interaktion beider Proteine (vgl. Δ801-910 und Δ908-910), was die Vermutung nahelegt, dass sich die mit Nedd4-2 interagierende Domäne von HCN1 zwischen den Aminosäuren 610-800 befindet und neben dem „PY“-Motiv noch von einem weiteren Bindungsmotiv abhängig ist. Die Deletion der letzten 3 Aminosäuren wiederum scheint eher zu einer Zunahme der Nedd4-2-Bindung zu führen. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant (Δ908-910, 160±26%; p=0,10). n = 3 unabhängige Experimente; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM).

3.2.3 Nedd4-2 und HCN1 interagieren *in vivo*

Da die Interaktion von Nedd4-2 mit HCN1 *in vitro* belegt werden konnte, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob diese Interaktion auch *in vivo* Bestand hat und ausreichend stabil ist, um durch eine Co-Immunpräzipitation detektiert zu werden. Außerdem sollte die Expression von Nedd4-2 in HCN1-exprimierenden Zellen im Gehirn charakterisiert werden.

3.2.3.1 Identifizierung der Interaktion von Nedd4-2 und HCN1 im Gehirn

Für die Co-Immunpräzipitation aus Gewebe wurden aus dem Gehirn einer adulten Ratte der Hippocampus, der somato-sensorische Cortex und das Cerebellum herauspräpariert und sofort in Lysepuffer homogenisiert. Nedd4-2 wurde, wie in Kap. 2.2.3.5 beschrieben, präzipitiert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit Kaninchen-IgG inkubiert. Präzipitiertes Nedd4-2 wurde im Immunblot durch den gleichen Antikörper, der zuvor in der Immunpräzipitation verwendet wurde, nachgewiesen. HCN1 wurde durch einen polyklonalen anti-HCN1 Antikörper aus Ziege detektiert. Die zugehörigen Immunblots sind in Abbildung 3-11 dargestellt.

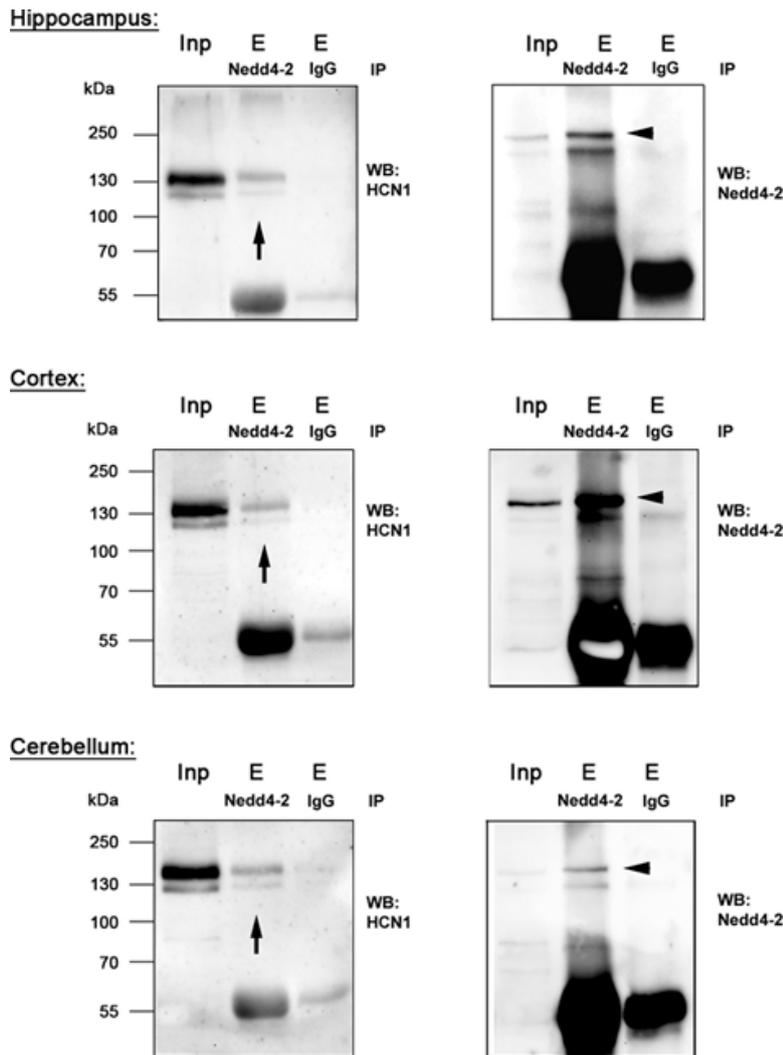


Abbildung 3-11: HCN1 präzipitiert zusammen mit Nedd4-2 *in vivo*

Co-Immunpräzipitation von Nedd4-2 und HCN1 aus hippocampalem Gewebe, somato-sensorischem Cortex und Cerebellum. Nedd4-2 wurde durch einen polyklonalen anti-Nedd4-2 Antikörper präzipitiert, als Negativkontrolle dienten Kaninchen-IgG. Die erfolgreiche Immunpräzipitation von Nedd4-2 wurde mit einem anti-Nedd4-2 Antikörper, die Co-Präzipitation von HCN1 mittels eines anti-HCN1 Antikörpers aus Ziege nachgewiesen. Aufgetragen sind jeweils ein Aliquot des eingesetzten Lysats (Input) sowie die Eluate der Immunpräzipitation (E Nedd, bzw. E IgG). Sowohl im Hippocampus als auch im Cortex und im Cerebellum präzipitiert der Antikörper, nicht jedoch die Kontroll-IgG, Nedd4-2 (ca. 120 kDa; Pfeilköpfe). HCN1 co-präzipitiert spezifisch mit Nedd4-2 (Pfeile), was auf eine Interaktion beider Proteine *in vivo* hinweist. * Schwere Kette des für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers. Bei der unteren sichtbaren Bande im Eluat der Kontroll-IgG (E IgG) handelt es sich um ein Artefakt

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass Nedd4-2 in allen untersuchten Geweben exprimiert wird (Input), wobei die Expression im Cerebellum schwächer als im Hippocampus oder somatosensorischen Cortex ist. Die Immunpräzipitation von Nedd4-2 war in allen Geweben erfolgreich. (E Nedd bei WB: Nedd4-2, Pfeilköpfe), bei den Kontrollen mit Kaninchen-Immunglobulinen waren keine spezifischen Banden zu erkennen (E IgG bei WB: Nedd4-2). HCN1 wird in allen Geweben gleichmäßig exprimiert und präzipitierte zusammen mit Nedd4-

2 (Pfeile), nicht aber mit den Kaninchen-IgG (E Nedd bzw. E IgG bei WB: HCN1). Dieser Befund weist darauf hin, dass HCN1 und Nedd4-2 auch *in vivo* miteinander interagieren.

3.2.3.2 Charakterisierung der Expression von Nedd4-2 im Gehirn

Neben dem Nachweis der Interaktion von Nedd4-2 und HCN1 in verschiedenen Hirnarealen sollte die subzelluläre Lokalisation beider Proteine immunhistochemisch genauer untersucht werden. Hierfür wurden Schnitte eines adulten Rattenhirns angefertigt und die beiden Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen (Kap. 2.2.5.3). Die immunhistochemischen Färbungen sind in Abbildung 3-12 dargestellt. In allen drei untersuchten Arealen wird Nedd4-2 in Neuronen exprimiert, die ebenfalls HCN1 exprimieren. Dies ist der Fall in der CA1-Region des Hippocampus, in Pyramidenzellen in der Schicht V des somato-sensorischen Cortex und in Purkinje-Zellen im Cerebellum. Diese Zelltypen sind in der Abbildung durch Pfeile markiert. Innerhalb der Zellen unterscheiden sich beide Proteine jedoch in ihrem Expressionsmuster. Während HCN1 in der CA1-Region des Hippocampus und der Schicht V des Cortex, wie aus der Literatur bekannt (Lörincz et al., 2002), überwiegend im dendritischen Kompartiment lokalisiert ist (Pfeilköpfe), beschränkt sich die Expression von Nedd4-2 vor allem auf das Soma der Zellen (Pfeile). Auch in den Purkinje-Zellen des Cerebellums ist Nedd4-2 fast ausschließlich im Soma zu detektieren (Pfeile). HCN1 ist hier zwar ebenfalls somatisch lokalisiert, seine Expression reicht jedoch auch in die Dendriten (Pfeilköpfe 1). Hierbei ist zu erwähnen, dass die starke HCN1-Immunreaktivität neben den Purkinje-Zellen (Pfeilköpfe 2) nicht von diesen selbst herrührt, sondern die präsynaptische Expression von HCN1 in den Axonterminalen benachbarter Korbzellen darstellt (Notomi and Shigemoto, 2004; Lujan et al., 2005).

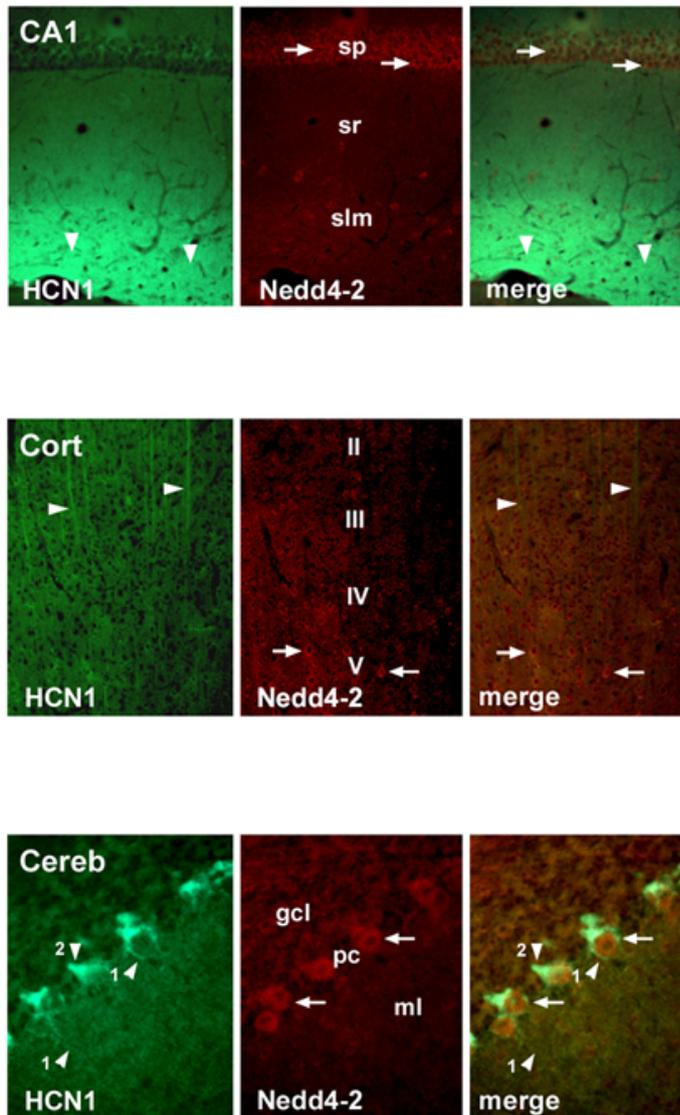


Abbildung 3-12: Nedd4-2 und HCN1 werden in denselben Zellen exprimiert

Immunohistochemische Doppelfärbung von Nedd4-2 (rot) und HCN1 (grün) im Hippocampus (CA1), somato-sensorischen Cortex (Cort) und Cerebellum (Cereb). Nedd4-2 wird in denselben Neuronen exprimiert, die auch HCN1 exprimieren wie die Pyramidenzellen der CA1-Region im Hippocampus (CA1; Pfeile), den Pyramidenzellen in der Schicht V des somato-sensorischen Cortex (Cort; Pfeile) und den Purkinje-Zellen im Cerebellum (Cereb; Pfeile). Die subzelluläre Lokalisation der beiden Proteine überlappt jedoch nicht sehr stark. Im Hippocampus und Cortex ist HCN1 vorwiegend in den Dendriten exprimiert, wie bereits von Lörincz et al. (2002) beschrieben (Pfeilköpfe), wohingegen die Expression von Nedd4-2 überwiegend auf das Soma begrenzt ist (Pfeile). Auch in den Purkinje-Zellen (pc) befindet sich Nedd4-2 hauptsächlich im Soma (Cereb; Pfeile), während die Expression von HCN1 neben der somatischen Oberfläche auch in die Dendriten reicht (Pfeilköpfe 1). Pfeilköpfe 2 deuten auf die Expression von HCN1 in den Axonterminalen der Korbzellen.

3.2.4 HCN1 wird durch Nedd4-2 ubiquitinyliert

Da gezeigt werden konnte, dass Nedd4-2 und HCN1 *in vivo* interagieren, wurde in einem nächsten Schritt die funktionelle Bedeutung der Bindung von Nedd4-2 an die HCN1-

Untereinheit untersucht. Nedd4-2 ist eine Ubiquitin-Ligase. Sie katalysiert den letzten Schritt der Übertragung eines Ubiquitin-Moleküls an Lysin-Reste des Zielproteins (Mono- oder Multiubiquitinylierung) oder an bereits an das Zielprotein gebundene Ubiquitin-Moleküle (Polyubiquitinylierung). Bei Transmembranproteinen wird durch die Ubiquitinylierung in der Regel die Internalisierung eines Transmembranproteins eingeleitet. Dies stellt eine Möglichkeit zur Regulation der Oberflächenexpression spannungsabhängiger Ionenkanäle dar (Bongiorno et al., 2011).

Um zu untersuchen, ob die Nedd4-2-Interaktion zur Ubiquitinylierung von HCN1 führt, wurde HCN1-myc in Anwesenheit von Nedd4-2-Flag in HEK293-Zellen überexprimiert, präzipitiert und auf das Vorhandensein einer Ubiquitinylierung untersucht. Als Kontrolle dienten nur mit HCN1-myc transfizierte Zellen. Die Ubiquitinylierung wurde entweder durch einen Antikörper detektiert, der sowohl Mono- als auch Polyubiquitinylierungen erkennt (anti-P4D1) oder durch einen Antikörper, der nur Polyubiquitinylierungen detektiert (anti-FK1). Das Ergebnis ist Abbildung 3-13 zu entnehmen: Nedd4-2-Flag co-präzipitiert mit HCN1 (Mitte) und führt zu einer Verstärkung der Gesamt-Ubiquitinylierung von HCN1. Die Inkubation des Immunblots mit anti-FK1 zeigt jedoch ein deutlich schwächeres Ubiquitinylierungsmuster des präzipitierten HCN1 und keine Zunahme in Anwesenheit von Nedd4-2. Dies deutet darauf hin, dass HCN1 in Anwesenheit von Nedd4-2 vor allem monoubiquitinyliert wird.

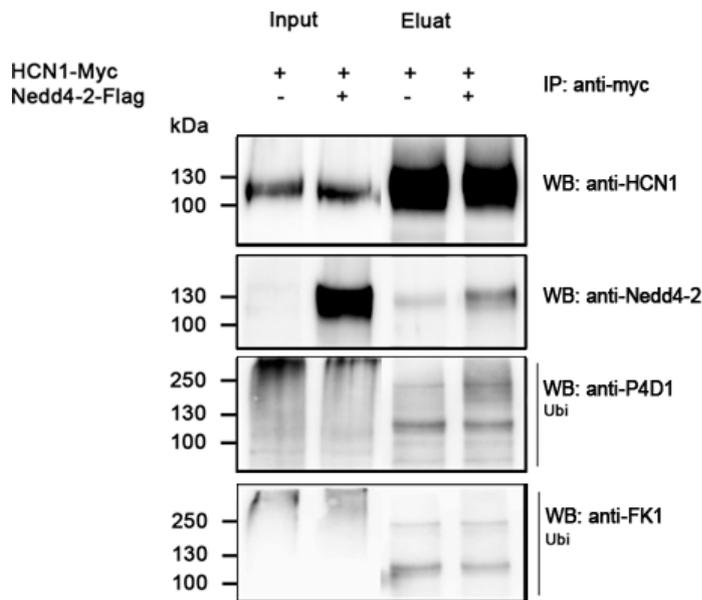


Abbildung 3-13: Nedd4-2 führt zur Ubiquitinylierung von HCN1

HEK293-Zellen wurden transient entweder mit HCN1-myc allein oder mit HCN1-myc und Nedd4-2-Flag transfiziert. Exprimiertes HCN1 wurde mittels eines monoklonalen anti-c-myc Antikörpers immunpräzipitiert (IP) und im Immunblot durch einen polyklonalen anti-HCN1 Antikörper nachgewiesen (Eluat, oben). Nedd4-2-Flag wurde mittels eines monoklonalen anti-Flag Antikörpers nachgewiesen (Mitte), die endogene Ubiquitinylierung wurde durch monoklonale anti-P4D1 (mono- und poly-Ubi) und anti-FK1 (nur poly-Ubi) Antikörper sichtbar gemacht (unten). Nedd4-2 co-präzipitiert mit HCN1 (Mitte). Das schwache Nedd4-2-Signal, das in dem nur mit HCN1 transfizierten Ansatz zu beobachten ist, könnte von endogen exprimiertem co-immunpräzipitierten Nedd4-2 herrühren. Die Co-Expression von Nedd4-2 führt zu einer Verstärkung der Gesamtubiquitinylierung von HCN1, nicht aber der Polyubiquitinylierung (Ubi, unten).

3.2.5 Funktionelle Untersuchung der Interaktion von Nedd4-2 mit HCN1

Als nächstes stellte sich die Frage, welche funktionalen Auswirkungen Nedd4-2 auf die HCN1-Expression hat. Der Fokus wurde dabei auf eine mögliche Beeinflussung des HCN1-Transports durch Nedd4-2 gelegt, da bekannt ist, dass dieses Protein an der Degradation von Ionenkanälen beteiligt ist. Es wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt, um die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion zu untersuchen:

1. Untersuchung des Einflusses von Nedd4-2 auf die Oberflächenexpression und die Glykosylierung von HCN1 in einer biochemischen Analyse.
2. Untersuchung der Bedeutung von Nedd4-2 an der Degradation von HCN1 durch Inhibition verschiedener für den Abbau verantwortlicher Kompartimente.

