

Ionenkanalmodulation durch Interferon in Layer V Pyramidenneuronen des somatosensorischen Cortex

Mechanismen und funktionelle Konsequenz

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Konstantin Stadler
aus Wien

Berlin 2011

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde an der

**Charité Universitätsmedizin Berlin
Centrum für Anatomie
Institut für Zell- und Neurobiologie**

im Bearbeitungszeitraum vom 01.03.2007 - 29.09.2011
unter der Leitung von PD Dr. Ulf Strauß
angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Ulf Strauß
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Joachim Pflüger

Disputation am 10. Februar 2012

Loud, heap miseries upon us yet entwine our arts
with laughters low!

James Joyce, Finnegans Wake (2:8 259.7)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	vii
Abstract	viii
1 Einleitung	1
1.1 Verhaltensbeeinflussende Symptome einer Infektion	1
1.1.1 <i>Sickness behaviour</i> - eine Strategie zur Infektionsbekämpfung . . .	1
1.1.2 Informationsfluss vom Immun- zum Nervensystem - Cytokine . . .	2
1.2 Interferone	3
1.2.1 Typ I Interferon	4
1.2.2 Typ II Interferon	6
1.2.3 Typ III Interferon	7
1.2.4 Nebenwirkungen einer Interferontherapie	7
1.2.5 Neuromodulation durch Interferon	7
1.3 Das corticale Layer V Pyramidenneuron	9
1.3.1 Der Cortex	9
1.3.2 Aufbau und Funktion des Layer V Pyramidenneurons	9
1.3.2.1 Morphologie	9
1.3.2.2 Signalverarbeitung	10
1.3.2.3 Subklassen	11
1.3.3 Ionenkanäle des Layer V Pyramidenneurons	11
1.3.3.1 Natriumkanäle	11
1.3.3.2 Kaliumkanäle	12
1.3.3.3 Kalziumkanäle	16
1.3.3.4 HCN Kanäle	17
1.4 Hypothesen	22
1.4.1 Interferon moduliert HCN Kanäle	23
1.4.1.1 Typ I Interferone vermindern den I_h	23
1.4.1.2 Interferon moduliert nur bestimmte HCN Untereinheiten	23
1.4.1.3 Auf welchem Weg erfolgt die HCN Modulation?	23
1.4.1.4 Die Reduktion des I_h hat funktionelle Konsequenzen . . .	24
1.4.2 Interferon moduliert weitere Ionenkanäle	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Verwendete Geräte und Hardware	25
2.2 Software	26
2.3 Reagenzien	26
2.3.1 Interferon	26
2.3.2 Blocker	27
2.3.3 Verwendete Lösungen	28
2.4 Versuchssysteme	29
2.4.1 Hirnschnitte	29

2.4.1.1	Versuchstiere	29
2.4.1.2	Präparation	29
2.4.2	Primärkultur	30
2.4.3	Transfektion von HEK293 mit HCN1 und HCN2	30
2.4.4	Simulationen	30
2.4.4.1	Resonanz Berechnung	30
2.4.4.2	NEURON Modell Umgebung	32
2.5	Datenerfassung im <i>patch clamp</i>	34
2.5.1	Allgemeine Versuchsdurchführung	35
2.5.2	Untersuchung des Resonanzverhaltens	37
2.6	Datenanalyse	39
2.6.1	Prozeduren	39
2.6.1.1	Experimentkontrolle	39
2.6.1.2	I_h Messungen	40
2.6.1.3	Resonanzmessungen	41
2.6.1.4	I_m Messungen	42
2.6.1.5	Eingangswiderstand und Feuerverhalten	42
2.6.2	Statistik	43
3	Resultate	46
3.1	Einfluss von Interferon auf I_h	46
3.1.1	Bestätigung des Effekts	46
3.1.1.1	IFN- β moduliert I_h cAMP unabhängig	46
3.1.1.2	IFN- β zeigt keinen Einfluss auf die Leckkomponente	50
3.1.2	Typ I und Typ II Interferone modulierten I_h	51
3.1.2.1	IFN- α	51
3.1.2.2	IFN- γ	53
3.1.3	Die Modulation des I_h beruht auf einer Aktivierung der neuronalen IFN-Signalkaskade	55
3.1.3.1	Ausschluss einer direkten IFN - HCN Kanalinteraktion	55
3.1.3.2	Ein rein neuronaler Effekt	56
3.1.4	Welche HCN Untereinheiten werden durch Interferon moduliert?	57
3.1.4.1	<i>In silico</i> Untersuchung	58
3.1.4.2	IFN- β Effekt in HCN1 -/- Mäusen	61
3.1.5	Funktionelle Konsequenzen der I_h Verminderung	63
3.1.5.1	Membranpotential	63
3.1.5.2	Resonanz	64
3.2	Einfluss von IFN- β auf das Feuerverhalten von Layer V Neuronen	66
3.2.1	Feuerverhalten vor und nach IFN- β	66
3.2.2	Multiple Kanalmodulationen durch IFN- β	68
3.2.2.1	BK Modell	68
3.2.2.2	Zuweisung der Kanaldichten	71
3.2.2.3	Test verschiedener Kanalmodulationen	73
3.2.3	IFN- β reduziert den I_m	75

4 Diskussion	76
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	76
4.1.1 Interferon moduliert HCN Kanäle	76
4.1.1.1 Typ I und Typ II Interferone vermindern den I_h	76
4.1.1.2 Interferon moduliert den HCN1 Kanal	77
4.1.1.3 Vermittlung des Effekts	78
4.1.1.4 Funktionelle Konsequenzen der I_h Modulation durch IFN	79
4.1.2 Interferon moduliert weitere Ionenkanäle	80
4.1.2.1 Bestätigung der Modulation des Feuerverhaltens	80
4.1.2.2 Multiple Ionenkanalmodulationen durch IFN	81
4.2 Implikationen	82
4.2.1 Erregungssteigerung durch I_h Verminderung	82
4.2.2 Vergleich mit anderen I_h reduzierenden Substanzen	83
4.2.3 PKC verbindet die IFN-Signalkaskaden mit den Ionenkanälen	84
4.2.4 Betrachtung des gesamten Effekts - <i>sickness behaviour</i>	86
4.2.4.1 I_h Veränderung aufgrund von Erkrankungen	86
4.2.4.2 IFN und Verhaltensänderungen	87
4.2.5 IFN, ein universeller Neuromodulator?	88
4.3 Methodenkritik	88
4.3.1 <i>Patch clamp</i>	88
4.3.2 Verwendete Interferonkonzentration	89
4.3.3 <i>In silico</i> Modell	89
4.4 Ausblick	90
4.4.1 Überprüfung der Rolle von PKC	90
4.4.2 Ausweitung der Untersuchungen	91
5 Literatur	93
A Abkürzungen und englisches Fachvokabular	108
B Abbildungsverzeichnis	112
C Tabellenverzeichnis	113
D Lebenslauf	114
E Selbstständigkeitserklärung	115

Zusammenfassung

Sich krank zu fühlen ist ein mentaler Vorgang. Die dabei auftretenden Symptome (Müdigkeit, Benommenheit, Appetitlosigkeit, Unaufmerksamkeit, allgemeines Unlustgefühl, ...) werden als Anpassung an die Erfordernisse des kranken Organismus aufgefasst (*sickness behaviour*). Die Ausbildung dieser Symptome setzt eine Kommunikation des Immunsystems mit dem Nervensystem voraus. Hierbei spielen Cytokine, wie bisher für die Klasse der Interleukine gezeigt, eine bedeutende Rolle. Auch die Applikation von Interferon im Zuge medizinischer Behandlungen (z. B. von Multipler Sklerose, Hepatitis C) führt zu grippeähnlichen neuronalen Symptomen. Des Weiteren reagieren Neurone auf eine direkte Gabe von Interferon mit einer erhöhten Erregbarkeit. Darauf basiert die zentrale Hypothese dieses Projektes: Interferon wirkt als Modulator neuronaler Ionenkanäle.

Die Erregbarkeit von Neuronen wird unter anderem durch die Charakteristik des *hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation* (HCN) Kanals bestimmt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sowohl Typ I Interferone (IFN- α und IFN- β) als auch das Typ II Interferon (IFN- γ) eine Reduktion und Verlangsamung des durch diesen Kanal vermittelten Stromes, I_h , in corticalen, somatosensorischen Layer V Pyramidenneuronen bewirken. Diese Modulation erfolgt auch ohne gliale Umgebung und ist abhängig von einem intakten Interferonsignalweg im Neuron. I_h spielt eine entscheidende Rolle bei der dendritischen Verarbeitung eintreffender Signale, u. a. durch die Beeinflussung des Frequenzverhaltens des Neurons. Die Applikation von Interferon bewirkt eine signifikante Änderung dieser Charakteristik.

Bisherige Untersuchungen zeigten eine Beeinflussung des neuronalen Feuerverhaltens durch Interferon. Dies kann in einer *in silico* Simulation eines Layer V Neurons nur dann reproduziert werden, wenn über die I_h Verminderung hinausgehende Kanalmodulationen (an mehreren Kalium- und Natriumkanälen) postuliert werden. *In vitro* Messungen am Kaliumstrom I_m bestätigen diese Hypothese.

Diese Studie zeigt, dass Interferon neben der klassischen, langsamen, antiviralen Cytokinwirkung auch als akuter Neuromodulator mehrerer Ionenkanäle fungiert. Dabei erfolgt eine gerichtete Verschiebung des neuronalen Zustandes: nach Interferon Applikation erhöht sich die Feuerrate, das Neuron beginnt bereits bei kleineren Strominjektionen zu feuern und reagiert sensitiver auf Eingangsströme mit niedrigerer Frequenz. Das Zusammenspiel der Kanalmodulationen hin zu einem Zustand höherer Erregbarkeit spricht gegen ein evolutionäres Epiphänomen durch die zufällige Überschneidung der antiviralen und Ionenkanal - Signalwege. Hingegen könnte die Neuromodulation durch Interferone eine der zellulären Grundlagen des *sickness behaviour* bilden.

Abstract

To feel sick is a mental process. The symptoms (fatigue, drowsiness, anorexia, impaired attention, ...) are considered as adaptations of the organism to overcome infections. The development of these symptoms requires the possibility of the immune system to communicate with the nervous system. Cytokines play an important part in this communication, which has been shown extensively for interleukins. Also the application of interferon during medical treatment (e. g. multiple sclerosis, Hepatitis C) leads to flu-like symptoms. On the cellular level, neurons respond to interferon with an increased excitability. Based on this, the central hypothesis of this study states the following: interferon acts as a modulator of neuronal ion channels.

The hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation (HCN) channel codetermines neuronal excitability. The results of this study show that both, type I interferons (IFN- α and IFN- β) and type II interferon (IFN- γ) reduce and slow down the current mediated by these channels (I_h) in layer V pyramidal neurons of the somatosensory cortex. The modulation does not depend on the glial environment, but on the functioning of the interferon signal pathway within neurons. I_h plays an important role at the dendritic computation, among others by influencing the frequency behaviour of neurons. The application of interferon causes a significant change of this characteristic.

Previous investigation showed an influence of interferon on the neuronal firing behaviour. In an *in silico* simulation of a layer V neuron, this result could only be reproduced by multiple ion channel modulations (HCN as well as potassium and sodium channels). One of the postulated modulations (on the potassium current I_m) could already be verified *in vitro*.

Classically, interferons were considered as slow acting, antiviral molecules. This survey shows, that in addition they also act as acute neuromodulators of various ion channels. Hereby an oriented shift of the neuronal state takes place: the application of interferon increases the firing rate gain, the neuron starts to fire at lower input currents and reacts stronger to incoming signals with lower frequencies. The interaction of all modulations to generate a state of higher excitability counts against an evolutionary epiphenomenon arising from coincidental overlapping of the antiviral and ion channel modulation signal pathways. In contrast, the neuromodulation by interferon may provide one cellular basis underlying the development of sickness behaviour.

1 Einleitung

Das Immun- und das Nervensystem ermöglichen angepasste Reaktionen des Organismus auf Umweltreize. Trotz unterschiedlicher Basiseinheiten (Leukozyten und Nervenzellen) sowie trennender Strukturen (Blut-Hirn-Schranke) bestehen vielfältige Kommunikationsmöglichkeiten zwischen den Systemen (Ziemssen und Kern 2007). So zeigt die Aktivierung des Immunsystems im Zuge einer Infektion eine Auswirkung auf das Verhalten des Organismus. Die Stoffklasse der Cytokine dient dabei als Botenstoff vom Immun- zum Nervensystem (Dantzer et al. 2008).

Der Cortex spielt eine Schlüsselrolle bei der Verarbeitung und Weiterleitung sensorischer Information. Im Cortex kontrollieren Pyramidenneurone des Layer V den Informationsfluss in andere, aktivitätsbeeinflussende Hirnregionen (Douglas und Martin 2004). Eine Beeinflussung der Erregbarkeit dieser Neurone durch ein Cytokin, IFN- β , konnte bereits gezeigt werden (Hadjilambreva et al. 2005). Dies lässt eine direkte Wirkung von IFN- β auf neuronale Ionenkanäle vermuten.

Die Hypothese, dass IFN- β als funktioneller Ionenkanalmodulator in Pyramidenneuronen des corticalen Layer V wirkt, wird in dieser Arbeit bestätigt und auf weitere Interferone ausgedehnt.

1.1 Verhaltensbeeinflussende Symptome einer Infektion

Oft werden wir uns einer Infektionskrankheit nur durch ihren Einfluss auf unseren mentalen Zustand bewusst. Wir fühlen uns krank durch Symptome wie Müdigkeit, Benommenheit, Appetitlosigkeit, Unaufmerksamkeit, generelle Unlust, . . . Diese Symptome sind nicht nur auf Menschen beschränkt, sondern können auch bei Tieren beobachtet und reproduziert werden (Hart 1988; Larson und Dunn 2001). Als Oberbegriff für diese Symptome, zusammen mit den neuroendokrinen Änderungen und Fieber, hat sich der Begriff „*sickness behaviour*“ etabliert (Kent et al. 1992; Dantzer 2009).

1.1.1 *Sickness behaviour* - eine Strategie zur Infektionsbekämpfung

Sickness behaviour ist eine evolutionäre Anpassung des Organismus zur Bekämpfung einer Infektion¹ (Hart 1988; Clark et al. 2008). Die auftretenden Symptome bewirken eine Einsparung von Energie und Ressourcen, die somit zur Infektionsbekämpfung zur Verfügung stehen; es kommt zu einem Wechsel des Motivationszustandes, die Aktivität wird eingeschränkt und das Schlafbedürfnis steigt (Aubert 1999). Unter dem Aspekt der Energiebereitstellung scheint hier die Appetitlosigkeit auf den ersten Blick kontraproduktiv, doch das Paradox klärt sich im Licht der Evolution: die Suche/Jagd nach

¹Fieber war das erste Symptom, für das eine solche vorteilhafte Wirkung gezeigt werden konnte. Tatsächlich stellte die Behandlung durch Fieber auslösende Injektionen (Malariaerreger), bis zur Entdeckung des Penicillins die einzig erfolgreiche Behandlungsmethode für Neurosyphilis dar (Hart 1988).

Nahrung ist bei Wildtieren mit einem hohen Energieaufwand verbunden; es besteht die Gefahr, entweder überhaupt keine Nahrung zu finden, oder in einem geschwächten Zustand einem Fressfeind gegenüberzustehen. Außerdem kann durch das Zurückziehen an einen geschützten Platz der Verlust an Körperwärme begrenzt werden (Hart 1988).

Neben den eher „motivationsbeeinflussenden“ (Aubert 1999) Symptomen verursachen Infektionen auch eine Reduktion der kognitiven Leistungen. Nachgewiesen werden konnten verlängerte Reaktionszeiten (Smith et al. 1998) und verminderte Gedächtnisleistungen (Larson und Dunn 2001).

Die adaptive Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion bewirkt eine überwiegend (Clark et al. 2008) adaptive Reaktion des Verhaltens des infizierten Organismus, d. h. eine Neuromodulation. Vice versa wirken Vorgänge im Nervensystem auch auf das Immunsystem (Marques-Deak et al. 2005; Ziemssen und Kern 2007).

1.1.2 Informationsfluss vom Immun- zum Nervensystem - Cytokine

Die neuromodulatorischen Auswirkungen einer Infektion implizieren eine Kommunikationsmöglichkeit des Immunsystems mit dem Nervensystem (Konsman et al. 2002; Cleeland et al. 2003). Prädestiniert für diese Aufgabe ist eine Klasse hormonähnlicher, löslicher Proteine: die Cytokine. Diese spielen eine große Rolle bei der Kommunikation zwischen Zellen, vor allem im Zuge der Regulation des Immunsystems (Tayal und Kalra 2008). Die Theorie, dass Cytokine die Signalstoffe des Immunsystems zum Zentralnervensystem (ZNS) sind, basiert auf einer Reihe von Arbeiten seit den frühen 1980'er Jahren, die neuronale und neurologische Veränderungen nach einer Cytokinapplikation zeigten (Smedley et al. 1983; Smith et al. 1988; Kent et al. 1992).

Am besten dokumentiert ist diese Wirkbeziehung bisher für das Cytokin Interleukin-1 (IL-1): Es wird im Zuge einer Infektion produziert und nach Applikation von IL-1 zeigen sich ähnliche Symptome wie bei einer Infektion. Im Gegenzug tritt bei der Blockade des IL-1 Rezeptors im Zuge einer Infektion ein vermindertes *sickness behaviour* auf. Allerdings kann die Wirkung von IL-1 nicht auf eine bestimmte Hirnregion oder auf die Aktivierung eines bestimmten Signalweges eingegrenzt werden und wird auch durch andere Cytokine moduliert (Konsman et al. 2002; Dantzer et al. 2008).

Sickness behaviour tritt nicht nur bei einer Entzündung innerhalb des ZNS auf, sondern ist ein Kennzeichen vieler, auch peripherer Infektionen. Wenn Cytokine als Botenstoffe des Signals „Krankheit“ oder „Infektion“ dienen, muss somit im Organismus eine Möglichkeit für Cytokine bestehen, mit den Parenchymzellen des Nervensystems zu interagieren. Übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass eine periphere Applikation von Cytokinen ausreicht, um im ZNS eine Cytokinwirkung (Expression von cytokinstimulierten Genen, Erhöhung des Cytokinspiegels im ZNS, *sickness behaviour*, ...) auszulösen (Wang et al. 2008; Banks und Erickson 2010). Als Möglichkeiten für eine Signalweiterleitung über die Blut-Hirn-Schranke kommen dafür in Frage (Banks und Erickson 2010):

- Stimulation afferenter Nervenfasern durch Cytokine
- Cytokinstimulierte Abgabe von Cytokinen durch Zellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden

- Transport von cytokinaktivierten Immunzellen durch die Blut-Hirn-Schranke, die daraufhin weitere Cytokine ausschütten
- Direkte Passage durch die Blut-Hirn-Schranke
- Cytokinstimulation der Neurone in den zirkumventrikulären Organen, die sich in der Regel auf der Außenseite der Blut-Hirn-Schranke befinden².

Für die Auslösung eines Cytokinsignals im ZNS müssen nur kleine Mengen durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden, da die Anwesenheit von Cytokine die Ausschüttung weiterer Cytokine, auch durch Neurone, stimuliert (Banks und Erickson 2010; Chakraborty et al. 2010).

Cytokine erfüllen alle Voraussetzungen, um die Information „Infektion“ an das Nervensystem weiterzuleiten. Dort lösen sie eine adaptive Verhaltensänderung, das *sickness behaviour*, aus, die der Bekämpfung der Infektion dient. Für das Cytokin Interleukin-1 konnte eine solche Wirkbeziehung bereits deutlich gezeigt werden. Allerdings besteht die Antwort eines Organismus auf eine Infektion in der Aktivierung eines ganzen Netzwerks von Cytokinen. Inwieweit eine andere Klasse von Cytokinen, die Interferone, neuromodulatorisch wirkt, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

1.2 Interferone

Die Ausschüttung von Interferonen ist ein Schlüsselpunkt bei der Aktivierung des Immunsystems. Sie wirken als immunstimulierende Faktoren mit antiviraler Aktivität und werden sowohl von spezifischen Abwehrzellen, als auch von virusinfizierten Zellen gebildet. Der Name „Interferon“ bezieht sich auch auf diese Wirkung, also mit der Replikation von Viren zu „interferieren“ (Isaacs und Lindenmann 1957). Allgemein können Interferone als „Proteine mit relativ speziesspezifischen antiviralen Effekten“ definiert werden (Borden et al. 2007).

Ein Organismus besitzt mehrere Möglichkeiten, eine Infektion durch einen Virus zu erkennen und darauf mit einer Interferonausschüttung zu reagieren. Dazu gehören unter anderem die Detektion von (i) extrazellulärer doppelsträngiger RNS (Ribonukleinsäure) oder (ii) endosomatische einfach- und doppelsträngige RNS und DNS (Desoxyribonukleinsäure) durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*) vor allem der Klasse TLR (*toll like receptors*). Zum anderen erkennen infizierte Zellen (iii) intrazelluläre virale RNS (diese aktiviert unterschiedliche RNS Helicasen und die daran angebunden Signalwege). Darüber hinaus scheint die Möglichkeit zu bestehen, dass Zellen auf (iv) organismusfremde DNS sowie (v) virale Proteine reagieren können³ (Randall und Goodbourn 2008; O'Neill und Bowie 2010).

²Allerdings sind die zirkumventrikulären Organe durch das Ependym von den inneren Hirnstrukturen getrennt. Eine Cytokinsignalweiterleitung über diese Struktur hinweg kann jedoch durch die oben besprochenen Mechanismen erfolgen.

³Neben einer viralen Infektion begegnen Zellen auch einer bakteriellen Infektion mit einer Interferonausschüttung. Letztere werden entweder durch die TLR erkannt oder die Zellen reagieren auf Ausscheidung oder Nukleinsäurebestandteile bereits lysierter Bakterien (Monroe et al. 2010).

Interferon dient als Signalfaktor und führt in den Zellen eines Organismus zur Expression einer Vielzahl von Genen. Diese bewirken einen „antiviralen“ Zustand, der auf die Verhinderung der viralen Reproduktion abzielt. Dies geschieht u. a. durch: den Stopp der Translation, die Degradation der zellulären RNS, eine Verhinderung des Transports der viralen RNS in den Zellkern und die Vermeidung der Ausbildung von *lipid rafts* (cholesterinreiche Mikrodomänen der Zellmembran, die für den Knospungsprozess einiger Viren notwendig sind). Des Weiteren wird in den infizierten Zellen der Zellzyklus eingefroren, ein pro-apoptotischer Zustand etabliert und u. U. eine Autophagie ausgelöst. Weitere immunmodulatorische Wirkungen führen zu einer gesteigerten Sensibilisierung gegenüber Interferon, der Produktion weiterer Interferone und Cytokine, einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems sowie der vermehrten Ausbildung und Aktivierung von Immunzellen (Schroder et al. 2004; Theofilopoulos et al. 2005; Randall und Goodbourn 2008).

Interferone werden aufgrund ihrer Aminosäuresequenz (Randall und Goodbourn 2008) in drei Typen unterteilt, die jeweils auch durch einen spezifischen Rezeptor gebunden werden:

1.2.1 Typ I Interferon

Die Familie der Typ I Interferone setzt sich aus unterschiedlichen Interferonen zusammen, von denen vor allem IFN- α und IFN- β für die ersten antiviralen Reaktionen auf eine Infektion mitverantwortlich sind (Savarin und Bergmann 2008). Weitere Mitglieder dieser Gruppe konnten bis jetzt im Menschen nicht nachgewiesen werden (IFN- δ und IFN- τ), oder sind in ihrem Vorkommen restringiert (IFN- η : Plazenta, IFN- κ : Keratinozyten). Allen Typ I Interferonen gemeinsam ist die tertiäre Struktur mit multiplen Alpha-helices (Bekisz et al. 2004; Theofilopoulos et al. 2005; Randall und Goodbourn 2008).

IFN- α : Diese Gruppe von Interferonen besteht aus bisher zwölf im Menschen identifizierten Proteinen mit z. T. nur geringfügigen Aminosäuresequenzunterschieden (Pestka et al. 2004; Moll et al. 2011). Funktionell unterscheiden sich die Subtypen durch ihre antivirale Aktivität gemessen an der ISG (Interferon stimulierte Gene) mRNA Expression (Moll et al. 2011). IFN- α wirkt vermutlich als Monomer (Pestka et al. 2004), das sich je nach Art aus 165 oder 166 Aminosäuren zusammensetzt und durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert wird (Bekisz et al. 2004). Eine frühere Klassifizierung beruht auf der Hauptquelle des jeweiligen Interferontyps, und nach dieser Klassifikation wird IFN- α als Leukozyteninterferon bezeichnet (Bekisz et al. 2004). Es existieren einige medizinische Anwendungen für IFN- α , dazu gehören u. a. die Behandlung von einigen Krebserkrankungen (malignen Melanomen, einigen Leukämien), *Condylomata acuminata* und chronischer Hepatitis B und C (Bekisz et al. 2004).

IFN- β : Bis jetzt konnte nur ein humanes IFN- β isoliert werden. Dieses besteht aus 166 Aminosäuren mit einer Disulfidbrücke (Bekisz et al. 2004). Die funktionelle Einheit ist wahrscheinlich ein Dimer (Pestka et al. 2004). Die auf der älteren Klassifikation basierende Bezeichnung für IFN- β lautet Fibroblasteninterferon. Therapeutisch

wird IFN- β zur Behandlung von multipler Sklerose eingesetzt (Bermel und Rudick 2007).

Die Bindung aller Typ I Interferone erfolgt durch den gleichen Rezeptorkomplex IFNAR (IFN- α/β -Rezeptor), der aus den zwei transmembranen Aminosäurketten (IFNAR1 und IFNAR2) besteht (siehe Abb. 1.1). Auf allen bisher untersuchten Vertebratenzellen konnten diese nachgewiesen werden (Bekisz et al. 2004), von unserer Arbeitsgruppe auch auf Layer V Pyramidenneuronen der Ratte (Stadler et al. in Rev.). Trotz Bindung an den gleichen Rezeptor zeigen IFN- α und IFN- β unterschiedliche Wirkungen (Der et al. 1998; Silva et al. 2002). Dies beruht auf der unterschiedlichen Affinität der Interferone zu den zwei Ketten des Rezeptors, die in weiterer Folge die Stabilität des Rezeptor-Liganden Komplexes beeinflussen (Jaitin et al. 2006; Jaks et al. 2007): diesem Modell zufolge liegen IFNAR1 und 2 in der Membran separiert vor. Typ I Interferone binden bevorzugt an IFNAR2 und in weiterer Folge bildet sich dann der IFNAR2-IFN-IFNAR1 Komplex, dessen Stabilität hauptsächlich von der Dissoziationskonstante des IFN zu den Ketten bestimmt wird.

Das cytoplasmatischen Ende von IFNAR1 assoziiert mit der Tyrosin Kinase 2 (TyK2) und das von IFNAR2 mit der Janus Kinase 1 (*just another kinase 1*, JAK1). Die Bindung von IFN führt zu einer Phosphorylierung von IFNAR1 durch TyK2 (an der Position Tyrosine 466) und bildet dadurch eine starke Kopplungsstelle für STAT2 (*signal transducer and activator of transcription 2*). Dieses wird dann in weiterer Folge ebenfalls von TyK2 phosphoryliert (Position Tyrosine 690), gleichzeitig auch STAT1 von JAK1 an der Position 701. STAT1 und STAT2 bilden daraufhin ein stabiles Heterodimer (Randall und Goodbourn 2008). Erst die Phosphorylierung von STAT2 ermöglicht den nukleären Transport des Dimers, der ansonsten durch einen beständigen Export des Moleküls aus dem Kern effektiv verhindert wird (Frahm et al. 2006). Das STAT1 und STAT2 Heterodimer bildet zusammen mit dem „Interferon Regulations Faktor 9“ (IRF-9) den „Interferon Stimulierten Gen Faktor 3“ (ISGF3) Komplex. In der Promotersequenz der meisten IFN stimulierten Gene befindet sich die ISRE (IFN-stimuliertes *response* Element) Sequenz. An dieses bindet der ISGF3 Komplex und startet dadurch die Transkription dieser Gene (Platanias 2005).

Neben diesen kanonischen existiert noch eine Vielzahl alternativer Signalwege (siehe Abb. 1.1). Zu diesen gehören u. a. unterschiedliche MAPK Wege (vor allem p38 und ERK), PI3K und die Aktivierung weiterer STAT Formen (Platanias 2005). Diese führen zu einer Überschneidung zwischen den Interferonsignalwegen. Allerdings werden nicht alle Signalwege in allen Zelltypen aktiviert (Platanias 2005). So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Applikation von IFN- β zu einer Aktivierung von TyK2 in corticalen Neuronen führt (der exprimierte Rezeptor also funktionell in der Membran vorhanden ist), ohne dass es dabei zu einer Regulierung von p38 kommt (Stadler et al. in Rev.).

Für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung ist eine Studie aus dem Jahr 2006 (Delhaye et al. 2006), die zeigte, dass Neurone im ZNS auf eine virale Enzephalitis mit einer Type I Interferonproduktion reagieren. Des Weiteren moduliert die Applikation von IFN- β die Proteinsynthese im ZNS (Beyer et al. 2009). Dieser Effekt ist mit dem anderen Typ I IFN (IFN- α) auch *in vivo* beobachtbar (Wang et al. 2008).

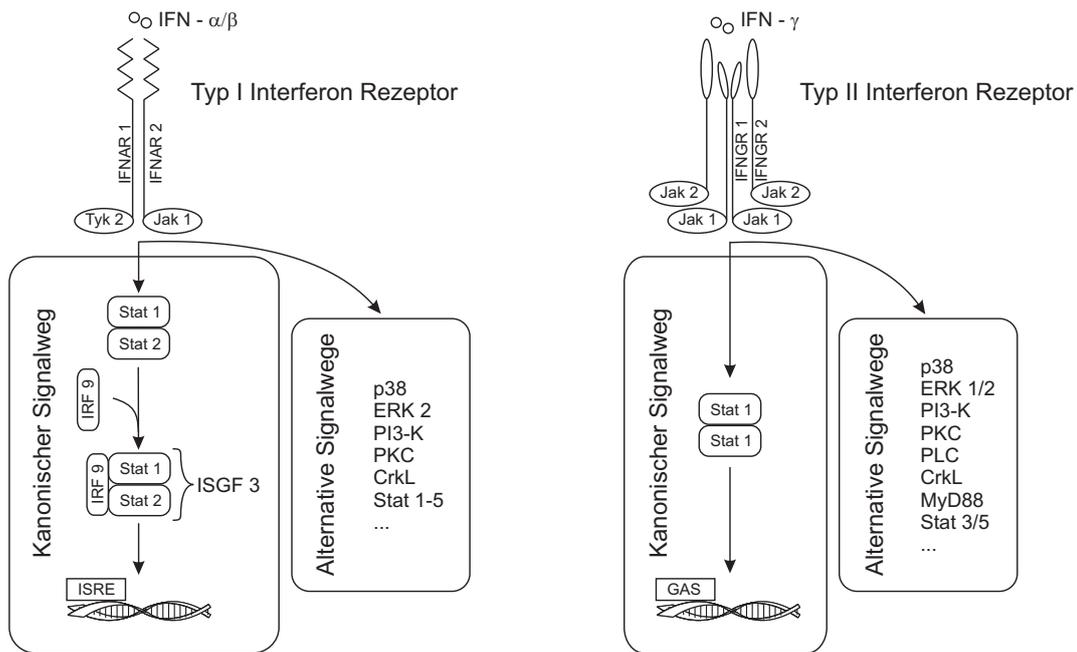


Abbildung 1.1: Überblick über die Typ I und Typ II Interferonsignalkaskaden. Die Abbildung wurde anhand der Daten in Uddin et al. (2002); Srivastava et al. (2004); Bekisz et al. (2004); Pestka et al. (2004); Kaur et al. (2005b); Kaur et al. (2005a); Katsoulidis et al. (2005); Takaoka und Yanai (2006); Stark (2007); Gough et al. (2008); Redig et al. (2009) angefertigt.

1.2.2 Typ II Interferon

Das einzige bisher bekannte Typ II Interferon ist IFN- γ (Lymphozyten Interferon, früher auch Makrophagen-Aktivierungs Faktor), das hauptsächlich von aktivierten Immunzellen (primäre T und NK Zellen, B-Zellen sowie APC Zellen) produziert wird (Schroder et al. 2004). Neurone des ZNS können auf IFN- γ reagieren (Chesler und Reiss 2002), und IFN- γ ist für die Kontrolle einer viralen Infektion im ZNS mitverantwortlich (Chakraborty et al. 2010; Stubblefield Park et al. 2011).

Strukturell unterscheidet sich IFN- γ von den Typ I Interferonen durch das Fehlen von Disulfidbrücken sowie der kürzeren Sequenz (140 Aminosäuren). Das Molekül ist in sechs Alpha-helices angeordnet und bildet ein Dimer (Pestka et al. 2004). Der Typ II Interferon spezifische Rezeptor (IFN- γ Rezeptor Komplex, IFNGR) besteht aus vier transmembranen Molekülen: 2 x IFNGR1 und 2x IFNGR2 (siehe Abb. 1.1). Im Gegensatz zu dem Typ I Interferonrezeptor sind die Untereinheiten des IFNGR schon vor der Bindung von IFN- γ miteinander verbunden (Krause et al. 2002). Intrazellulär sind die Rezeptorketten mit JAK1 bzw. JAK2 assoziiert. Wenn IFN- γ an den Rezeptorkomplex bindet, verursacht dies eine Konformationsänderung der Rezeptorketten, die in weiterer Folge eine gegenseitige Phosphorylierung von JAK1 und JAK2 und der intrazellulären Enden der Ketten bewirkt. Letzteres schafft eine Bindungsstelle für die SH2 Domäne von STAT1 an der Stelle 440 der

Kette IFN γ 1. Dies ermöglicht dann die Phosphorylierung des C-Terminus von Tyrosine Y701 an STAT1 und somit die Formung eines STAT1 Homodimers. Nach dem Transport in den Nucleus bindet dieses an die *gamma activated sequence* (GAS) in der Promoterregion der von IFN- γ regulierten Gene (Gough et al. 2008). Neben dieser kanonischen Formung des STAT1 Dimers kommt es auch zu einer Aktivierung mehrerer anderer STATs sowie wahrscheinlich auch von p38 und PI3K (Gough et al. 2008). Therapeutische Gaben von IFN- γ erfolgen unter anderem bei septischer Granulomatose (Platanias 2005).

1.2.3 Typ III Interferon

Die Gruppe der Typ III Interferone besteht aus IFN- λ 1 bis 3 (nach anderer Nomenklatur IL-28A, IL-28B und IL-29), die an den spezifischen Typ III Interferon Rezeptor, zusammengesetzt aus IFN- λ R1 und IL-10R2, binden. Intrazellulär sind die beiden Enden der Rezeptorketten mit JAK1 bzw. TyK2 assoziiert. Der weitere Signalweg der Typ III Interferone gleicht dem der Typ I Interferone, ebenso wie die dadurch ausgelöste antivirale Reaktion (Donnelly und Kotenko 2010).

1.2.4 Nebenwirkungen einer Interferontherapie

Die medizinische Anwendung von Interferon geht einher mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen, wobei neben Reaktionen an der Injektionsstelle, grippeähnliche Symptome zu den am häufigsten beobachteten gehören (Tayal und Kalra 2008). So führt eine IFN- α -Therapie im Zuge von Krebsbehandlungen zu Lethargie und Appetitlosigkeit und zu Veränderungen im EEG (Smedley et al. 1983; Rohatiner et al. 1985). Darüber hinaus entwickelt ein Teil der Patienten während einer IFN- α Therapie Anzeichen einer (reversiblen) Depression (Schiepers et al. 2005; Capuron et al. 2009; Dantzer et al. 2010). IFN- α spielt auch eine Rolle bei der Ausbildung der HIV assoziierten Demenz, wahrscheinlich durch die Reduzierung der dendritischen Verzweigung (Sas et al. 2009).

Fieber und weitere grippeähnliche Symptome gehören ebenfalls zu den häufigsten Nebenwirkungen einer IFN- β Therapie (Bermel und Rudick 2007; Clerico et al. 2007); Berichte über die Ausbildung einer Depression während einer IFN- β Therapie sind allerdings widersprüchlich (Zephir et al. 2003; Patten Scott et al. 2005; Fragoso et al. 2010).

Die Nebenwirkungen einer Behandlung mit IFN- γ ähneln denen einer Typ I Interferon Therapie (Bemiller et al. 1995; Tayal und Kalra 2008).

1.2.5 Neuromodulation durch Interferon

Eine vom Organismus erkannte Infektion führt zur Aktivierung eines Netzwerkes von Cytokinen, von denen wahrscheinlich mehrere an der Ausbildung der unterschiedlichen Symptome des *sickness behaviour* beteiligt sind (Konsman et al. 2002). Auf zellulärer Ebene konnte bisher gezeigt werden, dass IFN- α die Erregbarkeit der Neurone des zerebralen und zerebellaren Cortex erhöht (Calvet und Gresser 1979; Reyes-Vazquez et al. 1982) sowie im Hippocampus die Ausbildung von LTP (*long term potentiation*) hemmt

(D’Arcangelo et al. 1991; Mendoza-Fernández et al. 2000). In hippocampalen CA3 Pyramidenneuronen unterdrückt sowohl Typ I als auch Typ II Interferon die evozierten inhibitorischen postsynaptischen Potentiale und steigert somit die Erregbarkeit (Müller et al. 1993). *In vivo* bewirkt die direkte als auch periphere Applikation von IFN- α eine Steigerung der Feuerrate in Neuronen des Thalamus, Hippocampus und somatosensorischen Cortex der Ratte, während es im Hypothalamus zu einer Verminderung der Neuronenaktivität führt (Dafny et al. 1996).

Für IFN- β konnte gezeigt werden, dass es die neuronale Erregbarkeit in Layer II/III und Layer V Neuronen des somatosensorischen Cortex der Ratte nach Applikation steigert (Hadjilambrea et al. 2005). Zwei unterschiedliche Effekte von IFN- β liegen dieser Beobachtung zugrunde:

- IFN- β erhöht den Eingangswiderstand des Neurons im unterschweligen Bereich (um das Ruhemembranpotential, RMP) und beeinflusst somit die Membranzeitkonstante.
- Strominjektionen im überschweligen Bereich führen nach IFN- β Applikation zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl der Aktionspotentiale. Dieser Effekt setzt sich sowohl aus einer Steigerung des *gains* (Steigung der Aktionspotentialfrequenz-Strom (F-I) Kurve) als auch aus einer Verschiebung des Rheobase (Schwellenstromintensität bei der ein Aktionspotential ausgelöst wird) zusammen.

Beide Effekte sind dosisabhängig, wobei der halbe Effekt jeweils bei etwa 500 U ml^{-1} (Einheiten pro Milliliter) auftritt. Eine Sättigung der IFN induzierten Neuromodulation kann mit ca. 1000 U ml^{-1} erreicht werden. Der IFN- β Effekt auf den Eingangswiderstand kann nach einem Block der *hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated* (HCN, siehe 1.3.3.4 auf Seite 17) Kanäle mit ZD7288 nicht mehr beobachtet werden, während hingegen ein Block dieser Kanäle keinen Einfluss auf die Modulation des Feuerverhaltens hat. Versuche mit unterschiedlichen Blockersubstanzen deuten stattdessen auf eine Beteiligung des I_m , des kalziumaktivierten Kaliumstromes und des T - Typ Kalziumstromes bei der Veränderung des Feuerverhaltens hin. Dies lässt multiple Kanalmodulationen infolge einer IFN- β Gabe vermuten.

Erste Hinweise auf eine HCN Ionenkanalmodulation durch IFN- β lieferte auch eine Messung des durch diesen Kanaltyp fließenden Ionenstromes I_h vor und nach IFN- β Applikation. Hierbei konnte eine Reduktion des Stroms um etwa 25% in Layer V Pyramidenneuronen beobachtet werden. Diese Messungen erfolgten bei einem supramaximalen intrazellulären cAMP Gehalt (siehe 1.3.3.4 auf Seite 18) und zeigten eine große Schwankungsbreite. Die modulatorische Wirkung von IFN- β war auf einen funktionsfähigen IFNAR Rezeptorkomplex angewiesen; nach Blockade der dem Rezeptor nachgeschalteten JAK1 trat keine I_h Reduktion durch IFN- β auf (Daten aus der Dissertation von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.).

Die Modulation der neuronalen Erregbarkeit durch IFN- β in corticalen Neuronen stellt den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dar, bei der die neuromodulatorischen Auswirkungen von Interferon auf Layer V Pyramidenneurone detailliert untersucht werden sollen.

1.3 Das corticale Layer V Pyramidenneuron

Die Funktion des Nervensystems besteht in der Beschreibung einer stabilen Realität durch rekursive Rechenschritte (Foerster 1988). In Säugetieren spielt hierbei der Cortex eine zentrale Rolle, dessen Informationsweiterleitung in andere Hirnregionen durch Neurone der Schicht (Layer) V kontrolliert wird (Douglas und Martin 2004).

1.3.1 Der Cortex

Der typische sechsschichtige Cortex der Säugetiere („Isocortex“) entwickelte sich im Laufe der Evolution aus dem zwei- bis drei-schichtigen Cortex der Reptilien (Aboitiz 1999).

Signale der Sinnesorgane erreichen den Cortex beinahe ausschließlich über den Thalamus, der einen steuernden Einfluss auf die Menge und Art der an den Cortex weitergeleiteten Information ausübt (Sherman 2005). Die thalamocorticalen Verbindungen führen zu den Layern II-VI des Cortex (Brecht 2007), hauptsächlich innervieren sie hierbei den Layer IV (Thomson und Lamy 2007). Der Großteil der erregenden synaptischen Eingänge eines corticalen Neurons erfolgt allerdings über andere corticale Neurone, entweder aus der gleichen Hemisphäre (*corticocorticale ipsilaterale* Projektionen) oder aus der gegenüberliegenden (*callosal corticale* Projektionen) (Price et al. 2006). Analog dazu erfolgt der überwiegende Teil der axonalen Verbindungen innerhalb des Cortex. Subcorticale Ziele der corticalen Neurone sind unter anderem Striatum, Thalamus, Colliculi superiores, Claustrum, Pons und das Rückenmark (Thomson und Lamy 2007; Brecht 2007; Pierani und Wassef 2009). Eine besondere Rolle bei der Generierung der corticalen Ausgangssignale kommt dabei den Pyramidenneuronen des Layer V zu, die diese hauptsächlich aus Signalen von Neuronen des Layer II/III und anderen Layer V Neuronen berechnen (Douglas und Martin 2004).

1.3.2 Aufbau und Funktion des Layer V Pyramidenneurons

1.3.2.1 Morphologie

Namensgebend für diese Neurone ist das prominente, pyramidenförmige Soma, an dessen Spitze der apikale Dendritenbaum ansetzt (Zhu 2000). Je nach Subtyp des Neurons weist dieser eine bis mehrere Bifurkationsstellen auf, bevor er sich in Layer I des Cortex in kleinere Dendriten aufspaltet (*tuft region*). Auf der ganzen Länge des apikalen Dendritenbaum entspringen außerdem einzelne, kurze Dendritenstücke (*oblique dendrites*). Am Soma des Neurons setzen zahlreiche basale Dendriten an.

Alle Kompartimente eines Layer V Neurons weisen synaptische Eingänge auf, die hauptsächlich Signale aus anderen Gebieten des Cortex empfangen. Der Großteil der inhibitorischen, GABAergen Eingänge befindet sich am Soma und Axon des Neurons, während exzitatorische, glutamaterge Synapsen an dafür spezialisierten, dornenartigen Strukturen (*spines*) entlang der Dendriten ansetzen. Layer V Dendriten weisen zwei Eingangszonen auf: eine basale, in der überwiegend Signale aus der lokalen Umgebung des Neurons empfangen werden und eine distale, an der Signale aus weiter entfernten Hirnregionen das Neuron erreichen (Spruston 2008).

Die Axone der Layer V Pyramidenneurone enden ausschließlich in glutamatergen, exzitatorischen Synapsen. Die Projektionen zielen (i) in corticale Areale der gleichen oder anderen Hirnhemisphäre und (ii) zu verschiedenen subcorticalen Regionen, wie Colliculi superiores, Pons sowie Rückenmark und, als eine der Rückkopplungsinstanzen des Cortex, zum Thalamus (Douglas und Martin 2004; Schubert et al. 2007; Thomson und Lamy 2007; Brecht 2007).

1.3.2.2 Signalverarbeitung

Der überwiegende Teil der exzitatorischen Synapsen eines Layer V Neurons weist zwei ionotrope Rezeptorklassen auf: AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) und NMDA (*N*-methyl *D*-aspartate) Rezeptoren. AMPA Rezeptoren reagieren auf Glutamat mit einem Na^+ und K^+ Strom, der ein schnelles, kurzes, exzitatorisches (erregendes) postsynaptisches Potential (EPSP) bewirkt. Hingegen bewirkt die Öffnung der NMDA Rezeptoren einen Ioneneinstrom mit langsamerer Kinetik. NMDA Rezeptoren aktivieren nur bei gleichzeitiger Depolarisation, die den sonst vorherrschenden Mg^{2+} Block aufhebt. Neben Na^+ und K^+ leiten NMDA Rezeptoren auch Ca^{2+} , und spielen dadurch eine wichtige Rolle bei postsynaptisch getragener LTP und LTD (Feldman 2009). Die erste Verrechnungsinstanz an Dendriten bilden diese NMDA Rezeptoren: da eine Aktivierung dieser Rezeptoren nur bei gleichzeitiger Depolarisation erfolgt, ist dazu die synchrone Aktivierung mehrerer AMPA Rezeptoren erforderlich. Der Ionenstrom der NMDA Rezeptoren verstärkt die Depolarisation und ermöglicht damit die Öffnung weiterer NMDA Rezeptoren. Diese positive Rückkopplung kann zu einem sogenannten NMDA Spike anwachsen (London und Häusser 2005). Eine ausreichende Depolarisation durch mehrere solcher NMDA Spikes bewirkt dann an den Arealen besonders hoher Kalziumkanaldichte (*hotspots*) im Bereich der Hauptgabelungspunkten des apikalen Dendriten einen Kalzium Spike, der zum Soma weitergeleitet wird. Dort führt er in weiterer Folge zu einer Aktivierung von Natriumkanälen und zur Generierung eines Aktionspotentials. Die Integration an den basalen Dendriten erfolgt ähnlich, nur dass, aufgrund der Nähe zur Aktionspotentialinitiationszone, kein vermittelnder Kalzium Spike notwendig ist (Larkum et al. 2009).

Ein am initialen Axonsegment initiiertes Aktionspotential wandert einerseits entlang des Axons zu den Präsynapsen, andererseits findet in vielen Neuronen auch eine retrograde Weiterleitung in den Dendritenbaum statt. Diese sogenannte *backpropagation* tritt in Layer V Pyramidenneuron sowohl entlang des apikalen Dendritenbaumes (Stuart und Sakmann 1994) als auch in den basalen Dendriten auf (Acker und Antic 2009). Sie ermöglicht eine Rückkopplung des axonalen Ausgangs zu den Dendriten und moduliert dadurch das Feuerverhalten des Neurons. Zum einem geschieht dies durch eine Verminderung der Schwelle für dendritische Spikes, zum anderen durch einen direkten Einfluss auf die synaptische Effizienz (Waters et al. 2005).

1.3.2.3 Subklassen

Klassischerweise werden Layer V Pyramidenneurone in zwei Klassen eingeteilt: Typ 1 Zellen mit einem massiven apikalen Dendritenansatz und axonalen Verbindungen zu subcorticalen Regionen und Typ 2 Zellen mit einem schlankeren apikalen Dendriten und Verbindungen hauptsächlich zu der kontralateralen Hemisphäre oder dem ipsilateralen Striatum (Molnár und Cheung 2006). Neben den Projektionszielen sollen diese zwei Typen auch durch deren Feuerverhalten unterschieden werden können: in Typ 1 Zellen träfen Aktionspotentiale in *bursts* (Gruppen schnell aufeinander folgender Aktionspotentiale) auf, während Typ 2 Zellen ein regelmäßiges bzw. adaptierendes Feuerverhalten zeigten. Wahrscheinlich tritt diese elektrophysiologische Unterscheidung nicht in allen Regionen des Cortex klar zu Tage und ist auch durch die Präparationsmethode bedingt (pers. obs.; Hattox und Nelson 2007; Kole 2011). Stattdessen wird derzeit angenommen, dass unterschiedliche, z. T. auch morphologisch differenzierbare Subpopulationen von Layer V Pyramidenneuronen existieren: abhängig vom Projektionsziel (Thalamus, Striatum, kontralateraler Cortex, Tektum, . . .) des Neurons weisen diese ein unterschiedliches Feuerverhalten und eine spezifische Aktionspotentialcharakteristik auf (Otsuka und Kawaguchi 2008; Hattox und Nelson 2007).

1.3.3 Ionenkanäle des Layer V Pyramidenneurons

Die Erregbarkeit von Nervenzellen beruht auf dem Ionengradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum. Dieser ist gleichbedeutend mit einer unterschiedlichen Verteilung von elektrischer Ladung, die durch die isolierenden Eigenschaften der Zellmembran getrennt werden. Neben dem aktiven Ionentransport durch Ionenpumpen stellen Kanäle die einzige Möglichkeit für Ionen dar, die Membran zu passieren. Ein solcher Ionenfluss resultiert in einer Membranspannungsänderung: einem elektrischen Signal. An der Generierung dieser Signale sind Natrium-, Kalium-, Kalzium- und Chloridionen beteiligt (Johnston und Wu 1994).

Alle Kompartimente eines Neurons weisen Ionenkanäle auf (Stuart und Sakmann 1994). Diese stellen die Grundbausteine der neuronalen Informationsverarbeitung und -weiterleitung dar. Hier erfolgt eine Darstellung der für diese Arbeit wichtigen Ionenkanäle, mit besonderer Berücksichtigung des HCN - und M - Typ Kanals sowie der für die Modellierung notwendigen Kanäle.

1.3.3.1 Natriumkanäle

Transiente Natriumkanäle

Transient (d. h. kurzzeitig) öffnende Natriumkanäle sind hauptverantwortlich für die schnelle Depolarisation zu Beginn eines Aktionspotentials, hervorgerufen durch den Einstrom von Na^+ Ionen. Das initiale Segment des Axons weist die höchste Dichte dieser Kanäle auf und ermöglicht somit die Auslösung der somatisch-axonalen Aktionspotentiale. Erleichtert wird dies zusätzlich durch eine hyperpolarisierte Aktivierungs- und Inaktivierungskurve der dort lokalisierten Natriumkanäle. Wahrscheinlich ist dies auf eine

spezifische Expression des Natriumkanal Subtyps NaV1.6 am initialen Axonsegment zurückzuführen. Hingegen bestehen somatodendritisch lokalisierte Natriumkanäle vermutlich hauptsächlich aus den Subtypen NaV1.1 bis NaV1.3. Die (In)Aktivierungscharakteristik der entsprechenden Subtypen spricht für diese Hypothese (Kole et al. 2008).

Die Dichte der Natriumkanäle am Dendriten weist keine Distanzabhängigkeit auf (Migliore und Shepherd 2002). Ihre Funktion besteht hier in der Unterstützung der *backpropagation* (Spruston 2008) und der lokalen NMDA Spikes in der dendritischen *tuft* Region vor den Kalziumkanal *hotspots* (Larkum et al. 2009).

Persistierende Natriumkanäle

Neben dem transienten tritt in Layer V Neuronen auch ein persistierender Na^+ Strom, I_{nap} , auf. Dieser wird von einer Subpopulation der auch für den transienten Strom verantwortlichen Kanäle generiert, die eine stark verlängerte oder komplett fehlende Inaktivierung aufweisen. Vermutet wird, dass der Natriumkanal Subtyps NaV1.6 dem I_{nap} zugrunde liegt. In Übereinstimmung damit, tritt der I_{nap} hauptsächlich im Bereich des Axons und Axonhügels auf (Astman et al. 2006). Die funktionelle Wirkung der persistierenden Natriumkanäle besteht in der Modulation des neuronalen Feuer- (Franceschetti et al. 2000) und Resonanzverhaltens (Hutcheon und Yarom 2000).

1.3.3.2 Kaliumkanäle

Diese diverse Gruppe von Kanälen begrenzt die neuronale Erregbarkeit: ein geöffneter Kaliumkanal ermöglicht das Ausströmen von K^+ Ionen (bis zum Umkehrpotential von etwa -90 mV) und verursacht dadurch eine Hyperpolarisation bzw. bremst eine stattfindende Depolarisation.

Basierend auf der Anzahl der transmembranen Domänen (TMD) können drei Gruppen von Kalium Kanälen unterschieden werden (Coetzee et al. 1999):

1. Kaliumkanäle mit zwei TMD. Die beiden TMD dieser Kanäle bilden eine porrenformende Region (P - Domäne). Die funktionelle Einheit besteht aus einem Tetramer. Nominell erlauben diese Kanäle ausschließlich einen Kaliumstrom in die Zelle: Kir - *inward rectifier* K^+ Kanäle. Die Einwärtsgleichrichtung entsteht durch einen Block des Auswärtstromes durch divalente Kationen oder Polyamine. (Hibino et al. 2010). Funktionell und aufgrund ihrer molekularen Zusammensetzung können vier Klassen von Kir Kanälen unterschieden werden: klassische Kir Kanäle (Kir2.o), G-Protein gesteuerte Kir Kanäle (Kir3.0), ATP sensitive Kir Kanäle (Kir6.0) und K^+ Transport-Kanäle (Kir1.0, 4.0 und 7.0), mit jeweils mehreren Vertretern auch im ZNS. Die Funktion der Kanäle besteht dort in der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials (Hibino et al. 2010).
2. Kaliumkanäle mit vier TMD. Die strukturelle Basis für die zweite große Gruppe von Kaliumkanälen bilden Moleküle mit vier TMD, die zwei P - Domänen ausbilden. Die funktionelle Einheit besteht aus einem Homo- oder Heterodimer. Zur Zeit wird diese Gruppe von Kanälen in sechs Klassen unterteilt (Honoré 2007; Enyedi und Czirják 2010), von denen bisher TWIK (*tandem of P domains in weak inward rectifier K^+ channel*), TASK (TWIK related acid-sensitive K^+ channel), TREK (TWIK related

K^+ channel) und TRAAK (TWIK related arachidonic acid stimulated K channel) im Neocortex nachgewiesen werden konnten (Talley et al. 2001). Kaliumkanäle mit vier TMD spielen eine herausragende Rolle bei der neuronalen Informationsverarbeitung, da sie beim Ruhemembranpotential geöffnet sind. Verschiedene Vertreter dieser Gruppe, z. B. die TASK Kanäle, stimmen in ihrer Charakteristik mit der Definition eines Leckkanals überein: der Aktivierungszustand dieser Kanäle ist in weiten Bereichen weder spannungs- noch zeitabhängig (Lesage und Lazdunski 2000) und determiniert somit, zusammen mit anderen Kanälen, das Ruhemembranpotential (Meuth et al. 2006).

3. Kaliumkanäle mit sechs TMD. Diese Kanäle weisen eine P - Domäne zwischen dem fünften und sechsten TMD auf. Der funktionsfähige Kanal besteht aus einem Tetramer, bei dem die P - Domänen der einzelnen Moleküle zusammen die Durchflussöffnung bilden. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe werden im folgenden vorgestellt.

A - Typ Kalium Strom

Dieser transiente Kaliumstrom zeichnet sich durch seine schnelle Kinetik aus: die Aktivierung erfolgt beinahe instantan (spannungsabhängig mit einer Zeitkonstante von ca. ein bis zwei Millisekunden), die Inaktivierung mit einer Zeitkonstante von etwa 10 ms (Locke und Nerbonne 1997). Trotz der relativ hohen U_h von -20 mV tritt dank der breiten Aktivierungskurve von $k = 17$ mV (Inaktivierung: -80 mV mit einem k von -7 mV, Werte gerundet nach Bekkers 2000b) bereits bei -50 mV ein messbarer A - Typ Kaliumstrom auf (Locke und Nerbonne 1997). Aufgrund der schnellen Aktivierung fließt dieser bei einer Depolarisation schon vor der Öffnung der Natriumkanäle und moduliert somit den Zeitpunkt der Aktionspotentialauslösung (Debanne 2004; Covarrubias et al. 2008). Daneben bestimmt das Ausmaß des A - Typ Kaliumstroms auch die Größe und Reichweite der *backpropagation* mit (Migliore et al. 1999; Gasparini 2011). Die dendritische Verteilung der diesem Strom zugrunde liegenden Kanäle stellt einen wesentlichen Unterschied zwischen den CA1 Pyramidenneuronen des Hippocampus und den Layer V Pyramidenneuronen des Cortex dar: während in ersteren die Dichte mit der Distanz vom Soma zunimmt, ist in letzteren die Kanaldichte distanzunabhängig (Bekkers 2000a; Migliore und Shepherd 2002).

D - Typ Kalium Strom

Dieser Strom ähnelt dem A - Typ Kaliumstrom hinsichtlich seiner (In)Aktivierungsparameter, allerdings mit einer langsameren Kinetik. Die ebenfalls spannungsabhängige Aktivierungszeitkonstante beträgt zwischen zwei und fünf Millisekunden, die Zeitkonstante der Inaktivierung etwa 600 ms (Locke und Nerbonne 1997).

D - Typ Kaliumströme bilden den Hauptteil ($>90\%$) der schnell aktivierenden Kaliumströme des Axons und Axonhügels. Hier modulieren sie die Breite des Aktionspotentials und in weiterer Folge den Ausstoß von Neurotransmittern an der Präsynapse, abhängig vom Aktivitätszustand des Neurons vor dem Aktionspotential (Kole et al. 2007). Am Dendritenbaum scheinen D - Typ Kaliumströme nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Chen und Johnston 2004; Yuan und Chen 2006).

Delayed rectifier Kalium Strom

Im Vergleich zu den beiden bisher genannten Kaliumströmen zeigt dieser eine deutlich langsamere Kinetik bei ansonsten vergleichbaren (In)Aktivierungsparametern: die Aktivierungszeitkonstante beträgt zwischen 10 ms und 40 ms, für die Inaktivierung wurden Zeitkonstanten über 4 s gemessen (Locke und Nerbonne 1997). *Delayed rectifier* Kaliumströme treten bevorzugt in der perisomatischen Region auf, entlang des apikalen Dendriten nimmt die Stromdichte exponentiell ab (Schaefer et al. 2007). Neuere Befunde konnten den diesem Strom hauptsächlich zugrunde liegende Kaliumkanalsubtyp, Kv2.1., auch am initialen Axonsegment nachweisen (Sarmiere et al. 2008). *Delayed rectifier* Kaliumströme spielen eine wesentliche Rolle bei der Repolarisation während einer höherfrequenten (>1 Hz) Aktionspotentialsequenz (Du et al. 2000).

M - Typ Kalium Strom

Den M - Typ Kaliumstrom (I_m) kennzeichnet eine langsame (De-)Aktivierung (im Bereich von 100 ms bis 250 ms, spannungsabhängig) und eine fehlende bzw. stark verzögerte Inaktivierung. Aufgrund seiner Aktivierungsparameter (U_h zwischen -60 mV und -10 mV, k im Bereich von 10 mV bis 20 mV) tritt bereits beim RMP ein I_m auf (Chen und Johnston 2004; Jensen et al. 2007; Shah et al. 2008; Brown und Passmore 2009).

Zur Zeit sind fünf Untereinheiten des diesen Stroms zugrunde liegenden Kanals bekannt (Kv7.1 bis Kv7.5). Dem I_m in hippocampalen Neuronen liegen hauptsächlich die nicht inaktivierenden Untereinheiten Kv7.2 und Kv7.3 zugrunde, sowie die inaktivierende Untereinheit Kv7.5 (Shah et al. 2002; Brown und Passmore 2009). Für CA1 Neurone konnte gezeigt werden, dass diese zum größten Teil im initialen Axonsegment lokalisiert sind. Eine geringere Dichte findet sich in der perisomatischen Region, während in den distalen Dendriten dieser Kanaltyp nur selten vorkommen (Shah et al. 2008; Hu et al. 2007). Für corticale Pyramidenneurone fehlt bis dato eine kompartimentspezifische Untersuchung der zugrunde liegenden Untereinheiten, allerdings konnten Kv7.2 und Kv7.3 in kultivierten corticalen Neuronen nachgewiesen werden (Zhou et al. 2011).

Die generelle Rolle des I_m liegt in der Verminderung der neuronalen Erregbarkeit. Dies geschieht auf mehreren Ebenen:

Bestimmung des RMP. Dies geschieht durch den bereits beim RMP fließenden I_m .

Offensichtlich wird der Einfluss des I_m bei Blockade des Stroms, die zu einer Depolarisation des RMP um bis zu 9 mV führt (Shah et al. 2008).

Stabilisierung des RMP. Exzitatorische Signale führen zu einer Depolarisation des RMP.

Dies bringt das Neuron einerseits näher an die Schwelle, andererseits führt es zu einer weiteren Aktivierung von M - Typ Kaliumkanälen. Der dadurch bedingte K^+ Einstrom schwächt den Einfluss der erregenden Signale (George et al. 2009).

Resonanz. Die Aktivierungscharakteristik des I_m ermöglicht im Zusammenspiel mit den passiven neuronalen Parametern die Ausbildung eines Resonanzverhaltens im relativ zum RMP depolarisierten Spannungsbereich (Hu et al. 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus gleicht hier der durch den I_h bestimmten Resonanz im hyperpolarisierten Bereich und wird dort behandelt (siehe Kapitel 1.3.3.4 auf Seite 21).

Erhöhung der Aktionspotentialschwelle. Die axonal vorhandenen M - Typ Kaliumkanäle beeinflussen die Aktionspotentialschwelle, eine Blockade der Kanäle reduziert die Feuerschwelle um ca. 8 mV. Zusammen mit der depolarisierenden Wirkung einer I_m Reduktion führt ein vollständiger Block des I_m zu spontan feuernenden CA1 Neuronen (Shah et al. 2008).

Generierung der Hyperpolarisation nach einem Aktionspotential (*after hyperpolarization*, AHP). Der M - Strom spielt eine wichtige Rolle bei der Re- und Hyperpolarisation nach einem Aktionspotential. Die AHP verläuft in drei Phasen: einer schnellen, durch schnelle (kalziumabhängige BK) Kaliumkanäle vermittelten, (*fast*) fAHP; einer mittleren (*medium*) mAHP und einer langsamen (*slow*) sAHP. In CA1 Pyramidenneuronen bestimmt der I_m das mAHP: Ein Aktionspotential führt zur Öffnung der M - Typ Kaliumkanäle, die aufgrund der relativen langsamen Kanalkinetik auch nach der Spitze der Depolarisation noch weiterbesteht. Der dadurch verursachte K^+ Ausstrom führt zu einer Hyperpolarisation des Neurons (Gu et al. 2005). In Übereinstimmung damit führt eine Reduktion des I_m zu einer Erhöhung der Feuerrate bei gleicher Strominjektion (Brown und Passmore 2009). Die molekulare Grundlage des mAHP in anderen Neuronentypen konnte bis jetzt nicht restlos geklärt werden, klassischerweise werden auch SK Kanäle im Zusammenhang mit dem mAHP genannt (Faber und Sah 2007; Gu et al. 2008).

Kontrolle der Depolarisation nach einem Aktionspotential. Die Depolarisation durch ein Aktionspotential aktiviert persistierende Natriumkanäle. Nach der ersten schnellen fAHP bedingen diese eine, in der Regel kurze, Depolarisation (*after depolarisation*, ADP), deren Ausmaß durch I_m begrenzt wird. Bei einer Blockade des I_m kann das ADP hingegen die Aktionspotentialschwelle erreichen und ein neues Aktionspotential auslösen. Anstelle eines einzelnen wird so eine Gruppe schnell aufeinander folgender Aktionspotentiale (*bursts*) ausgelöst (Yue und Yaari 2004).

Kalzium abhängige Kaliumströme

Aufgrund ihrer Einzelkanalleitfähigkeit und Spannungsabhängigkeit können zwei Gruppen Kalzium abhängiger Kaliumströme unterschieden werden:

BK - Kanäle (*big potassium*). Diese Kanäle weisen eine große Einzelkanalleitfähigkeit von bis zu über 140 pS auf, etwa 10 mal mehr als die der übrigen spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Benhassine und Berger 2005). Die Öffnungswahrscheinlichkeit der BK Kanäle steigt sigmoidal (halbe Aktivierungskonzentration bei etwa 2 μ M) mit Erhöhung des Kalziumgehalts und erreicht bei etwa 10 μ M ihre Sättigung. Der Kalziumgehalt moduliert neben der maximal möglichen Öffnungswahrscheinlichkeit auch die Parameter der Spannungsabhängigkeit; mit dem Kalziumanstieg verschiebt sich U_h von etwa +150 mV bis -50 mV (Womack und Khodakhah 2002; Benhassine und Berger 2005).

Die für die Aktivierung der BK Kanäle notwendige Kalziumleitfähigkeit kann im Cytosol nur kleinräumig in der Nähe von Kalziumkanälen erreicht werden (Neher 1998). Dementsprechend zeigen BK Kanäle eine hohe Affinität zu Kalziumkanälen

(Benhassine und Berger 2005). Die schnelle Kinetik der BK Kanäle ermöglicht eine Aktivierung im Zuge eines einzelnen somatischen oder dendritischen Aktionspotentials (Womack und Khodakhah 2002).

BK Kanäle zeigen eine gleichmäßige Dichteverteilung im Soma und Dendriten (Benhassine und Berger 2005) mit allerdings unterschiedlichen Rollen je nach Kompartiment: somatische BK Kanäle tragen zur Repolarisation nach einem Natrium - Aktionspotential und somit zur fAHP bei, ein Block der BK Kanäle führt hier zu einem signifikant breiteren Aktionspotential bei unveränderter Spitzendepolarisation. Dendritische BK Kanäle hingegen reduzieren die Spannungsauslenkung dendritischer Kalzium - Aktionspotentiale (Benhassine und Berger 2009).

SK - Kanäle (*small potassium*, aufgrund der im Vergleich zu BK Kanälen geringen Einzelkanalleitfähigkeit von etwa 10 pS). Im Unterschied zu allen bisher behandelten Kanaltypen zeigen SK - Kanäle keine Spannungsabhängigkeit; ihre Aktivierung wird rein durch den intrazellulären Kalziumgehalt bestimmt (mit einer halben Aktivierungskalziumkonzentration von rund 300 nM). In Layer V Pyramidenneuronen können SK Kanäle am Soma und entlang des gesamten Dendritenbaumes nachgewiesen werden (Pedarzani und Stocker 2008). SK Kanäle sind zumindest teilweise für das mAHP in den Pyramidenneuronen des Cortex verantwortlich; ein Block der SK Kanäle führt hier zu einer erhöhten Feuerrate (Faber und Sah 2007; Pedarzani und Stocker 2008). Eine weitere Rolle spielen SK Kanäle bei der Begrenzung der dendritischen Erregung: sie verringern das Ausmaß der Depolarisation, hervorgerufen durch den Ca^{2+} Einstrom aktivierter NMDA Rezeptoren oder dendritischer Kalziumkanäle (Bond et al. 2005; Faber und Sah 2007; Gu et al. 2008).