Für die Untersuchung des Einflusses von Nedd4-2 auf die Oberflächenexpression wurde der Anteil von oberflächlich exprimiertem HCN1 nach Co-Expression von Nedd4-2 im Vergleich zu GFP und TRIP8b(1a-4) bestimmt. Die Transfektion von GFP diente hierbei als Kontrolle, TRIP8b(1a-4) wurde als interne Positivkontrolle verwendet, da für diese Isoform des Proteins TRIP8b eine deutliche Steigerung der HCN1-Oberflächenexpression beschrieben wurde (Lewis et al., 2009).

Für diese Experimente wurde ein HCN1-Konstrukt, das über eine integrierte Hämagglutinin (HA)-Domäne in der zweiten extrazellulären Schleife verfügt (pGW1-HCN1(HA-Ex2)), verwendet (Lewis et al., 2009). Diese wurde durch Inkubation der intakten Zellen mit einem gegen die HA-Domäne gerichteten Antikörper erkannt und der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex nach dem Lysieren der Zellen präzipitiert. HCN1-HA wurde entweder mit GFP, Nedd4-2 oder TRIP8b(1a-4) co-exprimiert (Abbildung 3-14 A). Überraschenderweise führte sowohl die Co-Expression von Nedd4-2 als auch von TRIP8b(1a-4) in diesen Experimenten zu einer Steigerung der HCN1-Expression (Abbildung 3-14 B). Für TRIP8b(1a-4) war dieser Effekt bereits bekannt (Lewis et al., 2009), nicht jedoch für Nedd4-2, dem bisher nur eine Beteiligung am Abbau zugesprochen wurde. Beide interagierende Proteine scheinen somit einen stabilisierenden Einfluss auf die HCN1-Untereinheit zu haben. Der relative Anteil des an der Zelloberfläche exprimierten HCN1 (bezogen auf das gesamt exprimierte HCN1) war jedoch in Anwesenheit von Nedd4-2 im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (GFP: $100 \pm 20\%$ vs. Nedd4-2: $51 \pm 8\%$, $p = 0,046$; Abbildung 3-14 C), wohingegen die Anwesenheit von TRIP8b(1a-4) zu einer Erhöhung des HCN1-Anteils an der Zelloberfläche führte (TRIP8b: $151 \pm 35\%$, $p = 0,2$ verglichen mit GFP, aber $p = 0,02$ verglichen mit Nedd4-2, Abbildung 3-14 C). Nedd4-2 und TRIP8b scheinen also einen unterschiedlichen Einfluss auf die Oberflächenexpression von HCN1 zu haben.

Nedd4-2 beeinflusste neben der Proteinstabilität und der relativen Oberflächenexpression auch den Glykosylierungsstatus der HCN1-Untereinheit (Abbildung 3-14 D und E). Normalerweise erkennt der Antikörper im Immunblot zwei HCN1-Banden (vgl. Abbildung 3-14 A), die unglykosylierte Form (ca. 105 kDa) und eine höhermolekulare glykosylierte Form (ca. 125 kDa) (Zha et al., 2008; Lewis et al., 2009). Die Anwesenheit von Nedd4-2 führte zu einer deutlichen Erniedrigung der Glykosylierung von HCN1, sowohl vom Gesamtprotein (Nedd4-2: $9 \pm 1\%$ vs. GFP: $23,0 \pm 1\%$, $p < 0,0001$; Abbildung 3-14 D), als

auch von dem an der Zelloberfläche befindlichen Anteil (Nedd4-2: $24 \pm 2\%$ vs. GFP: 44.0 ± 5 , $p = 0,002$; Abbildung 3-14 E). Die Co-Expression von TRIP8b(1a-4) zeigte auch hier gegenläufige Effekte, mit einer Zunahme der Glykosylierung beim Gesamt-HCN1 (TRIP8b: $39 \pm 2\%$, $p < 0,0001$, verglichen mit GFP; Abbildung 3-14 D). Interessantweise veränderte TRIP8b(1a-4) aber nicht den Glykosylierungsstatus am Anteil des oberflächlichen HCN1 ($38 \pm 1\%$, $p > 0,05$ verglichen mit GFP; Abbildung 3-14E).

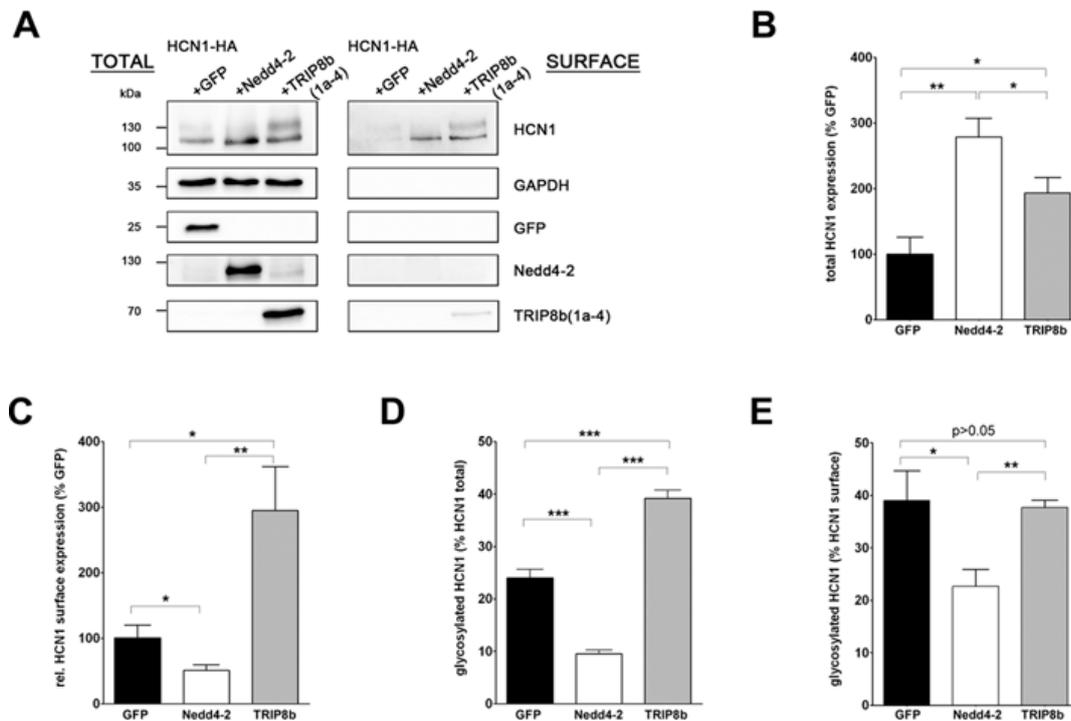


Abbildung 3-14: Nedd4-2 beeinflusst die Oberflächenexpression und den Glykosylierungsstatus von HCN1

A, Repräsentativer Immunblot zeigt die Ergebnisse der HA-Immünpräzipitation von HCN1. HEK293 Zellen wurden mit einem Hämagglutinin (HA)-gekoppelten HCN1-Konstrukt (HCN1-HA) und GFP, Nedd4-2 oder TRIP8b(1a-4) co-transfiziert. Rechte Spalte (Surface): Immunpräzipitat von nicht-permeabilisierten Zellen repräsentiert die an der Zelloberfläche befindlichen Proteine. Linke Spalte (Total): Gesamtprotein nach der Zellyse (HCN1, Nedd4-2, TRIP8b oder GFP). GAPDH wurde als interne Referenz für die Quantifizierung und als Kontrolle für die Qualität der Oberflächen-Immünpräzipitation verwendet. HCN1 zeigt zwei charakteristische Banden, die für glykosyliertes (~125 kDa) und unglykosyliertes HCN1 (~105 kDa) stehen. Dieses Muster unterscheidet sich jedoch zwischen den einzelnen Ansätzen, was auf eine Änderung des Glykosylierungsstatus deutet (vgl. D und E). **B**, Quantifizierung der HCN1-HA-Gesamtexpression nach Co-Transfektion mit Nedd4-2 oder TRIP8b(1a-4) relativ zur HCN1-HA-Expression mit GFP (als 100% gesetzt). Die Expression von HCN1-HA war sowohl nach Co-Transfektion von Nedd4-2 als auch TRIP8b(1a-4) im Vergleich zu GFP signifikant erhöht, wobei Nedd4-2 noch stärkere Effekte zeigte. **C**, Quantifizierung der relativen HCN1-HA-Oberflächenexpression (im Verhältnis zur Gesamtexpression) nach Co-Transfektion von GFP, Nedd4-2 oder TRIP8b(1a-4), wobei die HCN1-HA-Expression mit GFP auf 100% gesetzt wurde. In dieser Analyse haben Nedd4-2 und TRIP8b(1a-4) unterschiedliche Effekte auf die HCN1-HA-Oberflächenexpression. TRIP8b führt zu einem signifikanten Anstieg, Nedd4-2 hingegen zu einer signifikanten Herunterregulation der relativen HCN1-HA-Oberflächenexpression. **D**, Quantifizierung des Glykosylierungsstatus des Gesamt-HCN1. Co-Expression von Nedd4-2 führt zu einer signifikanten Reduktion des glykosylierten Anteils, während TRIP8b(1a-4) zu einer vermehrten Glykosylierung relativ zu GFP führt (aufgetragen ist der prozentuale Anteil der glykosylierten Form am Gesamt-HCN1). **E**, Quantifizierung des Glykosylierungsstatus des oberflächlichen HCN1. Die Co-Expression von Nedd4-2 führt erneut zu einer signifikanten Reduktion des glykosylierten Anteils, während nach Co-Expression von TRIP8b(1a-4) keine Veränderung der Glykosylierung von oberflächlichem HCN1 zu beobachten ist. n = 6 unabhängige Experimente; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untersuchungen im Rahmen dieses Teilprojekts mehrere neue Befunde hervorgebracht haben:

1. Es konnte gezeigt werden, dass HCN1 und Nedd4-2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* miteinander interagieren. Im Gehirn konnte die Expression von Nedd4-2 in Gebieten charakterisiert werden, die eine starke HCN1-Expression aufweisen, wie im Hippocampus, im somato-sensorischen Cortex und im Cerebellum. Die Untersuchung der Nedd4-2-Expression ergab, dass beide Proteine zwar in denselben Zellen exprimiert werden, sich in ihrer hauptsächlichen subzellulären Lokalisation aber unterscheiden.
2. Die Klonierung verschiedener C-terminaler HCN1-Deletionskonstrukte ermöglichte eine Eingrenzung der interagierenden Domäne auf eine Länge von 200 Aminosäuren. In dieser Domäne befinden sich zwei Motive, die beide für die Interaktion bedeutsam sind, zum einen das klassische „PY“-Motiv und zum anderen eine strangabwärts gelegene Region, die reich an den Aminosäuren Serin, Prolin und Threonin ist.
3. Funktionelle Untersuchungen ergaben, dass die Anwesenheit von Nedd4-2 zu einer verstärkten (Mono-)Ubiquitylierung der HCN1-Untereinheit führte. Außerdem reduzierte sich der relative Anteil von an der Zelloberfläche exprimiertem HCN1 bei gleichzeitiger Stabilisierung des internen HCN1 und Reduktion der Glykosylierung sowohl von oberflächlichem als auch von intrazellulärem Protein.

3.3 Suche nach Interaktionspartnern für den N-Terminus von HCN1

Ein weiteres Projekt, das im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet wurde, war die Suche nach neuen Interaktionspartnern für den cytoplasmatischen N-Terminus von HCN1. Diese Region vermittelt bei den, mit den HCN-Kanälen eng verwandten, spannungsabhängigen Kalium-(K_v)-Kanälen die Assoziation regulierender β -Untereinheiten. Zur Identifizierung potentiell interagierender Proteine wurde ein Screening-Verfahren in Hefezellen angewendet, das sog. „Yeast Two-Hybrid“-Verfahren. Mittels dieser Methode identifizierte Interaktionspartner sollten weiterhin hinsichtlich ihrer Bedeutung für die HCN1-Kanaluntereinheit charakterisiert werden.

3.3.1 Suche nach Bindungspartnern für den N-Terminus von HCN1 mittels eines Yeast Two-Hybrid Screens

Zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern des cytoplasmatischen N-Terminus von HCN1 wurde das konventionelle „Yeast Two-Hybrid“-System der Firma Clontech mit leichten Modifikationen eingesetzt. Hierzu musste das Köderkonstrukt kloniert und auf seine Einsetzbarkeit im System überprüft werden.

3.3.1.1 Klonierung des Köderkonstrukts und Test auf Autoaktivierung und Toxizität

Das Köderkonstrukt enthielt den durchlaufenden Leserahmen zur Expression eines Fusionsproteins, welches aus der Bindungsdomäne des Gal4-Proteins (AS 1-147) und dem intrazellulären N-Terminus von murinem HCN1 (AA 1-131) bestand. Bei dem verwendeten Vektor handelte es sich um pGBKT7 der Firma Clontech. Die entsprechende Plasmidkarte ist im Anhang dargestellt. Als Template für die Amplifikation des HCN1-Fragments diente das Konstrukt pGW1-mHCN1. Bevor das Konstrukt zur Durchmusterung einer cDNA-Bank eingesetzt werden konnte, musste das Fusionsprotein auf Autoaktivierung von Reportergenen und Toxizität geprüft werden. Dazu wurde das Köderkonstrukt in den Hefestamm AH109 transformiert und die Zellen auf Histidin-Mangelmedium ausgestrichen. Die transformierten Zellen zeigten kein Wachstum auf dem Mangelmedium, was darauf schließen ließ, dass das HCN1(1-131)-Fragment zu keiner transkriptionellen Aktivierung des Histidin-Gens führte. Auch der Test auf Toxizität, in dem der Hefestamm AH109 mit dem Köderkonstrukt oder

dem Leervektor pGBKT7 als Kontrolle transformiert und die Wachstumskurven mittels Messung der OD₆₀₀ über 3 h miteinander verglichen wurden, verlief negativ.

3.3.1.2 Screening einer humanen Hirn cDNA-Bank

Das „Library Mating“, also die gemeinsame Inkubation der Hefestämme AH109[pGBKT7-mHCN1(1-131)] als Köder und Y187[pGADT7(hBrain)] erfolgte nach dem unter Kap. 2.2.2.2 beschriebenen Protokoll. Die humane cDNA-Bank wurde verwendet, da sie über eine bessere Qualität verfügt als eine murine. Der „Mating“-Ansatz wurde auf 50 QDO/X-Platten ausgestrichen und für 14 Tage bei 30 °C inkubiert. Der für die cDNA-Bank bestimmte „Library“-Titer lag bei $6,6 \times 10^7$ KBE/ml, insgesamt wurden $2,2 \times 10^7$ KBE der cDNA-Bank durchmustert. Die für das „Library Mating“ errechnete Effizienz betrug 14,62% und lag damit deutlich über den minimal geforderten 2%.

Die auf den QDO/X-Platten gewachsenen blauen Kolonien wurden zwei weitere Male ausgestrichen, um die Anzahl der Kolonien, die mehrere cDNA-Bank-Plasmide aufgenommen haben, zu minimieren. Es wurden über 300 positive Klone identifiziert, von denen rund 100 weiter untersucht wurden. Die Plasmide wurden aus den Hefezellen isoliert und in kompetente *E. coli*-Bakterien (One Shot TOP10) transformiert. Die sich anschließenden DNA-Minipräparationen wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI verdaut. Diese Enzyme schneiden die „multiple cloning site“ des Vektors pGADT7 aus, linearisieren aber nur das ebenfalls enthaltene Plasmid pGBKT7-mHCN1(1-131), sodass das erhaltene DNA-Bandenmuster den cDNA-Bank-Plasmiden zugeordnet werden konnte. Die Plasmide wurden sequenziert, die Ergebnisse des Screenings sind Tabelle 7 zu entnehmen. Dabei sind nur die Interaktionspartner aufgeführt, deren Sequenz durch Datenbankabgleiche eindeutig zuzuordnen war. Diese Plasmide wurden zur Überprüfung der Interaktion einer erneuten Transformation in Hefezellen des Stammes AH109 unterworfen. Die Ergebnisse der Co-Transformation sind ebenfalls Tabelle 7 zu entnehmen. Einige der gefundenen Interaktionen ließen sich durch die Co-Transformation nicht bestätigen. Unter den Interaktionspartnern befanden sich mehrere Proteine des Cytoskeletts, wie das bereits als Interaktionspartner für HCN1 beschriebene Filamin A, aber auch einige Proteine, die laut Literatur regulierend auf den Transport von Ionenkanälen und Transmembranproteinen wirken können. Besonders SNX3, ein Mitglied der Sorting Nexin-Familie, erfüllte diese Bedingungen und wurde weiter untersucht.

SNX3 ist ein Mitglied der Sorting Nexin-Familie, die am retrograden Transport von Transmembranproteinen vom endosomalen Kompartiment zurück an die Plasmamembran beteiligt sind (Spang, 2011). Sorting Nexine sind ein Bestandteil des Retromerkomplexes, eines mit dem Endosom assoziierten Multiproteinkomplexes, und tragen zur Spezifität der Cargo-Erkennung des Retromers bei. Aktuelle Arbeiten zeigen, dass SNX3 eine Bedeutung an der Regulation bestimmter transmembranärer Rezeptorproteine hat (Harterink et al., 2011; Zhang et al., 2011). Die Interaktion mit solch einem intrazellulären Transportprotein ist auch für HCN1-Kanäle ein interessanter Regulationsmechanismus.

Tabelle 7: Ergebnisse des Yeast Two-Hybrid Screens

Nr.	Detektierter Interaktionspartner	Abkürzung	Wachstum auf QDO/X
1	Prosaposin Isoform a-c, Preproprotein	SAP	+
2	Calcium binding protein 39, Transkriptvariante 1	CAB39	--
3	Filamin A, Isoform a	FLNA	+
4	Elastin microfibril interfacier 2	EMILIN-2	+
5	Tight junction protein 1, Isoform a und b	TJP1	+
6	Ornithin decarboxylase antizym inhibitor	OAZ	+
7	ELL associated factor 2	EAF2	+
8	Microtubule-associated protein 1A	MAP1A	--
9	Phosphoinositide-3-kinase, beta polypeptide	PI3K	+
10	Na/K-ATPase beta 1 subunit, Isoform A und B	ATP1B1	+
11	Truncated type 1 keratin KA21	KRT222P	++
12	Galectin-1	LGALs1	+
13	Seizure related 6 homologue (mouse)-like 2, Isoform 1-4	SEZ6L2	++
14	Carboxypeptidase E, Preproprotein	CPE	--
15	Ubiquitin-conjugating enzyme	UBE2E3	--
16	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	GART	+
17	High density lipoprotein binding protein (Vigilin)	VGL	++
18	Gamma filamin, Isoform a und b	FLNC	++
19	DEAH box polypeptide 8	DHX8	++
20	kin of IRRE like 3, Isoform 1	KIRREL3	+
21	Centrobin, centrosomal BRCA2 interacting protein, Isoform beta	CNTROB	++
22	Chromosom 11 ORF 17 = Prolin-rich protein	BCA3	+
23	Sorting nexin 3, Isoform a und b	SNX3	++
24	Protocadherin beta 14 precursor	PCDHB14	++
25	Hypothetical protein LOC84299	-	++
26	Neuro-oncological ventral antigen 1, Isoform a und b	NOVA1	++
27	HNT1 hnRNP methyltransferase-like 1, definition: protein arginin methyltransferase	PRMT2	++
28	Protocadherin beta 10 precursor	PCDHB10	++
29	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X-)type motif 22, Isoform a	NUDT22	+
30	Neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor, Transkriptvariante 1	NSMAF	++
31	X-prolyl aminopeptidase (Aminopeptidase P) 1, soluble	XPNPEP1	+
+=	Wachstum blauer Kolonien auf QDO/X		
++ =	starkes Wachstum blauer Kolonien auf QDO/X		
-- =	kein Wachstum auf QDO/X		
n. d. =	nicht untersucht		

3.3.1.3 Bestätigung der gefundenen Interaktion mittels Co-Immunpräzipitation

Um die in Hefe gefundene Interaktion zwischen HCN1 und SNX3 in einer humanen heterologen Zelllinie bestätigen zu können, wurden Co-Immunpräzipitationen aus HEK293-Zellen durchgeführt. Da es sich bei dem im „Yeast Two-Hybrid“-System identifizierten potentiellen Interaktionspartner SNX3 um die humane Variante handelte, das eingesetzte HCN1-Köderkonstrukt aber für die murine Variante codierte, wurde murine hippocampale cDNA verwendet, um den durchlaufenden Leserahmen von mSNX3 zu klonieren. Diese wurde per PCR amplifiziert und in den Vektor p3xFlag-CMV-7.1™ kloniert. Neben dem Konstrukt mHCN1(1-133) wurde als Negativkontrolle das Konstrukt mHCN1(778-910) verwendet. Beide Konstrukte lagen in einen pEGFP-Vektor kloniert vor. mSNX3-Flag wurde durch Zugabe von monoklonaler anti-Flag-Agarose präzipitiert, im gegenläufigen Ansatz wurde mHCN1(1-131)-GFP, bzw. mHCN1(778-910)-GFP mittels des GFP-Traps präzipitiert. Im Immunblot erfolgte der Nachweis des präzipitierten SNX3 mit einem polyklonalen anti-SNX3 Antikörper. Die HCN1-Konstrukte wurden mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper detektiert. Die Ergebnisse des Experiments sind Abbildung 3-15 zu entnehmen. Beide experimentelle Ansätze zeigen, dass mSNX3-Flag mit dem mHCN1(1-131)-GFP, nicht aber mit mHCN1(778-910)-GFP oder GFP alleine co-präzipitiert.

Dieses Experiment bestätigt die Interaktion von SNX3 mit HCN1 in einem zweiten, unabhängigen Expressionssystem. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die Interaktion auf den cytoplasmatischen N-Terminus von HCN1 beschränkt.

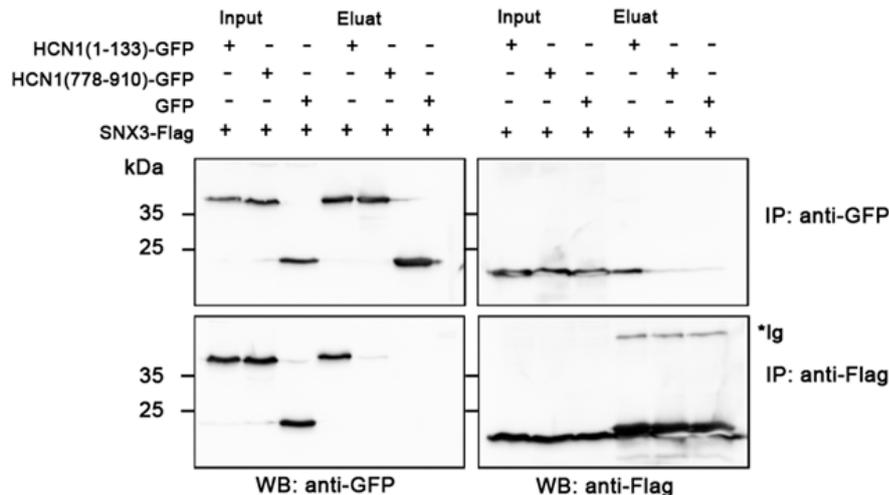


Abbildung 3-15: SNX3 bindet an HCN1(1-131) in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden transient mit Flag-markiertem mSNX3 zusammen mit mHCN1(1-131)-GFP oder mHCN1(778-910)-GFP co-transfiziert. Als Negativkontrolle diente die Transfektion von SNX3 mit GFP. In parallelen Ansätzen wurde exprimiertes SNX3 mittels Flag-Agarose und exprimiertes HCN1 mittels des GFP-Traps immunpräzipitiert. (IP: anti-Flag, bzw. IP: anti-GFP). Präzipitierte und co-immunpräzipitierte Proteine wurden dann im Immunblot durch einen monoklonalen anti-Flag und einen polyklonalen anti-GFP Antikörper nachgewiesen. Als Expressionskontrolle wurde ein Aliquot der Lysate (Input) verwendet. Nur mSNX3 und mHCN1(1-131) co-präzipitieren, nicht aber mSNX3 und mHCN1(778-910); * Ig, Schwere Kette des für die Immunpräzipitation eingesetzten Antikörpers.

3.3.2 Biochemische Charakterisierung der Interaktion von SNX3 mit HCN1

Um die Bindungsdomäne von SNX3 am N-Terminus von HCN1 genauer eingrenzen zu können, wurden Deletionskonstrukte des HCN1-Kanals hergestellt und diese im heterologen HEK293-Zellmodell mittels Co-Immunpräzipitationen genauer untersucht. Die HCN1-Konstrukte wurden unter Verwendung des „Phusion Site Directed-Mutagenesis Kit“ (Thermo) und des Plasmids pcDNA6/myc-His-mHCN1 generiert. Sie sind schematisch in Abbildung 3-16 A dargestellt. Nach Tran et al. unterteilt sich der cytoplasmatische N-Terminus von HCN1 in eine konservierte (AA 1-77) und eine unkonservierte (AA78-130) Domäne (Tran et al., 2002). Es wurde ein Konstrukt generiert, in dem nur die unkonservierte Domäne deletiert wurde (HCN1 Δ 2-77) und zwei weitere, bei denen zusätzlich Anteile der konservierten Domäne fehlten (HCN1 Δ 2-90 und HCN1 Δ 2-110). Ein Deletionskonstrukt, in dem der gesamte cytoplasmatische N-Terminus fehlte, wurde in den HEK293-Zellen nur sehr schwach exprimiert, deswegen wurde auf eine Variante ausgewichen, in der N-Terminus und zusätzlich die Transmembrandomäne fehlten (HCN1 Δ 2-385). Außerdem wurde ein Konstrukt kloniert, in welchem der Übergang von unkonservierter zu konservierter Domäne deletiert wurde (HCN1 Δ 67-87). Für die Co-Immunpräzipitationen wurden die HCN1-Konstrukte

zusammen mit SNX3-Flag in HEK293-Zellen überexprimiert. Aus den Zellextrakten wurde HCN1 über den myc-„tag“ präzipitiert und co-präzipitiertes SNX3 im Immunblot nachgewiesen. Die Immunblots sind in Abbildung 3-16 B dargestellt. Der Abbildung lässt sich entnehmen, dass SNX3 auch mit der kompletten HCN1-Untereinheit interagierte, aber keine der erzeugten Deletionen in der HCN1-Untereinheit zu einer vollständigen Aufhebung der Interaktion mit SNX3 führte. Im Vergleich mit der intakten HCN1-Untereinheit kam es zwar zu einer Abschwächung der Interaktion, SNX3 co-präzipitierte aber mit allen eingesetzten HCN1-Konstrukten.

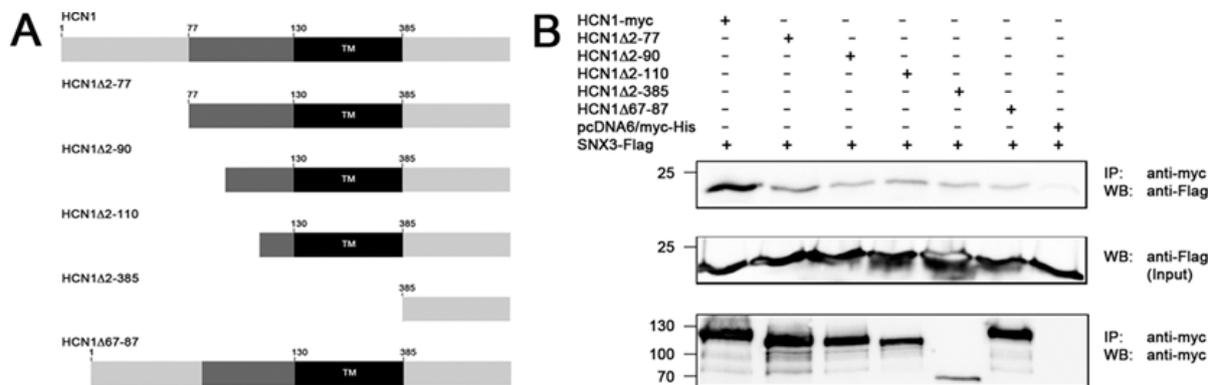


Abbildung 3-16: Keine klare Abgrenzung des Bindungsmotivs für SNX3 im N-Terminus von HCN1

A, Schematische Darstellung der klonierten N-terminalen Deletionskonstrukte von HCN1. Der N-Terminus gliedert sich in eine unkonservierte (AA1-77) und eine konservierte Region (AA78-130) (Tran et al., 2002). Die Transmembrandomäne (TM) und der C-Terminus sind vereinfacht dargestellt. **B**, Immunblot der Co-Immunpräzipitation der generierten HCN1-Konstrukte mit SNX3. HCN1 wurde mittels des myc-„tag“ präzipitiert (unten) und SNX3 mittels des Flag-„tags“ im Immunblot nachgewiesen (oben). Als Negativkontrolle wurden SNX3-Flag zusammen mit dem pcDNA6/myc-His-Leervektor überexprimiert. Aliquots des eingesetzten Zellextrakts wurden aufgetragen, um die gleichmäßige Expression von SNX3 nachzuweisen (Mitte). Zum Nachweis der erfolgreichen Immunpräzipitation wurden die HCN1-Deletionskonstrukte mittels eines anti-myc Antikörpers visualisiert (unten). Eine Deletion im N-Terminus von HCN1 führte zwar zu einer schwächeren Bindung von SNX3, die Interaktion wurde aber bei keinem Konstrukt vollständig aufgehoben.

In einem nächsten Schritt wurde das Experiment analog mit C-terminalen Deletionskonstrukten durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich die Bindungsdomäne für SNX3 nicht doch im C-Terminus befindet, da die unter Kapitel 3.3.1.3 beschriebene Co-Immunpräzipitation von SNX3 und dem C-Terminus von HCN1 nur mit den letzten 130 Aminosäuren (HCN1(778-910)) durchgeführt wurde. Zusätzlich zu dem bereits im Kapitel 3.2.2.2 beschriebenem Konstrukt HCN1Δ610-700 wurde noch ein weiteres generiert, welches unmittelbar nach der cAMP-Bindungsdomäne (CNBD) endet (HCN1Δ473-910). In beiden verwendeten Konstrukten war der N-Terminus unverändert vorhanden. Das Ergebnis der Co-

Immunpräzipitation ist Abbildung 3-17 zu entnehmen. Die C-terminalen Deletionen in der HCN1-Sequenz führten ebenfalls zu einer Abnahme der Menge des gebundenen SNX3, aber zu einer weitaus geringeren als bei der Co-Immunpräzipitation mit den N-terminalen Deletionskonstrukten. Während bei den N-terminalen Deletionskonstrukten eine relativ starke Abnahme der SNX3-Bindung unabhängig von der Größe der deletierten Regionen zu beobachten war, wurde die SNX3-Bindung bei den C-terminalen Deletionskonstrukten proportional zur Größe der Deletionskonstrukte geringer. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der N-Terminus von HCN1 der entscheidende Anteil für die Interaktion mit SNX3 sein muss. Eine leichte Beteiligung des C-Terminus kann aber nicht komplett ausgeschlossen werden.

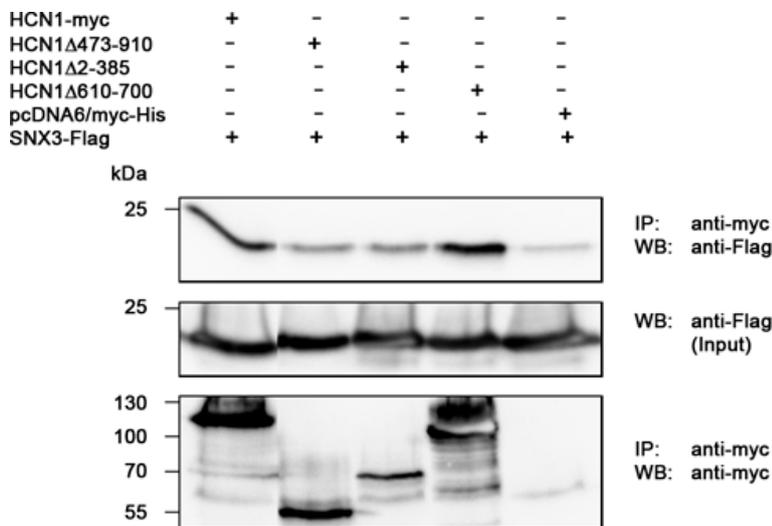


Abbildung 3-17: SNX3 interagiert nicht mit dem C-Terminus von HCN1

Immunblot der Co-Immunpräzipitation von HCN1-Deletionskonstrukten mit SNX3. Es sollte untersucht werden, ob SNX3 mit dem C-Terminus von HCN1 interagiert. HCN1 wurde dazu analog zu Abbildung 3-16 mittels des myc-„tag“ präzipitiert (unten) und SNX3 mittels des Flag-„tags“ im Immunblot nachgewiesen (oben). Deletionen im C-Terminus führten proportional zur Größe der Deletion zu einer Abschwächung der Interaktion, die Menge des gebundenen SNX3 sank jedoch nicht unter das Niveau der Interaktion mit der N-terminalen Deletionsmutante HCN1 Δ 2-385. Bei der Einschätzung der Signalstärke ist zu beachten, dass die Negativkontrolle in diesem Experiment ebenfalls eine schwache Co-Immunpräzipitation von SNX3 aufweist.

3.3.3 Charakterisierung der Expression von SNX3 im Gehirn

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SNX3 *in vitro* ein potentieller Interaktionspartner der HCN1-Untereinheit ist, wurde zur Überprüfung der Funktionalität und Plausibilität dieser Interaktion die Expression von SNX3 im Gehirn untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Regionen gelegt, in denen HCN1 verstärkt exprimiert wird. Dazu zählen

insbesondere die hippocampale Formation und der entorhinale Cortex. Dazu wurden folgende Ansätze verfolgt:

1. Untersuchung der Expression von SNX3 auf Proteinebene in verschiedenen Hirnregionen mittels Immunblot
2. Untersuchung der Lokalisation der mRNA von SNX3 mittels *in situ* Hybridisierung
3. Untersuchung der Lokalisation der SNX3-Expression mittels Immunhistochemie

Eine Untersuchung der Expression auf Proteinebene erfolgte zunächst in verschiedenen Hirnarealen mittels Immunblot. Dazu wurden aus einem adulten Mäusehirn entorhinaler Cortex, Hippocampus, Cortex, Cerebellum und Thalamus herauspräpariert und die Gewebe auf die Expression von SNX3 untersucht. Der Nachweis des SNX3-Proteins erfolgte mit einem spezifischen polyklonalen anti-SNX3 Antikörper. Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Abbildung 3-18 ist zu entnehmen, dass SNX3 in allen untersuchten Hirnarealen gleichmäßig exprimiert wird, wobei der Antikörper zwei Banden bei 17 kDa und bei 19 kDa erkannte. Hierbei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um zwei verschiedene Isoformen von SNX3, die durch alternatives „Splicing“ generiert werden (vgl. Eintrag bei Uniprot; www.uniprot.org). In einem nächsten Schritt wurde die Expression von SNX3 auf mRNA-Ebene mittels *in situ*-Hybridisierungen untersucht, um genauere Aussagen über die zelluläre Lokalisation von SNX3 im Hippocampus und entorhinalen Cortex treffen zu können.