1.3.3.3 Kalziumkanäle

Spannungsabhängige Kalziumkanäle spielen eine bedeutende Rolle bei der Informationsweiterleitung, sowohl im einzelnen Neuron als auch zwischen Neuronen im Netzwerk: Kalziumkanäle im Dendriten koppeln die Eingangszone in der apikalen *tuft* Region mit dem Soma in Pyramidenneuronen (siehe 1.3.2.2 auf Seite 10), Ca^{2+} moduliert Kaliumkanäle, die das Feuerverhalten beeinflussen und der Einstrom von Ca^{2+} , ausgelöst durch ein Aktionspotential, führt zur Ausschüttung von Neurotransmitter in der Präsynapse (Abel et al. 2004; Südhof und Malenka 2008; Larkum et al. 2009). Entsprechend ihrer Spannungsabhängigkeit können Kalziumkanäle in zwei Gruppen eingeteilt werden:

HVA Kalziumkanäle

Diese Kanäle aktivieren in der Regel bei Membranspannungen größer -20 mV (*high voltage activated*, HVA), d. h. im Zuge von Aktionspotentialen und Kalzium oder NMDA Spikes. Alle HVA Kanäle inaktivieren, zum einen im Zuge der Membrandepolarisation, zum anderen durch den Anstieg des intrazellulären Kalziumgehalts (Lacinová 2005). Es existieren mehrere Typen von HVA Kanälen:

- L - Typ Kalzium Kanal, benannt nach seiner großen (*large*) Einzelkanalleitfähigkeit sowie seiner langsamen (*long lasting*) Kinetik, bilden den Hauptteil der somatisch vorhandenen Kalziumkanäle (Almog und Korngreen 2009).
- N - Typ Kalzium Kanal, benannt nach seiner Erstbeschreibung in Neuronen (*neuronal non - L-Typ*). Dieser Kanaltyp ist zusammen mit dem
- P/Q - Typ Kalzium Kanal (P aufgrund der Erstbeschreibung in Purkinje Zellen, Q für eine Splicevariante des P-Typs), hauptverantwortlich für den Kalziumeinstrom in der Präsynapse in Folge eines Aktionspotentials (Dolphin 2006). Beide Kanaltypen konnten auch im Soma von Layer V Pyramidenneuronen nachgewiesen werden (Almog und Korngreen 2009).
- R - Typ Kalzium Kanal, erhielt seinen Namen aufgrund der Resistenz gegenüber dem Conotoxin ω -conotoxin GVIA und dem Agatoxin ω -Aga IVA die den N - bzw. P/Q Kanaltyp blockieren (Lacinová 2005). Dieser Kanaltyp zeigt sowohl eine flachere Aktivierungskurve als die anderen HVA Kanäle (rund 7 mV im Gegensatz zu rund 4 mV bis 5 mV) als auch eine leicht hyperpolarisierte U_h (-8 mV vs. -2 mV bis -4 mV). Beides zusammen ermöglicht, dass bereits bei etwa -30 mV ein Ca^{2+} Einstrom durch diesen Kanaltyp möglich ist (Li et al. 2007). Pyramidenneurone weisen diesen Kanaltyp sowohl im Soma (Almog und Korngreen 2009) als auch im Dendritenbaum (Johnston und Narayanan 2008) auf.

LVA Kalziumkanäle

Im Gegensatz zu den HVA Kanälen erfolgt ein Ca^{2+} Einstrom durch die LVA (*low voltage activated*) bereits nahe dem Ruhemembranpotential (Cain und Snutch 2010). T-Typ Kalziumkanäle (*tiny* und *transient* aufgrund ihrer kleinen Einzelkanalleitfähigkeit und schnellen Kinetik) sind die einzigen Vertreter dieser Gruppe (Lacinová 2005). Neuere Arbeiten sprechen gegen ein somatisches Vorkommen dieses Kanaltyps in Layer V Neuronen (Almog und Korngreen 2009), allerdings wird eine Expression am (apikalen) Dendriten postuliert (Johnston und Narayanan 2008). Dafür spricht auch das Vorhandensein der T-Typ mRNA in Layer V Neuronen (Talley et al. 1999).

1.3.3.4 HCN Kanäle

Der *hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated* (HCN) Kanal spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der neuronalen Informationsverarbeitung (Magee und Johnston 2005). Zwei Besonderheiten unterscheiden HCN Kanäle von den bisher behandelten Strömen: Erstens aktivieren HCN Kanäle durch Hyperpolarisation, d. h. der durch sie geleitete Strom (I_h) steigt mit dem Absinken der Membranspannung. Zweitens zeigen HCN Kanäle nur eine geringe Ionenspezifität: HCN Kanäle leiten sowohl Na^+ als auch K^+ Ionen, wobei das berechnete Verhältnis der Leitfähigkeiten abhängig von der Konzentration der Ionen etwa zwischen 1:5 und 1:2,5 liegt (Pape 1996). Darüber hinaus weisen HCN Kanäle noch eine geringe (0,5 % für HCN2 Kanäle) Leitfähigkeit für Ca^{2+} Ionen auf (Wahl-Schott und Biel 2009). Dies bedingt ein Umkehrpotential, das keinem Gleichgewichtspotential eines einzelnen Ions entspricht. Werte für das Umkehrpotential

von HCN Strömen liegen zwischen etwa -16 mV und -45 mV (Kole et al. 2006; Bättefeld et al. 2010). Trotz dieser Besonderheiten zeigen HCN Kanäle einen molekularen Aufbau ähnlich vielen Kaliumkanälen: sechs TMD, wobei die porenbildende Region durch die fünfte und sechste TMD gebildet wird. Den funktionellen Kanal bildet ein Tetramer (Wahl-Schott und Biel 2009). Phylogenetisch bilden HCN Kanäle eine Gruppe innerhalb der Kaliumkanäle (Yu und Catterall 2004).

Zur Zeit sind vier HCN Untereinheiten (HCN1 bis HCN4) in Säugern bekannt, die sich funktionell durch ihre Kinetik und die cAMP (Zyklisches Adenosinmonophosphat) Sensitivität ihrer U_h unterscheiden: HCN1 ist der „schnellste“ HCN Subtyp, die cAMP Sensitivität ist bei HCN2 und HCN4 am ausgeprägtesten (Wahl-Schott und Biel 2009). Dem I_h in adulten Layer V Pyramidenneuronen liegen die beiden, in diesen Zellen kolokalisierten, Untereinheiten HCN1 und 2 zugrunde (Santoro et al. 2000; Notomi und Shigemoto 2004). Die Dichte der HCN Kanäle steigt in diesen Neuronen entlang des Dendritenbaumes exponentiell mit der Entfernung vom Soma (Lörincz et al. 2002; Kole et al. 2006). Neben dem Dendriten wurden HCN1 Kanäle auch in der Präsynapse nachgewiesen (Huang et al. 2011).

Der relative Anteil der beiden Untereinheiten HCN1 und HCN2 in Layer V Pyramidenneuronen konnte aufgrund des Fehlens subtypspezifischer Blocker bis jetzt nicht bestimmt werden. Einen Hinweis liefern allerdings I_h Messungen in Tieren mit jeweils einer fehlenden Untereinheit: Bei einem *knock out* von HCN1 (HCN1 $-/-$ Mäuse) kann in corticalen Pyramidenneuronen noch ein Drittel des Stroms (im Vergleich zu Messungen in HCN1 $+/+$ Mäusen) nachgewiesen werden, ohne dass es dabei zu einem signifikanten Anstieg der relativen HCN2 Expression kommt (Chen et al. 2009b). Bei CA1 Pyramidenneuronen, die ein ähnliches HCN Expressionsmuster wie corticale Layer V Pyramidenneurone aufweisen, verbleiben nach einem *knock out* der HCN2 Untereinheit noch zwei Drittel des I_h (Ludwig et al. 2003).

Im Expressionssystem konnte eine funktionelle Heteromerbildung zwischen HCN1 und HCN2 erreicht werden. Die Aktivierungskinetik und cAMP Sensitivität dieser Heteromere liegt zwischen jener der HCN1 und HCN2 Homomere, kann jedoch nicht durch eine einfache arithmetische Mittelwertbildung der Homomerparameter berechnet werden. Die U_h der Aktivierungskurve gleicht jener der HCN1 Homomere (Chen et al. 2001; Ulens und Tytgat 2001). Ob diese Heteromere auch in nativen Neuronen auftreten, konnte bis dato nicht geklärt werden.

Modulatoren der HCN Kanäle

Eine Vielzahl von Substanzen beeinflussen die Parameter des I_h . Zu den wichtigsten zählen:

- cAMP: Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist der kanonische Modulator von HCN Kanälen. Es bindet an der CNBD (*cyclic nucleotide-binding domain*) am C-Terminalen Ende des HCN Kanals. Alle HCN Subtypen weisen die CNBD auf, trotzdem kommt es zu einer subtypspezifischen Kanalmodulation: Die halbe Aktivierungsspannung von HCN2 bzw. HCN4 wird um etwa $+10$ mV bis $+25$ mV verschoben und es kommt zu einer Beschleunigung der Kanalkinetiken. Auf HCN1 und HCN3 hat cAMP nur einen geringen Einfluss (Wahl-Schott und Biel 2009).

- PIP2: Das Membranphospholipid Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate moduliert mehrere Ionenkanäle. Für HCN2 Kanäle konnte gezeigt werden, dass PIP2 die halbe Aktivierungsspannung um etwa 15 mV depolarisiert (Pian et al. 2006).
- pH: I_h wird sowohl durch den extrazellulären als auch den intrazellulären pH Wert moduliert. Der Wechsel des intrazellulären Milieus von sauer (pH = 6) zu alkalisch (pH = 9) führt zu einer Verschiebung der halben Aktivierungsspannung von bis zu 20 mV in den depolarisierten Bereich (Wahl-Schott und Biel 2009).
- Chlor: Bei schnell (<20 s) aufeinander folgenden I_h Aktivierungen reicht die Zeitdauer zwischen den Pulsen nicht für eine vollständige Deaktivierung der langsamen HCN Kanäle (HCN3 und HCN4). Dies manifestiert sich in einer vergrößerten instantanen Stromkomponente bei der zweiten Aktivierung. Eine Erhöhung des intrazellulären Cl^- führt zu einer Verringerung dieser Stromkomponente (Mistrič et al. 2006). Die Leitfähigkeit von HCN2 und HCN4 wird darüber hinaus durch den extrazellulären Chloridgehalt reguliert (Wahl-Schott und Biel 2009).
- p38: Eine Inhibierung der mitogen-aktivierte Protein Kinase p38 führt zu Reduzierung des I_h durch eine Verschiebung der halben Aktivierungsspannung hin zu negativeren Werten. Übereinstimmend depolarisiert eine p38 Aktivierung die halbe Aktivierungsspannung (Poolos et al. 2006).
- Weitere interagierende Proteine. Für mehrere Proteine konnte eine Interaktion mit den intrazellulären Enden der HCN Moleküle gezeigt werden (Wahl-Schott und Biel 2009):
 - MiRP1: Das *MinK-related protein* MiRP1 interagiert mit HCN2. Dies moduliert zum einen die Kanaldichte, zum anderen die Kinetik der Aktivierung.
 - TRIP8b: Das *TPR-containing Rab8b* interagierende Protein TRIP8b spielt eine Rolle bei dem zielgerichteten Transport von Vesikeln in Neuronen. HCN Moleküle weisen eine Interaktionsstelle für TRIP8b auf und wahrscheinlich ist TRIP8b bei dem Aufbau des somatodendritischen HCN1 Gradienten involviert.
 - Filamin A: Filamin A erkennt nur den HCN1 Kanalsubtyp und verbindet diesen mit dem Cytoskelett. Wahrscheinlich führt dies zu einer Verlangsamung der Kanalkinetik.
 - Tamalin: Ebenfalls ein Protein, das am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt ist. Tamalin bindet spezifisch nur an HCN2.
- PKC: Für die Protein Kinase C (PKC) kann eine Beeinflussung der HCN Kanäle postuliert werden: In CA1 Pyramidenneuronen ist für die, mit einer *long term depression* (LTD) verbundene, Reduzierung des I_h eine Aktivierung von PKC notwendig (Brager und Johnston 2007). Die Verminderung des I_h in Layer V Pyramidenneuronen im Zuge einer Orexin A Applikation setzt ebenfalls eine Aktivierung von PKC voraus (Li et al. 2010).

Funktion des I_h in Layer V Pyramidenneuronen

HCN Kanäle sind zum Teil schon beim Ruhemembranpotential (RMP) aktiviert und ihr Öffnungszustand beeinflusst den Eingangswiderstand. Aus diesen beiden Tatsachen ergibt sich die Bedeutung dieser Kanaltyps für die neuronale Informationsverarbeitung:

I_h beeinflusst den Eingangswiderstand und das RMP

Der Anteil der bereits beim RMP geöffneten HCN Kanäle führt zu einem nicht inaktivierenden Einwärtsstrom positiver Ionen. Dieser ist mitbeteiligt bei der Festlegung des RMPs. Ersichtlich wird dies bei einem Block des I_h ; dieser resultiert in einem um ca. 11 mV negativeren RMP (Kole et al. 2006). Die Aktivierungscharakteristik des I_h stabilisiert das RMP auch gegen Schwankungen: eine Depolarisation führt zu einer geringeren Aktivierung der HCN Kanäle, dadurch vermindert sich der I_h (d.h. der positive Ioneneinstrom) und wirkt somit der Depolarisation entgegen. Im Falle einer Hyperpolarisation vergrößert sich der Anteil der aktivierten HCN Kanäle, es kommt zu einem stärkeren positiven Ioneneinstrom, der wiederum der Hyperpolarisation entgegenwirkt (Wahl-Schott und Biel 2009).

Der Eingangswiderstand eines Neurons beim RMP ergibt sich aus der Anzahl der bei dieser Spannung offenen Kanäle. Aufgrund ihrer Aktivierungscharakteristik befinden sich HCN Kanäle beim RMP bereits teilweise im geöffneten Zustand und bewirken somit die Spannungsabhängigkeit des Eingangswiderstandes (Surges et al. 2004). Die hohe Dichte der HCN Kanäle im Dendriten und der damit verbundene geringe Eingangswiderstand entkoppeln den distalen Dendritenbaum vom Soma; einzelne synaptische Signale am distalen Dendriten haben kaum eine Auswirkung auf das Membranpotential am Soma (Berger et al. 2003; Atkinson und Williams 2009). Der Eingangswiderstand determiniert auch die Membranzeitkonstante⁴ und hat somit einen großen Einfluss auf die dendritische Integration (Berger und Lüscher 2003): die Größe des I_h bestimmt die Zeitdauer für das Abklingen der Spannungsauslenkung hervorgerufen durch ein synaptisches Signal (Stuart und Spruston 1998). Eine effektive Spannungsauslenkung erfolgt somit nur bei einer synchronen Aktivierung mehrerer Synapsen (Migliore et al. 2004). Für die erste neuronale Verrechnungszone innerhalb der dendritischen *tuft region* konnte gezeigt werden, dass der I_h die Integration der NMDA Spikes vermindert und somit die Erregbarkeit des distalen Dendritenbaumes begrenzt (Larkum et al. 2009).

Die Notwendigkeit der präzisen Initiierung von Aktionspotentialen (VanRullen et al. 2005) führte im Lauf der Evolution wahrscheinlich zu der bemerkenswert geringen Einzelkanalleitfähigkeit (ca. 680 fS). Eine höhere Einzelkanalleitfähigkeit führte zu einem höheren Kanalrauschen, welches wiederum die zeitliche Genauigkeit der Aktionspotentialauslösung verminderte (Kole et al. 2006).

Ein auf den ersten Blick paradoxer Effekt ergibt sich aus der depolarisierenden und zugleich inhibitorischen Wirkung des I_h . Diese beruht auf der Inaktivierung von Kalziumkanälen durch die Depolarisation. Dieser Effekt begrenzt die Anzahl der aktivierbaren

⁴Die Membranzeitkonstante τ_M ist ein Maß für die Beeinflussung der Signalkinetik durch die intrinsischen Eigenschaften der Zellmembran. Sie ergibt sich aus dem Eingangswiderstand multipliziert mit der Zellkapazität. Nach einer Spannungsauslenkung benötigt die Membranspannung etwa $5\tau_M$ um wieder zu ihrem Ausgangswert zurückzukehren.

Kalziumkanäle sowohl im Dendriten (Tsay et al. 2007) als auch in der Präsynapse (Huang et al. 2011). Am Soma wird die inhibitorische Wirkung des I_h durch die Aktivierung des I_m aufgrund der I_h Depolarisation vermittelt (George et al. 2009).

I_h und Resonanz

Die Reaktion eines Neurons auf Eingangssignale ist abhängig von deren Frequenz. Die Frequenz, bei der die maximale Antwort erfolgt, wird als Resonanzfrequenz bezeichnet (Hutcheon und Yarom 2000). Sie entsteht durch das Zusammenspiel zweier Faktoren:

„Passive“ Membraneigenschaften: Die elektrischen Eigenschaften der passiven Zellmembran⁵ können näherungsweise durch einen ohmschen Widerstand parallel zu einem Kondensator repräsentiert werden. Der frequenzabhängige Widerstand einer solchen Schaltung, d. h. die Impedanz, nimmt mit der Frequenz ab. Für $f = 0$ wird nach dem initialen Ladevorgang kein Strom mehr durch einen idealen Kondensator geleitet, seine Impedanz ist gleich unendlich, die Impedanz der gesamten Schaltung wird rein durch den ohmschen Widerstand bestimmt. Für hohe, gegen unendlich gehende Frequenzen geht die Impedanz des idealen Kondensators gegen Null, der ohmsche Widerstand spielt für die Impedanz der Gesamtschaltung keine Rolle mehr. Ein solches elektrisches Verhalten bezeichnet man als Tiefpass.

Aktive Ionenkanäle: Einige aktive Ionenkanäle wirken der Auslenkung der Membranspannung entgegen (weiter oben für HCN Kanäle erläutert, der M - Typ Kaliumstrom zeigt ein ähnliches Verhalten im leicht depolarisierteren Spannungsbereich). Diese „Dämpfung“ erfolgt allerdings mit Verzögerung, bestimmt durch die Kinetik des Wechsels zwischen zwei Aktivierungszuständen. Mit Ansteigen der Frequenz gelingt es den Kanälen immer weniger, auf die Schwankungen der Membranspannung mit einer Änderung ihres Aktivierungszustandes zu reagieren. In diesem Sinne ähnelt ein solcher aktiver Ionenkanal einer elektrischen Induktivität, weshalb diese Kanäle auch als phänomenologische Induktivitäten bezeichnet werden (Narayanan und Johnston 2008).

Beide Eigenschaften zusammen führen zu einer von Null unterschiedlichen Resonanzfrequenz: Für niedrige Frequenzen bestimmt der aktive Ionenkanal die Impedanz, mit Anstieg der Frequenz ist es diesem aber nicht mehr möglich, dem Wechsel der Membranspannung zu folgen. Gleichzeitig sinkt die Impedanz der Zellmembran durch den immer stärkeren Einfluss der Membrankapazität. Bei einer bestimmten Frequenz kommt es zu einer Überschneidung der sinkenden Impedanzkurve des Tiefpasses und der ansteigenden Impedanzkurve des durch die aktiven Ionenkanäle geprägten Hochpasses. An diesem Punkt, der Resonanzfrequenz des Neurons, reagiert das Neuron mit der größten Spannungsauslenkung auf Eingangssignale (Hutcheon und Yarom 2000).

Bei konstanten passiven Zelleigenschaften bestimmen die Parameter des aktiven Kanals (aktuelle Leitfähigkeit und Kinetik) die Resonanzfrequenz. Aus der Spannungsabhängigkeit

⁵Mit allen Kanälen, die während der betrachteten Spannungsauslenkung keine (oder im Vergleich zu den dezitierten „aktiven“ Ionenkanälen nur minimale) Änderungen ihres Aktivierungszustandes zeigen. Die durch diese Kanäle fließenden Ströme werden im allgemeinen unter I_{leak} zusammengefaßt.

dieser Parameter folgt die Spannungsabhängigkeit der Resonanzfrequenz. Diese zeigt einen „U“ förmigen Verlauf, mit der geringsten Resonanzfrequenz etwa beim RMP. Bedingt wird dies einerseits durch die immer stärkere und schnellere Aktivierung des I_h bei Hyperpolarisation, andererseits durch weitere Aktivierung des I_m und I_{nap} bei Depolarisation (Hu et al. 2002).

Obschon die hier beschriebene Resonanz im Spannungsbereich vor der Aktionspotentialauslösung auftritt, hat sie Einfluss auf die neuronale Integration. Simulationsstudien zeigten, dass bei einem ausreichend hohen Hintergrundrauschen durch synaptische Aktivität (wie es *in vivo* auftritt) Neurone präferentiell entsprechend dieser (*subthreshold*) Resonanzfrequenz feuern (Richardson et al. 2003). Des Weiteren bewirkt die hohe Dichte der HCN Kanäle am Dendriten eine Bandpassfilterung distaler Signale (Ulrich 2002).

Phänomenologische Auswirkungen einer I_h Reduktion

Die Bedeutung des I_h auf die neuronale Informationsverarbeitung lässt eine Auswirkung dieses Stroms auf das Verhalten vermuten. Tatsächlich zeigen Tiere bei einem kompletten Fehlen (*knock out*) des HCN1 Kanals Lerndefizite in Verhaltenstests (Nolan et al. 2003). Verkompliziert wird dieser Befund durch den Umstand, dass bei einem *knock out* des HCN1 nur in der Vorderhirnregion es zu einer verbesserten Lernleistung kommt (Nolan et al. 2004).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei HCN2 $-/-$ Tieren Absenceereignisse auftreten. Vermutet wird hier, dass es durch das hyperpolarisierte RMP zu einer Aufhebung der Inaktivierung von T-Typ Kalziumkanälen in thalamocorticalen Neuronen kommt. Dies führt dann zu einer reduzierten Aktionspotentialschwelle und der Generierung von *bursts* (Ludwig et al. 2003). Eine Korrelation zwischen Absence-Epilepsie und einer verminderten HCN1 Expression konnte auch für Layer II/III Pyramidenneurone nachgewiesen werden (Strauss et al. 2004).

Pyramidenneurone des Layer V bilden eine der zentralen Rückkopplungsinstanzen des Cortex und kontrollieren gleichzeitig den Informationsfluss in aktivitätsbeeinflussende Hirnregionen (Douglas und Martin 2004). Die Signalverarbeitung innerhalb der Neurone wird durch eine Vielzahl von Ionenkanäle gewährleistet (Spruston 2008). Eine Modulation dieser Kanäle lässt daher einen Einfluss auf das Verhalten erwarten.

1.4 Hypothesen

Die zentrale Arbeitshypothese für diese Arbeit lautet:

Interferon wirkt als Modulator neuronaler Ionenkanäle.

Diese Aussage basiert auf Berichten über die Änderung neuronaler Parameter nach Interferonapplikation (siehe 1.2.5 auf Seite 7). Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist die Bestätigung einer direkten Ionenkanalmodulation durch Interferon in Layer V Pyramidenneuronen des somatosensorischen Cortex.

1.4.1 Interferon moduliert HCN Kanäle

IFN- β Applikation führt zu einer Änderung unterschiedlicher neuronaler Parameter (Hadjilambrea et al. 2005). Die dabei beobachtete Änderung des Eingangswiderstandes legt den Schluss nahe, dass eine Modulation der HCN Kanäle stattfindet. In dieser Arbeit soll ein direkter Nachweis dieser Kanalmodulation erfolgen. Darauf aufbauend sollen folgende Punkte untersucht werden:

1.4.1.1 Typ I Interferone vermindern den I_h

Wie IFN- β bindet auch IFN- α an den selben, Typ I Interferon spezifischen, Rezeptorkomplex. Vermutet wird daher, dass durch IFN- α eine der IFN- β Modulation ähnliche Beeinflussung des I_h erfolgt. Dies soll in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Die Bindung des Typ II Interferon IFN- γ erfolgt an einem anderen Rezeptorkomplex. Die darauf folgende intrazelluläre Signalkette weist große Unterschiede im Vergleich zu der Typ I Interferonsignalkette auf. Ob trotzdem eine I_h Modulation durch Typ II Interferon stattfindet, soll in dieser Arbeit geklärt werden.

1.4.1.2 Interferon moduliert nur bestimmte HCN Untereinheiten

Zwei HCN Untereinheiten liegen dem I_h in adulten Layer V Pyramidenneuronen zugrunde: HCN1 und HCN2. Diese unterscheiden sich u. a. aufgrund ihrer Kinetik; einen ersten Hinweis auf eine spezifische Beeinflussung kann daher eine Untersuchung des Zeitverlaufs der I_h Aktivierung liefern. Falls diese eine spezifische Interaktion vermuten lässt, soll in einer Simulation überprüft werden, ob die beobachtete Veränderung der Kinetik tatsächlich durch eine spezifische Interaktion erklärt werden kann. Bei einem positiven Befund soll das Simulationsergebnis durch Messungen in HCN1 -/- Tieren bewiesen werden.

1.4.1.3 Auf welchem Weg erfolgt die HCN Modulation?

Denkbar sind drei Szenarien:

- Interferone wirken direkt auf den Kanal, eine Aktivierung des Interferonsignalweges ist für die Modulation nicht notwendig.
- Die Kanalmodulation beruht auf einer Aktivierung des Interferonsignalweges in Neuronen.
- Die Modulation des I_h erfolgt aufgrund einer Aktivierung des Interferonsignalweges in glialen Zellen, die in weiterer Folge durch eine Interaktion mit Neuronen Ionenkanäle beeinflussen.

Zur Klärung dieser Frage erfolgen Untersuchungen in primären, neuronalen Neuronen einer neocorticalen Zellkultur sowie in HCN Kanal exprimierenden HEK 293 Zellen.

1.4.1.4 Die Reduktion des I_h hat funktionelle Konsequenzen

Eine prominente Eigenschaft des I_h ist seine Beteiligung an der Generierung des Resonanzverhaltens von Neuronen (siehe 1.3.3.4 auf Seite 21). Ob die durch Interferon hervorgerufene Modulation des I_h ausreicht, um dieses Verhalten zu verändern, soll durch den kombinierten Einsatz von *in vitro* Messungen und *in silico* Berechnungen geklärt werden.

1.4.2 Interferon moduliert weitere Ionenkanäle

Interferon ändert das Feuerverhalten in Layer V Pyramidenneuronen (Hadjilambreva et al. 2005). Dies lässt neben der Modulation des I_h noch die Ionenkanalmodulation weiterer Kanäle vermuten (siehe 1.2.5 auf Seite 7). Um diese Ionenkanalmodulationen zu identifizieren, wird eine Simulation eines Layer V Pyramidenneurons genutzt. Ein direkter Nachweis weiterer Kanalmodulationen soll durch *in vitro* Untersuchungen an einem beispielhaft ausgewählten Ionenkanal erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Hardware

Folgende Geräte wurden für die Experimente verwendet:

- Vibratom Leica VT1200S (Leica Microsystems, Deutschland)
- Axiovert S100 mit HBO 100 W (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Axioskop 2 FS plus, mit DIC-IR Optik (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Wasserimmersionsobjektive 10x (NA 0,3) & 60x (NA 0,9) (Olympus, Hamburg, Deutschland)
- Filtersatz für eGFP: BP436/20, FT 455, BP480/40 und dsRED: BP 546, FT 580, LP 590 (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Newport IG-Breadboard (Newport Corporation, Irvine, CA, USA)
- TILL Photonics IR-VideoCamera VX-55 (TILL Photonics GmbH, Gräfeling, Deutschland)
- Bildschirm Panasonic TC1470Y (Panasonic, Osaka, Japan)
- Badcontroller V (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland)
- SM5-9 Steuereinheit (Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland)
- Oszilloskop HM1507-3 und HM1508-2 (Hameg Instruments GmbH, Mainhausen, Deutschland)
- EPC-10 double und USB (HEKA GmbH, Lambrecht, Deutschland)
- AD-Wandler NI-USB 6251 (National Instruments Deutschland GmbH, München, Deutschland)
- Sutter P-97 Pipette Puller (Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA)
- Pressure Meter 2022P (Digitron Ltd, Torquay, UK)
- KNF Laborpumpe LABOPORT® N86 (KNF Neuberger AG, Balterswil, Schweiz)
- Sartorius Laborwaagen BP221S und BP110 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Osmometer – Osmomat 030 (Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland)
- Milli-Q, Elix 5 Wasseraufbereitungssystem (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland)
- pH-Meter pH537 (WTW GmbH, Weilheim, Deutschland)
- Wasserbad (GfL, Burgwedel, Deutschland)
- Computer – IBM kompatible PCs

2.2 Software

Für die Datenerfassung und -analyse sowie zur Modellierung kam folgende Software zum Einsatz:

- PatchMaster, Fitmaster v.7.3-7.5 (HEKA GmbH, Lambrecht, Deutschland)
- Origin[®] 7.0 und 7.5 (OriginLab Corp, Northampton, MA, USA)
- StatView 4.5.7 (Abacus Corporation, CA, USA)
- NI LabVIEW 8.5 (National Instruments Inc, TX, USA, 2008)
- SinGenerator (vom Autor in NI LabVIEW erstelltes Programm)
- NEURON 7.1 (<http://www.neuron.yale.edu/neuron/>, Carnevale und Hines 2006)
- PYTHON 2.7.2 (<http://www.python.org/>), mit NumPy (Version 1.6.0) und SciPy (Version 0.9.0, beide von <http://www.scipy.org/>)
- Scilab 5.0.1 (Scilab Consortium, INRIA, ENPC and Contributors, 1989-2008)

Folgende Programme wurden zur Darstellung der Daten und Erstellung der Dissertation verwendet:

- CorelDraw[®] Graphics Suite 10 und X4 (Corel[™] Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada)
- Focuswriter 1.3.3 (©2008-2010 Graeme Gott)
- Notepad++ v5.9.2. (Unicode, GNU General Public License; <http://notepad-plus-plus.org/>)
- L^AT_EX 2_ε- MikTeX Distribution 2.9 (<http://miktex.org/>)

2.3 Reagenzien

2.3.1 Interferon

Für alle Experimente wurde rekombinantes, in CHO (*Chinese Hamster Ovary*) Zellen exprimiertes⁶, Interferon verwendet:

- rIFN- α , U-CyTech (Utrecht, Niederlande)
- IFN- β , U-CyTech
 - rIFN- β , U-CyTech
 - mIFN- β , Hycultec GmbH (Beutelsbach, Deutschland)
- rIFN- γ , U-CyTech

⁶Die Alternative wäre in *Escherichia coli* exprimiertes Interferon. Hierbei kann allerdings eine Kontamination durch bakterielle Endotoxine (und somit eine potentielle, von der Interferonapplikation unabhängige Aktivierung der Immunsignalkaskaden) nicht ausgeschlossen werden.

Laut den Vorgaben des jeweiligen Datenblattes erfolgte die Rekonstitution der lyophilisierten Substanz in sterilem, doppelt destilliertem Wasser. Die Lösung wurde dann entsprechend dem durchschnittlichen Verbrauch pro Experiment aliquotiert und bei -80°C (rIFN- β) oder -20°C (alle anderen) gelagert. Eventuell nicht verbrauchtes IFN- β verblieb für maximal eine Woche bei 4°C . Falls nicht anders angegeben, betrug die verwendete Konzentration bei allen Experimenten 1000 Internationale Einheiten (*units*) Interferon pro Milliliter (U ml^{-1}). IFN- β der Maus (mIFN- β) wurde nur für die *knock out* Experimente verwendet und wird als solches angeführt; ansonsten bezieht sich die Bezeichnung Interferon auf die jeweilige Interferonart der Ratte.

2.3.2 Blocker

Tabelle 2.1: Verwendete Blocker

Substanz	Konzentration	Lagerung	Lieferant
TTX (Tetrodotoxin Citrat) blockiert Natrium Kanäle	1 μM	3 mM bei -20°C	Tocris
ZD 7288 blockiert I_h	50 μM	50 mM bei -20°C	Tocris
XE-991 blockiert I_m	10 μM	100 mM bei -20°C	Tocris
TEA (Tetraethylammoniumchlorid) blockiert K^+ Kanäle	10 mM	1 M bei 4°C	Sigma
4-AP (4 – Aminopyridin) blockiert den A-Typ K^+ Kanal	5 mM	0,5 M bei 22°C	Sigma
CNQX blockiert AMPA und Kainate Rezeptoren	20 μM	20 mM bei -20°C	Sigma
DAP-5 blockiert NMDA Rezeptoren	25 μM	50 mM bei 4°C	Tocris
Bicuculline blockiert GABA A Rezeptoren	10 μM	10 mM bei 4°C	Tocris
Ba^{2+} blockiert Kir Kanäle	0,4 mM	0,4 M bei 4°C	Merck
Ni^{2+} blockiert T-Typ Kalziumkanäle	1 mM	0,2 M bei 4°C	Sigma
LaCl_3 blockiert T-Typ Kalziumkanäle	10 μM	0,1 M bei 4°C	Sigma

Die Applikation aller Blocker erfolgte extrazellulär. Lieferanten: Tocris: Tocris, Bristol, UK; Sigma: Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland; Merck: Merck, Darmstadt, Deutschland

2.3.3 Verwendete Lösungen

Die Messungen im Hirnschnitt wurden entweder in artifizierter Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) oder in einer angepassten Lösung zur I_h Isolation (DCS - I_h Iso., *divalent cation solution*) durchgeführt. Die Präparation der Schnitte erfolgte in einer modifizierten ACSF Lösung mit einem erhöhten Sucrose Gehalt (sACSF). Die Modifikationen in dieser Lösung zielen auf eine Reduzierung der Erregbarkeit ab, um eine eventuell ausgelöste übermäßige Erregung (Excitotoxizität) während des Präpariervorgangs zu verhindern.