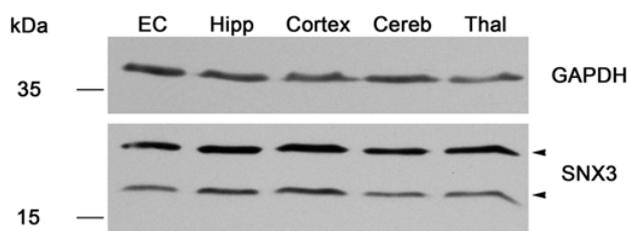


Abbildung 3-18: SNX3 wird in verschiedenen Hirnregionen exprimiert

Lysiertes Hirngewebe einer adulten Maus aus verschiedenen Regionen wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. SNX3 und GAPDH als Ladekontrolle wurden im Immunblot mit polyklonalen anti-SNX3 und monoklonalen anti-GAPDH Antikörpern nachgewiesen. Der SNX3 Antikörper erkannte zwei Isoformen bei ca. 17 und 19 kDa, die durch alternatives „Splicing“ entstehen. SNX3 wird im entorhinalen Cortex (EC), Hippocampus (Hipp), Cortex, Cerebellum (Cereb) und Thalamus (Thal) gleichmäßig exprimiert.

Die *in situ* Hybridisierung wurde wie unter Kap. 2.2.5.5 beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Sonden wurden aus muriner cDNA hergestellt. Da die Sequenzhomologie von SNX3 zwischen Maus und Ratte aber über 99% beträgt, konnten die Sonden auch zur Detektion von SNX3 mRNA auf Schnitten von Rattenhirn verwendet werden. Die Färbung zeigte eine spezifische Bindung der „anti-sense“-Sonde an die SNX3 mRNA (Abbildung 3-19 A), verglichen mit den „sense“-Sonde, die als Negativkontrolle diente (Abbildung 3-19 B). Es ist eine deutliche Expression von SNX3 mRNA in den Pyramidenzellen der CA1-Region, im Gyrus dentatus und in den Sternzellen des entorhinalen Cortex erkennbar. Diese Regionen exprimieren ebenfalls HCN1, wie auch in Abbildung 3-19 F-H dargestellt.

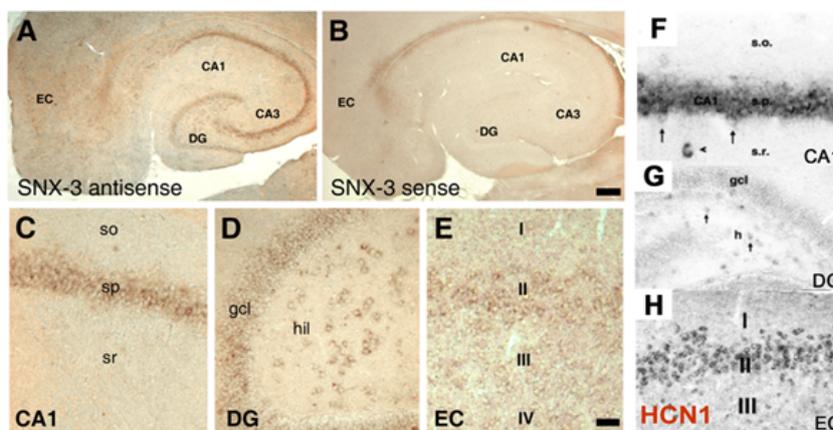


Abbildung 3-19: mRNA von SNX3 und HCN1 wird im Hippocampus und entorhinalen Cortex in denselben Zellen detektiert

Lichtmikroskopische Aufnahmen der *in situ* Hybridisierung. **A**, Digoxigenin-markierte „anti-sense“-Sonden zeigen die Expression von SNX3 mRNA im Hippocampus (CA1, CA3, DG) und im entorhinalen Cortex (EC) einer adulten Ratte. **B**, Die unspezifische „sense“-Sonde zeigt keine zelluläre Färbung und belegt damit die Spezifität der Färbung. **C-E**, Vergrößerungen zeigen distinkte Färbungen in den Pyramidenzellen (sp) der CA1-Region (**C**), in der Körnerzellschicht (gcl) und im Hilus (hil) des Gyrus dentatus (DG) (**D**), sowie den Sternzellen des entorhinalen Cortex (EC) (**E**). **F-G**, *In situ* Hybridisierung von HCN1 mRNA zur Darstellung der überlappenden Expression in allen untersuchten Zelltypen (entnommen aus (Bender, 2001; Bender et al., 2007)). Balken: A-B 200 µm, C-E 50 µm.

Die immunhistochemische Untersuchung wurde ebenfalls an einem adulten Rattenhirn durchgeführt. Es sollte hierbei untersucht werden, ob die auf mRNA-Ebene gefundene Überlappung der Expression von SNX3 und HCN1 auch auf Proteinebene Bestand hat. Abbildung 3-20 zeigt die Expressionsmuster von HCN1 und SNX3 im entorhinalen Cortex und im Hippocampus. Es ist eine deutliche Überlappung der Expression beider Proteine sowohl im entorhinalen Cortex als auch in der CA1-Region des Hippocampus zu erkennen.

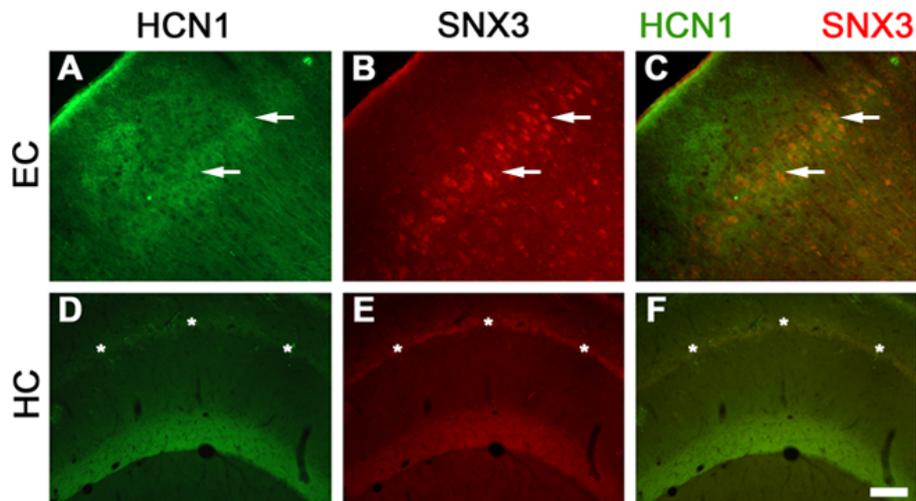


Abbildung 3-20: Überlappende Expression von HCN1 und SNX3 im Hippocampus (HC) und entorhinalen Cortex (EC)

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Hirnschnitte einer adulten Ratte wurden mit monoklonalen anti-HCN1 (A, D) und polyklonalen anti-SNX3 Primärantikörpern (B, E), sowie Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt. Beide Proteine zeigen überlappende Expressionen in der Schicht II des entorhinalen Cortex (A-C; Pfeile) und der CA1-Region des Hippocampus (D-F). Hier ist eine Co-Lokalisation beider Proteine vor allem im Stratum pyramidale (Sternchen) sowie im Stratum lacunosum moleculare zu erkennen. Balken: 50 μ m.

Zusätzlich zu den durchgeführten Experimenten, die zeigen, dass SNX3 und HCN1 *in vitro* interagieren und *in vivo* überlappende Expressionsmuster aufweisen, wurden Co-Immunpräzipitationen aus verschiedenen Hirnregionen durchgeführt, in denen im Rahmen dieser Arbeit eine gemeinsame Expression von HCN1 und SNX3 gezeigt werden konnte. Der Nachweis der Interaktion *in vivo* verlief jedoch bei allen durchgeführten Versuchsansätzen negativ. Dies deutet entweder auf eine sehr transiente Interaktion hin oder darauf, dass für die Interaktion noch weitere Faktoren erforderlich sind, die im Rahmen einer Co-Immunpräzipitation nicht erfasst werden können.

3.3.3.1 SNX3 interagiert mit HCN1 in entorhinalen Neuronen *in situ*

Da eine direkte Co-Immunpräzipitation von SNX3 und HCN1 aus Hirngewebe *in vivo* nicht erfolgreich war, wurde als alternative Darstellung der Interaktion der „*in situ* Proximity Ligation Assay (PLA)“ (Olink Biosciences) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine immunocytochemische Methode, mit der sich die Interaktion zweier Proteine innerhalb der Zelle detektieren lässt. Befinden sich zwei Proteine in einer ausreichend großen Nähe zueinander, wie sie während einer Interaktion gegeben ist, kommt es zur Bildung eines fluoreszenzmikroskopisch detektierbaren Signals. Die genaue Erläuterung dieser Methode ist

Kap. 2.2.5.4 zu entnehmen. Die Vorteile dieser Methode sind eine große Sensitivität und die Darstellbarkeit von transienten Interaktionen.

Für den *in situ* PLA wurden entorhinale Neurone an DIV 14 verwendet. Zur Detektion der Proteine wurden ein monoklonaler anti-HCN1 und ein polyklonaler anti-SNX3 Antikörper eingesetzt. Das Ergebnis ist Abbildung 3-21 (C, a-c) zu entnehmen. Die punktuellen roten Signale stellen die Interaktion zwischen *endogenem* HCN1 und *endogenem* SNX3 dar. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab, dass unter Normalbedingungen nur wenige Signale pro Zelle zu erkennen sind, was vermuten lässt, dass es sich um eine schwache oder vorübergehende Interaktion handelt. Um die Interaktion deutlicher darstellen zu können, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass für SNX3 eine Steigerung der Expression durch Stimulation mit Lithium beschrieben wurde (Mizutani et al., 2009). Da diese Daten aber aus einer Neuroblastoma-Zelllinie gewonnen wurden, mussten zunächst verschiedene Lithium-Konzentrationen in entorhinaler Dispersionskultur ausgetestet werden. Hierfür wurden entorhinale Neurone am DIV 13 für 24 h mit 1 mM bzw 3 mM LiCl₂ stimuliert. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Immunblot. Abbildung 3-21 A zeigt einen relevanten Westernblot und die Quantifizierung aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde eine tendenzielle Hochregulation der SNX3-Expression relativ zu GAPDH bei 3 mM LiCl₂ gefunden, sodass diese Konzentration zur Stimulation der Neurone für den *in situ* PLA verwendet wurde. Das Expressionsniveau von HCN1 blieb durch die Behandlung mit LiCl₂ unverändert (nicht gezeigt). Abbildung 3-21 C (d-f) zeigt den *in situ* PLA nach 24 h Lithium-Stimulation. Es ist eine signifikante Zunahme der Signale im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen (vgl. auch die Quantifizierung in Abbildung 3-21 B). Sowohl für die unbehandelte Kontrolle als auch für die Lithium-behandelten Neurone wurden Negativkontrollen mit jeweils nur einem Primärantikörper durchgeführt, um den Einfluss falsch positiver Signale zu minimieren. Diese Signale wurden bei der Quantifizierung berücksichtigt.

Anhand der dargestellten Ergebnisse lässt sich ableiten, dass HCN1 und SNX3 auch in Neuronen des entorhinalen Cortex miteinander interagieren, diese Interaktion aber vermutlich zu transient ist um im unbehandelten Gewebe detektiert zu werden. Durch Steigerung der SNX3-Expression mittels LiCl₂ ließ sich jedoch die Anzahl an „Interaktionsereignissen“, die mittels *in situ* PLA detektiert wurden, von durchschnittlich einem PLA-Signal pro Zelle auf durchschnittlich 2,5 Signale pro Zelle steigern.

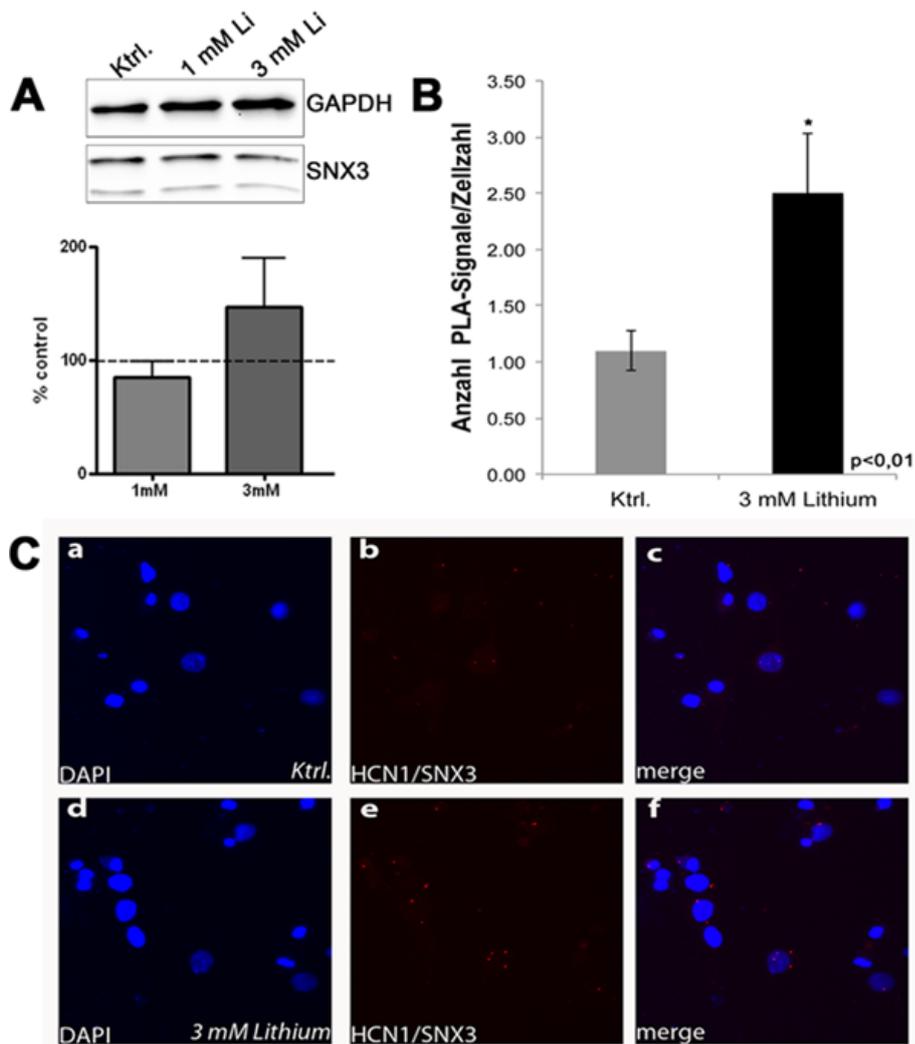


Abbildung 3-21: Interaktion von SNX3 mit HCN1 in entorhinaler Dispersionskultur in Abhängigkeit von Lithium-Stimulation

A, Dargestellt ist ein repräsentativer Immunblot und die Quantifizierung der Expression von SNX3 relativ zur unbehandelten Kontrolle und normiert auf die GAPDH-Expression (n = 3). Die Expression von SNX3 in entorhinaler Dispersionskultur ließ sich durch Behandlung mit 3 mM LiCl₂ steigern. **B**, Quantifizierung des *in situ* „Proximity Ligation Assay“ (PLA) zur Darstellung der Interaktion zwischen SNX3 und HCN1 in entorhinaler Dispersionskultur in unbehandelten Neuronen (n = 48) und nach Stimulation mit 3 mM LiCl₂ (n = 50). Diese zeigt eine 2,5-fache Steigerung der Interaktionsereignisse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (p<0,01). **C**, Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des *in situ* PLA. Dargestellt ist die Kontrolle (a-c) und die Lithium-Behandlung (d-f). Die punktuellen roten Signale stellen die Interaktion zwischen SNX3 und HCN1 dar. Die Zellkerne wurden zur Visualisierung mit DAPI angefärbt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM).

3.3.4 Untersuchung des Einflusses von SNX3 auf die Oberflächenexpression von HCN1

Abschließend stellte sich die Frage, inwieweit SNX3 die Membranexpression von HCN1 beeinflusst. Da SNX3 ein Bestandteil des Retromerkomplexes ist, war es naheliegend, den Einfluss von SNX3 auf den Membrantransport von HCN1 zu untersuchen. Dabei wurde wie bereits in Kapitel 3.2.5 beschrieben vorgegangen. HEK293-Zellen wurden mit dem HCN1-HA-Konstrukt und SNX3, TRIP8b(1a-4) oder GFP co-transfiziert, oberflächliches HCN1 wurde von einem monoklonalen anti-HA Antikörper erkannt und immunpräzipitiert. Abbildung 3-22 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Man erkennt eine signifikante Zunahme des Oberflächen-HCN1 nach Co-Transfektion mit HCN1-HA und TRIP8b(1a-4) im Vergleich zur Co-Transfektion mit HCN1-HA und GFP (Abbildung 3-22 A). Diese Zunahme entsprach den Literaturangaben (Lewis et al., 2009). Die Co-Transfektion von HCN1-HA und SNX3 hingegen zeigte eine Oberflächenexpression von HCN1 auf Kontrollniveau. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass SNX3, zumindest in diesem *in vitro* Zellkulturmodell, nicht an der Oberflächenexpression von HCN1-Kanaluntereinheiten beteiligt ist.