Tabelle 2.2: Extrazelluläre Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung (mM)	Verwendung
sACSF	NaCl (85), NaHCO ₃ (26), KCl (2,5), NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (1), CaCl ₂ (0,5), MgCl ₂ (7), Glucose (10), Sucrose (50)	Präparieren und Schneiden
ACSF	NaCl (119), NaHCO ₃ (26), KCl (2,5), NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (1), CaCl ₂ (2,5), MgCl ₂ (1,3), Glucose (10)	Aufbewahren der Schnitte, Standardlösung für die Messungen
DCS - I_h Iso.	NaCl (117), NaHCO ₃ (26), KCl (10), CaCl ₂ (2), MgCl ₂ (2), Glucose (10) mit Barium (0,4), TTX (10 ⁻³), Ni (1), CNQX (10 ⁻²), 4-AP (5), TEA (10), Bicuculline (10 ⁻²), DAP-5 (25*10 ⁻²)	Messung des pharmakologisch isolierten I_h
Extra - Kultur	NaCl (124), KCl (4), CaCl ₂ (3), MgCl ₂ (2), HEPES (25), Glucose (10)	Messungen an primär kultivierten Neuronen
Extra - HEK	NaCl (120), KCl (10), CaCl ₂ (1,8), MgCl ₂ (0,5), HEPES (10), Glucose (10), TEA (10), 4-AP (5)	Messungen an HEK 273 Zellen

Die Osmolarität aller verwendeten extrazellulären Lösungen betrug zwischen 290 und 310 mOsm. Teilweise wurde eine sACSF mit erhöhter Osmolarität (340 bis 360 mOsm, erzielt durch eine Erhöhung des Sucrose Anteils auf 75 mM und der Glucose auf 25 mM) verwendet, die allerdings keine unterschiedlichen Messergebnisse zur Folge hatte. Der pH Wert der Lösungen betrug pH = 7,4 und wurde bei den Lösungen „Extra - Kultur“ und „Extra - HEK“ mittels NaOH, bei „sACSF“, „ACSF“ und „DCS“ mittels des Carbonatpuffersystems (Begasung der Lösungen vor und während der Verwendung mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂)) eingestellt. Zum Ansetzen der Lösungen wurde ausschließlich doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet. Die erstellten Lösungen wurden bei 4 °C gelagert und für maximal eine Woche genutzt. Die verwendeten Chemikalien (außer Blockersubstanzen, siehe Tabelle 2.1) stammen von Sigma-Aldrich® (Steinheim, Deutschland) und Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland).

Die intrazelluläre Lösung (Pipettenlösung) setzte sich folgendermaßen zusammen (mM): KMeSO₄ (120), KCl (20), Na-Phosphocreatine (14), NaCl (4), EGTA (0,5), HEPES (10),

Mg₂⁺ - ATP (4), Tris - GTP (0,3). Je nach Versuchsansatz wurde der Lösung 0,1 mM cAMP zugegeben oder nicht. Die Osmolarität der Lösung betrug zwischen 280 und 300 mOsm. Die Lösung wurden nach der Erstellung sowie vor der Verwendung gefiltert (0,2 µm Nylonfilter Nalgene[®], Nalge Nunc International Corporation, New York, USA). Die pH Wert Einstellung erfolgte mittels KOH auf pH = 7,2. Die erstellte Lösung wurden aliquotiert (ca. 1 ml) und bei -20°C gelagert. Einmal aufgetaute Lösungen wurden nicht erneut verwendet. Die verwendeten Chemikalien stammen von Sigma-Aldrich[®] (Steinheim, Deutschland) und Carl Roth[®] (Karlsruhe, Deutschland).

2.4 Versuchssysteme

2.4.1 Hirnschnitte

Alle Versuche im Hirnschnitt erfolgten in Layer V Pyramidenneuronen des somatosensorischen Cortex mit 1000 U ml⁻¹ Interferon. Für die Präparation der akuten Hirnschnitte wurden ausschließlich männliche Tiere zwischen dem 11. und 27. postnatalen (P) Tag verwendet. Die Durchführung der Experimente erfolgte in Übereinstimmung mit der *European Communities Council Directive of November 24th, 1986 (86/609/EEC)* und den Vorgaben der Charité Universitätsmedizin Berlin hinsichtlich Tierschutz und Tiertötung. Nach der Anlieferung wurden die Tiere für mindestens einen Tag im Tierstall des Instituts unter Standardbedingungen gehalten.

2.4.1.1 Versuchstiere

Wistarratten. Bis auf die *knock out* Experimente wurden für die Versuche Ratten des Stamms Wistar aus der Zucht der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM - Berlin) verwendet. Die Tiere besaßen SPF (*specific pathogen free*) Status.

HCN1 -/- Mäuse und Kontrolltiere. Die HCN1 -/- Tiere (Nolan et al. 2003) stammten von *The Jackson Laboratory* (Maine, USA). Eine Verpaarung dieser Tiere mit C57Bl6/J Mäusen erfolgte in der FEM-Berlin. Die Würfe dieser Verpaarung (F1) wurden untereinander verpaart, in der F2 Generation standen somit neben heterozygoten Tieren, HCN1 +/+ und HCN1 -/- Tiere (*littermates*) für die Messungen zur Verfügung. Die Messungen wurden sowohl in diesen *littermate* gepaarten Tieren als auch in reinen HCN1 -/- und genetisch unveränderten Tieren durchgeführt. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch eine technische Angestellte anhand des Protokolls von *The Jackson Laboratory*.

2.4.1.2 Präparation

Die tiefe Betäubung der Tiere erfolgte mit Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland). Unmittelbar nach der darauf folgenden Dekapitation wurde das Gehirn freigelegt und in eisgekühlte, carbogengestättigte sACSF (siehe Tabelle 2.2) transferiert. Nach fünf Minuten in sACSF wurden aus dem Gehirn zwei Gewebelöcke heraus getrennt, die

jeweils den linken bzw. rechten somatosensorischen Cortex enthielten. Diese Gewebelöcke wurden mittels Sekundenkleber (UHU® Sekundenkleber - Cyanacrylat; UHU GmbH & Co.KG, Bühl/Baden, Deutschland) auf dem Probenteller des Mikrotoms (VT1200) angebracht und mit eiskalter sACSF umspült. Vor dem Schneiden wurde die vertikale Auslenkung der Klinge kompensiert (Leica Vibrocheck™). Die Anfertigung der Gewebeschnitte erfolgte mit 0,12 mm Vorschub, einer Ausschwenkamplitude von 2 mm und einer nominellen Schnittdicke von 400 µm. Jeder fertiggestellte Schnitt wurde sofort in 33°C±1°C warme sACSF transferiert und dort für 30 min bis 45 min gelagert. Danach erfolgte die Aufbewahrung der Gewebsschnitte in ACSF bei Raumtemperatur. Unmittelbar vor der Messung wurde der zu untersuchende Hirnschnitt auf ein mit Poly-D-Lysin beschichtetes Deckgläschen aufgebracht. Der Flüssigkeitsfilm zwischen dem Schnitt und der beschichteten Oberfläche wurde mit einem Zellstofftuch aufgesogen und ermöglichte somit eine stabile Verbindung zwischen Deckgläschen und Hirnschnitt. Neuronales Gewebe wurde bis maximal acht Stunden nach Tötung des Tieres für Experimente verwendet.

2.4.2 Primärkultur

Die primäre Zellkultur kortikaler Neurone erstellte eine technische Angestellte des Instituts aus Rattenembryonen vom Tag 19 nach der Befruchtung (E19) analog zu einem Protokoll für Mausneuronen (Drews et al. 2009). Die Messungen erfolgten dann an Neuronen, die sich mindestens neun bis maximal vierzehn Tage in Kultur befanden (*days in vitro*, DIV 9 bis 14). Für die Versuche wurden die Deckgläschen mit der Neuronenkultur in das extrazelluläre Messmedium (Extra - Kultur, siehe Tabelle 2.2) überführt. Die Experimentdauer beschränkte sich auf maximal eine Stunde nach Entfernung der Neurone aus dem Brutschrank.

2.4.3 Transfektion von HEK293 mit HCN1 und HCN2

Die Züchtung sowie Transfektion der *Human Embryonic Kidney* (HEK)293 Zellen wurde von Herrn Arne Battefeld durchgeführt. Die HEK293 Zellen wurden mit Trypsin behandelt und mit geringer Dichte auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgesät. Die Transfektion mit rHCN1 (Battefeld et al. 2010) oder rHCN2 (NM_053684, Spende von Shigetada Nakanishi) erfolgte am Tag darauf mit einem Standard Kalzium-Phosphat Protokoll (Battefeld et al. 2010). Messungen wurden 2 bis 3 Tage nach der Transfektion in Zusammenarbeit mit Herrn Arne Battefeld durchgeführt. Nach der Entnahme der Zellen aus dem Brutschrank und der Überführung in die Extrazellulärlösung erfolgten Experimente für maximal 1,5 Stunden.

2.4.4 Simulationen

2.4.4.1 Resonanz Berechnung

Zum Behufe einer ersten Abschätzung der beobachteten I_h Verminderung auf die Resonanzfrequenz diente ein bereits veröffentlichtes Modell (Hutcheon et al. 1996a). Dieses

Modell, das sogenannte *basic* I_h (BH) Modell in der Originalbeschreibung, basiert auf einer Beschreibung der I_h Aktivierung mit zwei Zeitkonstanten:

$$I_h = \hat{g}_h(p_{\text{fast}}m_{\text{fast}} + p_{\text{slow}}m_{\text{slow}})(U - U_{\text{rev}}) \quad (2.1)$$

mit

$$p_{\text{fast}} + p_{\text{slow}} = 1 \quad (2.2a)$$

$$\frac{dm_{\text{fast}}}{dt} = \frac{m_{\infty}(U) - m_{\text{fast}}}{\tau_{\text{fast}}(U)} \quad (2.2b)$$

$$\frac{dm_{\text{slow}}}{dt} = \frac{m_{\infty}(U) - m_{\text{slow}}}{\tau_{\text{slow}}(U)} \quad (2.2c)$$

$$m_{\infty}(U) = \frac{1}{1 + e^{-\frac{U - U_h}{k}}} \quad (2.2d)$$

\hat{g}_h	... maximale I_h Leitfähigkeit
U_{rev}	... Umkehrpotential des I_h (<i>reversal potential</i>)
$m_{\infty}(U)$... maximal erreichbarer I_h Aktivierung bei der anliegenden Spannung U
U_h	... halbe Aktivierungsspannung (Spannung bei der $m_{\infty} = 0,5$)
k	... Steigung der Aktivierungskurve
τ_{fast} und τ_{slow}	... schnelle (<i>fast</i>) und langsame (<i>slow</i>) Zeitkonstante
p_{fast} und p_{slow}	... Anteil der schnellen und langsamen Komponente des Stroms am Gesamtstrom

Da das Modell nur für diskrete Spannungswerte berechnet wurde, konnte auf eine funktionale Beschreibung der Zeitkonstanten (τ_{fast} und τ_{slow}) in Abhängigkeit von der Membranspannung U verzichtet werden. Stattdessen stammen diese Werte direkt aus den Experimenten bei diesen Spannungen.

Unter der Annahme, dass außer I_h und einem Leckstrom I_{leak} keine weiteren Ströme in der Zelle vorhanden sind, lässt sich der Gesamtstrom bei Strominjektion folgendermaßen beschreiben:

$$c_m \frac{dU}{dt} = -g_{\text{leak}}(U - U_{\text{leak}}) - I_h + I_{\text{inj}} \quad (2.3)$$

c_m	... Membrankapazität
g_{leak}	... dem I_{leak} zugrundeliegende Leitfähigkeit
U_{leak}	... Umkehrpotential des I_{leak}
I_{inj}	... injizierter Strom

Das Zusammenführen und Linearisierung der Formeln 2.1 und 2.3 ermöglicht die Berechnung der frequenz- (f) und spannungsabhängigen Impedanz Z im Frequenzbereich:

$$Z(f, U) = \frac{1}{g_{\text{leak}} + 2\pi i f c_m + g_h(1 + H_{\text{fast}} + H_{\text{slow}})} \quad (2.4)$$

mit

$$g_h = \hat{g}_h m_\infty(U) \quad (2.5a)$$

$$H_{\text{fast}} = p_{\text{fast}} \frac{\hat{g}(U)}{1 + 2\pi i f \tau_{\text{fast}}} \quad (2.5b)$$

$$H_{\text{slow}} = p_{\text{slow}} \frac{\hat{g}(U)}{1 + 2\pi i f \tau_{\text{slow}}} \quad (2.5c)$$

$$\hat{g}(U) = \frac{m'_\infty(U)}{m_\infty(U)} (U - U_{\text{rev}}) \quad (2.5d)$$

Die Werte der Parameter sind in Tabelle 2.3 angeführt. Die Mathematik des Modells wurde mit einem Scilab 5.0.1 Knoten innerhalb von NI LabVIEW implementiert. Somit konnten die Vorteile einer textbasierenden Mathematiksoftware mit der einfachen Oberflächenerstellung von NI LabVIEW kombiniert werden. Die Darstellung der Impedanz erfolgte in der Polarform. Die Berechnung wurde für $U = -70$ mV durchgeführt.

Tabelle 2.3: Parameter der Resonanzsimulation

Parameter	Vor IFN	Nach IFN	Änderung
\hat{g}_h	13,1 nS	9,9 nS	-24,4 %
U_{rev}	-20,5 mV	-20,5 mV	
k	10,6	10,6	
U_h	-88,3 mV	-88,3 mV	
τ_{fast}	0,255 s	0,312 s	+22,3 %
τ_{slow}	1,757 s	1,757 s	
p_{fast}	0,7	0,61	-12,9 %
g_{leak}	5,74 nS	5,74 nS	
c_m	210 pF	210 pF	

2.4.4.2 NEURON Modell Umgebung

Um Rückschlüsse und Voraussagen hinsichtlich einer spezifische Interferon Ionenkanalinteraktionen treffen zu können, wurden *in silico* Simulationen in NEURON (siehe 2.2 auf Seite 26) durchgeführt. Dieses Programmpaket erlaubt die Simulation von abstrakten Neuronenmodellen über morphologisch detailliert rekonstruierte Neuronen bis hin zu kleinen Netzwerken. Die Geometrie der Modellneurone wird dabei durch den Durchmesser und die Länge von *sections* (z. B. ein Zweig eines Dendriten) sowie deren Verbindungen untereinander beschrieben. In weiterer Folge sind die *sections* in *segments* unterteilt, denen bestimmte neuronale Eigenschaften, wie passive und aktive Leitfähigkeiten, synaptische Eingänge o. ä. zugewiesen werden können. Diese Mechanismen können entweder *ad novo* erstellt oder aus der NEURON Modell Datenbank (<http://senselab.med.yale.edu/modeldb/>) entnommen werden. Darüber hinaus enthält die Datenbank auch vollständige Neuronen-

modelle, die auf der realitätsnahen morphologischen und funktionellen Rekonstruktion bestimmter Neuronentypen aufbauen.

Die Modelle in NEURON stellen im Wesentlichen die Anfangswerte eines Systems aus Differentialgleichungen dar, zu deren Lösung das Rückwärtsdifferenzenverfahren (implizites Euler-Verfahren) verwendet wird (Carnevale und Hines 2006). Durch dieses Verfahren kann während der Simulation für jeden Zeitschritt sowie für jedes *segment* die Membranspannung bestimmt werden. Durch die Wahl der zeitlichen (Diskretisierung des numerischen Algorithmus) sowie räumlichen (Anzahl der *segments*) Auflösung werden die Ergebnisse, auf Kosten der Rechenzeit, beliebig genau.

Das simulierte Neuron - passive Eigenschaften

Als Grundlage der Simulation diente ein morphologisch und funktionell realitätsnah rekonstruiertes Modell eines Layer V Pyramidenneurons (Stuart und Spruston 1998, Fig. 1A). Wie in der Originalbeschreibung wurde der spezifische Membranwiderstand R_m den Dendriten mit der Distanz vom Soma sigmoidal abfallend zugewiesen:

$$R_m(d) = R_m^{\text{end}} + \frac{R_m^{\text{soma}} - R_m^{\text{end}}}{1 + e^{\frac{d_h - d}{s}}} \quad (2.6)$$

$R_m(d)$... Membranwiderstand in Abhängigkeit von der Distanz d

R_m^{soma} ... Membranwiderstand am Soma und dem ersten dendritischen Segment

R_m^{end} ... Endwert des Membranwiderstandes in maximaler Entfernung vom Soma am Ende des Dendriten

d ... Distanz vom Soma am Dendriten

d_h ... Punkt an dem $R_m(d)$ genau zwischen R_m^{soma} und R_m^{end} liegt

s ... Steilheit der R_m Abnahme

Die beiden anderen passiven Parameter R_i und C_m weisen keine Distanzabhängigkeit auf. Die durch *spines* vergrößerte Membranoberfläche wurde im Modell durch eine Halbierung von R_m und eine Verdopplung von C_m , ausgehend von $20 \mu\text{m}$ für basale und $100 \mu\text{m}$ für apikale Dendriten, simuliert. Eine Skalierung der aktiven Kanäle erfolgte in diesem Bereich durch eine Verdoppelung der spezifischen Leitfähigkeit. Die diskreten Werte der passiven Parameter sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Um eine Akkumulation des intrazellulären Kalziums durch den Einstrom durch die Kalziumkanäle zu verhindern, wurde dem Modell eine Kalziumpumpe hinzugefügt. Diese stabilisierte die interne Kalziumkonzentration auf 100nM , war aber gleichzeitig träge genug, um Kalziumschwankungen aufgrund von Aktionspotentialen zuzulassen (Zeit-

Tabelle 2.4:

Passive Parameter des NEURON Modells

Parameter	Wert
R_m^{soma}	$34,396 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$
R_m^{end}	$5,357 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$
d_h	$405,84 \mu\text{m}$
s	$50 \mu\text{m}$
R_i	$68 \Omega \text{ cm}$
C_m	$1,5 \mu\text{F cm}^{-2}$

konstante des Kalziumausgleichs von 200 ms). Das Modell wurde einem veröffentlichten Modell aus der Modelldatenbank entnommen (Kole et al. 2006).

Da die Kinetik der aktiven Membraneigenschaften in hohem Maße temperaturabhängig ist (z. B. Magee 1998), wurden alle Berechnungen bei einer simulierten Temperatur von 32 °C, korrespondierend zu den *in vitro* Experimenten, durchgeführt.

Neue Kanalmodelle

Der Großteil der erforderlichen Kanalmodelle konnte aus bereits veröffentlichten Modellen übernommen werden (die Quellen sind in der Tabelle 3.3 auf Seite 72 angeführt). Für die Simulation des I_h gab es aber bis dato kein Modell, das auf einer unabhängigen Beschreibung der dem Strom zugrunde liegenden Subeinheiten HCN1 und HCN2 beruht. Ein solches wurde für diese Arbeit erstellt. Ebenso konnte in den bisher veröffentlichten Modellen keine zufriedenstellende Simulation des großen Kalzium-abhängigen Kaliumkanals (BK) gefunden werden. Deshalb fiel auch hier die Entscheidung zugunsten einer eigenen Implementierung des BK-Kanal Modells. Die beiden Modelle werden in den Resultaten (3.1.4.1 auf Seite 58 und 3.2.2.1 auf Seite 68) beschrieben.

Neue Kanalmodelle für die NEURON Simulationsumgebung müssen in NMODL (NEURON Model Description Language, Hines und Carnevale 2000) implementiert werden. Die Beschreibung des Kanals besteht dabei aus mehreren Blöcken (PARAMETER, INITIAL, FUNCTION, ...). Von besonderer Bedeutung ist dabei der Block BREAKPOINT, in dem die Berechnung der Kanaleigenschaften im aktuellen Zeitschritt erfolgt. Des Weiteren erfolgt in diesem Kanal die Zuweisung der Differentialgleichungslösungsverfahren. Ein in NMODL implementiertes Kanalmodell steht für alle NEURON Simulationen zur Verfügung.

2.5 Datenerfassung im *patch clamp*

Zur Bestimmung der elektrophysiologischen Parameter und deren Veränderung nach Interferon Applikation wurde die *patch clamp* Methode angewendet. Bei dieser Methode handelt es sich um ein Verfahren zur Erfassung und Beeinflussung neuronaler elektrischer Membranströme und -spannungen (Neher und Sakmann 1976). Die Technik beruht auf der Ausformung einer, gegenüber der Umgebung elektrisch hochohmig isolierten, Verbindung, dem sogenannten *giga seal*, zwischen der zellulären Lipidmembran und einer darauf aufgesetzten Glaspipette. Nach der Ausformung des *giga seals* sind mehrere experimentelle Konfigurationen möglich: zum einen können die Ströme durch die von der Pipette eingeschlossene Membran gemessen werden (bei einer intakten Zelle als *cell attached*, bei abgelöster Zellmembran je nach Orientierung der Membran in der Pipette als *inside out* oder *outside in* bezeichnet); zum anderen lässt sich durch Zerstörung oder Perforation des Membranstücks unter der Pipette eine relativ niederohmige (6 bis 20 M Ω) Verbindung zum Zellinneren herstellen. Bei einer Zerstörung des Membranstücks durch einen transienten Unterdruckpuls (alternativ durch Anlegen kurzer Wechselstrompulse) spricht man hierbei von der *whole cell* Konfiguration, bei der kleinporigen Perforation durch geeignete Substanzen (z. B. Nystatin oder Amphothericin-B) hingegen vom (*whole cell*) *perforated patch*. Letztere bietet den Vorteil, dass durch die perforierte Membran zwar eine elektrische Verbindung über den Austausch monovalenter Ionen (überwiegend

K^+ und Cl^-) gegeben ist (Lippiat 2008), divalente Ionen (z. B. Ca^{2+}) und höhermolekulare Anionen (ATP, GTP, ...) jedoch zurückgehalten werden und somit das intrazelluläre Milieu weitgehend erhalten bleibt. In Kauf genommen wird dabei allerdings ein, gegenüber dem klassischen *whole cell*, größerer Widerstand zwischen Pipette und Zellinnerem.

Bei beiden Messkonfigurationen können zwei prinzipielle Untersuchungsansätze unterschieden werden. Beim ersten, dem sogenannten *voltage clamp*, wird die Spannung der Zelle kontrolliert („geklemmt“) und der Strom gemessen. Durch das sukzessive Anlegen verschiedener Spannungen und Analyse der entsprechenden Stromantworten dient diese Technik hauptsächlich zur Untersuchung und Charakterisierung von Ionenkanälen. Die zweite Technik, der *current clamp*, definiert sich durch eine Kontrolle des Stromflusses in die Zelle bei gleichzeitiger Messung der Spannung. Grundsätzlich gilt diese Technik als die dem natürlichen Zustand ähnlichere, da zum einen der bei dieser Messung notwendige hohe Eingangswiderstand des Vorverstärkers dem der Membran entspricht und zum anderen die Zelle auch im ursprünglichen Zustand durch Stromflüsse durch die Synapsen gesteuert wird. Somit dient diese Technik vor allem zur Untersuchung der Erregbarkeit (Eingangswiderstand, Feuerverhalten) von Neuronen; von Bedeutung ist darüber hinaus das Verhalten der Zelle, wenn kein Strom angelegt wird, da hierbei das Ruhemembranpotential bestimmt werden kann.

2.5.1 Allgemeine Versuchsdurchführung

Die Visualisierung der kultivierten Neurone sowie der HEK293 Zellen erfolgte mittels eines Axiovert S100, im Falle der kultivierten Neurone in Ausnahmefällen auch mit dem Axioskop 2 FS bei 10 oder 60 facher Vergrößerung (Wasserimmersionsobjektive mit NA 0,3 bzw. NA 0,9). Während der Experimente wurden die Zellen in der Messkammer mit der jeweiligen Extrazellulärlösung (Tabelle 2.2 auf Seite 28) umspült. Die Messungen an allen kultivierten Zellen fanden bei Raumtemperatur statt, die Verbindung zwischen Verstärker und Messlösung erfolgte mit Ag/AgCl Elektroden (EP05, EP1 und EP4, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA).

Die Visualisierung der Neurone im Hirnschnitt erfolgte mittels IR-DIC Videomikroskopie am Axioskop 2 FS bei 60 facher Vergrößerung (Wasserimmersionsobjektiv). Das Bild wurde mit einer Tillphotonics IR-VideoCamera VX-55 aufgezeichnet und dem Bildschirm (Panasonic TC-1470Y) dargestellt. Um eine konstante Experimenttemperatur von 32°C bis 34°C zu gewährleisten, wurden sowohl die umspülende ACSF als auch die Messkammer beheizt (Badcontroller V, Thermomixer comfort). Die Messungen fanden ausschließlich an Layer V Neuronen des somatosensorischen Cortex statt; Anhaltspunkte für die Lokalisierung lieferte ein stereotaktischer Atlas von Hirnschnitten der Ratte (Paxinos 1998). Die Neurone für die Versuche lagen, gemessen von der Schnittkante, in einer Tiefe von 30 µm bis 70 µm.

Die Aufzeichnung der Daten bei allen elektrophysiologischen Messungen erfolgte mit einem EPC-10 und der Software Patchmaster von HEKA. Simultan erfolgte eine analoge Kontrolle der Signale mit einem Oszilloskop. Der EPC-10 Vorverstärker wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators (SM5-9) bewegt. Elektrophysiologische Messungen reagieren empfindlich auf Erschütterungen und Vibrationen, weshalb das Mikroskop sowie der

Mikromanipulator auf einem schwingungsfreien Tisch (Newport IG-Breadboard) montiert waren. Zur Absaugung der Flüssigkeit aus der Messkammer diente eine KNF Laborpumpe, der Zufluss erfolgte aus einem sich über dem Mikroskop befindlichen Behälter mittels Tygon®-R3603 Schläuchen. Bei einem der Messplätze ergab sich aufgrund der Einstreuung von elektromagnetischen Störsignalen die Notwendigkeit einer Abschirmung mit einem selbst erstellten Faradayschen Käfig.

Zur Herstellung der Pipetten diente das Pipettenziehgerät P-97. Hierbei wird eine Glaskapillare (1,65 mm Außendurchmesser, Glastyp #0010 mit einem Bleigehalt (PbO) von 22 % (PG10165-4, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA)) im Laufe mehrere Zyklen erwärmt und auseinander gezogen. Die genaue Temperatur und Zugkraft richtet sich einerseits nach dem Glastyp, andererseits nach den jeweiligen, singulären Eigenschaften des verwendeten Heizfilaments. Ein typisches Programm zur Herstellung von Messpipetten lautet etwa wie folgt: Zyklus (1): $Heat = 410$, $Pull = ()$, $Vel = 32$, $Time = 250$; Zyklus (2): $Heat = 395$, $Pull = ()$, $Vel = 42$, $Time = 250$; Zyklus (3): $Heat = 342$, $Pull = ()$, $Vel = 85$, $Time = 250$.

Der Faktor *Heat* kontrolliert hierbei den elektrischen Strom, der durch das Filament fließt und damit die Hitze, mit der das Glas geschmolzen wird. *Pull* bezeichnet die Kraft, mit der an der Pipette gezogen wird, beginnend 40 ms nach der Beendigung der Heizphase. Dieser Parameter wurde für die Herstellung der Messpipetten auf Null gesetzt. *Velocity* ist die Geschwindigkeit, mit der die Glashalterungen nach dem Erweichen des Glases auseinander gezogen werden. *Time*: Die Zeit während der die Kühlluft mit einem bestimmten Druck ($P = 500$) zugeführt wird (eine Einheit *Time* entspricht $\frac{1}{2}$ ms).

Die so gezogenen Pipetten besaßen nach der Befüllung mit der intrazellulären Lösung (siehe 2.3.3 auf Seite 28) einen Widerstand von 3 bis 5 M Ω . Die Messpipetten wurden unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment hergestellt und ausschließlich einmal verwendet. Vor dem Eintauchen in das Extrazellulärmedium wurde ein leichter positiver Druck (~ 40 mbar, kontrolliert mit einem Druckmessgerät, Pressure Meter 2022P) an die Pipette appliziert. Die somit ständig herausströmende Intrazellulärlösung verhinderte eine etwaige Verschmutzung der Pipettenspitze durch Bestandteile oder Verunreinigungen des Extrazellulärmediums. Nach dem Eintauchen der Pipette wurde der *offset* der Messanordnung (bedingt durch den *offset* des Verstärkers und das Grenzflächenpotential zwischen Intra- und Extrazellulärmedium) sowie die Kapazität der Pipette kompensiert. Es erfolgte keine nachfolgende Korrektur des Grenzflächenpotentials im *whole cell* Modus. Bei der Annäherung an die Zelle erzeugte die ausströmende Pipettenlösung eine leichte Eindellung der Zellmembran. Nach Wegnahme des Drucks erfolgte teilweise eine spontane Ausformung des *giga seals*, ansonsten wurde die Ausbildung durch Anlegen eines leichten Unterdrucks unterstützt. Sofort nach Erreichen des *giga seals* (somit also im *cell attached* Modus) wurde das Pipetteninnere auf -70 mV (Neurone) bzw. -40 mV (HEK293) geklemmt, um eine Depolarisation der Zelle nach der Perforation der Membran zu verhindern. Danach wurde die Zellmembran mittels Unterdruckimpulsen aufgerissen.

Nach Erreichen der *whole cell* Konfiguration und in regelmäßigen Abständen im Verlauf eines Experiments erfolgte eine Bestimmung des seriellen Widerstandes (Summe der Widerstände zwischen der Messelektrode und dem Zellinneren), R_s , und der Zellkapazität, C (siehe 2.6.1.1 auf Seite 39).

Der weitere Versuchsablauf war durch die Art der Experimente vorgegeben. In der Regel erfolgten nach dem *patchen* eines Neurons mehrere Kontrollmessungen, danach wurde Interferon eingewaschen und der Effekt auf die untersuchten Parameter protokolliert. Der Interferoneffekt begann ca. 3 min nach Einwaschen der Substanz und benötigte etwa 20 min für seine volle Ausprägung (Abb. 3.1c auf Seite 47). Aufgrund dieser ersten Versuche wurden weitere Experimente für maximal 30 min durchgeführt, bei einem Abbruch des Experiments (z. B. aufgrund R_s Erhöhung oder U_h Verschiebung) erfolgte eine Analyse nur bei einer Interferoneinwirkdauer von mindestens 6 min.

2.5.2 Untersuchung des Resonanzverhaltens

Die Impedanz-Amplituden-Profil (*impedance amplitude profile*, ZAP) Methode zur Bestimmung der neuronalen Resonanz (Puil et al. 1986; Hutcheon et al. 1996b) basiert auf der Injektion eines sinusförmigen Eingangstroms mit variabler Frequenz und Analyse der Spannungsantwort. Da beides mit dem EPC-10 Steuerprogramm Patchmaster nicht möglich ist, wurde ein entsprechendes Programm in NI LabVIEW erstellt: SinGenerator. Dieses liest und schreibt die Strom- und Spannungswerte für die ZAP Messungen direkt (d. h. unter Umgehung von Patchmaster) in den Messverstärker EPC-10 (siehe Abb. 2.1). Dies ermöglicht, dass dieses Programm mit allen Verstärkern, die eine externe Signaleinspeisung sowie das Auslesen der Membranspannung auf der Hardwareseite gewährleisten, verwendet werden kann.

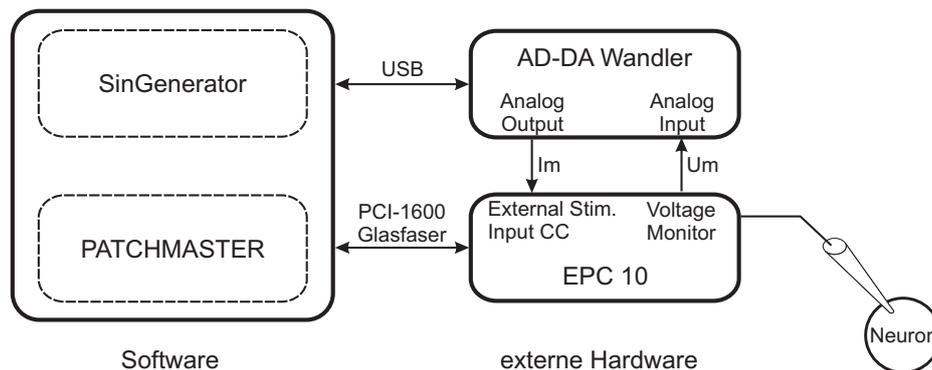


Abbildung 2.1: Einbindung des SinGenerators in den Messaufbau. Softwareseitig findet kein Datenaustausch statt.

SinGenerator besteht aus fünf Funktionsblöcken:

Initialisierung. Dieser Programmblock wird beim Start von SinGenerator ausgeführt. Das Programm verlangt die Angabe der verwendeten AD/DA Anschlüsse, der Skalierung des EPC-10 *inputs* (CC-Gain, in der Regel $0,1 \text{ pA mV}^{-1}$), und des Verzeichnisses, in dem die Daten gespeichert werden sollen. Im Falle einer Änderung während des Experiments, kann mittels „Reset“ eine erneute Initialisierung durchgeführt werden.

Parametereingabe und Signalberechnung. Der ZAP Puls wird nach Eingabe der Parameter (Start- und Endfrequenz, Schrittweite, Dauer und Amplitude) berechnet.

Ausgabe des Signals und Aufzeichnen der Spannungsantwort. Der zuvor berechnete Puls wird an dem angegebenen DA Anschluss ausgegeben und die Spannungsantwort am AD Eingang aufgezeichnet.

Speicherung der Daten. Nach der Aufzeichnung erfolgt die Darstellung des ZAP Pulses (injizierter Strom und aufgezeichnete Spannungsantwort). Die Daten können nun gespeichert und optional auch sofort ausgewertet werden. Danach kann die nächste Messung erfolgen.

Analyse. Die Auswertung der aufgezeichneten Daten kann entweder sofort nach der Aufzeichnung des Pulses oder zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen (d. h. die aufgezeichneten Pulse können auch nach dem Experiment nochmals in SinGenerator geladen und ausgewertet werden). Die Analyseprozeduren können auch bei anders gewonnenen Daten (z. B. aus den NEURON Simulationen) verwendet werden.

Die Analyse der ZAP Profile beginnt mit einer Untersuchung des Signals im Zeitbereich. Hierbei werden die Extremwerte der Spannungsauslenkung erfasst und die mittlere Spannung berechnet. Des Weiteren lässt sich die Spannung von jedem Punkt des aufgezeichneten Signals auslesen. Danach erfolgt die Transformation der aufgezeichneten Daten in den Frequenzbereich mittels FFT (*fast Fourier transform*), wobei die oberste zu analysierende Frequenz (zur Verringerung der Rechenzeit und Datenmenge) und eine Fensterfunktion (Gewichtungsfunktion für schärfere Spektrallinien und zur Reduzierung von Seitenbändern – Verminderung des *leakage*) ausgewählt werden können (bei den vorliegenden Experimenten 20 Hz und Typ *rectangular*).

Die Impedanz \underline{Z} des Neurons ergibt sich in weiterer Folge durch Division der Amplituden und Subtraktion der Phasenwinkel.

Die Darstellung der Impedanz ($\underline{Z} = Z e^{j\phi}$) erfolgt in der Polardarstellung mit dem Scheinwiderstand Z und dem Phasenwinkel ϕ als Funktion der Frequenz f (wahlweise linear oder logarithmisch). Das Programm bietet die Möglichkeit, beide Kurvenverläufe mit Hilfe eines gleitenden Durchschnitts mit wählbarer Breite zu glätten. Um die Resonanzfrequenz zu bestimmen wird danach der Spitzenwert des Scheinwiderstandes gesucht. Dies geschieht entweder durch Auffinden des maximalen Punktes innerhalb des Plots, eine Methode die u. U. bei verrauschten Signalen mit transienten Spitzen falsche Ergebnisse liefert, oder durch einen Spitzenwertdetektionsalgorithmus. Dieser passt ein quadratisches Polynom mit definierter Breite an den Signalverlauf an und ermittelt dessen Spitzenwert.

Ausgehend von der ermittelten Resonanzfrequenz f_{Res} und -scheinwiderstand Z_{Res} sowie des Scheinwiderstandes bei $f \approx 0 \text{ Hz}$ ⁷, Z_0 , berechnet das Programm weitere Parameter des Resonanzverhaltens: die Stärke der Resonanz $Q = Z_{\text{Res}}/Z_0$, den Scheinwiderstand bei der halben Bandbreite (*half band width*) $Z_{\text{HBW}} = \frac{Z_{\text{Res}} - Z_0}{2}$ und die halbe Bandbreite

⁷Eine Bestimmung des Scheinwiderstandes bei exakt 0 Hz (= Eingangswiderstand) ist mittels der verwendeten FFT Methode nicht möglich, weshalb dafür entweder der Wert bei 0,5 Hz bestimmt oder der Wert aus einer separat durchgeführten Eingangswiderstandsmessung übernommen wurde.

HBW (Frequenzspanne, bei der $Z \geq Z_{HBW}$), ein Maß für Breite des bevorzugten Frequenzbereiches des Neurons. Weitere Resonanzparameter ($Z_{10}, Z_{20}, Z_{HD}, f_{HD}$, aus Erchova et al. 2004) werden ebenfalls berechnet, spielen aber für die Auswertung des Interferoneffekts in dieser Arbeit keine Rolle.

Des Weiteren wird die Frequenz des Nulldurchgangs des Phasenplots, Φ_0 , bestimmt. Dieser liefert eine Aussage über die Frequenz, bei der das Verhalten des Neurons von einer induktiven Prägung hin zu einer kapazitiven wechselt.

2.6 Datenanalyse

Grundsätzlich ist anzumerken, dass die Ergebnisse der *in vitro* und der *in silico* Messungen mit den selben Methoden und größtenteils auch Programmen ausgewertet wurden. Die Datenerfassung aus den Rohdaten erfolgte dabei bei den *in vitro* Experimenten in Patch- oder Fitmaster, bei den *in silico* Versuchen durch Routinen innerhalb der NEURON Umgebung. Die nachfolgenden Analysen wurde größtenteils mit C Prozeduren innerhalb von Origin durchgeführt.

2.6.1 Prozeduren

2.6.1.1 Experimentkontrolle

Um die Qualität der *in vitro* Versuche zu gewährleisten, wurden während des Experiments in kurzen Abständen Pipettentestpulse durchgeführt. Diese lieferten Informationen über den aktuellen seriellen Widerstand, R_s . Eine Erhöhung des R_s um mehr als 30 % führte zum Abbruch des jeweiligen Experiments (der R_s wurde während des Experiments mittels einer *online* Analyse berechnet).

Der Pipettentestpuls wurde im *voltage clamp* durchgeführt und bestand aus einem symmetrischen Rechteckspuls ± 10 mV für 50 ms ausgehend vom jeweiligen Haltepotential (gefiltert mit 10 kHz und digitalisiert mit einer Abtastrate von 100 kHz). Der Puls wurde dreimal wiederholt und die Berechnung der Parameter erfolgte aus dem Mittelwert der drei Wiederholungen. Die initiale Stromantwort auf die Spannungsauslenkung des Rechteckspulses wird alleine durch den R_s begrenzt, da die Kapazität der Zelle erst umgeladen werden muss. Der R_s kann somit mittels $R_s = \Delta U / I_p$ berechnet werden, wobei I_p den Maximalwert der Stromantwort darstellt (gemessen in Relation zum Ruhestrom). Nach Erreichen des Spitzenstromwertes fällt dieser exponentiell bis zum neuen Haltestrom für die anliegende Spannung. Die Zeitkonstante des Abfalls ergibt sich aus dem Produkt des Eingangswiderstandes (Summe des R_s und des Membranwiderstandes) und der Kapazität. Durch die Schnelligkeit des Abfalls wird auch die Fläche unter der Stromkurve (begrenzt durch die gedachte, rückwärts in die Zeit interpolierte Linie des neuen Haltestroms) bestimmt. Diese ist ein Maß für die Ladungsmenge Q , die für das Laden der neuronalen Kapazität C notwendig ist. Es gilt $C = Q / \Delta U$.

Der Eingangswiderstand des Neurons lässt sich theoretisch aus dem neuen Haltestrom berechnen: $R_{in} = \Delta U / \Delta I$. Diese Berechnung leidet allerdings unter dem geringen

Eingangswiderstand des Vorverstärkers und der größeren *space clamp*⁸ Problematik im *voltage clamp*. Deshalb wurde der R_{in} zumeist im *current clamp* bestimmt.

2.6.1.2 I_h Messungen

Die Bestimmung der I_h Parameter erfolgte durch eine pharmakologische Isolation des Stroms (mittels DCS - I_h Iso., siehe Tabelle 2.2 auf Seite 28). Der I_h wurde durch negative Spannungspulse bis -130 mV in 10 mV Schritten, die in der Regel 2 s andauerten, aktiviert (Interpulsintervall von 5 s, gefiltert mit 3 kHz und digitalisiert mit einer Abtastrate von 10 kHz). Zum Ende eines solchen Pulses hatte die durch den Spannungssprung ausgelöste Stromänderung einen stabilen Zustand (*steady state*) erreicht. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Messung des Stroms. Dieser *steady state* Strom setzt sich aus der Summe des Leckstroms I_{leak} und des I_h zusammen. I_{leak} weist per Definition keine Spannungsabhängigkeit auf, eine I_h Aktivierung erfolgt erst ab etwa -60 mV. Somit kann der I_{leak} bei Spannungen, die zu einer I_h Aktivierung führen, durch eine Extrapolation der *steady state* Ströme vor der I_h Aktivierung (von -40 mV bis -50 mV) bestimmt werden. Die Berechnung der I_h Amplitude erfolgt dann durch Subtraktion des extrapolierten I_{leak} von dem *steady state* Stroms bei einer bestimmten Spannung: die *leak subtraction* Methode.

Die Spannungsabhängigkeit der I_h Aktivierung wurde mittels einer *tail current* Analyse bestimmt. Dabei nutzt man die relativ langsame Deaktivierung des I_h . Bei einem depolarisierenden Spannungssprung (bei den verwendeten Protokollen meist auf -65 mV) verbleibt der I_h noch für kurze Zeit in seinem ursprünglichen Aktivierungszustand. Der Stromfluss durch die HCN Kanäle ist gegeben durch $I_h = \hat{g}_h l(U - U_{rev})$. Die maximale I_h Leitfähigkeit \hat{g}_h ist konstant, durch den Sprung auf eine konstante Spannung auch die Differenz $U - U_{rev}$. I_h wird gemessen und so stellt die Aktivierung l die einzige veränderliche Unbekannte in dieser Gleichung dar und kann durch eine Normierung der *tail currents* bestimmt werden. Diese wurde daraufhin als Funktion der Spannung dargestellt und mit einer sigmoidalen Funktion gefittet:

$$f(U) = \frac{1}{1 + e^{\frac{U - U_h}{k}}} \quad (2.7)$$

Somit konnte die halbe Aktivierungsspannung U_h und die Steigung der Aktivierung k bestimmt werden. Der teilweise bei I_h Messungen zu beobachtende *run down* (d. h. einer kontinuierlichen Abnahme der Stromamplitude im Laufe eines Experiments) ist mit einer Verschiebung der U_h assoziiert (Pian et al. 2006). Dadurch wird bei einer bestimmten Spannung ein geringerer Anteil der HCN Kanäle geöffnet, was zu einer Verringerung der I_h Amplitude führt. In den Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass IFN- β in den meisten Fällen zu einer Reduktion des I_h ohne U_h Verschiebung führt (Stadler et al. in Rev.). Eine Verschiebung der U_h während eines Experiments deutet daher auf einen

⁸Das Anlegen einer Spannung durch einen *patch* am Soma klemmt nicht das gesamte Neuron auf diese Spannung. Stattdessen kommt es mit der Distanz von der Stelle des *patch* zu einem Spannungsabfall, dessen Größe durch die Kabelgleichung bestimmt wird, den *space clamp*.

run down hin. Ab dem Zeitpunkt einer U_h Verschiebung von mehr als 5 mV erfolgte ein Ausschluss der I_h Messwerte aus den Analysen.

Die Kinetik der I_h Aktivierung wurde mittels eines Fits des Stroms mit einer doppelt exponentiellen Funktion bestimmt:

$$f(t) = A + A_{\text{fast}}(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{\text{fast}}}}) + A_{\text{slow}}(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{\text{slow}}}}) \quad (2.8)$$

t ... Zeit

A ... Ausgangsamplitude des Stroms

A_{fast} ... Amplitude der schnellen Komponente der Aktivierung

τ_{fast} ... schnelle Zeitkonstante der Aktivierung

A_{slow} ... Amplitude der langsamen Komponente der Aktivierung

τ_{slow} ... langsame Zeitkonstante der Aktivierung

Eine Berechnung des Anteils der schnellen Komponente an der Aktivierung des Gesamtstroms erfolgte mit:

$$p_{\text{fast}} = \frac{A_{\text{fast}}}{A_{\text{fast}} + A_{\text{slow}}} \quad (2.9)$$

Der Fit der Deaktivierung erfolgte mit einer einfach exponentiellen Funktion (Formel 2.8 ohne den A_{slow} Term).

2.6.1.3 Resonanzmessungen

Die Parameter des neuronalen Resonanzverhaltens wurden mittels SinGenerator bestimmt (siehe 2.5.2 auf Seite 37). Dies war auch für die Simulationsversuche der Fall, da die Strom- und Spannungskurven aus NEURON ebenfalls in SinGenerator geladen werden können.

Der Versuchsablauf der Resonanzmessung gestaltete sich üblicherweise wie folgt: Zuerst wurde mittels Patchmaster der EPC-10 in den *current clamp* Modus geschaltet und das Messpotential (in der Regel -70 mV) durch Stromapplikation eingestellt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte üblicherweise auch eine Bestimmung des Eingangswiderstandes. Danach wurde der ZAP Puls im SinGenerator gestartet. An der Zelle lag zu diesem Zeitpunkt ein konstanter Haltestrom (vom Patchmaster) mit aufgesetztem Sinussignal (des SinGenerators) an. Die Spannungsantwort der Zelle konnte in Patchmaster beobachtet werden und gleichzeitig zeichnete SinGenerator diese auf. Nach Beendigung des ZAP Pulses erfolgte meist *ad hoc* eine Auswertung, vor allem um die Spitzenspannungsauslenkung der Antwort zu ermitteln: Um ein lineares Strom – Spannungsverhältnis innerhalb der Sinusauslenkung zu gewährleisten, wurde die Stromamplitude des ZAP Pulses derart eingestellt, dass die Spannungsauslenkung (Spitze zu Spitze) nicht mehr als 20 mV betrug. Die Spannungsantwort wurde mit 400 Hz gefiltert und danach mit einer Abtastrate von 1 kHz digitalisiert.

Der Großteil der ZAP Pulse bestand aus einer linear ansteigenden Frequenz von 0 Hz bis 10 Hz über einen Zeitraum von 20 s; zu Kontrollzwecken verwendete Frequenzbereiche von 5 Hz bis 30 Hz und Zeitperioden von 10 s bis zu 60 s erbrachten vergleichbare Ergebnisse.

Für die Messung der Resonanz wurde vor und nach Interferon Applikation das gleiche Haltepotential eingestellt, d. h. eine etwaige Hyper- oder Depolarisation des Membranpotentials wurde durch Änderung des Haltestroms ausgeglichen. Resonanzmessungen wurden ausschließlich an Neuronen im Hirnschnitt durchgeführt.

2.6.1.4 I_m Messungen

Derzeit besteht keine Möglichkeit zur pharmakologische Trennung des M - Typ Kalium Stromes I_m von den anderen spannungsabhängigen Kaliumströmen. Deshalb wurde zur Charakterisierung des Stroms eine „indirekte“ Messmethode genutzt. Dazu wurde das Neuron (nach Block der T - Typ Kalziumströme mit LaCl_3 , der Natriumkanäle mit TTX und des I_h mit ZD7288) für 30 s auf -30 mV geklemmt. Dies zielte auf eine vollständige Aktivierung des I_m sowie eine Inaktivierung der anderen Kaliumströme ab. Danach erfolgte eine Depolarisierung auf -50 mV. Der I_m wurde aus der Differenz zwischen der Spitze des deaktivierenden Stromes nach der kapazitiven Transiente bis zum Erreichen des *steady state* (nach 1 s) bestimmt. Die Digitalisierung der Daten erfolgte nach einer Filterung mit 3 kHz mit einer Abtastrate von 10 kHz. Das Interpulsintervall betrug 5 min, in denen die Zelle auf das Ruhemembranpotential geklemmt wurde. Die molekulare Identität des gemessenen Stromes wurde in einigen Experimenten durch Block der M - Typ Kaliumkanäle mit XE-991 bestätigt. Mit der gewählten Methode ist keine Bestimmung der absoluten Größe des I_m möglich, allerdings lässt eine Reduktion des bestimmten deaktivierenden Stromes einen Rückschluss auf eine I_m Verminderung zu.

2.6.1.5 Eingangswiderstand und Feuerverhalten

Die Bestimmung des Eingangswiderstandes R_{in} des Neurons erfolgte im *current clamp* (gefiltert mit 3 kHz und digitalisiert mit einer Abtastrate von 20 kHz). Dazu wurde ein symmetrischer Rechteckstrompuls (je nach Größe und Alter des Neurons ± 20 pA oder ± 50 pA) von zwei Sekunden Dauer durch die Pipette in das Neuron geleitet. Die Messung der Spannungsantwort erfolgt im letzten Viertel des Pulses zu Zeitpunkten, bei denen der Spannungsverlauf nicht durch synaptische Signale kontaminiert war. Der Eingangswiderstand ergibt sich aus $R_{in} = \Delta U / \Delta I$, wobei diese Gleichung graphisch durch einen Fit der drei Datenpunkte (die beiden Punkte der Stromauslenkung sowie bei $I = 0$) in einem U/I Plot gelöst wurde.

Das Feuerverhalten eines Neurons kann durch zwei Parameter beschrieben werden:

1. Rheobase: Die Schwellenstromintensität, die zur Auslösung eines Aktionspotentials notwendig ist.
2. *Gain*: Die Steigung, mit der die Anzahl der Aktionspotentiale mit der Eingangsstromstärke korreliert.

Die Bestimmung beider Parameter erfolgte durch einen linearen Fit des F/I Plots (Anzahl der Aktionspotential als Funktion der Eingangsstromstärke) im linearen Anfangsbereich. Der *gain* entspricht der Steigung dieses Fits, die Rheobase dem Schnittpunkt des Fits mit der Abszisse.

2.6.2 Statistik

Der Großteil der statistischen Auswertung beruht auf einen Vergleich der Datenpunkte vor und nach Interferon. Als erster Anhaltspunkt wird dazu in den Resultaten der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben (der Mittelwert wird auch in den Abbildung als Balken eingetragen). Ein Vergleich der Daten erfolgte je nach Anzahl der Datenpunkte und ihrer Verteilung mit einem parametrischen (Student's t-Test) oder nicht-parametrischen (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Daten, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für nicht gepaarte) Verfahren. Die je nach Datensatz verwendeten Verfahren sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5: Statistische Verfahren und Parameter

Datensatz	Messungen ^{#)}	Normalverteilung ^{§)}		Test ^{*)}	
	n	ctrl	IFN	Verfahren	p
3.1.1.1					
I_h Amp.	6	–	–	Wilc.	0,0277
U_h	6	–	–	Wilc.	0,2489
k	6	–	–	Wilc.	0,7532
U_h Vgl	6/16	–	+ (0,0006)	Mann.	0,1404
R_s	6	–	–	Wilc.	0,0747
Vgl Akt.	6	–	–	Wilc.	0,0277
Vgl Deakt.	4	–	–	Wilc.	0,0679
τ_{fast}	6	–	–	Wilc.	0,0277
τ_{slow}	6	–	–	Wilc.	0,9165
p_{fast}	6	–	–	Wilc.	0,0277
τ_{deakt}	6	–	–	Wilc.	0,0277
3.1.1.2					
Amp.	9	+ (0,436)	+ (0,055)	t-Test	0,865

^{#)} Für die gepaarten Tests ist die Größe des Datensatzes vor und nach Interferon Applikation dieselbe (Angabe eines Werts). Bei Angabe zweier Werte erfolgte ein nicht gepaarter Test. ^{§)} Ab $n = 8$ wurde mittels des Shapiro-Wilk Tests (in Origin 7.0 oder PYTHON) auf Normalverteilung getestet. Die p -Werte des Tests sind angegeben (+: normalverteilt, –: nicht normalverteilt). ^{*)} Bei normalverteilten Daten und $n \geq 8$ wurde die Teststatistik mit dem t-Tests (zweiseitig, gepaart oder ungepaart, implementiert in Origin 7.0) berechnet. Bei $n < 8$ oder nicht normalverteilten Daten erfolgte der Test bei gepaarten Daten mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Wilc., implementiert in StatView oder PYTHON), ansonsten mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Mann., implementiert in PYTHON).

Tabelle 2.5: Statistische Verfahren und Parameter (Fortgesetzt)

Datensatz	Messungen ^{#)} n	Normalverteilung ^{§)}		Test ^{*)}	
		ctrl	IFN	Verfahren	p
3.1.2.1					
I_h Amp.	10	+ (0,863)	+ (0,433)	t-Test	0,0103
U_h	8	+ (0,227)	+ (0,327)	t-Test	0,0666
R_s	10	- (0,002)	- (0,034)	Wilc.	0,114
τ_{fast}	10	+ (0,245)	+ (0,770)	t-Test	0,027
τ_{slow}	10	+ (0,581)	+ (0,783)	t-Test	0,348
p_{fast}	10	+ (0,867)	+ (0,448)	t-Test	0,031
τ_{deakt}	10	+ (0,438)	+ (0,251)	t-Test	0,0018
3.1.2.2					
I_h Amp.	9	- (0,008)	- (0,009)	Wilc.	0,0046
U_h	9	+ (0,190)	+ (0,159)	t-Test	0,033
R_s	9	+ (0,376)	+ (0,734)	t-Test	0,495
τ_{fast}	9	+ (0,531)	+ (0,110)	t-Test	0,0078
τ_{slow}	9	+ (0,161)	+ (0,094)	t-Test	0,190
p_{fast}	9	+ (0,867)	+ (0,119)	t-Test	0,0262
τ_{deakt}	9	- (0,025)	+ (0,252)	Wilc.	0,0077
3.1.3.1					
HCN1 Amp.	6	-	-	Wilc.	0,345
HCN2 Amp.	6	-	-	Wilc.	0,249
3.1.3.2					
I_h Amp.	5	-	-	Wilc.	0,043
R_s	5	-	-	Wilc.	0,892
R_{in}	6	-	-	Wilc.	0,028

^{#)} Für die gepaarten Tests ist die Größe des Datensatzes vor und nach Interferon Applikation dieselbe (Angabe eines Werts). Bei Angabe zweier Werte erfolgte ein nicht gepaarter Test. ^{§)} Ab $n = 8$ wurde mittels des Shapiro-Wilk Tests (in Origin 7.0 oder PYTHON) auf Normalverteilung getestet. Die p -Werte des Tests sind angegeben (+: normalverteilt, -: nicht normalverteilt). ^{*)} Bei normalverteilten Daten und $n \geq 8$ wurde die Teststatistik mit dem t-Tests (zweiseitig, gepaart oder ungepaart, implementiert in Origin 7.0) berechnet. Bei $n < 8$ oder nicht normalverteilten Daten erfolgte der Test bei gepaarten Daten mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Wilc., implementiert in StatView oder PYTHON), ansonsten mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Mann., implementiert in PYTHON).

Tabelle 2.5: Statistische Verfahren und Parameter (Fortgesetzt)

Datensatz	Messungen ^{#)}	Normalverteilung ^{§)}		Test ^{*)}	
	n	ctrl	IFN	Verfahren	p
3.1.4.2					
I_h Amp. WT	8	+ (0,904)	+ (0,901)	t-Test	0,0043
R_s WT	8	+ (0,294)	+ (0,784)	t-Test	0,097
Vgl WT	3/5			Mann.	0,297
I_h Amp. KO	8	+ (0,262)	+ (0,569)	t-Test	0,479
R_s KO	8	+ (0,738)	+ (0,969)	t-Test	0,497
Vgl KO	4/4			Mann.	0,149
C	8/8	+ (0,260)	+ (0,594)	t-Test	0,174
Effekt	8/8	+ (0,611)	+ (0,771)	t-Test	0,0065
Effekt <i>litter</i>	3/4			Mann.	0,034
3.1.5.1					
U_{mem}	9	+ (0,686)	+ (0,075)	t-Test	0,0033
R_s	9	- (0,002)	+ (0,114)	Wilc.	0,594
3.1.5.2					
f_{Res}	9	+ (0,108)	+ (0,177)	t-Test	0,00002
Z_{Res}	9	- (0,008)	- (0,008)	Wilc.	0,0152
Q	9	+ (0,126)	+ (0,197)	t-Test	0,325
HBW	9	+ (0,543)	+ (0,960)	t-Test	0,0401
R_s	9	- (0,002)	+ (0,114)	Wilc.	0,594
Φ_0	7	-	-	Wilc.	0,0425
3.2.1					
R_{in}	8	+ (0,871)	+ (0,055)	t-Test	0,0310
<i>Rheo</i>	8	+ (0,948)	+ (0,660)	t-Test	0,0352
<i>gain</i>	8	+ (0,344)	+ (0,149)	t-Test	0,0218
R_s	8	- (0,0006)	+ (0,270)	Wilc.	0,208
3.2.3					
I_m Amp.	6	-	-	Wilc.	0,028
R_s	6	-	-	Wilc.	0,463

^{#)} Für die gepaarten Tests ist die Größe des Datensatzes vor und nach Interferon Applikation dieselbe (Angabe eines Werts). Bei Angabe zweier Werte erfolgte ein nicht gepaarter Test. ^{§)} Ab $n = 8$ wurde mittels des Shapiro-Wilk Tests (in Origin 7.0 oder PYTHON) auf Normalverteilung getestet. Die p -Werte des Tests sind angegeben (+: normalverteilt, -: nicht normalverteilt). ^{*)} Bei normalverteilten Daten und $n \geq 8$ wurde die Teststatistik mit dem t-Tests (zweiseitig, gepaart oder ungepaart, implementiert in Origin 7.0) berechnet. Bei $n < 8$ oder nicht normalverteilten Daten erfolgte der Test bei gepaarten Daten mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Wilc., implementiert in StatView oder PYTHON), ansonsten mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Mann., implementiert in PYTHON).

3 Resultate

Alle Versuche im Hirnschnitt erfolgten in Layer V Pyramidenneuronen des somatosensorischen Cortex mit 1000 U ml^{-1} Interferon. Bis auf eine Ausnahme (Experimente in HCN1 -/- Mäusen) wurden für die Experimente Wistarratten (P11 - P27) genutzt. Bei allen Experimenten wurde eine auf KMeSO_4 basierende Pipettenlösung verwendet ⁹.

3.1 Einfluss von Interferon auf I_h

3.1.1 Bestätigung des Effekts

In den Vorarbeiten konnte bereits festgestellt werden, dass eine IFN- β Applikation den Eingangswiderstand erhöht (siehe 1.2.5 auf Seite 7). Diese Modulation deutet auf eine Änderung des I_h hin. Ziel der in diesem Abschnitt zusammengefaßten Experimente war, diese Befunde zu bestätigen.

3.1.1.1 IFN- β moduliert I_h cAMP unabhängig

- Hypothese:** Die Modulation des I_h tritt auch ohne cAMP auf.
Resultat: Hypothese bestätigt; In Folge von IFN- β erfolgt eine I_h Reduktion um ca. 25 % auf.
Versuchssystem: Rattencortex - Layer V, DCS - I_h Iso., Intra - K Methyl ohne cAMP

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein bekannter Modulator der HCN Kanäle, der vor allem bei der langsamen HCN Untereinheit HCN2 eine Verschiebung der U_h bewirkt (siehe 1.3.3.4 auf Seite 18). Die bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse zeigten eine I_h Verminderung unter Verwendung einer intrazellulären Lösung (Pipettenlösung) mit supramaximaler cAMP Konzentration (0,1 mM). Diese wurde verwendet, da das Fehlen von cAMP für einen möglichen *run down* des I_h verantwortlich gemacht wird (Pian et al. 2006). Ein solcher *run down* ist mit einer Verschiebung der U_h hin zu negativeren Spannungswerten assoziiert (siehe 2.6.1.2 auf Seite 40). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Modulation des I_h durch IFN- β nur bei dieser speziellen cAMP Konzentration zu beobachten ist. Deshalb sollte die I_h Modulation auch für eine intrazelluläre Lösung ohne cAMP bestätigt werden.

Auch ohne intrazelluläres cAMP bewirkte IFN- β (1000 U ml^{-1}) eine Verminderung des I_h (Abb. 3.1a). Diese fand bei allen, eine I_h Aktivierung auslösenden, Spannungen statt (Abb. 3.1b); am deutlichsten ausgeprägt war der Effekt allerdings bei der maximal gemessenen Aktivierung (-130 mV), weshalb die nachfolgenden Vergleiche sich auf die Aktivierung bei dieser Spannung beziehen.

⁹Zur Zusammensetzung der Extra- und Intrazellulärlösung siehe 2.3.3 auf Seite 28.

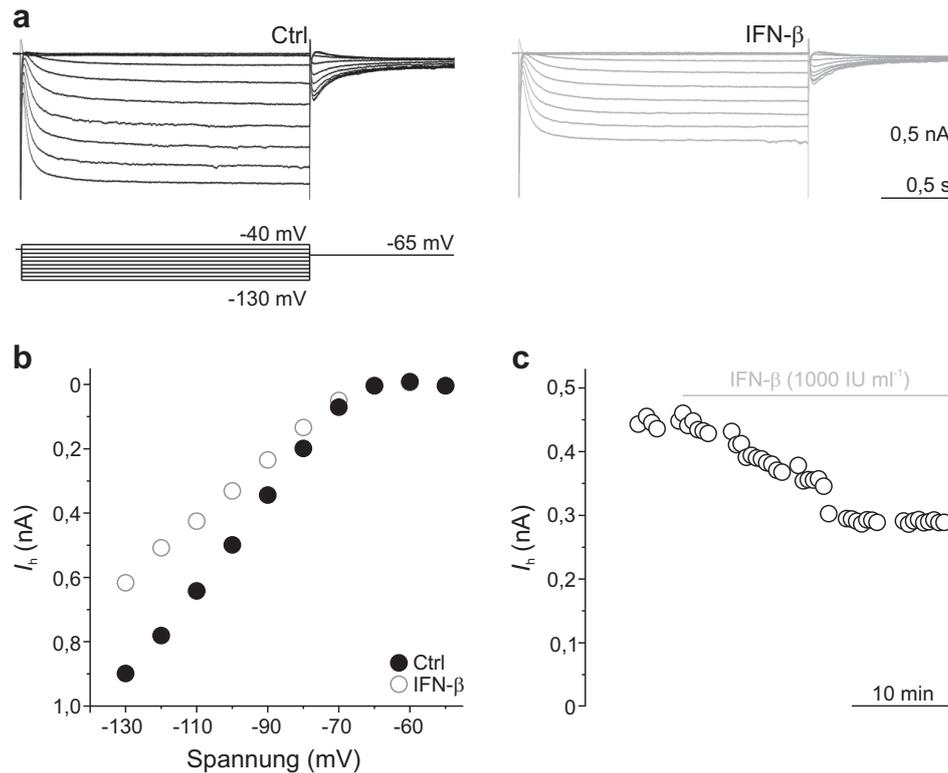


Abbildung 3.1: IFN- β reduziert I_h . (a) *Leak subtracted* I_h vor (links) und nach (rechts) 1000 U ml⁻¹ IFN- β . Die Aktivierung des I_h erfolgte durch sukzessive Hyperpolarisation der Membranspannung in 10 mV Schritten von -40 mV bis -130 mV (Interpulsintervall von 5 s) (b) Strom/Spannungskurve des *leak subtracted* I_h vor (○) und nach IFN- β Applikation (●). (c) Zeitverlauf der Amplitudenreduktion (*leak subtracted* I_h) im Zuge einer IFN- β Gabe. Die Aufzeichnung dieser Datenpunkte erfolgte im Unterschied zu allen anderen Protokollen durch Hyperpolarisation auf -100 mV, um eine etwaige Schädigung des Neurons oder eine Reduktion des I_h durch wiederholte, starke Hyperpolarisation zu verhindern.

Die Reduktion der *leak subtracted* I_h Amplitude¹⁰ begann ca. 3 min nach IFN- β Applikation und benötigte etwa 20 min um einen stabilen Zustand zu erreichen (Abb. 3.1c). Wie auch bei supramaximaler cAMP Konzentration (Daten aus der Dissertation von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.) führte IFN- β in allen untersuchten Neuronen zu einer Reduzierung der maximalen I_h Amplitude bei -130 mV (Kontrolle: 869 pA \pm 109 pA vs. IFN- β : 642 pA \pm 175 pA; $n = 6$; $P < 0,05$; Abb. 3.2a). Diese erfolgte ohne Veränderung der Aktivierungskurve (Abb. 3.2b): die beiden Parameter der Aktivierung, k (Kontrolle: 10,2 mV \pm 0,6 pA vs. IFN- β : 10,4 pA \pm 1,0 pA; $n = 6$; $P > 0,75$; Abb. 3.2c) und U_h (Kontrolle: -91,2 mV \pm 4,0 mV vs. IFN- β : -89,1 mV \pm 3,0 mV; $n = 6$; $P > 0,24$; Abb. 3.2d) blieben konstant.

¹⁰Alle angegebenen I_h Amplituden wurden mittels der *leak subtraction* Methode bestimmt (siehe 2.6.1.2 auf Seite 40).

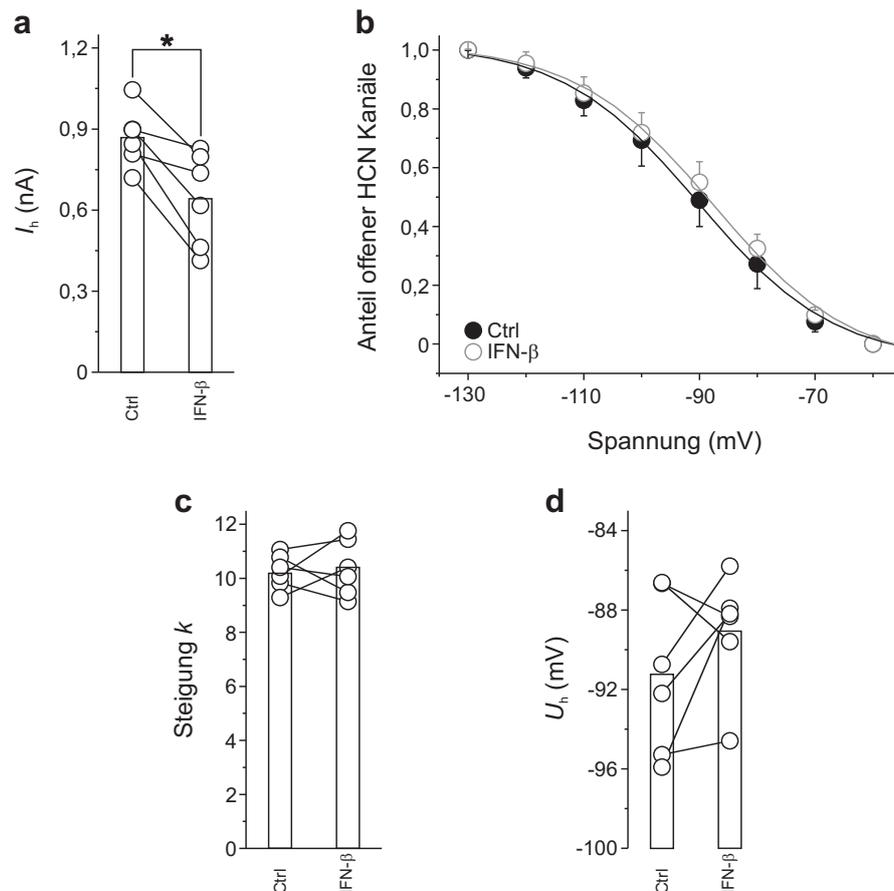


Abbildung 3.2: IFN- β reduziert I_h in allen untersuchten Neuronen bei gleichbleibender U_h . (a) Eine Reduktion des *leak subtracted* I_h bei -130 mV konnte in allen untersuchten Layer V Pyramidenneuronen beobachtet werden. (b) IFN- β führte nicht zu einer Veränderung der Aktivierungsfunktion (Ctrl: \circ , IFN- β : \bullet). (c) Die Steigung k der Aktivierungskurve sowie (d) die halbe Aktivierungsspannung U_h verblieben konstant nach IFN- β Applikation.