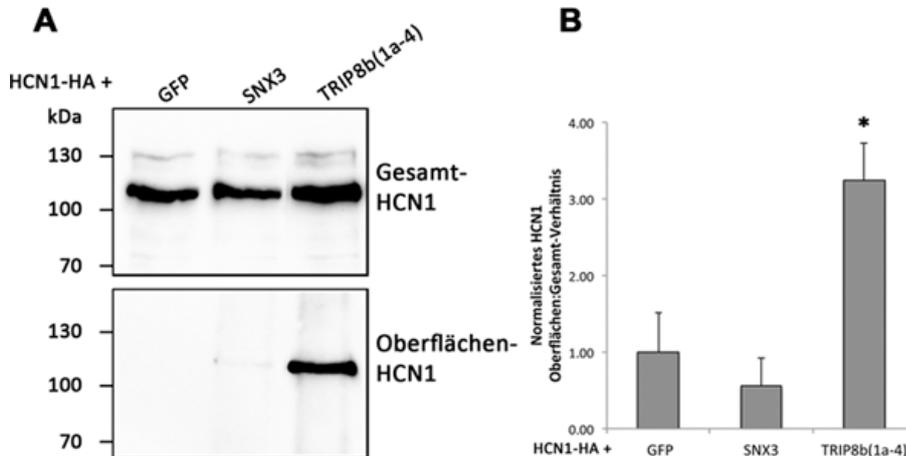


Abbildung 3-22: SNX3 hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von HCN1

A, HEK293-Zellen wurden mit HCN1-HA und GFP, SNX3 oder TRIP8b(1a-4) co-transfiziert. Oberflächliches HCN1 wurde auf den intakten Zellen über die extrazelluläre HA-Domäne mittels eines monoklonalen anti-HA Antikörpers erkannt und nach dem Lysieren der Zellen per Immunpräzipitation vom internen HCN1 separiert. Oberflächliches und Gesamt-HCN1 (5% des Gesamtzelllysats) wurden im Immunblot mit einem polyklonalen anti-HCN1 Antikörper nachgewiesen. **B**, Quantifizierung des Verhältnisses Oberflächen:Gesamt-HCN1, das auf den Oberflächenanteil von HCN1 nach Cotransfektion von HCN1-HA und GFP normiert wurde, zeigt, dass die Cotransfektion von TRIP8b(1a-4) zu einer signifikanten Steigerung der HCN1-Oberflächenexpression führt (wie bei (Lewis et al., 2009) beschrieben) ($p < 0,05$), wohingegen SNX3 keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von HCN1 hat; $n = 3$ unabhängige Experimente. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM).

Die durchgeführten Experimente zur Bedeutung der Interaktion von HCN1 mit dem an endosomalen Transportprozessen beteiligten Protein SNX3 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. SNX3 wurde im Rahmen eines „Yeast Two-Hybrid“-Screenings als potentieller Interaktionspartner für den N-Terminus von HCN1 entdeckt. Diese Interaktion ließ sich im Zellkulturmodell bestätigen.
2. Eine Eingrenzung der für die Interaktion mit SNX3 entscheidenden Bindungsdomänen in der HCN1-Sequenz war nur bedingt erfolgreich. Sowohl die Deletion des N- als auch des C-Terminus von HCN1 führten zur Abschwächung der Interaktion mit SNX3, aber zu keiner vollständigen Aufhebung. Obwohl im N-Terminus eine starke Bindung evident war, ist eine Interaktion mit dem C-Terminus nicht komplett auszuschließen.
3. Das Expressionsmuster von SNX3 deckt sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Gehirn weitgehend mit dem von HCN1. Die Co-Immunpräzipitation aus Gewebe verlief jedoch negativ. Allerdings konnte eine immunocytochemische *in situ*-Untersuchung die Interaktion von SNX3 und HCN1 in entorhinaler Dispersionskultur nachweisen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es sich bei der Interaktion von SNX3 mit HCN1 um eine transiente Interaktion handelt, die durch Co-Immunpräzipitationen nicht detektiert werden kann. Vorstellbar wäre darüber hinaus auch noch die Beteiligung anderer Proteine in einem Multi-Protein-Komplex. Auch die Funktion der Interaktion bleibt vorläufig ungeklärt.

4 DISKUSSION

Posttranslationale Modifikationen, zu denen auch die Assoziation von β -Untereinheiten und Transportproteinen gehören, spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulierung von Ionenkanälen. Sie dirigieren den Transport der Kanäle in die verschiedenen Zellkompartimente und können das Ausmaß deren Expression an der Zelloberfläche beeinflussen. Gerade für HCN-Kanäle, die die Eigenschaft haben, in Abhängigkeit der Neuronenpopulation in unterschiedlichen Kompartimenten exprimiert zu werden und deren Funktion abhängig von ihrer subzellulären Lokalisation ist, stellt die Regulation des intrazellulären Transports einen wichtigen Mechanismus zur Regulierung ihrer Funktion dar. Kürzlich konnte mit der Entdeckung des Proteins TRIP8b eine β -Untereinheit für HCN-Kanäle identifiziert werden (Santoro et al., 2004). Die Anwesenheit von TRIP8b führt maßgeblich zu einer gesteigerten Oberflächenexpression von HCN1 (Santoro et al., 2009; Lewis et al., 2011). Die Interaktion mit TRIP8b ist jedoch nicht der einzige regulierende Faktor des Transports von HCN-Kanälen, da dieser auch in der Abwesenheit von TRIP8b stattfindet (Lewis et al., 2011; Huang et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zum einen der Einfluss von TRIP8b-Isoformen auf den präsynaptischen HCN1-Transport im etablierten Tractus perforans-Modell untersucht (Bender et al., 2007). Zum anderen wurden jedoch auch zwei bisher unbekannte Interaktionspartner der HCN1-Untereinheit identifiziert und charakterisiert. Dabei handelt es sich um Proteine, die an der intrazellulären Sortierung von Membranproteinen beteiligt sind: die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 und das am endosomalen Transport beteiligte Sorting Nexin 3. Der Einfluss dieser Proteine auf den cytoplasmatischen Transport der HCN1-Untereinheit wurde in der vorliegenden Arbeit durch verschiedene experimentelle Ansätze verdeutlicht. Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse bestärken die These, dass die Lokalisation von HCN-Kanälen von verschiedenen Proteinen beeinflusst wird, die in einem komplexen System durch eine Assoziation mit der Kanaluntereinheit dessen Transport dirigieren und sowohl die Oberflächenexpression als auch das Recycling und den Abbau der HCN-Kanäle regulieren.

4.1 Die Regulation des axonalen Transports von HCN1 im Tractus perforans wird durch die Expression bestimmter TRIP8b-Isoformen beeinflusst

Die subzelluläre Lokalisation von HCN-Kanälen ist abhängig von der Neuronenpopulation. So ist in Pyramidenzellen der hippocampalen CA1 Region und des Cortex die dort überwiegend exprimierte Isoform HCN1 fast ausschließlich in den distalen Dendriten lokalisiert (Lörincz et al., 2002), wohingegen in anderen Zelltypen HCN-Kanäle auch präsynaptisch lokalisiert sein können (Southan et al., 2000; Aponte et al., 2006; Bender et al., 2007; Boyes et al., 2007; Huang et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Regulation präsynaptisch lokalisierter HCN1-Kanäle im medialen Tractus perforans untersucht, die nach der Geburt sehr ausgeprägt ist, mit zunehmender Entwicklung jedoch abnimmt, obwohl die somatische Expression unverändert bleibt (Bender et al., 2007). Dies legt die Regulation von Transportvorgängen nahe. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TRIP8b eine β -Untereinheit von HCN-Kanälen ist und deren Oberflächenexpression durch eine Beteiligung am endosomalen Transport beeinflusst (Santoro et al., 2009). Das Protein unterliegt einem ausgeprägten „Splicing“, wobei drei Isoformen im Gehirn überwiegen (TRIP8b(1a-4), TRIP8b(1a) und TRIP8b(1b-2)). Die am stärksten exprimierte Isoform TRIP8b(1a-4) führt in Oocyten zu einer massiven Steigerung der Oberflächenexpression von HCN1, wohingegen TRIP8b(1a) und das schwächer exprimierte TRIP8b(1b-2) die Oberflächenexpression von HCN1 deutlich senken (Santoro et al., 2009). Die genaue Funktion von TRIP8b(1a) ist jedoch umstritten, da Lewis et al. für diese Isoform eine Expressionssteigerung von HCN1 in HEK293-Zellen beobachten konnten (Lewis et al., 2009). Kürzlich konnten Piskorowski et al. zeigen, dass TRIP8b(1a-4) und TRIP8b(1a) für den dendritischen Transport von HCN1 in CA1 Pyramidenzellen verantwortlich sind und dort unterschiedliche Effekte aufweisen (Piskorowski et al., 2011): Während TRIP8b(1a-4) die Oberflächenexpression von HCN1 fördert, unterdrückt TRIP8b(1a) die Expression von HCN1 in Axonen. An der subzellulären Lokalisation von HCN1 scheint also die Feinabstimmung dieser beiden Isoformen mit ihren unterschiedlichen Funktionen maßgeblich beteiligt zu sein.

Dies wird auch dadurch belegt, dass es in der adulten TRIP8b^{-/-}-Maus, nicht aber in der TRIP8b(1b-2)^{-/-}-Maus (in der die Isoformen (1a-4) und (1a) unverändert exprimiert wurden), im Vergleich zum Wildtyp zu einer signifikanten Steigerung der HCN1-Expression in der mittleren Molekularschicht des Gyrus dentatus kommt (Wilkars et al., 2012). Dieser Bereich stellt die Terminationszone des medialen Tractus perforans dar, in der die Axone der Tractus

perforans-Neurone Synapsen mit den dort lokalisierten Körnerzellen bilden. Um zu untersuchen, ob TRIP8b in diesen Tractus perforans-Neuronen exprimiert wird, wurde dessen Expression im entorhinalen Cortex (EC) auf Protein- und mRNA-Ebene durch Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung charakterisiert. Diese Experimente ergaben, dass TRIP8b in der Schicht II des medialen EC exprimiert wird, darunter auch in den dort lokalisierten Sternzellen, die den medialen Tractus perforans bilden. Ein Immunblot von entorhinalem Gewebe immaturer und adulter Ratten ergab, dass TRIP8b(1a-4) und TRIP8b(1a) die dort hauptsächlich exprimierten Isoformen sind. Außerdem konnte eine entwicklungsabhängige Steigerung der Expression beider TRIP8b-Isoformen in vergleichbarem Ausmaß gezeigt werden, während die HCN1-Expression unverändert blieb. Dies steht in Übereinstimmung mit den von Bender et al. gemachten Beobachtungen, nach denen die HCN1-Expression im Soma unverändert bleibt und präsynaptisch mit zunehmendem Alter abnimmt (Bender et al., 2007).

Um herauszufinden, welche der beiden TRIP8b-Isoformen an der Verhinderung der axonalen HCN1-Expression beteiligt ist, wurden Experimente in entorhinaler Dispersionskultur durchgeführt. Dafür wurden immature Neurone verwendet, die HCN1-GFP zusammen mit TRIP8b(1a-4) oder TRIP8b(1a) überexprimierten. Die gemeinsame Expression von HCN1-GFP mit TRIP8b(1a), nicht jedoch mit TRIP8b(1a-4), resultierte in einer signifikanten Anreicherung sowohl von HCN1-GFP als auch von TRIP8b(1a) im somato-dendritischen Kompartiment bei gleichzeitiger signifikanter Reduktion der axonalen Expression. Ein tendenziell ähnlicher, jedoch etwas abgeschwächter Effekt, wurde auch für endogenes HCN1, welches in ausdifferenzierten Neuronen (ab ca. DIV 10) exprimiert wird, gezeigt. Diese Beobachtungen legen nahe, dass es sich bei TRIP8b(1a) um eine Isoform handelt, die die HCN1-Expression in den Axonen reduziert, indem sie die Kanäle in Richtung des dendritischen Kompartiments lenkt. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen in CA1 Pyramidenzellen unterstützt. Für diesen Zelltyp konnte gezeigt werden, dass eine artifizielle Expression von HCN1 in den Axonen durch eine Co-Expression von TRIP8b(1a), nicht aber TRIP8b(1a-4), unterdrückt wird (Piskorowski et al., 2011). Bei der alleinigen Überexpression zeigte TRIP8b(1a) hingegen keine Präferenz für das somato-dendritische Kompartiment. Hier ist eine relativ homogene Expression von TRIP8b im gesamten Neuron, einschließlich des Axons, zu beobachten. Dies legt nahe, dass sich TRIP8b(1a) erst durch die Interaktion mit HCN1 in Richtung der Dendriten orientiert. Eine Ursache könnte eine Konformationsänderung des TRIP8b Proteins sein (Santoro et al., 2011). Eine andere

Möglichkeit wäre eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von TRIP8b, der für die Beteiligung an spezifischen Transportkomplexen verantwortlich sein könnte. Dass TRIP8b phosphoryliert werden kann, wurde durch die Identifikation verschiedener *in vivo* Phosphorylierungsstellen belegt (Munton et al., 2006; Trinidad, 2006). Die Existenz solcher feiner Regulationsmechanismen würde auch den Befund erklären, dass die Anwesenheit von TRIP8b(1a) in etwa 10% der HCN1-GFP-exprimierenden Neurone nicht zu einer Anreicherung im somato-dendritischen Kompartiment führte. Möglicherweise erfüllen diese Zellen nicht die optimale Voraussetzung für ein Zusammenspiel der TRIP8b(1a) regulierenden Faktoren. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen weiterhin eine eher generellere Beteiligung von TRIP8b(1a-4) am Transport zur Zelloberfläche und Einbau in die Plasmamembran nahe. Diese Beobachtungen stimmen nicht mit den von Piskorowski et al. gemachten überein (Piskorowski et al., 2011), die über gegenläufige Funktionen von TRIP8b(1a-4) und TRIP8b(1a) berichten, wobei TRIP8b(1a-4) den dendritischen Transport fördert und TRIP8b(1a) die axonale Expression unterdrückt. Außerdem beschrieben sie für TRIP8b(1a) eine vorwiegend axonale Lokalisation, was von den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden konnte. Da es sich hierbei aber um immunhistochemische Experimente in CA1-Pyramidenzellen handelt, könnte die Verwendung verschiedener experimenteller Ansätze und untersuchter Zelltypen diese Differenzen erklären.

Der Transport von HCN1 wird jedoch nicht ausschließlich durch die Interaktion mit HCN1 beeinflusst. In einer aktuellen Publikation zeigen Huang et al. am Beispiel präsynaptischer kortikaler Endigungen einen von TRIP8b unabhängigen Transport von HCN1 (Huang et al., 2012). Dieser Befund bestätigt die Beteiligung anderer Bindungspartner am Transport von HCN1.

4.2 Die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 reguliert die Oberflächenexpression von HCN1

Die HCN1-Untereinheit enthält mehrere Strukturmodule, die als Interaktionsdomänen für andere Proteine in Frage kommen, darunter ein C-terminal gelegenes „PY“-Motiv. Dieses Motiv ist insbesondere als Interaktionsdomäne für die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nedd4-2 mit der HCN1-Untereinheit interagiert und durch Ubiquitylierung deren Transport beeinflusst.

Die Ubiquitylierung stellt eine wichtige posttranslationale Modifikation dar, um die Expression von Ionenkanälen an der Zelloberfläche dynamisch zu regulieren. Die Bindung von einem oder mehreren Ubiquitin-Molekülen an ein in der Plasmamembran befindliches Transmembranprotein dient als Signal für die Induktion der Internalisierung und ist an der Regulation verschiedener sich anschließender endosomaler „Sorting“-Prozesse beteiligt. Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren und kommt hochkonserviert in allen eukaryotischen Zellen vor. Es verfügt am C-terminalen Ende über ein Di-Glycinmotiv, über das es kovalent an Lysine im Zielprotein gebunden werden kann. Die ursprüngliche Vorstellung, dass die Bindung von Ubiquitin einzig den Abbau eines Transmembranproteins einleitet, ist mittlerweile dem Wissen um die vielfältigen Aufgaben der Ubiquitylierung gewichen (Miranda and Sorkin, 2007; Mukhopadhyay and Riezman, 2007). Diese sind in hohem Maße vom Grad der Ubiquitylierung abhängig. Während die Polyubiquitylierung, also die Bindung einer Kette von Ubiquitinen, den endosomalen Transport mit anschließender Degradation eines Transmembranproteins einleitet, dient die Monoubiquitylierung nicht ausschließlich als Signal für den Abbau, sondern übernimmt vielmehr vielfältige Aufgaben in der Induktion der Endocytose, der Regulation des endosomalen „Sortings“ und des Membrantransports (Haglund, 2003; Miranda and Sorkin, 2007).

Die Ubiquitylierung eines Proteins wird über eine dreistufige Enzymkaskade katalysiert. Im ersten Schritt wird das Ubiquitin aktiviert, indem es an das Enzym E1 („ubiquitin activating enzyme“) gebunden wird. Von dort wird es an das Enzym E2 („ubiquitin conjugating enzyme“) übertragen. In einem letzten Schritt erfolgt die Übertragung des Ubiquitins an die Ubiquitin-Ligase E3, die die kovalente Bindung des Ubiquitins an sein Zielprotein katalysiert. Während im humanen Genom nur wenige verschiedene E1- und E2-Enzyme beschrieben sind, existieren über 400 Ubiquitin-Ligasen, was verdeutlicht, dass dieses die entscheidenden Enzyme sind, die die Ubiquitylierung des Zielproteins regulieren (Miranda and Sorkin, 2007). Bei den E3-Ligasen unterscheidet man zwei verschiedene Gruppen: Die eine Gruppe beinhaltet E3-Ligasen mit einer „RING“-Domäne, mit der sie an E2-Enzyme binden und diesen als Adapterprotein dienen können. Die andere Gruppe, zu denen auch die Mitglieder der Nedd4 („neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 4“)-Familie zählen, enthält C-terminal eine „HECT“-Domäne, über die sie das an sie gebundene Ubiquitin auf ihr Zielprotein übertragen (Rotin and Kumar, 2009). Nedd4-Proteine bestehen darüber hinaus aus einer N-terminalen Calcium/Lipid-bindenden C2-Domäne und zwei oder vier Tryptophan-reichen WW-Domänen (Typ I und Typ IV). Die Typ I WW-Domänen

ermöglichen die Interaktion mit Prolin-reichen Motiven im Zielprotein, wie z. B. das „PY“-Motiv (PPxY). Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der Mitglieder dieser Proteinfamilie haben die einzelnen Isoformen unterschiedliche Substrate und damit unterschiedliche physiologische Aufgaben.

Die ersten Ionenkanäle, für die eine Ubiquitinylierung durch Nedd4-2 beschrieben wurde, waren ENaC („epithelial Na-channel“), Natriumionen leitende Kanäle, die in der Niere exprimiert werden (Kamynina et al., 2001). Nedd4-2 wird neben der Niere jedoch auch im Gehirn exprimiert und ist dort an der Ubiquitinylierung verschiedener Na_v- und K_v-Ionenkanäle beteiligt (Abriel and Staub, 2005). Aufgrund dieser Befunde und der Tatsache, dass HCN1 C-terminal ebenfalls über ein „PY“-Motiv verfügt, wurde in einem Teilprojekt dieser Arbeit untersucht, ob Nedd4-2 auch mit HCN1 interagiert. Diese These ließ sich durch erfolgreiche Co-Immunpräzipitationen *in vitro*, wie auch *in vivo*, bestätigen. Es konnte außerdem die Bindungsdomäne in der HCN1-Untereinheit bestimmt werden. Diese begrenzt sich überraschenderweise nicht ausschließlich auf das klassische „PY“-Motiv (aa 654-657), sondern scheint zusätzlich von weiter C-terminal gelegenen Motiven abzuhängen (aa 700-800), da eine Deletion der gesamten Region (aa 610-800) zu einer deutlich stärkeren Abschwächung der Bindung von Nedd4-2 führte, als es bei einer Deletion des „PY“-Motivs alleine der Fall war. Diese strangabwärts gelegene Region beinhaltet einen Polyglutamin-„Stretch“ (aa 730-755), der von Segmenten flankiert wird, die insbesondere die Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin enthalten. Während bisher für den Polyglutamin-„Stretch“ keine besondere Funktion beschrieben wurde, ist die im Nedd4-2 Protein enthaltene Typ IV WW-Domäne in der Lage, mit phosphorylierten Serin- und Threonin-Residuen, gefolgt von Prolinen, zu interagieren (Sudol and Hunter, 2000). Diese Motive sind mehrfach an die Polyglutaminregion angrenzend vorhanden. Es ist also im Falle von HCN1 von einem erweiterten „PY“-Motiv auszugehen, welches die Interaktion mit Nedd4-2 vermittelt. Dieser Befund deckt sich mit Daten in der Literatur: Für KCNQ2-Kanäle wurde eine Ubiquitinylierung durch Nedd4-2 unabhängig von der Existenz eines „PY“-Motivs beschrieben (Ekberg et al., 2007). Für Na_v1.6-Kanäle wurde eine Stress-induzierte Internalisierung durch zwei verschiedene Nedd4-2-Bindungsmotive beschrieben (Gasser et al., 2010). Diese Beispiele verdeutlichen, dass das „PY“-Motiv nicht die ausschließliche Bindungsdomäne von Nedd4-2 ist, sondern die Ubiquitin-Ligase auch über alternative Bindungsmotive mit seinem Substrat interagieren kann.

Neben der Durchführung von Co-Immunpräzipitationen von HCN1 mit Nedd4-2 aus verschiedenen Hirnregionen, die den Nachweis lieferten, dass die Interaktion auch *in vivo* Bestand hat, wurde das Expressionsmuster beider Proteine auf neuronaler Ebene untersucht. Diese immunhistochemischen Experimente ergaben, dass Nedd4-2 in denselben Zellen exprimiert wird, die ebenfalls HCN1 exprimieren. Es wurde die subzelluläre Lokalisation von HCN1 und Nedd4-2 in der hippocampalen CA1-Region, im Cortex und im Cerebellum untersucht. In der CA1-Region im Hippocampus und im Cortex wurde HCN1 stark in den Dendriten exprimiert, wie auch bei Lörincz et al. (2002) beschrieben, während Nedd4-2 überwiegend im Soma lokalisiert war. Dieselbe Situation war in den Purkinjezellen im Cerebellum zu beobachten: Auch hier war Nedd4-2 im Soma lokalisiert, wohingegen sich die HCN1-Expression auf das somato-dendritische Kompartiment verteilte. Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass Nedd4-2 unter Umständen nur kompartimentspezifisch an der Regulation der HCN1-Oberflächenexpression beteiligt ist. Diese könnte auf das somatische Kompartiment begrenzt sein, während andere Interaktionspartner, wie z. B. TRIP8b, das in bestimmten Zelltypen an der Förderung des dendritischen und Verhinderung des axonalen HCN1-Transports (Lewis et al., 2011; Piskorowski et al., 2011; Wilkars et al., 2012) beteiligt ist, diese Aufgabe in anderen Zellkompartimenten verrichten.

Nun stellte sich die Frage, welche Funktion die durch Nedd4-2 vermittelte Ubiquitylierung von HCN1-Kanälen haben könnte. Für Nedd4-2 wurde bislang eine Beteiligung an der Endocytose verschiedener Transmembranproteine sowie eine sich anschließende, durch die Ubiquitylierung vermittelte Degradation beschrieben (Rotin et al., 2000; Kabra et al., 2008; Georgieva et al., 2011; Lin et al., 2011). Dabei kann Nedd4-2 die Anheftung verschiedener Ubiquitylierungsmuster katalysieren. Insbesondere die (Multi-)Monoubiquitylierung dient als Erkennungssignal für einen endosomalen Transport mit der Möglichkeit des „Recyclings“ zurück an die Zelloberfläche oder eines Abbaus in Lysosomen, wie es für den TrkA-Rezeptor oder den AMPA-Rezeptor gezeigt werden konnte (Georgieva et al., 2011; Lin et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Nedd4-2 auf die Oberflächenexpression von HCN1 untersucht. Es konnte eine relative Abnahme des an der Zelloberfläche lokalisierten HCN1 im Verhältnis zum Gesamtprotein (internes und an der Oberfläche exprimiertes HCN1) beobachtet werden. Dies steht in Einklang mit bereits publizierten Daten, nach denen Nedd4-2 die Endocytoserate steigert (Rotin et al., 2000). Überraschenderweise stieg die Menge des Gesamt-HCN1 in Anwesenheit von Nedd4-2 im Vergleich zur Kontrolle jedoch an. Dies scheint der generellen Meinung, dass Nedd4-2 die Degradation von Proteinen

vermittelt, zu widersprechen. Interessanterweise existieren jedoch auch Studien, die aufzeigen, dass die Folgen von Ubiquitynylierungen komplexer sein können. So konnten für den TRPV4-Ionenkanal nach Ubiquitynylierung durch die Ubiquitinligase AIP4 positive Effekte auf die Proteinstabilität gezeigt werden (Wegierski et al., 2006). Die Autoren dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Ubiquitynylierung von TRPV4 zu einer verstärkten Internalisierung, allerdings ohne gesteigerte nachfolgende Degradation und damit zu einer Anreicherung im Cytoplasma führt. Vergleichbare Mechanismen sind auch für die Ubiquitynylierung von HCN1 durch Nedd4-2 vorstellbar. Eine weitere interessante Beobachtung, die gemacht werden konnte, war eine Veränderung des Glykosylierungsstatus durch Nedd4-2. Sowohl das an der Zelloberfläche lokalisierte HCN1 als auch das Gesamt-HCN1 wiesen eine deutliche Abnahme des Glykosylierungsstatus auf. Die Glykosylierung von HCN-Kanälen ist verantwortlich für den Transport der Kanäle an die Zelloberfläche (Much et al., 2003). Ein verringerter Glykosylierungsstatus wäre eine mögliche Erklärung für die Zunahme des intrazellulären HCN1 in Anwesenheit von Nedd4-2. Die Glykosylierung scheint aber einen unterschiedlich starken Einfluss auf die einzelnen HCN-Isoformen zu haben, so wurde für HCN1 eine Oberflächenexpression auch in Abwesenheit einer Glykosylierung gezeigt (Hegle et al., 2010). Dies erklärt die Existenz von oberflächlich lokalisiertem, unglykosyliertem HCN1 in den durchgeführten Experimenten. Die genaue Funktion, die Nedd4-2 auf den Glykosylierungsstatus von HCN1 ausüben könnte, muss aber in nachfolgenden Experimenten exakter beleuchtet werden.

4.3 HCN1 ist mit dem endosomalen Transportprotein SNX3 assoziiert

Das dritte Teilprojekt der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Suche nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern für den cytoplasmatischen N-Terminus von HCN1. Für diesen wurde bisher nur eine Beteiligung an der Heterodimerisierung einzelner Kanaluntereinheiten beschrieben (Proenza et al., 2002; Tran et al., 2002). Da HCN-Kanäle strukturell eng mit den K_v -Kanälen verwandt sind, welche über den N-Terminus mit ihren β -Untereinheiten interagieren, war es naheliegend, mittels eines „Yeast Two-Hybrid-Screenings“ in Hefezellen nach möglichen Interaktionspartnern für diese Domäne von HCN1 zu suchen. Dabei wurde ein Mitglied der Sorting Nexin-Familie, SNX3, identifiziert und die gefundene Interaktion im Folgenden weiter charakterisiert. SNX3 ist ein Transportprotein, welches am endosomalen „Sorting“ von Transmembranproteinen beteiligt ist.

Unter endosomalem „Sorting“ versteht man die sich an die Endocytose anschließende Entscheidung über den weiteren intrazellulären Transport eines Transmembranproteins. Dieser erfolgt mittels endocytotischer Vesikel in ein endosomales Kompartiment. Dieses durchläuft eine Reifung vom frühen zum späten Endosom. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation endocytotischer Vesikel, weshalb ein spätes Endosom auch als „multivesicular body“ (MVB) bezeichnet wird. Vom MVB können die Transmembranproteine entweder zum Abbau in Lysosomen oder Proteasomen oder zurück zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert werden. Von dort können sie mittels Exocytose zur Plasmamembran gebracht werden (Mellman, 1996). Der retrograde Transport vom MVB zum TGN wird durch den Retromerkomplex vermittelt. Für die Erkennung des Cargos dient in diesem Komplex ein Trimer der Proteine Vps26, Vps29 und Vps35 („vacuolar protein sorting“). Außerdem enthält der klassische Retromerkomplex Dimere aus Sorting Nexinen. Sorting Nexine bilden eine Proteinfamilie von ca. 30 Mitgliedern, denen gemein ist, dass sie eine Phox-Domäne (PX-Domäne) besitzen. Diese stellt ein Bindungsmotiv für Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI(3)P) dar. PI(3)P ist ein membranständiges Phospholipid, das den Transport von Cargo durch endosomale Membranen durch die Interaktion mit Transportproteinen reguliert. Außerdem verfügen die meisten Sorting Nexine über weitere Domänen wie z. B. Protein-Protein-Interaktionsdomänen oder BAR-Domänen, mit deren Hilfe sie die Membrankurvatur induzieren. Sorting Nexine wirken an verschiedenen Stellen des retrograden Transports: An einem Transport vom späten Endosom zum TGN sind die BAR-Domänen enthaltenden Dimere SNX1/2 und SNX5/6 beteiligt (Spang, 2011). SNX27 hingegen ist am direkten Transport an die Plasmamembran ohne den Umweg über das TGN beteiligt, wie es am Beispiel für Beta-Adrenorezeptoren gezeigt wurde (Temkin et al., 2011). Die Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass Sorting Nexine spezifisch mit Transmembranproteinen interagieren und somit die Spezifität der Cargo-Erkennung des Retromerkomplexes erhöhen (Worby and Dixon, 2002; Johannes and Wunder, 2011). Dabei kann man sich die Sorting Nexine als Richtungsgeber vorstellen, die ihr assoziiertes Transmembranprotein von verschiedenen endosomalen Kompartimenten in den retrograden Transport dirigieren.

SNX3 ist das Mitglied der Sorting Nexin-Familie mit der einfachsten Struktur. Es besteht fast ausschließlich aus der PX-Domäne, mit jeweils kurzem N- und C-Terminus (Haft et al., 1998; Worby and Dixon, 2002). SNX3 hat eine hohe Bindungsaffinität zu PI(3)P, was dazu führt, dass es vorwiegend an frühe Endosomen assoziiert ist (Yu and Lemmon, 2001). SNX3 ist trotz seiner einfachen Struktur ebenfalls ein Bestandteil des Retromerkomplexes. Kürzlich

konnten zwei Arbeitsgruppen die Rolle, die SNX3 im retrograden Transport spielt, genauer beleuchten (Harterink et al., 2011; Zhang et al., 2011): SNX3 hat eine evolutionär konservierte Funktion am retrograden Transport des Wntless-Rezeptors und dirigiert den Rezeptor in einen alternativen Transportweg ohne Beteiligung des SNX-BAR-Retromerkomplexes vom frühen Endosom zum TGN. Da eine direkte Interaktion mit SNX3 nicht identifiziert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass SNX3 nach der Bindung des Cargo-Erkennungstrimers Vps26-29-35 an den Komplex assoziiert wird. Außer am Wntless-Transport ist für SNX3 auch eine Beteiligung am retrograden Transport des Transferrinrezeptors und des EGF(„epidermal growth factor“-)-Rezeptors beschrieben (Xu et al., 2001; Chiow et al., 2011), was darauf schließen lässt, dass SNX3 nicht exklusiv mit Wntless interagiert und einen interessanten Assoziationspartner für den Transport weiterer Transmembranproteine darstellt.

Die in Hefe gefundene Interaktion zwischen dem N-Terminus von HCN1 (aa 1-131) und SNX3 ließ sich im Zellkulturmodell auch für die gesamte Kanaluntereinheit bestätigen. Allerdings war es nicht möglich, wie am Beispiel von Nedd4-2 gezeigt, die Bindungsdomäne exakt einzugrenzen. Überraschenderweise zeigten verschiedene generierte Deletionskonstrukte des N-Terminus von HCN1 zwar eine Abschwächung der SNX3-Bindung, aber in keinem Fall eine komplette Aufhebung. Dabei war es unabhängig, ob die unkonservierte Domäne (Δ 2-77; Tran et al., 2002), der gesamte N-Terminus mit Transmembrandomäne (Δ 2-385) oder einzelne Segmente innerhalb des N-Terminus deletiert wurden. Ein analog durchgeführtes Experiment mit C-terminalen Deletionskonstrukten von HCN1 zeigte jedoch, dass eine schwache Beteiligung des C-Terminus an der Interaktion nicht komplett ausgeschlossen werden kann, die hauptsächlich für die Interaktion verantwortliche Domäne sich aber im N-Terminus befinden muss.

Da für SNX3, ebenso wie für Nedd4-2, keine Daten über eine Verteilung der Expression im Gehirn vorlagen, wurde die Expression sowohl auf Protein- wie auch auf mRNA-Ebene untersucht. Das Vorhandensein von SNX3 wurde mittels Immunblot in verschiedenen Hirnarealen wie Hippocampus, Cortex, Thalamus und Cerebellum nachgewiesen. Diese Regionen sind ebenfalls reich an HCN1. Immunhistochemisch konnte eine überlappende Expression von HCN1 und SNX3 in der Schicht II des entorhinalen Cortex sowie in der CA1-Region des Hippocampus gezeigt werden. Diese Ergebnisse ließen sich auf mRNA-Ebene durch *in situ*-Hybridisierungen bestätigen. Die Voraussetzungen für eine Bedeutung der

Interaktion *in vivo* sind also durch das Vorhandensein beider Proteine in denselben Zellen gegeben. Allerdings war es nicht möglich, die Interaktion durch Co-Immunpräzipitationen aus Gewebe zu bestätigen. Es wurde aus diesem Grund der alternative Nachweis durch eine *in situ* „Co-Immunpräzipitation“ mittels des *in situ* PLA verwendet, der Interaktionen immunocytochemisch innerhalb der Zelle detektiert. Diese sensitive Methode zeigte eine Interaktion beider Proteine, die sich durch eine Expressionssteigerung von SNX3 durch Lithium (Mizutani et al., 2009) noch verstärken ließ. Die nicht erfolgreiche Darstellung der Interaktion *in vivo* kann verschiedene Ursachen haben: Von technischen Schwierigkeiten (keine Eignung der eingesetzten Antikörper für Co-Immunpräzipitationen) abgesehen, könnte die Interaktion transient verlaufen, sodass sie durch Co-Immunpräzipitationen nicht detektiert werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre das Vorliegen einer indirekten Interaktion. Es könnten andere Bindungspartner in Form eines Multiproteinkomplexes beteiligt sein, die eine Detektion der Bindung von SNX3 an HCN1 unter nativen Bedingungen erschweren. Beachtenswert ist, dass es auch anderen Gruppen, die die Interaktion von Transmembranproteinen mit SNX3 untersuchten, nicht gelang, diese Interaktion direkt mittels Co-Immunpräzipitationen zu bestätigen (Strochlic et al., 2007; Harterink et al., 2011). Da SNX3 als ein Bestandteil des Retromerkomplexes am Transport von HCN1 zum TGN und damit zurück an die Zelloberfläche beteiligt sein könnte, war es naheliegend, einen Einfluss von SNX3 auf die Oberflächenexpression von HCN1 zu untersuchen. Dieses Experiment ergab unter den gewählten Versuchsparametern jedoch eine HCN1-Oberflächenexpression auf Kontrollniveau in Anwesenheit von SNX3. Dies könnte bedeuten, dass SNX3 zwar mit HCN1 während des endosomalen Transport assoziiert ist, es für eine Beeinflussung des Transports und damit der Funktion von HCN1 aber weiterer Assoziationspartner bedarf, die innerhalb eines Komplexes interagieren und in den verwendeten heterologen Expressionssystemen fehlten. Diese These wird durch die Arbeit von Harterink et al. unterstützt, in der gezeigt werden konnte, dass SNX3 mit dem Cargo-Erkennungskomplex des Retromers direkt interagiert und somit die Spezifität der Cargo-Bindung mitbestimmt (Harterink et al., 2011). Es müssten zur Klärung der Rolle von SNX3 beim endosomalen Transport von HCN1 weitere Experimente durchgeführt werden, wobei die Beeinflussung weiterer Funktionen von HCN1 untersucht werden sollte.