Die U_h (vor der IFN- β - Applikation) ist im Vergleich zu der aus den Experimenten mit supramaximaler cAMP Konzentration (Kontrollwert: $-88,3$ mV \pm $7,5$ mV; Daten aus der Promotion von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.) zwar geringfügig hyperpolarisiert, die Verschiebung war allerdings nicht signifikant ($n = 6$; $P > 0,14$). Dies stimmt überein mit der relativen cAMP Insensitivität der hauptsächlich exprimierten HCN Untereinheit in diesem Neuronentyp, HCN1, und den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (z. B. Kole et al. 2006).

Die Reduktion des I_h wurde nicht durch eine Zunahme des seriellen Widerstandes R_s bewirkt (Kontrolle: $10,1$ M Ω \pm $2,0$ M Ω vs. IFN- β : $10,7$ M Ω \pm $2,4$ M Ω ; $n = 6$; $P > 0,07$). Die durchschnittliche Kapazität der Zellen betrug 194 pF \pm 24 pF.

Die I_h Aktivierung in Layer V Pyramidenneuronen ist gekennzeichnet durch einen schnellen Anstieg der Amplitude in den ersten etwa 100 ms, gefolgt von einer langsameren

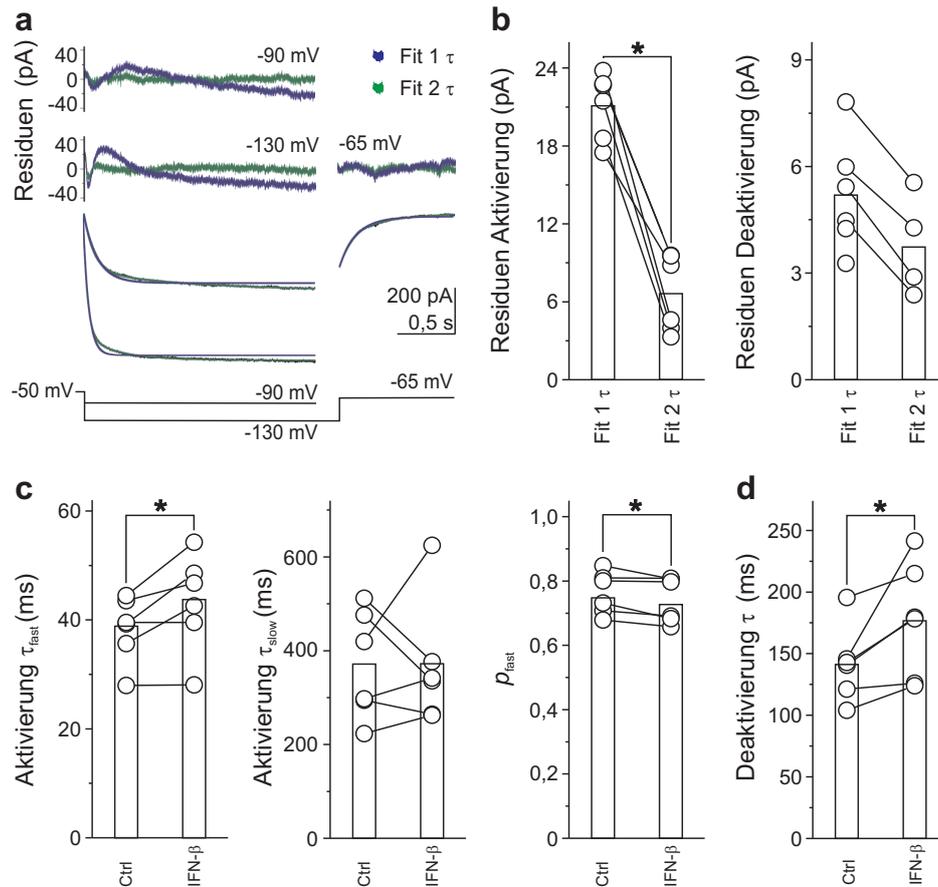


Abbildung 3.3: IFN- β verlangsamt die I_h Aktivierung. (a) Fit der Aktivierung (links) und Deaktivierung (rechts) des I_h (unten) mit ein (blau) oder zwei (grün) Zeitkonstanten und Residuen der Fits (oben). (b) Der Fit mit zwei Zeitkonstanten lieferte sowohl für die Aktivierung auf -130 mV (signifikant, links) als auch für die Deaktivierung auf -65 mV (nicht signifikant, rechts) eine bessere Übereinstimmung mit dem Zeitverlauf des I_h . Allerdings war für die Deaktivierung ein Fit mit zwei unterschiedlichen Zeitkonstanten nicht für alle Experimente möglich (nicht verbundene Datenpunkte). (c) IFN- β Applikation führte zu einer spezifischen Erhöhung der schnellen Zeitkonstante τ_{fast} (links). Für die langsame Zeitkonstante τ_{slow} konnte keine signifikante Änderung festgestellt werden (mittig). Mit der Erhöhung von τ_{fast} einher ging eine Reduzierung ihres Anteils am Gesamtverlauf des Stromes (rechts). (d) IFN- β führte ebenfalls zu einer Verlangsamung der Kinetik der Deaktivierung.

Komponente, die ca. 1 s bis 2 s zur vollständigen Aktivierung benötigt. Folglich konnte der Verlauf der Aktivierung gut mit einer biexponentiellen Funktion (Abb. 3.3a, grüner Fit) beschrieben werden (für die Fitfunktion siehe Formel 2.8 auf Seite 41), sowohl bei einem Sprung auf etwa U_h (-90 mV) als auch bei einer nahezu vollständigen Aktivierung der HCN Kanäle (-130 mV). Zum Vergleich: ein Fit mit einer monoexponentiellen Funktion wich stark von der beobachteten Kinetik ab (Abb. 3.3a, blauer Fit). Dies war bei allen gemessenen Zellen der Fall (Residuen beim Fit mit einer Zeitkonstante: $21,1$ pA \pm $2,5$ pA

vs. Residuen beim Fit mit zwei Zeitkonstanten: $6,6 \text{ pA} \pm 3,0 \text{ pA}$; $n = 6$; $P < 0,05$; Abb. 3.3b links). Die Kinetik der Deaktivierung ließ sich mit zwei Zeitkonstanten zwar ebenfalls besser beschreiben als mit einer, allerdings war die Verbesserung nicht signifikant (Residuen beim Fit mit einer Zeitkonstante: $5,9 \text{ pA} \pm 1,6 \text{ pA}$ vs. Residuen beim Fit mit zwei Zeitkonstanten: $3,8 \text{ pA} \pm 1,4 \text{ pA}$; $n = 4$; $P > 0,05$; Abb. 3.3b rechts). Bei zwei Zellen (unverbundene Kreise in Abb. 3.3b rechts) war ein Fit mit zwei Zeitkonstanten nicht möglich. Aus diesem Grund, und da für die bereits vorliegenden I_h Daten die Beschreibung der Deaktivierungskinetik immer mit einer Zeitkonstante erfolgte, wurde für die weitere Analyse die Deaktivierung auch in dieser Arbeit immer mit einer Zeitkonstante gefittet.

Die Verminderung der I_h Amplitude war mit einer Verlangsamung der Aktivierungskinetik assoziiert. Hierbei konnte eine selektive Vergrößerung der schnellen Zeitkonstante, τ_{fast} , der I_h Aktivierung festgestellt werden (Kontrolle: $38 \text{ ms} \pm 6 \text{ ms}$ vs. IFN- β : $43 \text{ ms} \pm 9 \text{ ms}$; $n = 6$; $P < 0,05$; Abb. 3.3c links); die langsame Zeitkonstante τ_{slow} blieb unverändert (Kontrolle: $371 \text{ ms} \pm 115 \text{ ms}$ vs. IFN- β : $368 \text{ ms} \pm 134 \text{ ms}$; $n = 6$; $P > 0,9$; Abb. 3.3c mittig). Es zeigte sich auch, dass der Anteil der schnellen Komponente an der Aktivierung des Gesamtstroms p_{fast} durch IFN- β abnahm (Kontrolle: $0,76 \pm 0,07$ vs. IFN- β : $0,74 \pm 0,07$; $n = 6$; $P < 0,05$; Abb. 3.3c rechts). Des Weiteren trat eine Verlangsamung der Kinetik der Deaktivierung nach IFN- β Applikation auf (Kontrolle: $142 \text{ ms} \pm 31 \text{ ms}$ vs. IFN- β : $177 \text{ ms} \pm 47 \text{ ms}$; $n = 6$; $P < 0,05$; Abb. 3.3d).

Die Verminderung und Verlangsamung des I_h kann sowohl bei der Verwendung einer Intrazellulärlösung mit supramaximalem cAMP Gehalt als auch beim Fehlen von cAMP nachgewiesen werden. Da in der *whole cell* Konfiguration eine starke Durchmischung und daher Verdünnung des intrazellulären Milieus des Neurons auftritt, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auch eine durch cAMP vermittelte Interaktion zwischen IFN- β und HCN ausgeschlossen werden.

3.1.1.2 IFN- β zeigt keinen Einfluss auf die Leckkomponente

- Hypothese:** Die Verringerung des I_h ist nicht auf eine Erhöhung des Leckstromes zurückzuführen.
- Resultat:** IFN- β bewirkt keine Änderung des Leckstroms.
- Versuchssystem:** Rattencortex - Layer V, DCS - I_h Iso., Intra - K Methyl mit cAMP, Block des I_h mit ZD7288

In den bereits zu Beginn der Studie vorliegenden Ergebnissen erfolgte die Bestimmung der I_h Amplitude mittels der *leak subtraction* Methode (siehe 2.6.1.2 auf Seite 40). Diese Methode beruht auf einer Extrapolation des Leckstroms I_{leak} und Subtraktion dieses Stroms vom gemessenen *steady state* bei einer bestimmten Spannung. Diese Methode ist empfindlich gegenüber Änderungen des I_{leak} . Bei gleichbleibender Gesamtamplitude führte eine Erhöhung des I_{leak} zu einer falsch berechneten Reduktion des *leak subtracted* I_h . Um einen solchen Effekt auszuschließen, wurde der Leckstrom nach dem Block der HCN Kanäle mittels ZD7288 vor und nach IFN- β Gabe gemessen.

Hierbei trat keine Änderung des Leckstroms auf (Kontrolle: $495 \text{ pA} \pm 130 \text{ pA}$ vs. IFN- β : $502 \text{ pA} \pm 154 \text{ pA}$; $n = 9$; $P > 0,86$; Abb. 3.4). Geachtet wurde auf eine etwa gleich lange Einwirkzeit von IFN- β im Vergleich zum vorherigen Experimentsatz ($15 \text{ min} \pm 7 \text{ min}$ vs. $16 \text{ min} \pm 8 \text{ min}$, bei einer minimalen Einwirkzeit bei beiden Experimentsätzen von 6 min). Die durchschnittliche Kapazität der Zellen betrug $195 \text{ pF} \pm 34 \text{ pF}$.

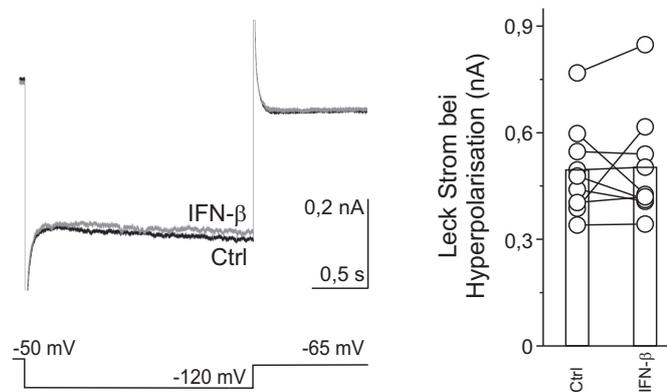


Abbildung 3.4: IFN- β hat keinen Einfluss auf den Leckstrom. Nach der pharmakologischen Isolierung des I_h und darauffolgender I_h Blockung verblieb einzig ein passiver Leckstrom im Neuron. Dieser I_{leak} zeigte keine Abhängigkeit von IFN- β (links: Exemplarische Darstellung des I_{leak} vor (schwarzer Stromverlauf) und nach (grau) IFN- β ; rechts: Datenpunkte des *steady state* I_{leak} vor und nach IFN- β).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die berechnete I_h Verminderung direkt auf eine Verminderung des zellulären I_h zurückgeführt werden kann.

3.1.2 Typ I und Typ II Interferone modulierten I_h

Bislang konnte für das Typ I Interferon IFN- β eine direkte Ionenkanalmodulation des I_h nachgewiesen werden. Hier soll überprüft werden, ob auch andere Interferone diese neuromodulatorische Wirkung zeigen.

3.1.2.1 IFN- α

Hypothese: Auch IFN- α , ein weiterer Vertreter der Typ I Interferone, bewirkt eine I_h Verminderung.

Resultat: IFN- α bewirkt eine I_h Reduktion im gleichen Ausmaß wie IFN- β .

Versuchssystem: Rattencortex - Layer V, DCS - I_h Iso., Intra - K Methyl mit cAMP

Alle Typ I Interferone binden an dem gleichen Rezeptor (IFNAR, siehe 1.2.1 auf Seite 4) und es konnte gezeigt werden, dass die I_h Verminderung nur nach Aktivierung des diesem Rezeptor nachgeschalteten Signalweges erfolgt (siehe 1.2.5 auf Seite 7). Beides zusammen legte die Vermutung nahe, dass auch IFN- α , welches an demselben Rezeptor

bindet, zu einer I_h Verminderung führen könnte. Daher wurden die IFN- β - I_h Versuche mit IFN- α wiederholt.

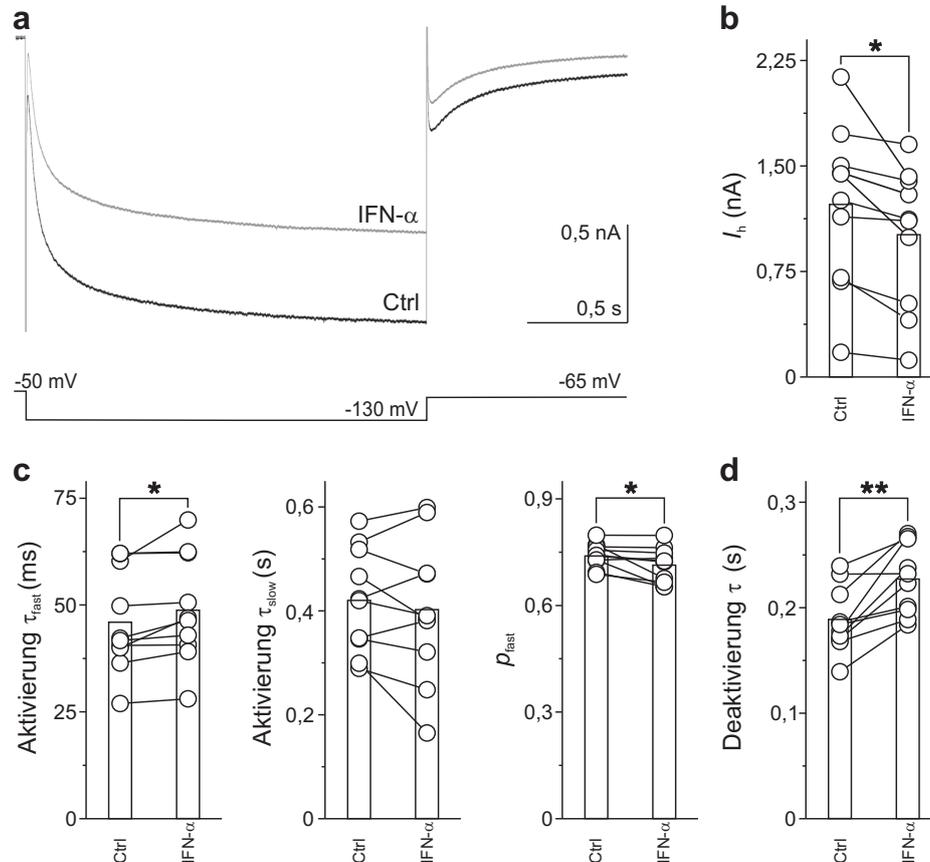


Abbildung 3.5: IFN- α moduliert I_h . (a) *Leak subtracted* I_h vor (schwarz) und nach (grau) IFN- α Applikation. (b) IFN- α führte zu einer Reduktion der I_h Amplitude in allen untersuchten Zellen. (c) Die Änderung der I_h Kinetik nach IFN- α glich jener durch IFN- β : Es trat eine Verlangsamung der schnellen Komponente der Aktivierung des I_h (quantifiziert durch die Erhöhung von τ_{fast} , links) auf, während die langsame Komponente konstant blieb (τ_{slow} , mittig). Wiederum kam es zu einer Reduktion des relativen Anteils der schnellen Komponente am Gesamtstrom (rechts). (d) Eine Verlangsamung der Kinetik der Deaktivierung infolge von IFN- α konnte ebenfalls festgestellt werden.

Wie IFN- β bewirkte auch IFN- α eine Verminderung der *leak subtracted* I_h Amplitude (Kontrolle: $1,22 \text{ nA} \pm 0,57 \text{ nA}$ vs. IFN- α : $1,00 \text{ nA} \pm 0,50 \text{ nA}$; $n = 10$; $P < 0,05$; Abb. 3.5a und b). Die Veränderung war nicht durch eine Verschiebung der U_h bedingt (Kontrolle: $-88,3 \text{ mV} \pm 3,4 \text{ mV}$ vs. IFN- α : $-86,6 \text{ mV} \pm 4,3 \text{ mV}$; $n = 8$; $P > 0,06$; die im Vergleich zu den Amplituden geringere n -Zahl war durch einen Verlust zweier Zellen während des Experiments bedingt: zwar konnte die *steady state* Amplitude noch gemessen werden, eine Analyse des *tail currents* war hingegen nicht mehr möglich). Bei keiner in die Analyse miteinbezogenen Zellen änderte sich der R_s um mehr als 30 %, und auch im Mittel konnte

keine signifikante R_s Änderung festgestellt werden (Kontrolle: $7,7 \text{ M}\Omega \pm 2,9 \text{ M}\Omega$ vs. IFN- α : $8,2 \text{ M}\Omega \pm 2,6 \text{ M}\Omega$; $n = 10$; $P > 0,1$). Die durchschnittliche Kapazität der Zellen betrug $210 \text{ pF} \pm 43 \text{ pF}$.

Analog zu IFN- β führte auch IFN- α zu einer Änderung der Kinetik des I_h (Abb. 3.5c und d): die schnelle Zeitkonstante τ_{fast} stieg von $46,2 \text{ ms} \pm 1,1 \text{ ms}$ auf $48,9 \text{ ms} \pm 1,2 \text{ ms}$ ($n = 10$; $P < 0,05$), während keine Änderung der langsamen Zeitkonstante τ_{slow} auftrat (Kontrolle: $421,5 \text{ ms} \pm 100,1 \text{ ms}$ vs. IFN- α : $402,3 \text{ ms} \pm 137,8 \text{ ms}$; $n = 10$; $P > 0,3$). Dies war wiederum mit einer Abnahme des relativen Anteils der schnellen Amplitude am Gesamtverlauf p_{fast} assoziiert (Kontrolle: $0,74 \pm 0,03$ vs. IFN- α : $0,71 \pm 0,05$; $n = 10$; $P < 0,05$). Die Deaktivierungszeitkonstante, τ_{deakt} , stieg von $188,3 \text{ ms} \pm 30,9 \text{ ms}$ auf $226,8 \text{ ms} \pm 33,2 \text{ ms}$ ($n = 10$; $P < 0,01$).

Somit kann festgestellt werden, dass alle untersuchten Typ I Interferone eine Modulation des I_h in Layer V Neurone bewirken.

3.1.2.2 IFN- γ

- Hypothese:** IFN- γ bewirkt keine I_h Modulation.
Resultat: Die Hypothese wurde falsifiziert, IFN- γ hat einen mit IFN- α und IFN- β vergleichbaren Einfluss.
Versuchssystem: Rattencortex - Layer V, DCS - I_h Iso., Intra - K Methyl mit cAMP

Im Gegensatz zu den Typ I Interferonen, deren Wirkung über eine Bindung an einen gemeinsamen Rezeptor (IFN- α/β -Rezeptor, IFNAR) vermittelt wird, bindet das Typ II Interferon IFN- γ an einen eigenen Rezeptor: IFNGR (IFN- γ Rezeptor Komplex). Die dadurch angestoßene kanonische Signalkaskade ist spezifisch für Typ II Interferone (siehe Abb. 1.1). Zusammen mit den zuvor gezeigten Ergebnissen ließ dies eine auf Typ I Interferone beschränkte IFN/ I_h Interaktion vermuten. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden die Versuche mit dem Typ II Interferon, IFN- γ , wiederholt.

Überraschenderweise zeigte sich auch bei diesen Versuchen eine Reduktion des I_h in einem mit Typ I Interferonen vergleichbaren Ausmaß (Abb. 3.6a). Die *leak subtracted* I_h Amplitude (Abb. 3.6b) sank im Schnitt um ca. 20% von $1,10 \text{ nA} \pm 0,54 \text{ nA}$ auf IFN- γ : $0,89 \text{ nA} \pm 0,41 \text{ nA}$ ($n = 9$; $P < 0,01$). Zwar kam es hierbei zu einer signifikanten Verschiebung der U_h (Kontrolle: $-89,5 \text{ mV} \pm 3,5 \text{ mV}$ vs. IFN- γ : $-87,2 \text{ mV} \pm 4,4 \text{ mV}$; $n = 9$; $P < 0,05$), allerdings erfolgte diese in den depolarisierten Bereich und konnte somit nicht für die I_h Reduktion verantwortlich gemacht werden. Die Reduktion des I_h konnte auch nicht auf eine Zunahme des seriellen Widerstandes zurückgeführt werden (Kontrolle: $9,58 \text{ M}\Omega \pm 2,73 \text{ M}\Omega$ vs. IFN- γ : $9,87 \text{ M}\Omega \pm 2,86 \text{ M}\Omega$; $n = 9$; $P > 0,5$). Die durchschnittliche Kapazität der Zellen betrug $212 \text{ pF} \pm 26 \text{ pF}$. Wie auch bei Typ I Interferonen kam es zu einer Verlangsamung der Kinetik (Abb. 3.6c und d), die im Falle der Aktivierung auf die schnelle Komponente beschränkte war (τ_{fast} : Kontrolle: $45,0 \text{ ms} \pm 10,3 \text{ ms}$ vs. IFN- γ : $52,9 \text{ ms} \pm 14,6 \text{ ms}$; $n = 9$; $P < 0,01$ und τ_{slow} : Kontrolle: $334,7 \text{ ms} \pm 83,1 \text{ ms}$ vs. IFN- γ : $456,0 \text{ ms} \pm 249,1 \text{ ms}$; $n = 9$; $P > 0,19$). Dabei kam es zu einer signifikanten Verminde-

3.1 Einfluss von Interferon auf I_h

zung des relativen Anteils der schnellen Amplitude am Gesamtverlauf p_{fast} (Kontrolle: $0,70 \pm 0,04$ vs. IFN- γ : $0,65 \pm 0,06$; $n = 9$; $P < 0,05$). Wie zu diesem Zeitpunkt schon zu erwarten, kam es wiederum zu einer Verlangsamung der Deaktivierungskinetik im Sinne einer Erhöhung von τ_{deakt} (Kontrolle: $194,6 \text{ ms} \pm 43,3 \text{ ms}$ vs. IFN- γ : $244,0 \text{ ms} \pm 62,6 \text{ ms}$; $n = 9$; $P < 0,01$).

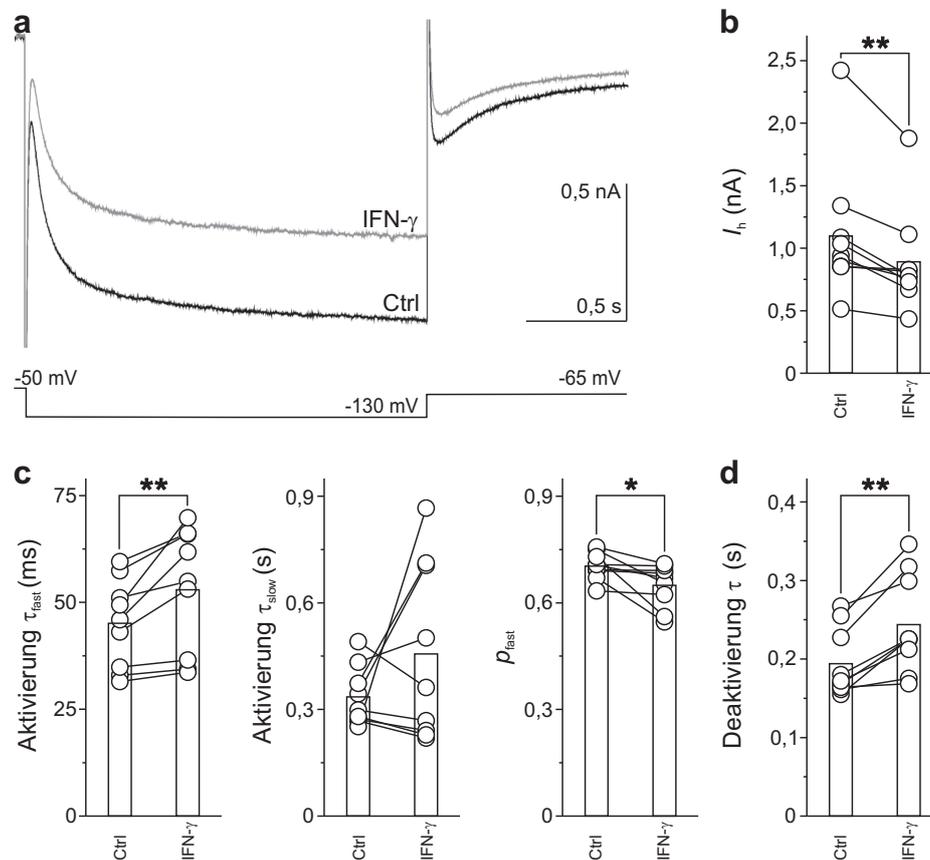


Abbildung 3.6: IFN- γ moduliert I_h . (a) *Leak subtracted* I_h vor (schwarz) und nach (grau) IFN- γ Applikation. (b) IFN- γ führte zu einer Verringerung der I_h Amplitude in allen untersuchten Zellen. (c) Wie bei den Typ I Interferonen IFN- α und IFN- β führte das Typ II Interferon IFN- γ ebenfalls zu einer Verlangsamung der I_h Aktivierung. Die schnelle Zeitkonstante der Aktivierung τ_{fast} nahm zu (links), während keine signifikante Änderung der langsamen Zeitkonstante τ_{slow} auftrat (mittig). Dies war verbunden mit einer Reduktion des relativen Anteils der schnellen Komponente am Gesamtstrom (rechts). (d) Eine Verlangsamung der Kinetik der Deaktivierung infolge von IFN- γ konnte ebenfalls festgestellt werden.

Diese Versuche zeigen, dass sowohl Typ I als auch Typ II Interferone eine Reduktion und Verlangsamung des I_h bewirken. Bemerkenswert ist die Konstanz der Reduktion, im Mittel kam es zu einer I_h Verminderung um $22,7\% \pm 3,5\%$. Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse wurde für alle weiteren *in vitro* Experimente IFN- β verwendet.

3.1.3 Die Modulation des I_h beruht auf einer Aktivierung der neuronalen IFN-Signalkaskade

Die vorherigen Versuche zeigen, dass sowohl Typ I als auch Typ II Interferone I_h modulieren. Offen ist, wie diese Modulation vermittelt wird. In Frage kommen (i) eine direkte Interferon HCN Kanalinteraktion, (ii) eine Interaktion über den intrazellulären Interferonsignalweg oder (iii) eine Vermittlung über eine Interferonaktivierung der glialen Umgebung (siehe auch 1.4.1.3 auf Seite 23).

3.1.3.1 Ausschluss einer direkten Interferon - HCN Kanalinteraktion

- Hypothese:** IFN- β zeigt keinen Einfluss auf HCN Kanäle ohne den IFN spezifische Signalweg.
- Resultat:** In HEK293 Zellen exprimierte rHCN Kanäle werden von rIFN- β nicht moduliert.
- Versuchssystem:** HEK293 Zellen mit rHCN1 oder rHCN2, Extra - HEK, Intra - K Methyl mit cAMP

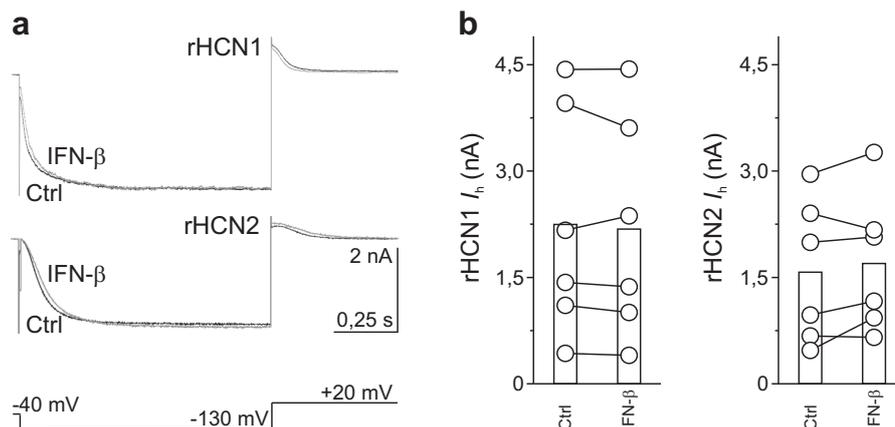


Abbildung 3.7: IFN- β zeigt keinen Einfluss auf in HEK293 Zellen exprimierte HCN Kanäle (a, Ctrl: schwarz, IFN- β : grau). Dies traf sowohl auf exprimierte rHCN1 Kanäle (b links) als auch rHCN2 Kanäle zu (b rechts).

Die bis dato vorliegenden Ergebnisse wiesen auf eine durch den Typ I Signalweg vermittelte IFN- β - HCN Beeinflussung hin; nach Blockade des ersten Schritts der intrazellulären Interferonsignalkaskade, JAK1, konnte keine I_h Modulation durch IFN- β mehr erzielt werden (Daten aus der Dissertation von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev. - siehe auch 1.2.5 auf Seite 7). Als zusätzliche Evidenz sollte eine direkte Modulation der HCN Kanäle durch IFN ausgeschlossen werden. Dazu wurden rHCN1 und rHCN2 Kanäle in HEK293 Zellen exprimiert. Die Wahl fiel auf dieses humane, d. h. nicht auf Rattenzellen basierendes, Expressionssystem, um eine mögliche Aktivierung

des Interferonsignalweges durch die Applikation von Ratten Interferon zu verhindern. Dies war möglich, da rIFN- β eine hohe Spezifität aufweist (Novick et al. 1994; U-CyTech Datenblatt rIFN- β auf <https://www.ucytech.com/sites/default/files/manuals/Datasheet20CT044.pdf>) und somit nicht an (humanen) Interferonrezeptoren bindet. Die Klonierung und Transfektion der HEK Zellen erfolgte durch Herrn Arne Battefeld, die Messungen wurden ebenfalls in Zusammenarbeit mit ihm durchgeführt.

Weder für den durch rHCN1 noch durch rHCN2 vermittelten I_h konnte eine Modulation durch rIFN- β festgestellt werden (Abb.3.7a und b). Die Amplitude des *leak subtracted* I_h der mit rHCN1 transfizierten Zellen betrug vor IFN- β Applikation $2,25 \text{ nA} \pm 1,6 \text{ nA}$ und danach $2,20 \text{ nA} \pm 1,5 \text{ nA}$ ($n = 6$; $P > 0,3$). Bei den mit rHCN2 transfizierten HEK293 Zellen konnte ebenfalls keine signifikante Änderung der *leak subtracted* I_h Amplitudenwerte beobachtet werden (Kontrolle: $1,58 \text{ nA} \pm 1,00 \text{ nA}$ vs. IFN- β : $1,71 \text{ nA} \pm 1,00 \text{ nA}$; $n = 6$; $P > 0,2$). Somit kann eine direkte Wirkung von IFN auf HCN Kanäle ausgeschlossen werden.

3.1.3.2 Ein rein neuronaler Effekt

- Hypothese:** IFN- β führt auch bei einer drastisch reduzierten glialen Zellzahl zu einer Modulation des I_h .
- Resultat:** Bestätigt. Die Modulation des neuronalen I_h wird nicht durch die gliale Umgebung vermittelt.
- Versuchssystem:** Corticale primäre Neuronenkultur, Extra - Kultur, Intra - K Methyl mit cAMP

Nach dem Ausschluss einer direkten Wechselwirkung zwischen IFN- β und HCN Kanälen blieben zwei Hypothesen, die den Einfluss von IFN- β auf I_h erklären können. Zum einen könnte Interferon an glialen Zellen binden und die Freisetzung eines Botenstoffes verursachen, der in weiterer Folge direkt oder indirekt (über die Aktivierung eines neuronalen Signalweges) auf HCN Kanäle wirkt. Zum anderen könnte IFN- β an neuronale IFNAR binden und die I_h Modulation eine Folge der interneuronalen Signalkaskade darstellen. Letztere Hypothese impliziert, dass die I_h Modulation durch Interferon auch in einer primären, neuronalen Zellkultur, bei der die Anzahl der glialen Zellen stark reduziert sind, nachweisbar sein sollte.

Dies war der Fall: IFN- β führte zu einer mit den *in vitro* Ergebnissen vergleichbaren Reduktion der I_h Amplitude um ca. 25% (Kontrolle: $389 \text{ pA} \pm 134 \text{ pA}$ vs. IFN- β : $283 \text{ pA} \pm 63 \text{ pA}$; $n = 5$; $P < 0,05$; 3.8a und b). Der Zeitverlauf der I_h Verminderung ähnelte ebenfalls dem im Hirnschnitt (Abb. 3.8a). Die Verminderung des I_h war nicht mit einer Erhöhung des R_s verbunden (Kontrolle: $15,4 \text{ M}\Omega \pm 3,8 \text{ M}\Omega$ vs. IFN- β : $14,8 \text{ M}\Omega \pm 3,8 \text{ M}\Omega$; $n = 5$; $P > 0,8$). Die durchschnittliche Kapazität der Zellen betrug $55 \text{ pF} \pm 20 \text{ pF}$.