4.4 Versuch einer Synthese der vorgestellten Befunde

Die in dieser Arbeit untersuchten Assoziationspartner von HCN1-Kanaluntereinheiten zeigen einen unterschiedlichen Einfluss auf den Transport von HCN1, abhängig davon, an welcher Stelle der cytoplasmatischen Transportmaschinerie sie eingreifen. Ein am Transport beteiligtes Protein wirkt jedoch nie exklusiv auf seinen Interaktionspartner, sondern ist Bestandteil eines hoch komplexen Netzwerkes, in dem es eine Vielzahl an Regulationsmöglichkeiten und alternativen Wegen gibt, damit die Zelle flexibel auf die an sie gestellten Anforderungen und Umweltbedingungen reagieren kann. Für HCN1-Kanäle konnte bereits eine dynamische Regulation der Kanaluntereinheiten in hippocampalen Neuronen in verschiedene Zellkompartimente durch vesikulären Transport und Steuerung der Oberflächenexpression gezeigt werden (Noam et al., 2010), wobei die, bis auf die β -Untereinheit TRIP8b, an der Regulation beteiligten Proteine weitgehend unbekannt sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neben der Untersuchung des Einflusses einzelner TRIP8b-Isoformen zwei neue potentielle Interaktionspartner identifiziert, Nedd4-2 und SNX3. Deren postulierter Einfluss auf den cytoplasmatischen HCN1-Transport gibt Abbildung 4-1 wider. Dargestellt ist schematisch der Ablauf des endosomalen „Sorting“-Prozesses einer HCN1-Untereinheit nach Endocytose, an dessen Initiation vermutlich Nedd4-2 beteiligt ist. Beim Transport in den endosomalen Vesikeln durchlaufen diese einen Reifungsprozess, bis sie schließlich als MVB vorliegen. Vom MVB kann HCN1 direkt zurück an die Plasmamembran transportiert (recycelt) werden, wofür in erster Line TRIP8b verantwortlich sein dürfte, oder aber – bei überwiegendem Einfluss von Nedd4-2 – zum Abbau ins Lysosom transportiert werden. Alternativ kann auch ein indirekter Rücktransport über den Retromerkomplex zum TGN stattfinden, wo die Kanaluntereinheiten erneut in Vesikel verpackt und an die Zelloberfläche transportiert werden. SNX3 könnte als Bestandteil des Retromers verantwortlich für die Erkennung von HCN1 sein.

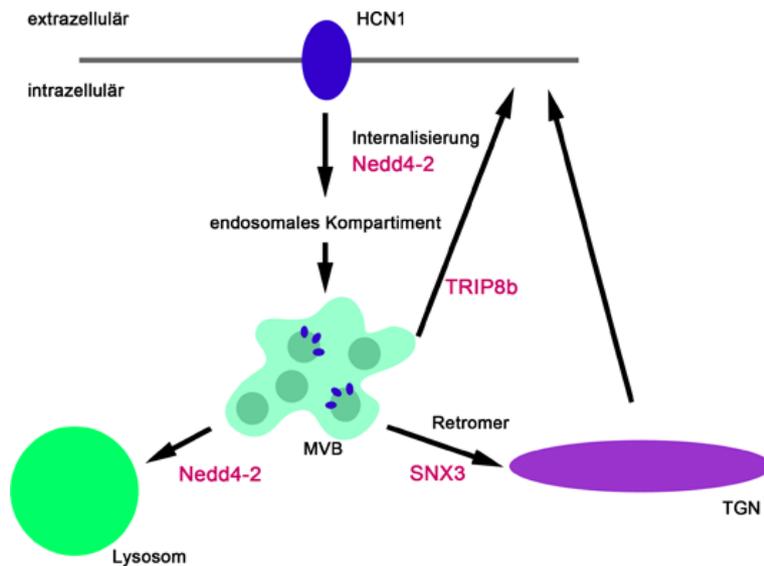


Abbildung 4-1: Modell der Regulationsmöglichkeiten des endosomal Transports von HCN1

Schematische Darstellung der Transportmöglichkeiten der HCN1-Untereinheit (blau) nach erfolgter Internalisierung durch Endocytose. Die Kanaluntereinheiten durchlaufen das endosomale Kompartiment und erreichen schließlich die MVBs („multi-vesicular bodies“). Von dort gibt es die Möglichkeit eines direkten Rücktransports an die Zelloberfläche, eines indirekten Rücktransports über den Retromer-Komplex und das TGN (Trans-Golgi-Netzwerk) oder die Degradation in lysosomalen Kompartimenten. Die in dieser Arbeit untersuchten assoziierten Transportproteine sind an ihrem postulierten Wirkort in diesem Modell dargestellt.

Die Entscheidung darüber, welchen Weg der Transport von HCN1 einschlägt, kann zusätzlich durch eine Regulation der assoziierten Transportproteine beeinflusst werden. So wurden für Nedd4-2 posttranslationale Modifikationen in Form von Ubiquitylierung und Phosphorylierung beschrieben (Debonneville, 2001; Bruce et al., 2008). Auch für SNX3 wurde eine Beteiligung an der Oberflächenexpression von ENaC-Kanälen durch Regulation des Ubiquitylierungsstatus entdeckt (Boulkroun et al., 2008). TRIP8b hingegen scheint phosphoryliert zu werden (Munton et al., 2006; Trinidad, 2006). Diese Modifikation könnte zu einer Konformationsänderung und dementsprechend einer verminderten Assoziation mit HCN1 führen. Der intrazelluläre Transport von HCN-Kanälen unterliegt einer Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten auf verschiedenen Ebenen und bietet somit eine Erklärung für die unterschiedliche Expression in verschiedenen Reifungsgraden von Neuronen und den Kompartiment-spezifischen Transport in verschiedenen Zelltypen.

4.5 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Befunde tragen zu einem erweiterten Verständnis des intrazellulären Transports von HCN1-Untereinheiten bei. Der Fokus wurde dabei auf die Interaktion mit assoziierten Proteinen, sog. β -Untereinheiten gelegt. Dabei wurde der Effekt verschiedener Isoformen der bereits bekannten β -Untereinheit TRIP8b auf den axonalen Transport untersucht, des Weiteren wurden zwei bisher unbekannte Interaktionspartner identifiziert und charakterisiert: die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 und das Sorting Nexin 3, das ein Bestandteil des Retromerkomplexes darstellt.

In der Diskussion sind bereits einige Fragen angeklungen, die in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden sollen. Für das weiterführende Verständnis des Einflusses der TRIP8b-Isoformen (1a-4) und (1a) auf den axonalen Transport im Tractus perforans wäre nach den durchgeführten Experimenten *in vitro* eine Untersuchung der Situation im Gewebeverband von großer Wichtigkeit. Eine Möglichkeit dafür wäre die Entwicklung eines Expressionssystems zur selektiven Expression einzelner TRIP8b-Isoformen im intakten Tractus perforans. Dies ließe sich durch die Transfektion organotypischer Gewebekulturen neonataler Ratten oder TRIP8b-defizienter Mäuse mit viralen Expressionsvektoren, die für die jeweilige TRIP8b-Isoform codieren, bewerkstelligen. Weiterhin wäre es von großer Bedeutung, die Regulation der differentiellen Expression von TRIP8b zu untersuchen. Über die Mechanismen, die dafür sorgen, dass in verschiedenen Neuronenpopulationen und Entwicklungsstadien TRIP8b in einer unterschiedlichen Isoformkomposition vorliegt, ist zur Zeit noch sehr wenig bekannt. Als möglicher Regulator wäre die neuronale Aktivität vorstellbar. Interessant wäre deshalb die Untersuchung des Einflusses von Epilepsie auf die Expression von TRIP8b, da diese Erkrankung auch drastische Auswirkungen auf die Expression von HCN1 hat. Diese Experimente ließen sich durch Einleitung eines Status epilepticus durch Pilocarpin im Tierversuch durchführen.

Um einen tieferen Einblick in die Assoziation von Nedd4-2 mit HCN1 zu gewinnen, ist eine weitere Charakterisierung der Interaktion erforderlich. Da die Erforschung dieser Interaktion sich noch auf einem niedrigen Erkenntnisstand befindet, sind grundlegende Untersuchungen dazu unerlässlich. So ließe sich durch elektrophysiologische Methoden eine Beeinflussung der Kanaleigenschaften durch die Interaktion mit Nedd4-2 und insbesondere durch die sich daraus ergebende Ubiquitylierung des Kanals untersuchen. Dafür wäre es möglich, die

Interaktionspartner im heterologen Zellkulturmodell zu exprimieren, es wäre aber auch eine Überexpression in neuronaler Dispersionskultur oder in organotypischer Gewebekultur vorstellbar, um sich der Situation *in vivo* anzunähern. Der weitere Vorteil elektrophysiologischer Messungen wäre eine Bestätigung der in dieser Arbeit gefundenen Beeinflussung des Oberflächentransports von HCN1 und eine genauere Untersuchung der Beeinflussung des I_h durch eine Veränderung des Glykosylierungsstatus in Anwesenheit von Nedd4-2. Darüber hinaus würden sich Experimente in Nedd4-2-defizienten Mäusen anbieten, um zu untersuchen, ob sich die Expression von HCN1 und die Eigenschaften des I_h in Abwesenheit von Nedd4-2 verändern. In diesen Mäusen wurde bereits der Einfluss des Fehlens von Nedd4-2 auf die Regulation von ENaC in verschiedenen Geweben untersucht (Shi et al., 2008; Boase et al., 2011), allerdings existieren bislang keine Untersuchungen auf die Auswirkungen der Nedd4-2-Defizienz für die Regulation von mit Nedd4-2 interagierenden Ionenkanälen im Gehirn, was überaus interessant zu untersuchen wäre.

Auch für das dritte Teilprojekt, die Untersuchung der Interaktion von SNX3 mit HCN1, sind noch grundlegende Fragestellungen zu klären. Im Fokus steht dabei die genaue Aufklärung der Interaktion. Es stellt sich dabei vor allem die Frage, ob andere Partner in Form eines Multiproteinkomplexes daran beteiligt sind. Eine Möglichkeit dies zu untersuchen, wäre die Überexpression von Proteinen des Vps-Komplexes im heterologen Zellkultur-Modell zusammen mit SNX3 und HCN1 und die Durchführung von Co-Immunpräzipitationen. Außerdem ist es noch erforderlich, die exakte Funktion von SNX3 am endosomalen HCN1-Transport aufzuklären. Dafür bietet sich die Überexpression von SNX3, sowie ggf. anderer Partner, in neuronaler Dispersionskultur und die immunocytochemische Untersuchung der HCN1-Expression an. Eine geeignete Möglichkeit, eine Beeinflussung des cytoplasmatischen Transports von HCN1 zu detektieren, wären dabei Co-Lokalisationsstudien mit geeigneten Markern endoplasmatischer Organellen.

5 LITERATUR

- Abramoff MD, Paulo JM, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11:36–42.
- Abriel H, Staub O (2005) Ubiquitylation of ion channels. *Physiology (Bethesda)* 20:398–407.
- Aponte Y, Lien C-C, Reisinger E, Jonas P (2006) Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. *J Physiol* 574:229–243.
- Baram TZ, Santoro B (2003) The multiple personalities of h-channels. *Trends in neurosciences* 26:550.
- Bender R (2001) Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1–4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus. *Neuroscience* 106:689–698.
- Bender RA, Baram TZ (2008) Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks. *Progress in Neurobiology* 86:129–140.
- Bender RA, Kirschstein T, Kretz O, Brewster AL, Richichi C, Rüschemschmidt C, Shigemoto R, Beck H, Frotscher M, Baram TZ (2007) Localization of HCN1 channels to presynaptic compartments: novel plasticity that may contribute to hippocampal maturation. *J Neurosci* 27:4697–4706.
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X (2009) Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 89:847–885.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513–1523.
- Boase NA, Rychkov GY, Townley SL, Dinudom A, Candi E, Voss AK, Tsoutsman T, Semsarian C, Melino G, Koentgen F, Cook DI, Kumar S (2011) Respiratory distress and perinatal lethality in Nedd4-2-deficient mice. *Nat Comms* 2:287.
- Bongiorno D, Schuetz F, Poronnik P, Adams DJ (2011) Regulation of voltage-gated ion channels in excitable cells by the ubiquitin ligases Nedd4 and Nedd4-2. *channels* 5:71–80.
- Bonifacino JS, Traub LM (2003) Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes. *Annual Review of Biochemistry* 72:395–447.
- Boukroun S, Ruffieux-Daidié D, Vitagliano J-J, Poirot O, Charles R-P, Lagnaz D, Firsov D, Kellenberger S, Staub O (2008) Vasopressin-inducible ubiquitin-specific protease 10 increases ENaC cell surface expression by deubiquitylating and stabilizing sorting nexin 3. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 295:F889–F900.
- Boyes J, Bolam JP, Shigemoto R, Stanford IM (2007) Functional presynaptic HCN channels in the rat globus pallidus. *European Journal of Neuroscience* 25:2081–2092.

- Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ (2002) Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci* 22:4591–4599.
- Brewster AL, Bernard JA, Gall CM, Baram TZ (2005) Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. *Neurobiol Dis* 19:200–207.
- Brewster AL, Chen Y, Bender RA, Yeh A, Shigemoto R, Baram TZ (2007) Quantitative analysis and subcellular distribution of mRNA and protein expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels throughout development in rat hippocampus. *Cereb Cortex* 17:702–712.
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ (1979) How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280:235–236.
- Bruce MC, Kanelis V, Fouladkou F, Debonneville A, Staub O, Rotin D (2008) Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain. *Biochem J* 415:155–163.
- Chaplan SR, Guo H-Q, Lee DH, Luo L, Liu C, Kuei C, Velumian AA, Butler MP, Brown SM, Dubin AE (2003) Neuronal Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channels Drive Neuropathic Pain. *J Neurosci* 23:1169–1178.
- Chioh KH, Tan Y, Chua RY, Huang D, Ng MLM, Torta F, Wenk MR, Wong SH (2011) SNX3-dependent regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) trafficking and degradation by aspirin in epidermoid carcinoma (A-431) cells. *Cell Mol Life Sci* 69:1505–1521.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156–159.
- Clapham DE (1998) Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron* 21:5–7.
- Debonneville C (2001) Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression. *EMBO J* 20:7052–7059.
- Deutsch C (2002) Potassium Channel Ontogeny. *Annu Rev Physiol*:19–46 Available at: <http://dxdoi.org/10.1146/annurevphysiol64081501155934>.
- DiFrancesco D (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol*:455–472.
- DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351:145–147.
- Donovan P, Poronnik P (2012) Nedd4 and Nedd4-2: Ubiquitin ligases at work in the neuron. *Int J Biochem Cell Biol* 45:706–710.
- Ekberg J, Schuetz F, Boase NA, Conroy S-J, Manning J, Kumar S, Poronnik P, Adams DJ (2007) Regulation of the Voltage-gated K⁺ Channels KCNQ2/3 and KCNQ3/5 by Ubiquitination. *J Biol Chem* 282:12135–12142.

- Fields S, Song O-K (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245–246.
- Gasser A, Cheng X, Gilmore ES, Tyrrell L, Waxman SG, Dib-Hajj SD (2010) Two Nedd4-binding motifs underlie modulation of sodium channel Nav1.6 by p38 MAPK. *Journal of Biological Chemistry* 285:26149–26161.
- Gauss R, Seifert R, Kaupp UB (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393:583–587.
- Georgieva MV, de Pablo Y, Sanchis D, Comella JX, Llovera M (2011) Ubiquitination of TrkA by Nedd4-2 regulates receptor lysosomal targeting and mediates receptor signaling. *Journal of Neurochemistry* 117:479–493.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59–74.
- Haft CR, la Luz Sierra de M, Barr VA, Haft DH, Taylor SI (1998) Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol Cell Biol* 18:7278–7287.
- Haglund K (2003) Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends in Biochemical Sciences* 28:598–604.
- Han Y, Noam Y, Lewis AS, Gallagher JJ, Wadman WJ, Baram TZ, Chetkovich DM (2011) Trafficking and Gating of Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels Are Regulated by Interaction with Tetratricopeptide Repeat-containing Rab8b-interacting Protein (TRIP8b) and Cyclic AMP at Distinct Sites. *Journal of Biological Chemistry* 286:20823–20834.
- Harterink M, Port F, Lorenowicz MJ, McGough IJ, Silhankova M, Betist MC, van Weering JRT, van Heesbeen RGHP, Middelkoop TC, Basler K, Cullen PJ, Korswagen HC (2011) A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion. *Nature Cell Biology* 13:914–923.
- Hegle AP, Nazzari H, Roth A, Angoli D, Accili EA (2010) Evolutionary emergence of N-glycosylation as a variable promoter of HCN channel surface expression. *Am J Physiol, Cell Physiol* 298:C1066–C1076.
- Huang Z, Lujan R, Kadurin I, Uebele VN, Renger JJ, Dolphin AC, Shah MM (2011) Presynaptic HCN1 channels regulate CaV3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat Neurosci* 14:478–486.
- Huang Z, Lujan R, Martinez-Hernandez J, Lewis AS, Chetkovich DM, Shah MM (2012) TRIP8b-Independent Trafficking and Plasticity of Adult Cortical Presynaptic HCN1 Channels. *J Neurosci* 32:14835–14848.
- Ingham RJ, Gish G, Pawson T (2004) The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Nature* 23:1972–1984.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153:163–168.

- Jespersen T, Membrez M, Nicolas C, Pitard B, Staub O, Olesen S, Baro I, Abriel H (2007) The KCNQ1 potassium channel is down-regulated by ubiquitylating enzymes of the Nedd4/Nedd4-like family. *Cardiovasc Res* 74:64–74.
- Johannes L, Wunder C (2011) The SNXy flavours of endosomal sorting. *Nature Cell Biology* 13:884–886.
- Kabra R, Knight KK, Zhou R, Snyder PM (2008) Nedd4-2 induces endocytosis and degradation of proteolytically cleaved epithelial Na⁺ channels. *J Biol Chem* 283:6033–6039.
- Kamynina E, Debonneville C, Hirt RP, Staub O (2001) Liddle's syndrome: A novel mouse Nedd4 isoform regulates the activity of the epithelial Na⁺ channel. *Kidney International* 60:466–471.
- Kaupp UB, Seifert R (2001) Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* 63:235–257.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lai HC, Jan LY (2006) The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nature Reviews Neuroscience* 7:548–562.
- Lewis AS, Estep CM, Chetkovich DM (2010) The fast and slow ups and downs of HCN channel regulation. *Channels (Austin)* 4:215–231.
- Lewis AS, Schwartz E, Chan CS, Noam Y, Shin M, Wadman WJ, Surmeier DJ, Baram TZ, Macdonald RL, Chetkovich DM (2009) Alternatively Spliced Isoforms of TRIP8b Differentially Control h Channel Trafficking and Function. *J Neurosci* 29:6250–6265.
- Lewis AS, Vaidya SP, Blaiss CA, Liu Z, Stoub TR, Brager DH, Chen X, Bender RA, Estep CM, Popov AB, Kang CE, Van Veldhoven PP, Bayliss DA, Nicholson DA, Powell CM, Johnston D, Chetkovich DM (2011) Deletion of the Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel Auxiliary Subunit TRIP8b Impairs Hippocampal I_h Localization and Function and Promotes Antidepressant Behavior in Mice. *J Neurosci* 31:7424–7440.
- Lin A, Hou Q, Jarzylo L, Amato S, Gilbert J, Shang F, Man H-Y (2011) Nedd4-mediated AMPA receptor ubiquitination regulates receptor turnover and trafficking. *Journal of Neurochemistry* 119:27–39.
- Lörincz A, Notomi T, Tamás G, Shigemoto R, Nusser Z (2002) Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nature* 5:1185–1193.
- Lujan R, Albasanz JL, Shigemoto R, Juiz JM (2005) Preferential localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel subunit HCN1 in basket cell terminals of the rat cerebellum. *European Journal of Neuroscience* 21:2073–2082.
- Lupica CR, Bell JA, Hoffman AF, Watson PL (2001) Contribution of the hyperpolarization-activated current (I_h) to membrane potential and GABA release in hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 86:261–268.

- Maccaferri G, McBain CJ (1996) The hyperpolarization-activated current (I_h) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *J Physiol (Lond)* 497 (Pt 1):119–130.
- Magee JC (1998) Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 18:7613–7624.
- McCormick DA, Pape H-C (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol (Lond)* 431:291–318.
- Mellman I (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annual review of cell and developmental biology* 12:575–625.
- Miranda M, Sorkin A (2007) Regulation of Receptors and Transporters by Ubiquitination: New Insights into Surprisingly Similar Mechanisms. *molecular interventions* 7:157–167.
- Misonou H, Mohapatra DP, Park EW, Leung V, Zhen D, Misonou K, Anderson AE, Trimmer JS (2004) Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nat Neurosci* 7:711–718.
- Mizutani R, Yamauchi J, Kusakawa S, Nakamura K, Sanbe A, Torii T, Miyamoto Y, Tanoue A (2009) Sorting nexin 3, a protein upregulated by lithium, contains a novel phosphatidylinositol-binding sequence and mediates neurite outgrowth in N1E-115 cells. *Cellular Signalling*:1586–1594.
- Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (1999) Differential Distribution of Four Hyperpolarization-Activated Cation Channels in Mouse Brain. *Biological Chemistry* 380:975–980.
- Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, Biel M (2003) Role of Subunit Heteromerization and N-Linked Glycosylation in the Formation of Functional Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels. *Journal of Biological Chemistry* 278:43781–43786.
- Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315:201–205.
- Munton RP, Tweedie-Cullen R, Livingstone-Zatchej M, Weinandy F, Waidelich M, Longo D, Gehrig P, Potthast F, Rutishauser D, Gerrits B, Panse C, Schlapbach R, Mansuy IM (2006) Qualitative and Quantitative Analyses of Protein Phosphorylation in Naive and Stimulated Mouse Synaptosomal Preparations. *Molecular & Cellular Proteomics*:283–293.
- Noam Y, Zha Q, Phan L, Wu RL, Chetkovich DM, Wadman WJ, Baram TZ (2010) Trafficking and Surface Expression of Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 285:14724–14736.
- Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, Buhl DL, Santoro B, Gibbs E, Vronskaya S, Buzsáki G, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2004) A Behavioral Role for Dendritic Integration. *Cell* 119:719–732.

- Notomi T, Shigemoto R (2004) Immunohistochemical localization of I_h channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *European Journal of Neuroscience* 471:241–276.
- Pape H-C (1996) Queer Current and Pacemaker: The Hyperpolarization-Activated Cation Current in Neurons. *Annu Rev Physiol* 58:299–327.
- Piskorowski R, Santoro B, Siegelbaum SA (2011) TRIP8b Splice Forms Act in Concert to Regulate the Localization and Expression of HCN1 Channels in CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron* 70:495–509.
- Poolos NP, Bullis JB, Roth MK (2006) Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 26:7995–8003.
- Proenza C, Tran N, Angoli D, Zahynacz K, Balcar P, Accili EA (2002) Different roles for the cyclic nucleotide binding domain and amino terminus in assembly and expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 277:29634–29642.
- Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated Cation Currents: From Molecules to Physiological Function. *Annu Rev Physiol* 65:453–480.
- Rotin D, Kumar S (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:398–409.
- Rotin D, Staub O, Haguenaer-Tsapis R (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 176:1–17.
- Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA (2000) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* 20:5264–5275.
- Santoro B, Hu L, Liu H, Saponaro A, Pian P, Piskorowski RA, Moroni A, Siegelbaum SA (2011) TRIP8b Regulates HCN1 Channel Trafficking and Gating through Two Distinct C-Terminal Interaction Sites. *J Neurosci* 31:4074–4086.
- Santoro B, Piskorowski RA, Pian P, Hu L, Liu H, Siegelbaum SA (2009) TRIP8b Splice Variants Form a Family of Auxiliary Subunits that Regulate Gating and Trafficking of HCN Channels in the Brain. *Neuron* 62:802–813.
- Santoro B, Wainger BJ, Siegelbaum SA (2004) Regulation of HCN channel surface expression by a novel C-terminal protein-protein interaction. *J Neurosci* 24:10750–10762.
- Shi PP, Cao XR, Sweezer EM, Kinney TS, Williams NR, Husted RF, Nair R, Weiss RM, Williamson RA, Sigmund CD, Snyder PM, Staub O, Stokes JB, Yang B (2008) Salt-sensitive hypertension and cardiac hypertrophy in mice deficient in the ubiquitin ligase Nedd4-2. *Am J Physiol Renal Physiol*:F462–F470.
- Shin M, Brager D, Jaramillo TC, Johnston D, Chetkovich DM (2008) Mislocalization of h channel subunits underlies h channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 32:26–36.

- Southan AP, Morris NP, Stephens GJ, Robertson B (2000) Hyperpolarization-activated currents in presynaptic terminals of mouse cerebellar basket cells. *J Physiol (Lond)* 526:91–97.
- Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstråle K, Leuchowius K-J, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson L-G, Landegren U (2006) Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature Methods* 3:995–1000.
- Spang A (2011) Signalling gets sorted by retromer. *EMBO J* 30:2988–2989.
- Strochlic TI, Setty TG, Sitaram A, Burd CG (2007) Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *The Journal of Cell Biology* 177:115–125.
- Sudol M, Hunter T (2000) NeW wrinkles for an old domain. *Cell* 103:1001–1004.
- Temkin P, Lauffer B, Jäger S, Cimermancic P, Krogan NJ, Zastrow von M (2011) SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nature Cell Biology* 13:717–723.
- Tran N, Proenza C, Macri V, Petigara F, Sloan E, Samler S, Accili EA (2002) A conserved domain in the NH2 terminus important for assembly and functional expression of pacemaker channels. *J Biol Chem* 277:43588–43592.
- Trimmer JS, Rhodes KJ (2003) Localization of Voltage-Gated Ion Channels IN Mammalian Brain. *Annu Rev Physiol* 66:477–519.
- Trinidad JC (2006) Comprehensive Identification of Phosphorylation Sites in Postsynaptic Density Preparations. *Molecular & Cellular Proteomics* 5:914–922.
- Varga C, Lee SY, Soltesz I (2010) Target-selective GABAergic control of entorhinal cortex output. *Nat Neurosci* 13:822–824.
- Wegierski T, Hill K, Schaefer M, Walz G (2006) The HECT ubiquitin ligase AIP4 regulates the cell surface expression of select TRP channels. *EMBO J* 25:5659–5669.
- Wilkars W, Liu Z, Lewis AS, Stoub TR, Ramos EM, Brandt N, Nicholson DA, Chetkovich DM, Bender RA (2012) Regulation of Axonal HCN1 Trafficking in Perforant Path Involves Expression of Specific TRIP8b Isoforms. *PLoS ONE* 7:e32181.
- Worby CA, Dixon JE (2002) Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:919–931.
- Xu Y, Hortsman H, Seet L, Wong SH, Hong W (2001) SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nature* 3:658–666.
- Yu JW, Lemmon MA (2001) All phox homology (PX) domains from *Saccharomyces cerevisiae* specifically recognize phosphatidylinositol 3-phosphate. *J Biol Chem* 276:44179–44184.

- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature Cell Biology* 425:200–205.
- Zha Q, Brewster AL, Richichi C, Bender RA, Baram TZ (2008) Activity-dependent heteromerization of the hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide gated (HCN) channels: role of N-linked glycosylation. *Journal of Neurochemistry* 105:68–77.
- Zhang P, Wu Y, Belenkaya TY, Lin X (2011) SNX3 controls Wingless/Wnt secretion through regulating retromer-dependent recycling of Wntless. *Cell Res* 21:1677–1690.
- Zolles G, Wenzel D, Bildl W, Schulte U, Hofmann A, Müller CS, Thumfart J-O, Vlachos A, Deller T, Pfeifer A, Fleischmann BK, Roeper J, Fakler B, Klöcker N (2009) Association with the auxiliary subunit PEX5R/Trip8b controls responsiveness of HCN channels to cAMP and adrenergic stimulation. *Neuron* 62:814–825.

6 ANHANG

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Struktur einer HCN-Kanal-Untereinheit.....	4
Abbildung 1-2: Subzelluläre Lokalisation der HCN-Kanäle in verschiedenen Neuronenpopulationen der Hippocampusformation	6
Abbildung 1-3: Schematisches Modell der Funktion von TRIP8b in CA1 Pyramidenzelle....	10
Abbildung 3-1: Effekte der TRIP8b-Isoformen auf HCN1-Lokalisation in der MML des Gyrus dentatus.....	48
Abbildung 3-2: Expressionsanalyse von TRIP8b im entorhinalen Cortex	50
Abbildung 3-3: TRIP8b wird im entorhinalen Cortex altersabhängig exprimiert	52
Abbildung 3-4: Expression von HCN1-GFP und TRIP8b Isoformen nach Einzeltransfektion in undifferenzierter entorhinaler Dispersionskultur	54
Abbildung 3-5: Expression von HCN1-GFP und TRIP8b Isoformen nach Co-Transfektion in undifferenzierter entorhinaler Dispersionskultur	55
Abbildung 3-6: Expression von endogenem HCN1 und TRIP8b nach Transfektion von TRIP8b-Isoformen in differenzierter entorhinaler Dispersionskultur.....	57
Abbildung 3-7: HCN1 verfügt über ein „PY“-Motiv.....	59
Abbildung 3-8: HCN1 und Nedd4-2 interagieren <i>in vitro</i>	61
Abbildung 3-9: Übersicht der klonierten C-terminalen Deletionskonstrukte von HCN1	62
Abbildung 3-10: Nedd4-2 benötigt für die Interaktion mit HCN1 zwei verschiedene Motive	64
Abbildung 3-11: HCN1 präzipitiert zusammen mit Nedd4-2 <i>in vivo</i>	66
Abbildung 3-12: Nedd4-2 und HCN1 werden in denselben Zellen exprimiert	68
Abbildung 3-13: Nedd4-2 führt zur Ubiquitynylierung von HCN1	70
Abbildung 3-14: Nedd4-2 beeinflusst die Oberflächenexpression und den Glykosylierungsstatus von HCN1	73
Abbildung 3-15: SNX3 bindet an HCN1(1-131) in HEK293-Zellen	79
Abbildung 3-16: Keine klare Abgrenzung des Bindungsmotivs für SNX3 im N-Terminus von HCN1	80
Abbildung 3-17: SNX3 interagiert nicht mit dem C-Terminus von HCN1	81
Abbildung 3-18: SNX3 wird in verschiedenen Hirnregionen exprimiert	82
Abbildung 3-19: mRNA von SNX3 und HCN1 wird im Hippocampus und entorhinalen Cortex in denselben Zellen detektiert.....	83

Abbildung 3-20: Überlappende Expression von HCN1 und SNX3 im Hippocampus (HC) und entorhinalen Cortex (EC)	84
Abbildung 3-21: Interaktion von SNX3 mit HCN1 in entorhinaler Dispersionskultur in Abhängigkeit von Lithium-Stimulation	86
Abbildung 3-22: SNX3 hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von HCN1	87
Abbildung 4-1: Modell der Regulationsmöglichkeiten des endosomalen Transports von HCN1	101

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung aller verwendeten Primärantikörper	15
Tabelle 2: Zusammenfassung aller eingesetzten Sekundärantikörper	15
Tabelle 3: Zusammenfassung aller eingesetzten Oligonukleotide	17
Tabelle 4: Zusammenfassung aller eingesetzten Konstrukte	20
Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenngels.....	33
Tabelle 6: Zusammensetzung des Sammelgels	33
Tabelle 7: Ergebnisse des Yeast Two-Hybrid Screens	77

6.3 Publikationsverzeichnis

Originalveröffentlichungen

Stoenica L, **Wilkars W**, Battefeld A, Stadler K, Bender R, Strauss U (2013): HCN1 subunits contribute to the kinetics of Ih in neonatal cortical plate neurons. *Developmental Neurobiology*; Publikation zum Druck angenommen.

Vierk R, Glassmeier G, Zhou L, Brandt N, Fester L, Dudzinski D, **Wilkars W**, Bender RA, Lewerenz M, Gloger S, Graser L, Schwarz J, Rune GM (2012): Aromatase inhibition abolishes LTP Generation in female but not in male mice. *J Neurosci*, vol. 32 (24) pp. 8116-8126

Wilkars W*, Liu Z*, Lewis AS, Stoub TR, Ramos EM, Brandt N, Nicholson DA, Chetkovich DM, Bender RA (2012): Regulation of axonal HCN1 trafficking in perforant path involves expression of specific TRIP8b isoforms. *PLoS ONE*, vol. 7 (2) p. e32181

Rohde J, Kirschstein T, **Wilkars W**, Müller L, Tokay T, Porath K, Bender RA, Köhling R (2012): Upregulation of presynaptic mGluR2, but not mGluR3 in the epileptic medial perforant path. *Neuropharmacology*, vol. 62 (4) pp. 1867-1873

Bender RA, Zhou L, **Wilkars W**, Fester L, Lanowski JS, Paysen D, König A, Rune GM (2010): Roles of 17beta-estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus. *Cereb. Cortex*, vol. 20 (12) pp. 2985-2995

*: geteilte Erstautorenschaft

Posterbeiträge

Wilkars W, Liu Z, Lewis AS, Stoub TR, Ramos EM, Brandt N, Nicholson DA, Chetkovich DM, Bender RA: Regulation of axonal HCN1 trafficking in perforant path involves expression of specific TRIP8b isoforms.

8th FENS Forum of European Neuroscience 2012, Barcelona, Spanien

Wilkars W, Mohr E, Bender RA: Regulation of HCN1 subcellular trafficking may involve N-terminal interaction with Sorting Nexins.

9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2011, Göttingen

Wilkars W, Mohr E, Bender RA: Identification and characterization of potential binding partners influencing the trafficking of HCN1 channels.

105th Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft 2010, Hamburg,

6.4 Wissenschaftlicher Werdegang

Persönliche Daten

Name: Wiebke Wilkars
 Geboren am: 24.10.1983 in Kiel
 Nationalität: deutsch

Ausbildung

Seit 03/2009	<p>Promotion bei Prof. Dr. Roland Bender am Institut für Neuroanatomie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf „Regulation des subzellulären Transports von HCN1- Kanälen durch assoziierte intrazelluläre Proteine“</p>
10/2009-09/2011	<p>Aufbaustudiengang Molekularbiologie am Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universität Hamburg</p>
01/2007-07/2007	<p>Diplomarbeit bei Prof. Dr. Edmund Maser am Institut für Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein „Klonierung und Charakterisierung der humanen Dehydrogenasen/Reduktasen DHRS2 und DHRS4“</p>
10/2002-10/2007	<p>Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Staatsexamen 08/2004 2. Staatsexamen 11/2006 3. Staatsexamen 02/2008
05/2002	<p>Abitur Kieler Gelehrtenschule</p>

Danksagung

Viele Menschen waren an dem Entstehen dieser Arbeit beteiligt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken!

Herrn Prof. Dr. Roland Bender danke ich für die hervorragende Betreuung, für sein Engagement, seine Anregungen und seine Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für die gute Zusammenarbeit in den letzten vier Jahren.

Frau Prof. Dr. Gabriele Rune danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit im Institut für Neuroanatomie anfertigen zu können und für die Bereitstellung der dafür nötigen Mittel.

Bei PD Dr. Edgar Kramer möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jörg Ganzhorn danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen und die mir in den letzten vier Jahren sehr liebe Kollegen gewesen sind. Allen voran danke ich Dr. Nicola Brandt für ihre Hilfe bei allen großen und kleinen Problemen, nicht nur im Labor, für ihre Unterstützung und ihre Aufmunterung. Es war eine tolle Zeit!

Stephan, dir danke ich dafür, dass du immer für mich da bist und mich in allem, was ich tue, unterstützt und ermutigst. Ohne das Wissen, dass du mir den Rücken stärkst, wäre mir so Vieles schwerer gefallen.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, Gudrun und Robert Wilkars, die es mir ermöglicht haben, diesen Weg zu gehen und die mich immer bedingungslos unterstützt und an mich geglaubt haben. Ich danke euch aus vollem Herzen, dass ihr immer für mich da seid. Ich bin froh, euch stolz machen zu können!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Wiebke Wilkars, geboren am 24.10.1983, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Hamburg, den2013

.....

Wiebke Wilkars