Die I_h Reduktion war wie auch bei den Versuchen im Hirnschnitt (Hadjilambrea et al. 2005, siehe auch 3.2.1 auf Seite 66) mit einer signifikanten Erhöhung des Eingangswiderstandes verbunden. (Kontrolle: $645 \text{ M}\Omega \pm 518 \text{ M}\Omega$ vs. IFN- β : $721 \text{ M}\Omega \pm 549 \text{ M}\Omega$; $n = 6$; $P < 0,05$; Abb. 3.8c).

IFN- β moduliert I_h unabhängig von der glialen Umgebung des Neurons. Zusammen mit den Ergebnissen von 3.1.3.1 auf Seite 55 und der Beobachtung, dass nach Blockade der Interferonsignalkaskade keine Modulation des I_h auftritt (Daten aus der Dissertation von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.) bestätigt dies die Hypothese, dass die neuromodulatorische Wirkung von Interferon über die neuronale Interferonsignalkaskade vermittelt wird.

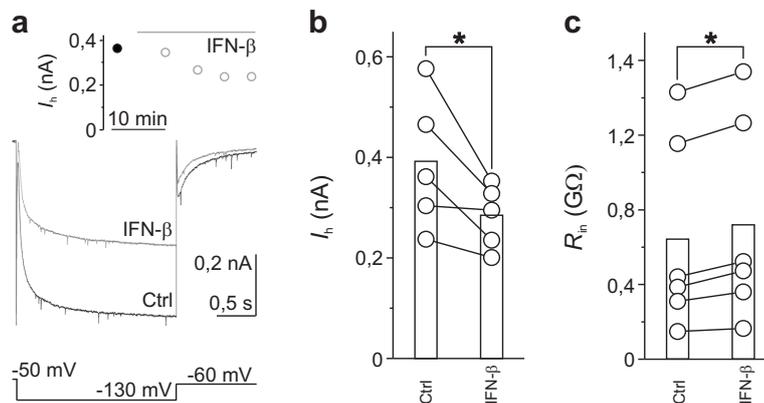


Abbildung 3.8: IFN- β moduliert I_h in primär kultivierten, corticalen Neuronen. (a) *Leak subtracted* I_h in einem kultivierten Neuron vor (schwarzer Stromverlauf) und nach (grau) IFN- β Applikation. Wie im Gehirnschnitt benötigte der Effekt etwa 20 min um seinen volle Ausprägung zu erreichen (eingefügtes Bild oben). (b) Die Reduktion der I_h Amplitude infolge von IFN- β konnte in allen gemessenen Zellen beobachtet werden. (c) Die Verminderung des I_h führte wie auch in Layer V Pyramidenneuronen im Hirnschnitt zu einer signifikanten Erhöhung des Eingangswiderstandes.

3.1.4 Welche HCN Untereinheiten werden durch Interferon moduliert?

- Hypothese:** Interferone wirken bevorzugt auf die „schnelle“ HCN Untereinheit HCN1.
- Resultat:** Sowohl Simulationsergebnisse als auch Messungen in HCN1 $-/-$ Mäusen sprechen für eine HCN1 spezifische Interferoninteraktion.
- Versuchssystem:** NEURON Simulation, Messungen in HCN1 $-/-$ Tiere

Sowohl Interferone des Typ I als auch des Typ II führten zu einer I_h Reduktion. Diese war bei allen Experimenten mit einer spezifischen Verlangsamung der schnellen Komponente der Aktivierung verbunden, die mit einer Verringerung des Amplitudenanteils der schnellen Komponente einherging (Abb. 3.3, Abb. 3.5c und d, Abb. 3.6c und d). Dieser Umstand ließ eine bevorzugte Wirkung der Interferone auf die schnelle HCN Untereinheit, HCN1, vermuten. Um diese Vermutung zu untermauern, wurde zuerst ein Modell eines

Neurons mit zwei HCN Kanälen erstellt. Eine Überprüfung der Simulationsergebnisse erfolgte daraufhin in HCN1 -/- Mäusen.

3.1.4.1 *In silico* Untersuchung

Für die computerbasierte Untersuchung des Effekts wurde eine morphologische Rekonstruktion eines corticalen Layer V Pyramidenneurons verwendet (Stuart und Spruston 1998 - Fig. 1A.; siehe auch 2.4.4.2 auf Seite 33). Zur Bestimmung einer möglichen HCN Subtyp spezifischen Interferoninteraktion musste dieses Modell mit den beiden, in adulten Layer V Pyramidenneuronen überwiegend vorhanden HCN Untereinheiten, HCN1 und HCN2, ausgestattet werden. Diese beiden Kanalmodelle wurden, basierend auf I_h Daten aus Expressionssystemen, *ad novo* erstellt.

HCN1 und HCN2 Modell

Die Implementierung der unabhängigen HCN1 und HCN2 Simulation erfolgte durch:

$$I_{h1,2}(U, t) = \hat{g}_{h1,2} l_{1,2}(U, t)(U - U_{\text{rev}}) \quad (3.1)$$

$I_{h1,2}$... Stromfluss durch die Untereinheiten HCN1 bzw. HCN2

$\hat{g}_{h1,2}$... maximale Leitfähigkeit des HCN1 respektive HCN2 Kanals

$l_{1,2}$... Aktivierungszustand der jeweiligen Untereinheit, d. h. Anteil der geöffneten Kanäle

U ... Membranspannung

U_{rev} ... Umkehrpotential des Stroms

Der Aktivierungszustand l folgt einer Kinetik erster Ordnung und errechnet sich für beide Untereinheiten unabhängig durch:

$$\frac{dl}{dt} = \frac{l_{\infty}(U) - l}{\tau(U)} \quad (3.2a)$$

mit

$$l_{\infty}(U) = \frac{1}{1 + e^{\frac{U - U_h}{k}}} \quad (3.2b)$$

$$\tau(U) = \frac{e^{0,0378 * gmt * z * (U - U_{\text{rev}})}}{q_{\Gamma} * aNt * (1 + e^{0,0378 * z * (U - U_h^{\tau})})} \quad (3.2c)$$

$$q_{\Gamma} = q_{10}^{\frac{T - 23}{10}} \quad (3.2d)$$

U_h	... halbe Aktivierungsspannung des HCN Kanals
k	... Steigung der Aktivierungskurve
gmt, z, aNt, U_h^τ	... Parameter zur Berechnung von τ in Abhängigkeit von U
q_{10}	... Skalierungsfaktor für die Temperaturabhängigkeit
T	... nominelle Temperatur der Simulation (32 °C)

Für eine realitätsnahe Beschreibung der Kinetik von HCN1 und HCN2 wurden die Parameter an die Zeitkonstantendaten von rHCN1 in HEK Zellen (Battfeld et al. 2010) und mHCN2 (Xue et al. 2002) angepasst. Die Anpassung der simulierten Ströme an den *in vitro* beobachteten I_h erfolgte dann in weiterer Folge durch Skalierung von \hat{g}_h und aNt . Die finalen Werte sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Für die Anpassung der Parameter wurde in NI LabVIEW ein Programm erstellt, das gleichzeitig die Darstellung der *in vitro* Vorgaben (Aktivierungskurve, Werte der Zeitkonstanten) und der aus den gewählten Parametern errechneten Kurven erlaubt. Eine Änderung der Parameter bewirkt dabei eine sofortige Neuberechnung der betreffenden Kurve und ermöglicht somit eine effiziente Anpassung des Kanalmodells an die experimentellen Ergebnisse.

Die halbe Aktivierungsspannung U_h entsprach den Messungen an Layer V Neuronen mit supramaximaler cAMP Konzentration (Daten aus der Dissertation von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.), da hierbei die U_h von HCN2 in den Bereich derjenigen von HCN1 rückt (Wahl-Schott und Biel 2009). Des Weiteren sollten die u. U. geformten HCN1/2 Heteromere eine U_h vergleichbar mit uniform exprimierten HCN1 aufweisen (Chen et al. 2001). Der simulierte serielle Widerstand, R_s , entsprach dem Mittelwert des R_s bei diesen Messungen: 10,4 M Ω .

Nach dem Auffinden der optimalen Parameterkombination für HCN1 und HCN2 wurde das Kanalmodell in NMODL (*NEURON model description language*) implementiert und stand damit in der NEURON Programmierumgebung zur Verfügung.

Verteilung der HCN Kanäle

Die *in vitro* Untersuchungen des I_h erfolgte bei einer pharmakologischen Isolation des Stroms (siehe 2.6.1.2 auf Seite 40). Das *in silico* Äquivalent dazu ist ein Modell mit einem (passiven) I_{leak} und HCN1 und HCN2 als den alleinigen aktiven Kanälen.

Eine Zuweisung dieser Kanäle auf das unter 2.4.4.2 (auf Seite 33) vorgestellte Modell erfolgte mit einer entlang des Dendriten mit der Entfernung (d) exponentiell zunehmenden Leitfähigkeit (Kole et al. 2006):

$$\hat{g}_h = y + A e^{\frac{d}{\lambda}} \quad (3.3)$$

Tabelle 3.1: Parameter der HCN Modelle

Parameter	HCN1	HCN2
U_h	-88,3 mV	-88,3 mV
k	-10,6 mV	-10,6 mV
U_{rev}	-20,5 mV	-20,5 mV
aNt	$1,02 * 10^{-3}$	$2,2 * 10^{-4}$
z	1,8	1,5
gmt	0,44	0,561
U_h^τ	-90 mV	-90 mV
q_{10}	4,5	4,5

Der Skalierungsfaktor der Temperaturabhängigkeit (q_{10}) wurde aus Magee (1998) übernommen.

Mit den Parametern $y = -0,252 \text{ pS } \mu\text{m}^{-2}$; $A = 1,2 \text{ pS } \mu\text{m}^{-2}$ und $\lambda = 323 \mu\text{m}$ entsprach dies einer 40 fachen Zunahme entlang der dendritischen Achse (maximale Entfernung vom Soma: $1117,6 \mu\text{m}$). Um die geringere I_h Leitfähigkeit in jüngeren Ratten zu berücksichtigen, wurde die HCN Dichte im Unterschied zu der oben genannten Publikation auf einen Startwert von $0,95 \text{ pS } \mu\text{m}^{-2}$ am Soma reduziert.

In allen Kompartimenten wurde die Gesamtleitfähigkeit auf $\frac{2}{3}$ HCN1 und $\frac{1}{3}$ HCN2 aufgeteilt (zur Begründung dafür siehe 1.3.3.4 auf Seite 17). Das Spannungsprotokoll für die Simulation folgte dem der *in vitro* Experimente (-50 mV , -130 mV , -65 mV).

Simulationsergebnis

Der mit dem oben beschriebenen Ansatz simulierte I_h betrug $1,57 \text{ nA}$ (*leak subtracted*) mit $\tau_{\text{fast}} = 77,9 \text{ ms}$ und $\tau_{\text{slow}} = 451 \text{ ms}$, bei einem Anteil der schnellen Komponente am Gesamtstrom $p_{\text{fast}} = 0,61$. Die Deaktivierung erfolgte mit einer Zeitkonstante von $\tau_{\text{deakt}} = 212 \text{ ms}$.

Zwei IFN- β HCN Kanalinteraktionen wurden getestet:

1. Eine uniforme Reduktion beider HCN Kanaluntereinheiten
2. Eine spezifische Reduktion von HCN1

Die *in vitro* Ergebnisse zeigten, dass die Reduktion des I_h nicht durch eine Verschiebung der U_h bedingt wird. Deshalb erfolgte in beiden Fällen eine Reduktion der HCN Spitzenleitfähigkeit \hat{g}_h . Diese wurde reduziert, bis am Soma eine mit den *in vitro* Ergebnissen vergleichbare I_h Verminderung auf 76 % des Ausgangswertes auftrat.

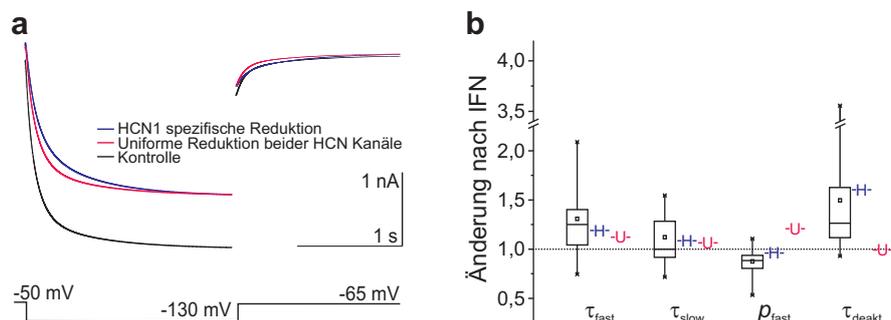


Abbildung 3.9: Simulationsergebnis zweier möglicher IFN- β HCN Subtyp Interaktionen. (a) Die spezifische Reduktion der schnellen Untereinheit des HCN Kanals, HCN1, führte zu einer deutlicheren Verlangsamung der Aktivierungskinetik verglichen mit einer uniformen Reduktion beider Untereinheiten. (b) Mit der spezifischen Reduktion der HCN1 Untereinheit (-H-) konnten die *in vitro* Ergebnisse (Boxplots, die Daten stammen aus den Versuchen zur IFN- β verursachten I_h Modulation mit supramaximalen cAMP Gehalt, Stadler et al. in Rev.) besser reproduziert werden als mit einer uniformen Reduktion beider Kanaluntereinheiten (-U-).

Dazu war es notwendig, die HCN Leitfähigkeit entweder (1) uniform auf 61,2 % zu reduzieren, oder (2) die Leitfähigkeit von HCN1 auf 42,5 % zu senken. Nur im Fall (2) konnten die *in vitro* Ergebnisse vollständig reproduziert werden (Abb. 3.9a und b): die schnelle Zeitkonstante der Aktivierung stieg um den Faktor 1,2 (auf $\tau_{\text{fast}} = 93 \text{ ms}$), bei

einer gleichzeitigen Reduktion des Anteils an der Gesamtkinetik auf $p_{\text{fast}} = 0,59$. Die langsame Zeitkonstante blieb nahezu unverändert ($\tau_{\text{slow}} = 491 \text{ ms}$ – Faktor 1,08). In weiterer Übereinstimmung mit den *in vitro* Versuchen kam es zu einem Anstieg der Zeitkonstante der Deaktivierung um den Faktor 1,6 ($\tau_{\text{deakt}} = 340 \text{ ms}$). Im Fall (1) kam es zu einer weniger ausgeprägten Verlangsamung der Aktivierung ($\tau_{\text{fast}} = 88 \text{ ms}$ – Faktor 1,1; $\tau_{\text{slow}} = 482 \text{ ms}$ - Faktor 1,07), die im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen mit einer Erhöhung des Anteils der schnellen Komponente ($p_{\text{fast}} = 0,74$) und einer beschleunigten Deaktivierung ($\tau_{\text{deakt}} = 210 \text{ ms}$ – Faktor 0,99) verbunden war.

Wie oben erwähnt, erfolgte die Anpassung der Werte an die Experimente mit supra-maximalem cAMP Gehalt (Daten aus der Promotion von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.). Dabei war keine Verschiebung der U_h zu erwarten, da bei dieser cAMP Konzentration die U_h der HCN1 und HCN2 Monomere sowie der HCN1/2 Heteromere sich in etwa gleichen sollte (Chen et al. 2001). Hätte man allerdings bei den Experimenten ohne intrazellulärem cAMP eine U_h Verschiebung erwarten können? Um diese Frage zu klären, wurde die U_h des HCN2 Modells soweit hyperpolarisiert, bis sich die Gesamt U_h um 2,9 mV in den negativeren Bereich verschob (analog zu den *in vitro* Ergebnissen in 3.1.1.1 auf Seite 46). Dazu war eine Verschiebung der HCN2 U_h um $-9,3 \text{ mV}$ notwendig. Wurde in diesem Ansatz nun die HCN1 Gesamtleitfähigkeit auf 42,5 % reduziert (siehe oben), verschob sich die Gesamt U_h um 0,88 mV. Im Anbetracht der auftretenden Standardabweichungen der *in vitro* U_h Messungen ist es unwahrscheinlich, dass eine solche minimale Verschiebung signifikant nachgewiesen werden könnte.

Das Modell liefert einen weiteren Hinweis auf eine spezifische IFN- β HCN1 Interaktion. Eine endgültige Bestätigung sollen die Untersuchungen an HCN1 -/- Mäusen liefern.

3.1.4.2 IFN- β Effekt in HCN1 -/- Mäusen

Hypothese: IFN- β interagiert spezifisch mit der „schnellen“ HCN Untereinheit HCN1.

Resultat: Bestätigt; in HCN1 -/- Tieren erfolgt keine IFN- β bedingte I_h Reduktion.

Versuchssystem: Mauscortex - Layer V, DCS - I_h Iso., Intra - K Methyl mit cAMP

Die Simulationsergebnisse lieferten ein starkes Indiz für eine HCN1 spezifische IFN- β Interaktion. Zur Bestätigung dieses Befundes erfolgten Messungen in HCN1 -/- Tieren. Da HCN1 -/- Ratten zur Zeit nicht existieren, wurden die Messungen in Mäusen durchgeführt. Dafür mussten die Ergebnisse aus den Experimenten in Wistarratten in C57Bl6/J Mäusen reproduziert werden. Hierbei wurde der gleiche Neurontyp, Layer V Pyramidenneurone des somatosensorischen Cortex, in der Altersstufe von P11 bis P23 verwendet. Die Experimente erfolgten mit Maus (m)IFN- β .

Wie in Wistarratten bewirkte IFN- β auch in C57Bl6/J Mäusen eine etwa 29 % Reduktion des I_h (Kontrolle: $829 \text{ pA} \pm 314 \text{ pA}$ vs. mIFN- β : $590 \text{ pA} \pm 274 \text{ pA}$; $n = 8$; $P < 0,01$; Abb. 3.10a links) ohne signifikante Erhöhung des R_s (Kontrolle: $9,0 \text{ M}\Omega \pm 2,6 \text{ M}\Omega$ vs. IFN- β : $9,7 \text{ M}\Omega \pm 2,1 \text{ M}\Omega$; $n = 8$; $P > 0,09$). Das Ausmaß der Reduktion war unabhängig

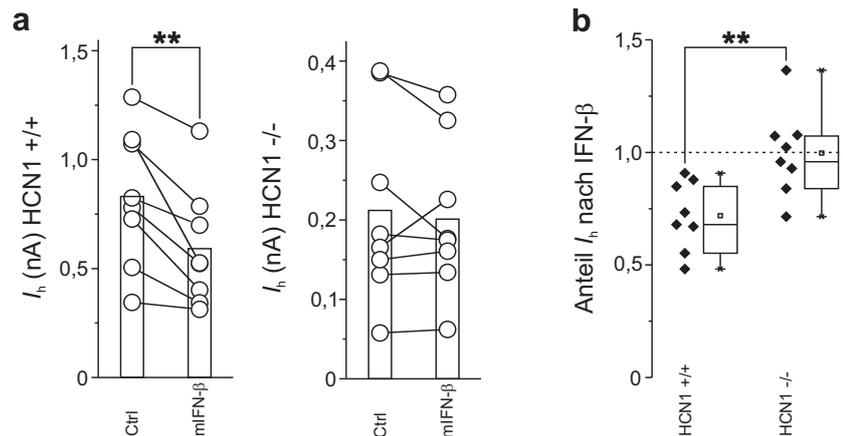


Abbildung 3.10: HCN-Subtypspezifische mIFN- β Interaktion. (a) Links: Wie in Wistarratten bewirkte mIFN- β eine Reduktion des I_h in HCN1 +/+ Mäusen. Rechts: Hingegen führte die Applikation von IFN- β zu keiner I_h Reduktion in HCN1 -/- Mäusen. (b) Das Ausmaß der I_h Reduktion (Anteil verbleibender Amplitude im Vergleich zur Ausgangsamplitude) unterschied sich signifikant zwischen HCN1 +/+ und HCN1 -/- Tieren.

davon, ob die Messung in reinen C57Bl6/J Mäusen oder in HCN1 +/+ Mäusen aus HCN1 +/- Verpaarungen stattfanden (verbleibende I_h Amplitude nach mIFN- β in reinen C57Bl6/J Mäusen: $65\% \pm 9\%$ vs. *littermate* HCN1 +/+ Mäusen: $76\% \pm 18\%$; $n = 3$ bzw. $n = 5$; $P > 0,25$).

Hingegen konnte in HCN1 -/- Mäusen keine Reduktion des I_h festgestellt werden (Kontrolle: $213\text{ pA} \pm 119\text{ pA}$ vs. mIFN- β : $202\text{ pA} \pm 98\text{ pA}$; $n = 8$; $P < 0,05$; Abb. 3.10a Rechts). Die Kapazitäten der untersuchten Neurone in HCN1 -/- Tieren ($178\text{ pF} \pm 24\text{ pF}$) glichen jenen der Neurone aus HCN1 +/+ Tieren ($200\text{ pF} \pm 35\text{ pF}$; $n = 8$; $P > 0,17$). Dieses Resultat setzt sich aus Messungen in reinen HCN1 -/- Tieren (aus der Verpaarung der von The Jackson Lab gelieferten Tiere) als auch aus HCN1 +/- Verpaarungen hervorgegangen HCN1 -/- Mäusen zusammen (Rückkreuzung mit C57Bl6/J Mäusen zur Gewinnung von *littermates*). Die Ergebnisse in beiden Gruppen weisen keine signifikanten Unterschiede auf (verbleibende I_h Amplitude nach mIFN- β in reinen HCN1 -/- Mäusen: $91\% \pm 13\%$ vs. *littermate* HCN1 -/- Mäusen: $109\% \pm 22\%$; $n = 4$ für beide Gruppen; $P > 0,10$).

Der Auswirkung von mIFN- β auf HCN1 +/+ und HCN1 -/- Mäusen unterschied sich signifikant (verbleibende I_h Amplitude nach mIFN- β in HCN1 +/+: $72\% \pm 15\%$ vs. HCN1 -/-: $100\% \pm 19\%$; $n = 8$; $P < 0,01$; Abb. 3.10b). Bei einer Einschränkung dieser Analyse auf reine *littermate* HCN1 +/+ und HCN1 -/- Tiere zeigt sich ein ähnliches Ergebnis (verbleibende I_h Amplitude nach mIFN- β in HCN1 +/+: $65\% \pm 9\%$ vs. HCN1 -/-: $109\% \pm 22\%$; $n = 3$ bzw. $n = 4$; $P > 0,05$).

Die *in silico* und *in vitro* Untersuchungen lieferten übereinstimmende Ergebnisse: IFN- β interagiert spezifisch mit der „schnellen“ HCN Untereinheit HCN1.

3.1.5 Funktionelle Konsequenzen der I_h Verminderung

Bereits bei einem Membranpotential von etwa -70 mV befindet sich ein Teil der HCN Kanäle im offenen Zustand (vgl. Abb. 3.2b – etwa 10% bei -70 mV). Diese bestimmen, im Zusammenspiel mit anderen Kanälen, den Eingangswiderstand, das Frequenzverhalten und das Ruhemembranpotential (siehe 1.3.3.4 auf Seite 20). Die Änderung des Eingangswiderstandes konnte bereits in den Vorarbeiten (Hadjilambrea et al. 2005) sowie für primär kultivierte Neurone gezeigt werden (Abb. 3.8c). Ob die durch Interferon bedingte I_h Verminderung ausreicht, um eine Änderung des Ruhemembranpotentials und des neuronalen Frequenzverhaltens zu bedingen, wird in den folgenden Kapiteln untersucht. Die Experimente erfolgten dabei nicht in DCS - I_h Iso. sondern in normaler ACSF, um einen den nativen Bedingungen ähnlicheren Zustand zu gewährleisten.

3.1.5.1 Membranpotential

Hypothese: Die I_h Reduktion führt zu einer signifikanten Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials (RMP).

Resultat: Die Hypothese konnte bestätigt werden. Die IFN- β Applikation verschob das RMP im Mittel um $-3,3$ mV.

Versuchssystem: Rattencortex - Layer V, ACSF, Intra - K Methyl mit cAMP

Das RMP wird von I_h sowohl mitbestimmt als auch stabilisiert, bei einem vollständigen Block der HCN Kanäle tritt eine Hyperpolarisation um ca. 11 mV auf (siehe 1.3.3.4 auf Seite 20). Bei dem oben vorgestellten *in silico* Modell trat nach der partiellen HCN Reduktion, sowohl bei der uniformen als auch der HCN1 spezifischen, eine Hyperpolarisation um 1,9 mV auf. Tatsächlich verschob die *in vitro* Applikation von IFN- β das RMP im Mittel um 3,3 mV von $-69,1$ mV \pm 0,8 mV auf $-72,4$ mV \pm 2,4 mV ($n = 9$; $P < 0,01$; Abb. 3.11). Die Änderung des RMP war nicht durch eine Erhöhung des R_s bedingt (Kontrolle: $8,0$ M Ω \pm 1,0 M Ω vs. IFN- β : $8,1$ M Ω \pm 1,1 M Ω ; $n = 9$; $P > 0,5$), die mittlere Kapazität der Zellen betrug 162 pF \pm 43 pF.

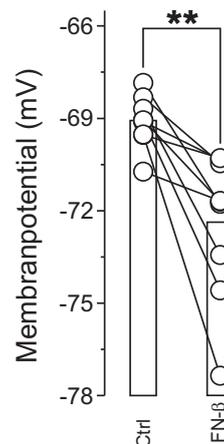


Abbildung 3.11: Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials nach IFN- β .

3.1.5.2 Resonanz

- Hypothese:** Das Frequenzverhalten der Layer V Neurone unterliegt einer Modulation durch IFN- β .
- Resultat:** Sowohl *in silico* als auch *in vitro* Versuche zeigen eine Änderung mehrerer Frequenzparameter durch IFN- β . Hervorzuheben ist die Verminderung der Resonanzfrequenz verbunden mit der Erhöhung des Impedanzwertes.
- Versuchssystem:** *In silico*, Rattencortex - Layer V, ACSF, Intra - K Methyl mit cAMP

Die Resonanzfrequenz von Neuronen wird durch das Zusammenspiel des I_h mit den passiven Komponenten der neuronalen Membran (Leckstrom und Kapazität) bestimmt (siehe Kapitel 1.3.3.4 auf Seite 21). Für eine erste Abschätzung, ob die beobachtete I_h Reduktion hinreichend für eine Resonanzfrequenzverschiebung sein könnte, wurde die Impedanzberechnung von Hutcheon et al. (1996a) in Scilab und NI LabVIEW implementiert (siehe Kapitel 2.4.4.1 auf Seite 30). Die Anpassung der Modellparameter an die von uns gemessenen Werte ergab eine Resonanzfrequenz f_{Res} von 2,23 Hz bei einem Scheinwiderstand Z_{Res} von 121,3 M Ω . Nach der Reduktion der HCN Leitfähigkeit und der Vergrößerung der schnellen Zeitkonstante entsprechend den *in vitro* Ergebnissen zeigte das Modell eine Verschiebung der Resonanzfrequenz auf $f_{\text{Res}} = 1,76$ Hz bei einer gleichzeitigen Erhöhung des Scheinwiderstandes auf $Z_{\text{Res}} = 131,2$ M Ω (Abb. 3.12a). Des Weiteren kam es zu einer Verschiebung des Nulldurchgangs der Phasenfunktion, Φ_0 , von 1,55 Hz zu 1,16 Hz (Abb. 3.12b).

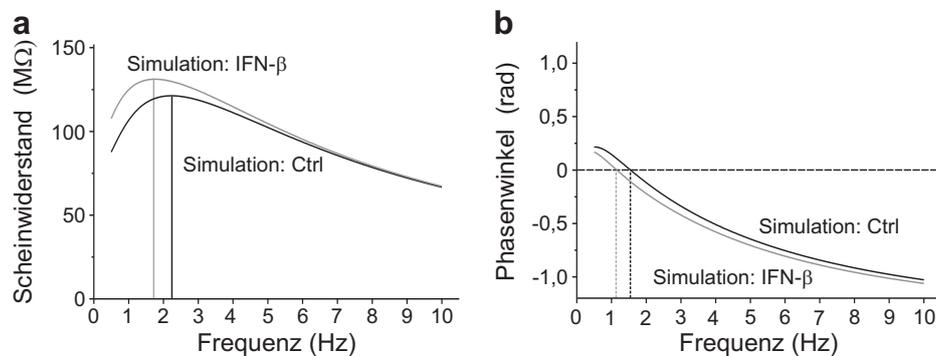


Abbildung 3.12: Simulierte Auswirkung einer Verminderung des I_h auf das neuronale Resonanzverhalten. Die hier angenommene Verminderung des I_h entsprach dem Mittel aus den durchgeführten *in vitro* Messungen. Die Berechnung folgte einem veröffentlichten Modell (Hutcheon et al. 1996a) zur Resonanzbestimmung. (a) Die Reduktion des I_h führte zu einer Erhöhung des Scheinwiderstandes dessen Spitzenwert Z_{Res} schon bei einer geringeren Frequenz f_{Res} erreicht wird. (b) Der Nulldurchgang des Phasenwinkels, d. h. der Wechsel von einem induktiv hin zu einem kapazitiv geprägten Verhalten, verschob sich aufgrund einer I_h Reduktion.

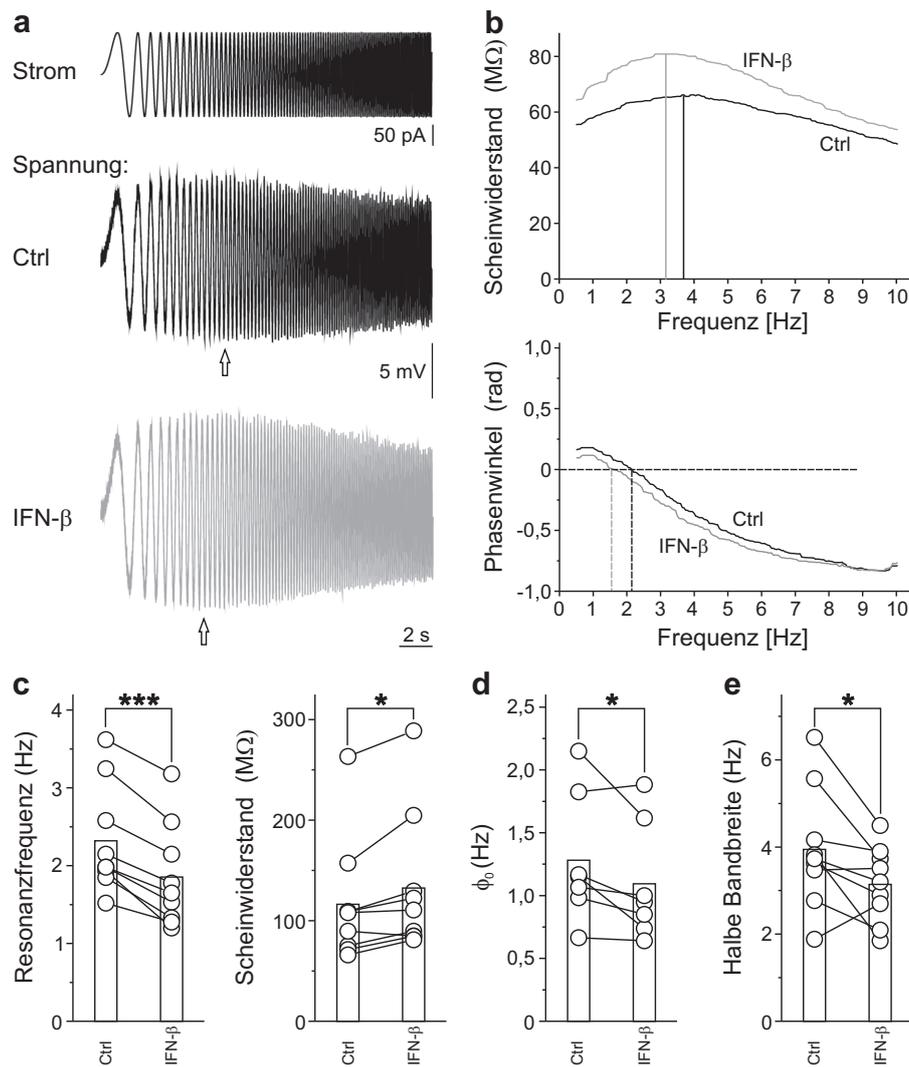


Abbildung 3.13: IFN- β vermindert die Resonanzfrequenz und erhöht die Impedanz. (a) Oben: Injizierter ZAP Strom und Spannungsantwort vor (mittig) und nach (unten) IFN- β Applikation. Die Stelle der maximalen Spannungsauslenkung ist mit einem Pfeil \uparrow markiert. (b) IFN- β führte zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz bei gleichzeitiger Erhöhung des Scheinwiderstandes über dem gesamten gemessenen Frequenzspektrum (oben). Ebenso trat eine Verschiebung des Nulldurchgangs des Phasenwinkels auf (unten). (c) Die Verschiebung der Resonanzfrequenz konnte in allen untersuchten Zellen nachgewiesen werden (links). Diese war mit einer signifikanten Erhöhung des Scheinwiderstandes verbunden (rechts). (d) Im Zuge der IFN- β Applikation konnte eine signifikante Reduktion der Frequenz des Nulldurchgangs des Phasenwinkels beobachtet werden. (e) Die Verschiebung der Resonanzfrequenz war verbunden mit einer Verschmälerung der halben Bandbreite.

Diese Ergebnisse wurden daraufhin in dem zuvor erstellten NEURON Modell überprüft (siehe 3.1.4.1 auf Seite 58). Hierbei erfolgte eine rein HCN1 spezifische Reduktion, wie sie zuvor durch die Messungen in HCN1 -/- Tieren bestätigt wurde. Dabei kam es zu einer Verschiebung der f_{Res} von 4,5 Hz zu 3,3 Hz. Verbunden war dies mit einem Anstieg des Scheinwiderstandes Z_{Res} von 36 M Ω auf 40 M Ω .

Somit wiesen beide Modelle auf eine Änderung des Resonanzverhaltens durch die interferonbedingte I_h Modulation hin. Im letzten Schritt wurden diese Ergebnisse mit *in vitro* Versuchen verifiziert. Hierbei konnten die Ergebnisse der Modellberechnungen bestätigt werden. Die Applikation von IFN- β verschob die Resonanzfrequenz von $f_{\text{Res}} = 2,3 \text{ Hz} \pm 0,7 \text{ Hz}$ zu $f_{\text{Res}} = 1,9 \text{ Hz} \pm 0,7 \text{ Hz}$ ($n = 9; P < 0,001$) und erhöhte die Impedanz von $Z_{\text{Res}} = 117 \text{ M}\Omega \pm 62 \text{ M}\Omega$ auf $Z_{\text{Res}} = 133 \text{ M}\Omega \pm 70 \text{ M}\Omega$ ($n = 9; P < 0,05$; Abb. 3.13a, b und c). Die durchschnittliche Kapazität der Zellen betrug $162 \text{ pF} \pm 43 \text{ pF}$. Wie auch im Modell trat eine signifikante Reduktion der induktiven Phase auf, die durch die Bestimmung des Nulldurchgangs der Phasenfunktion quantifiziert werden konnte (Kontrolle: $\Phi_0 = 1,3 \text{ Hz} \pm 0,5 \text{ Hz}$, vs. IFN- β : $\Phi_0 = 1,1 \text{ Hz} \pm 0,5 \text{ Hz}$; $P < 0,05$, $n = 7$; Abb. 3.13d). Die Stärke der Resonanz, Q wurde durch IFN- β nicht beeinflusst ($Q_{\text{ctrl}} = 1,3 \pm 0,24$ vs. $Q_{\text{ifn}} = 1,3 \pm 0,15$; $n = 9; P > 0,32$), hingegen kam es zu einer Verminderung des präferierten Eingangsfrequenzspektrums (Kontrolle: $HBW = 3,9 \text{ Hz} \pm 1,4 \text{ Hz}$, vs. IFN- β $HBW = 3,2 \text{ Hz} \pm 0,9 \text{ Hz}$; $n = 9; P < 0,05$; Abb. 3.13e). Die Änderung der Resonanzparameter war nicht durch eine Erhöhung des R_s bedingt (Kontrolle: $8,0 \text{ M}\Omega \pm 1,0 \text{ M}\Omega$ vs. IFN- β : $8,1 \text{ M}\Omega \pm 1,1 \text{ M}\Omega$; $n = 9; P > 0,5$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die durch IFN Applikation verursachte I_h Reduktion zur funktionellen Änderung verschiedener neuronaler Parameter führt: Erstens kommt es zu einer Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials, zweitens zu einer signifikanten Erhöhung des Eingangswiderstandes und drittens zu einer Verschiebung der Resonanz hin zu niedrigeren Frequenzen. Letzteres war verbunden mit einer Erhöhung der Impedanz und einer Verminderung des präferierten Eingangsfrequenzspektrums.

3.2 Einfluss von IFN- β auf das Feuerverhalten von Layer V Neuronen

3.2.1 Feuerverhalten vor und nach IFN- β

- Hypothese:** Eine Veränderung des Feuerverhaltens nach IFN- β ist auch unter *whole cell patch clamp* Bedingungen zu beobachten.
- Resultat:** Bestätigt; IFN- β führt zu einer Erhöhung der Feuerrate und des Eingangswiderstandes. Der Effekt ist weniger ausgeprägt als mit Einstichelektroden.
- Versuchssystem:** Rattencortex - Layer V, ACSF, Intra - K Methyl mit cAMP

Bereits Hadjilambreva et al. (2005) konnte zeigen, dass eine IFN- β Applikation zu einer stärkeren überschwelligeren neuronalen Erregbarkeit führt. Diese Experimente wurden mit

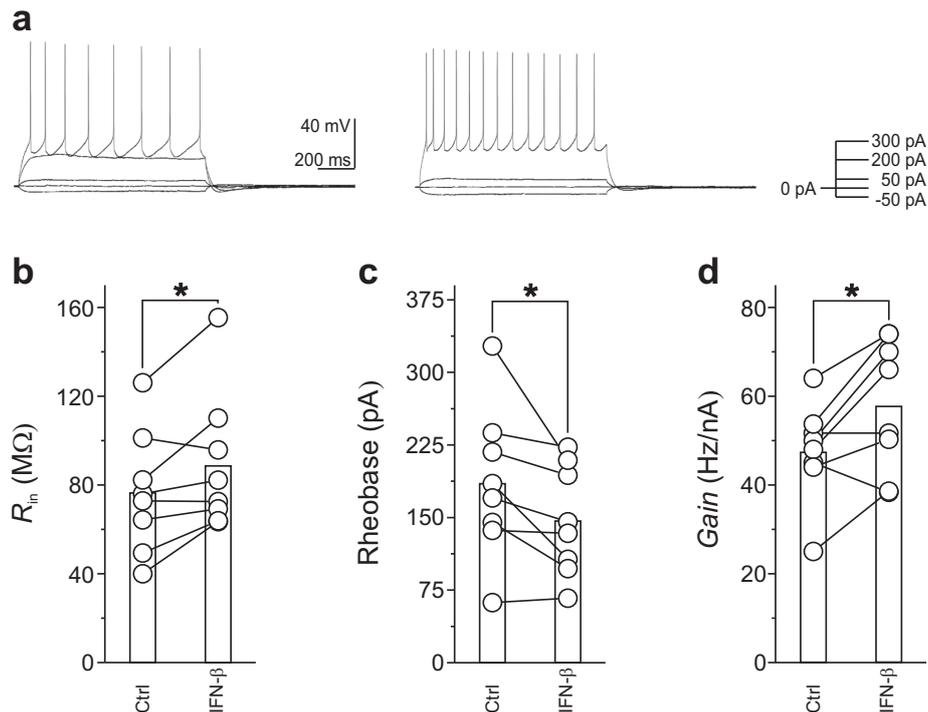


Abbildung 3.14: IFN- β verändert das neuronale Feuerverhalten in Layer V Pyramidenneuronen. (a) *Current clamp* Ableitung in einem Layer V Pyramidenneuron vor (links) und nach (mittig) 1000 U ml^{-1} IFN- β . Das Feuerverhalten wurde durch sukzessive Erhöhung (50 pA) des Eingangstromes bestimmt, zwecks einer übersichtlichen Darstellung sind nur ausgewählte Stromschritte abgebildet (rechts, für 200 pA nur für die Kontrolle, da bei diesem Stromschritt das Neuron nach IFN- β bereits feuerte). Ersichtlich ist aus den Spannungsverläufen auch die Zunahme des Eingangswiderstandes (größere Auslenkung bei den $\pm 50 \text{ pA}$ Stromschritten). (b) IFN- β führte zu einer Vergrößerung des Eingangswiderstandes. (c) Nach IFN- β begannen die Neurone bereits bei geringeren Eingangstromstärken zu feuern, hier quantifiziert durch die Reduktion der Rheobase. (d) IFN- β führte zu einer Erhöhung der Feuerrate (*gain*).

Einstichelektroden durchgeführt; eine Bestätigung dieser Ergebnisse erfolgte im *whole cell patch clamp* Modus:

Wie auch in den Messungen an primär kultivierten neuronalen Neuronen (siehe 3.1.3.2 auf Seite 56) führte die Applikation von IFN- β zu einer Erhöhung des Eingangswiderstandes (Kontrolle: $76,5 \text{ M}\Omega \pm 27,6 \text{ M}\Omega$ vs. IFN- β : $89,1 \text{ M}\Omega \pm 31,4 \text{ M}\Omega$; $n = 8$; $P < 0,05$). Rheobase (Kontrolle: $185,2 \text{ pA} \pm 78,7 \text{ pA}$ vs. IFN- β : $146,9 \text{ pA} \pm 56,8 \text{ pA}$; $n = 8$; $P < 0,05$) und *gain* (Kontrolle: $47,7 \text{ Hz/nA} \pm 11,1 \text{ Hz/nA}$ vs. IFN- β : $57,9 \text{ Hz/nA} \pm 15,0 \text{ Hz/nA}$; $n = 8$; $P < 0,05$) veränderten sich analog zu den Ergebnissen mit Einstichelektroden. Die Veränderung wurde nicht durch eine Erhöhung des seriellen Widerstandes bedingt (Kontrolle: $7,8 \text{ M}\Omega \pm 0,75 \text{ M}\Omega$ vs. IFN- β : $8,1 \text{ M}\Omega \pm 1,2 \text{ M}\Omega$; $n = 8$; $P > 0,2$). Die durchschnittliche Kapazität der Zellen betrug $170 \text{ pF} \pm 38 \text{ pF}$.

Qualitativ spiegeln die Ergebnisse der Messungen in der *whole cell patch clamp* Konfiguration diejenigen mit Einstichelektroden wider, allerdings war die Modulation durch

IFN- β weniger ausgeprägt (durchschnittliche Veränderung des Eingangswiderstandes im *whole cell*: +17% vs. Einstichelektroden: +142%; Rheobase *whole cell*: -22% vs. Einstichelektroden: -50%; *gain whole cell*: +21% vs. Einstichelektroden: +60%). Der verminderte Effekt von IFN- β könnte durch die Verdünnung des Cytosols mit der intrazellulären Messlösung (Pipettenlösung) und der damit verbundenen Beeinträchtigung der intrazellulären Signalkaskaden hervorgerufen werden.

3.2.2 Multiple Kanalmodulationen durch IFN- β

- Hypothese:** Für die beobachtete Änderung des Feuerverhaltens nach Interferonapplikation sind multiple Kanalmodulationen notwendig.
- Resultat:** Im *in silico* Modell lassen sich die *in vitro* Ergebnisse durch eine kombinierte Kanalmodulation der I_h , I_{BK} , I_{nap} und I_m Kanälen reproduzieren.
- Versuchssystem:** NEURON Modell

Die durchgeführten Vorarbeiten zeigten, dass die durch Interferon bedingte Veränderung des Feuerverhaltens nicht ausschließlich auf die HCN Modulation durch Interferon zurückgeführt werden kann (siehe 1.2.5 auf Seite 7). Welche Kanalmodulationen hierfür notwendig sind, ist bis dato allerdings unklar. Erste Hinweise sollte ein *in silico* Modell liefern.

In den bisher publizierten Modellen konnte kein Layer V Neuron mit dem erforderlichen Kanalbesatz gefunden werden. Deshalb wurde das oben vorgestellte Modell (3.1.4.1 auf Seite 58) ausgebaut.

Hierzu wurden im ersten Schritt die erforderlichen Kanäle aus der NEURON Modell Datenbank (<http://senselab.med.yale.edu/modeldb/>) entnommen. Für den BK Kanal konnte wie für HCN1 und HCN2 kein zufriedenstellendes Modell gefunden werden, weshalb dieses für die Simulation neu erstellt wurde:

3.2.2.1 BK Modell

Die Öffnungswahrscheinlichkeit von BK-Kanälen steigt sowohl mit Depolarisation als auch mit steigender intrazellulärer Kalziumkonzentration. Öffnungswahrscheinlichkeiten höher 0,5 werden dabei nur bei Kalziumkonzentrationen von über einem 1 μM erreicht, einer Konzentration, die im Gesamtcytosol eines gesunden Neurons wahrscheinlich nie erreicht wird. Deshalb wird vermutet, dass BK-Kanäle in der Membran mit Kalziumkanälen assoziieren (Benhassine und Berger 2005). Ein Einstrom von Kalzium durch diese Kanäle führt lokal zu einer beträchtlichen Erhöhung der Kalziumkonzentration (bis zu 100 μM , Neher 1998), die dann in einer Öffnung der BK-Kanäle resultiert. Neben der Öffnungswahrscheinlichkeit kommt es durch die Erhöhung der Kalziumkonzentration auch zu einer Verschiebung der halben Aktivierungsspannung U_h^{BK} (Womack und Khodakhah 2002; Benhassine und Berger 2005).

Bis dato gibt es keine vollständige Charakterisierung des BK Kanals in Layer V Neuronen des somatosensorischen Cortex. Die BK Parameter zur Modellerstellung stammten

daher aus verschiedenen Arbeiten über diesen Kanal in Layer V Neuronen (Benhassine und Berger 2005; Benhassine und Berger 2009), CA1 Neuronen (Gong et al. 2001) und cerebralen Purkinje Neuronen (Womack und Khodakhah 2002).

Der Stromfluss durch die BK Kanäle, I_{BK} , ergibt sich aus:

$$I_{\text{BK}} = \hat{g}_{\text{BK}} p(U, ca, t) (U - U_{\text{rev}}^{\text{BK}}) \quad (3.4)$$

\hat{g}_{BK} ... maximale BK Kanal Leitfähigkeit

U ... Membranspannung

$U_{\text{rev}}^{\text{BK}}$... Umkehrpotential des I_{BK}

Der Anteil der geöffneten BK Kanäle, p , folgt hierbei einer Kinetik erster Ordnung:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{p_{\infty}(U, ca) - p}{\tau_{\text{BK}}} \quad (3.5a)$$

mit

$$p_{\infty}(U, ca) = \frac{p_0(ca)}{1 + e^{\frac{U_{\text{h}}^{\text{BK}}(ca) - U}{k^{\text{BK}}}}} \quad (3.5b)$$

Die erreichbare Öffnungswahrscheinlichkeit $p_{\infty}(U, ca)$ ist abhängig von der maximal möglichen Öffnungswahrscheinlichkeit bei der gegebenen Kalziumkonzentration:

$$p_0(ca) = \frac{1}{1 + \left(\frac{ca_{\text{h}}}{ca}\right)^{ca_{\text{k}}}} \quad (3.5c)$$

und der kalziumabhängigen halben Aktivierungsspannung:

$$U_{\text{h}}^{\text{BK}}(ca) = U_{\text{h},\text{min}}^{\text{BK}} + \frac{U_{\text{h},\text{max}}^{\text{BK}} - U_{\text{h},\text{min}}^{\text{BK}}}{1 + \left(\frac{ca_{\text{h}}}{ca}\right)^{ca_{\text{k}}^{\text{U}}}} \quad (3.5d)$$

τ_{BK} ... Zeitkonstante der Kanalkinetik

k^{BK} ... Steigung der Aktivierungskurve

ca_{h} ... Zentrumspunkt der Kalziumabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit

ca_{k} ... Steigung der Kalziumabhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit

- $U_{h,\min}^{\text{BK}}$... minimale U_h^{BK} bei hoher Kalziumkonzentration
- $U_{h,\max}^{\text{BK}}$... maximale U_h^{BK} bei geringer Kalziumkonzentration
- ca_h^{U} ... Zentrumsunkt der Kalziumabhängigkeit von U_h^{BK}
- ca_k^{U} ... Steigung der Kalziumabhängigkeit von U_h^{BK}

Vor der Implementierung der endgültigen Kanalsimulation in NMODL wurden die Abhängigkeiten des Modells in PYTHON getestet. Mit der letztendlichen Parameterkombination (Tabelle 3.2) zeigt sich hierbei die in Abb. 3.15 dargestellte Kalzium- und Spannungsabhängigkeit.

Über die Geschwindigkeit der Kanalaktivierung und -deaktivierung sowie der Kalziumbindung konnten nicht ausreichend quantitative Daten gefunden werden, um eine dezidierte Implementierung der Kinetik zu ermöglichen. Die publizierten Werte bewegen sich zwischen 1 ms und 3 ms (Benhassine und Berger 2005; Womack und Khodakhah 2002). Die Bestimmung dieser Werte erfolgte z. T. bei Raumtemperatur, bei den hier durchgeführten *in vitro* Messungen lagen hingegen 32°C vor.

Über die Temperaturabhängigkeit sowie Spannungssensitivität der Zeitkonstanten der BK Kanäle ist nichts bekannt. Aufgrund dieser Unsicherheiten wurde die Zeitkonstante der Kinetik τ_{BK} fest mit 1 ms angenommen. Die Anpassung der Öffnungswahrscheinlichkeit auf einen veränderten intrazellulären Kalziumspiegels erfolgte instantan. Dies ermöglichte eine Änderung des Aktivierungszustandes als Reaktion auf ein Aktionspotential (Womack und Khodakhah 2002).

Die postulierte Kopplung von BK Kanälen mit Kalziumkanälen sollte zu einer rund um BK Kanäle lokal erhöhten Kalziumkonzentration führen. Um dies im Modell zu berücksichtigen, wurde die jeweils aktuelle interne Kalziumkonzentration ca_i des simulierten Neurons für die Berechnung der BK Öffnungswahrscheinlichkeit skaliert:

$$ca(t) = ca_i(t) * sc \tag{3.6}$$

- $ca_i(t)$... Aktuelle interne Kalziumkonzentration ¹¹
- sc ... Skalierungsfaktor zur lokalen Erhöhung der Kalziumkonzentration
- $ca(t)$... Für das BK Kanalmodell relevante Kalziumkonzentration

Alle Parameter des Kanalmodells sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Parameter des BK Modells

Parameter	Wert
ca_h	2 μM
ca_k	1
$U_{h,\min}^{\text{BK}}$	-46,08 mV
$U_{h,\max}^{\text{BK}}$	155,67 mV
ca_h^{U}	2 μM
ca_k^{U}	-0,94208
$U_{\text{rev}}^{\text{BK}}$	-105 mV
k^{BK}	17
τ_{BK}	1 ms
sc	100

¹¹Diese unterliegt aufgrund der Aktivität von Kalziumkanälen und dem Abtransport durch die Kalziumpumpe (siehe 2.4.4.2 auf Seite 33) einer ständigen Veränderung und zeigt daher eine Abhängigkeit von t .

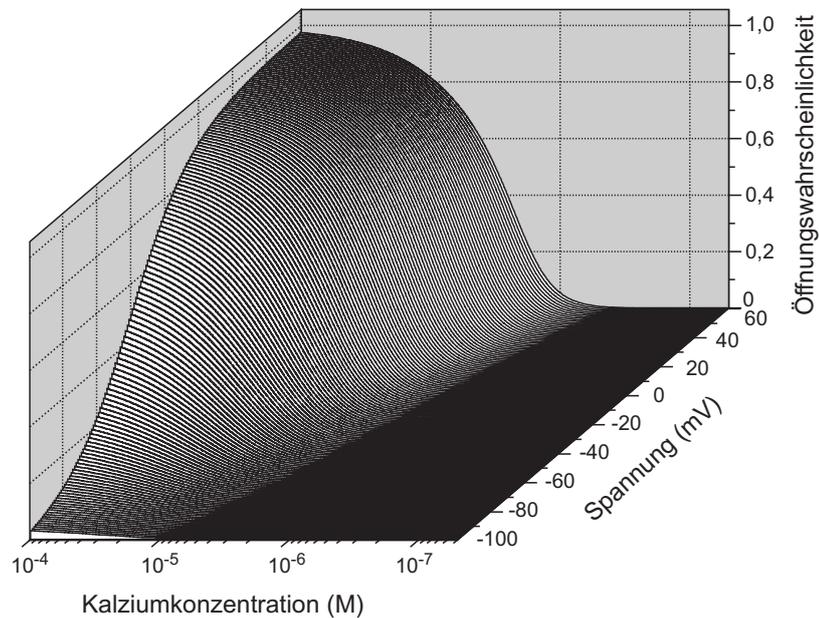


Abbildung 3.15: Öffnungswahrscheinlichkeit des modellierten BK Kanals in Abhängigkeit von der Spannung und der effektiven Kalziumkonzentration. Letztere wurde mittels eines Skalierungsfaktors aus der internen Kalziumkonzentration berechnet, um die postulierte Kopplung der BK Kanäle mit Kalziumkanälen zu berücksichtigen.

3.2.2.2 Zuweisung der Kanaldichten

Im nächsten Schritt erfolgte eine Verteilung der aktiven Kanäle auf die gewählte Geometrie (2.4.4.2 auf Seite 33, Abb. 3.16a) anhand der veröffentlichten Kanalbeschreibungen zu diesen Kanälen. Zuletzt wurde das Modell an die eigenen *in vitro* Ergebnisse sowie publizierte Werte hinsichtlich *backpropagation* (Abfall der Aktionspotentialamplitude entlang des Dendriten mit einer Längenkonstante von 127 μm im Vergleich zu z. B. 155 μm in Stuart et al. 1997) und Verhalten nach dem Block diverser Kanäle angepasst. Die verwendeten Kanäle und Verteilungsparameter sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Die FI-Parameter des Modells betragen: Rheobase 304 pA und *gain* 74 Hz/nA und entsprechen somit den durchschnittlichen Werten aus den *in vitro* Messungen mit Einstichelektroden (Rheobase 299 pA und *gain* 75 Hz/nA; Hadjilambrea et al. 2005).

Tabelle 3.3: Aktive Kanäle des erweiterten Modells

Kanal	Verteilung	Dichte (pS μm^{-2})	Quelle
Axon			
transienter Na(x) ⁱ Kanal	uniform	3500	Kole et al. 2008
<i>delayed rectifier</i>	uniform	40	Kole et al. 2006
M-Typ K Kanal	uniform	50	Shah et al. 2008
Soma			
transienter Na Kanal	uniform	420	Kole et al. 2008
persistierender Na Kanal	uniform	10	Uebachs 2010
<i>delayed rectifier</i>	uniform	20	Kole et al. 2006
M-Typ K Kanal	uniform	10	Shah et al. 2008
A-Typ K Kanal (prox. ⁱⁱ)	uniform	150	Acker und Antic 2009
Ca aktivierter K Kanal	uniform	0,6	erstellt ⁱⁱⁱ
HVA Ca Kanal	uniform	2	Acker und Antic 2009
HCN1 und HCN2 ^{iv}	uniform	0,95	erstellt ^{iv}
Dendriten			
transienter Na Kanal			Kole et al. 2008
apikale Dendriten	prox.: 350; distal: 320		
basale Dendriten	linear abfallend ^v von 150		
<i>delayed rectifier</i>	exp. abfallend von 20 ^{vi}		Kole et al. 2006
M-Typ K Kanal	prox. 5, distal 0		Shah et al. 2008
A-Typ K Kanal			Acker und Antic 2009
dist. und prox. Typ ⁱⁱ			
apikale Dendriten	uniform	300	
basale Dendriten	linear abfallend ^{vii} von 150		
Ca aktivierter K Kanal	uniform	0,6	erstellt ⁱⁱⁱ
HVA Ca Kanal	uniform	2	Shah et al. 2008
LVA Ca Kanal	prox. 0, distal 0,5		Acker und Antic 2009
HCN1 und HCN2 ^{iv}	exp. Anstieg ^{iv} von 0,95		erstellt ^{iv}

Die Quellen beziehen sich auf die Beschreibung des Kanalmodells (bzw. des darin enthaltenen Verweises auf die ModelDB). Die Verteilung der Kanäle wurde aus der Literatur übernommen, eine Anpassung der Spitzenleitfähigkeiten erfolgte, um eine Reproduktion der *in vitro* Beobachtungen zu gewährleisten.

ⁱ Nax: AIS spezifische Modifikation der Kanalkinetik (Kole et al. 2008). ⁱⁱ Die beiden Implementierungen des A-Typ Kaliumkanals unterscheiden sich durch die Parameter ihrer Spannungsabhängigkeit. Die Aktivierungskurve des distalen (dist.) ist im Vergleich zum proximalen (prox.) Typ um -12mV verschoben (Migliore et al. 1999). Der Wechsel vom prox. zum dist. Typ erfolgt linear innerhalb der ersten $300\mu\text{m}$ entlang des Dendriten. ⁱⁱⁱ siehe 3.2.2.1 auf Seite 68 ^{iv} siehe 3.1.4.1 auf Seite 59. ^v mit einem Faktor von 0,7. ^{vi} mit einer Längskonstante von $80\mu\text{m}$. ^{vii} mit $0,5\text{pS}/\mu\text{m}$.

3.2.2.3 Test verschiedener Kanalmodulationen

In dem erstellten Modell (Abb. 3.16a und b) wurden im nächsten Schritt mehrere Einzelkanalmodulationen getestet.

In den Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Modulation von HCN für die Veränderung des Feuerverhaltens durch IFN- β nicht notwendig ist (Hadjilambreva et al. 2005). Im Modell sollte nun geklärt werden, inwieweit die HCN1 Modulation durch IFN- β das Feuerverhalten verändert. Dazu wurde die Leitfähigkeit des HCN1 Kanals entsprechend der im vorherigen Modell festgestellten notwendigen Reduktion (auf 42,5 % des Ausgangswertes) angepasst. Dies führte zu einer geringen Erregungssteigerung, die allerdings nicht den *in vitro* Ergebnissen entsprach (drittes vs. erstes Säulenpaar in 3.16c). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die durch IFN verursachte HCN Modulation hinreichend für die beobachtete Änderung des Feuerverhaltens ist.

Im nächsten Schritt wurden unterschiedlichste Kanalmodulationen (einzeln, mit HCN1 und auch untereinander kombiniert) getestet. Im allgemeinen erfolgten die Kanalmodulationen mit einer Veränderung der Leitfähigkeit um 25 % und 50 % (bis auf die Zunahme des I_{nap} , dieser wurde um 10 % und 25 % moduliert, da bei größeren Veränderungen das Modell instabil wurde). Eine Auswahl der getesteten Modulationen ist in 3.16c dargestellt (rechts an die HCN1 Einzelkanalmodulation folgend). Mit keinem dieser Ansätze konnten die *in vitro* Befunde reproduziert werden.

Den entscheidenden Hinweis brachte dann die Beobachtung, dass auch Typ II Interferon eine Reduktion des I_h bewirkt (siehe 3.1.2.2 auf Seite 53). Dies legte die Vermutung nahe, dass ein gemeinsamer Bestandteil sowohl der Typ I als auch der Typ II Interferon-signalkaskade die Ionenkanalmodulation bewirkte. Ein gemeinsamer Schritt in beiden Signalkaskaden ist die Aktivierung der Protein Kinase C (PKC; Kaur et al. 2005a; Gough et al. 2008; Redig et al. 2009; Seo et al. 2009). Für PKC wird seit längerem ein Einfluss auf die HCN Kanäle vermutet (Cathala und Paupardin-Tritsch 1997; Liu et al. 2003; Brager und Johnston 2007; Carr et al. 2007; Li et al. 2010). Für weitere Kanäle konnte eine Modulation durch PKC bereits nachgewiesen werden:

- Reduktion des M - Typ Kalium Stromes I_m (Lee et al. 2010)
- Reduktion des großen Kalzium abhängigen Kaliumstromes I_{BK} (Kizub et al. 2010; Zhou et al. 2010)
- Erhöhung des persistierenden Natriumstroms I_{nap} durch U_h Verschiebung (Curia et al. 2004)

In das Modell wurden diese Abhängigkeiten folgendermaßen implementiert: Reduktion des HCN1 auf 42,5 % des Ausgangswertes (entsprechend den *in vitro* Ergebnissen), Reduktion des I_m auf 76 % des Ausgangswertes (hiermit wurden die im nächsten Kapitel gezeigten *in vitro* Befunde eingearbeitet), Reduktion der BK Leitfähigkeit auf 50 % und Verschiebung der U_h von I_{nap} um -2 mV. Mit diesem Ansatz konnten die *in vitro* Befunde reproduziert werden (3.16c).

Die Veränderung des Feuerverhaltens setzt multiple Ionenkanalmodulationen durch Interferon voraus. Eine mögliche Verbindung zwischen dem Interferonsignalweg und den Ionenkanälen ist die Aktivierung der Protein Kinase C.

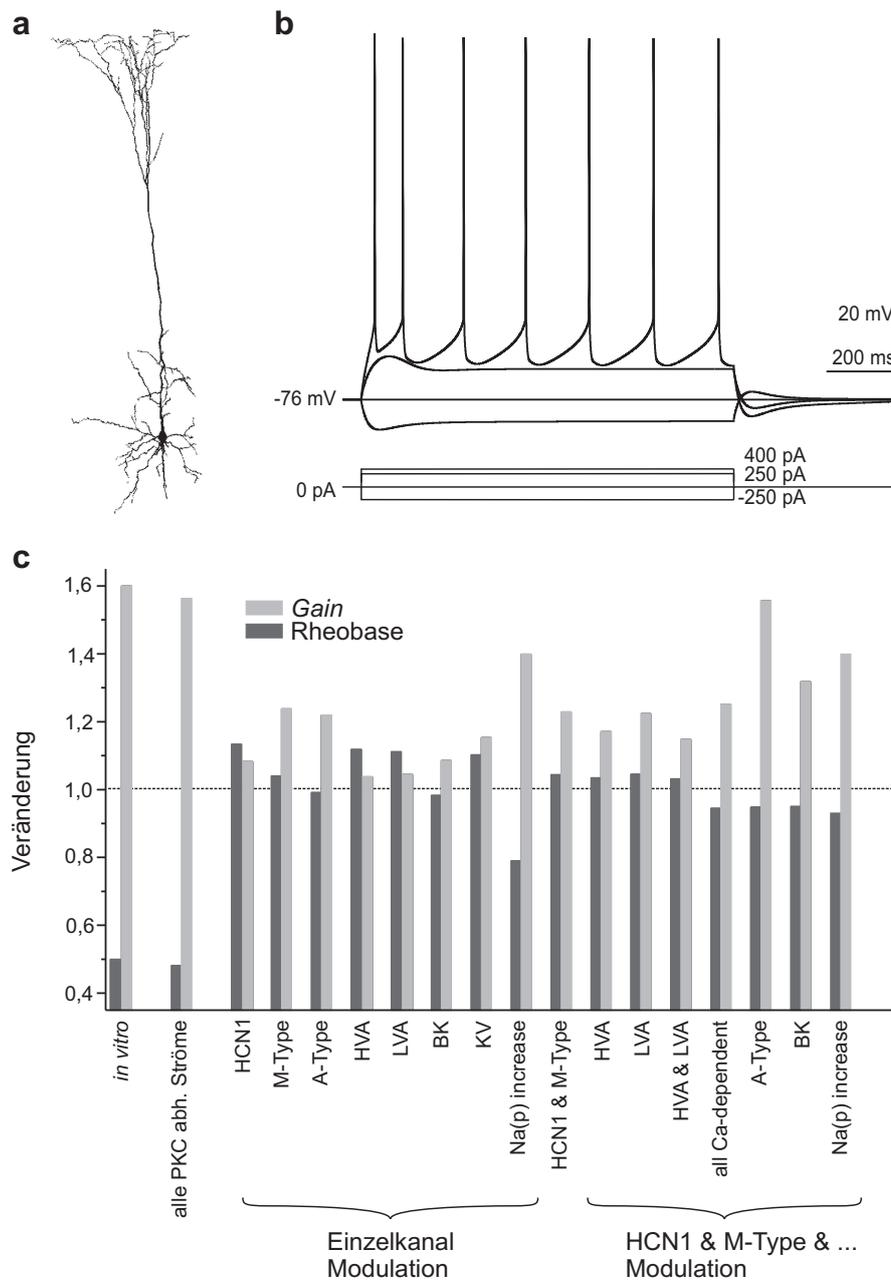


Abbildung 3.16: *In silico* Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Ionenkanalmodulationen auf das neuronale Feuerverhalten. (a) Darstellung der verwendeten Zellgeometrie (morphologische Rekonstruktion von Stuart und Spruston 1998, Fig. 1A.). (b) Spannungsantwort des simulierten Neurons auf unterschiedliche Eingangströme. (c) Test unterschiedlicher Ionenkanalmodulationen. Die *in vitro* Ergebnisse von Hadjilambrea et al. (2005) konnten mit einer Modulation der bekannten PKC abhängigen Ströme reproduziert werden (I_h , I_m , I_{NaP} , I_{BK}). Hingegen war mit den anderen getesteten Ionenkanalmodulationen keine Reproduktion der *in vitro* Beobachtungen möglich.

3.2.3 IFN- β reduziert den I_m

Hypothese: IFN- β moduliert über die HCN Kanäle hinaus noch weitere neuronale Ionenkanäle.

Resultat: Auch für I_m kann eine Reduktion durch IFN- β nachgewiesen werden.

Versuchssystem: Rattencortex - Layer V, ACSF mit TTX, ZD7288 und LaCl₃, Intra - K Methyl

Als letzter Schritt sollte die Schlussfolgerung aus den *in silico* Untersuchungen für einen Kanal *in vitro* bestätigt werden. Die Wahl fiel hierbei auf den M-Strom I_m , da dieser eine bedeutende Rolle bei der Bestimmung des neuronalen Feuerverhaltens spielt (Brown und Passmore 2009). Darüber hinaus moduliert er die Wirkung des I_h auf die neuronale Integration (George et al. 2009). Bereits in den Vorarbeiten wurde eine Veränderung dieses Stromes vermutet (Hadjilambrea et al. 2005).

Wie auch bei den I_h Versuchen erfolgte eine Applikation von 1000 U ml⁻¹ IFN- β . Diese führte zu einer mittleren Reduktion des I_m um 24 % (Ctrl: 61,9 pA \pm 24,1 pA vs. IFN- β : 49,9 pA \pm 29,7 pA; $n = 6$; $P < 0,05$), die nicht mit einer Änderung des R_s korreliert war (Kontrolle: 6,6 M Ω \pm 0,5 M Ω vs. IFN- β : 6,6 M Ω \pm 0,6 M Ω ; $n = 6$; $P > 0,4$). Die durchschnittliche Kapazität der Zellen betrug 251 pF \pm 67 pF.

IFN- β führte zu einer Reduktion des I_m . Dieses Ergebnis ist ein erster Schritt zur Aufklärung der multiplen Ionenkanalmodulationen durch Interferon, wie sie durch die Simulationsuntersuchungen vorausgesagt wurden.

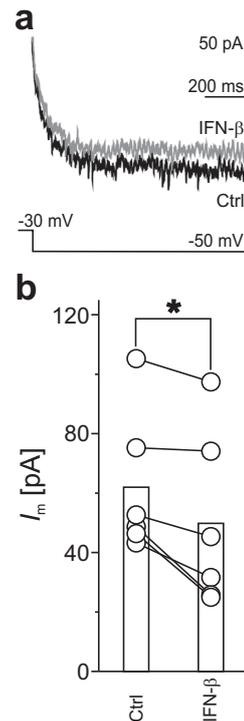


Abbildung 3.17: IFN- β reduziert den M - Typ Kaliumstrom. (a) Die Messung des I_m erfolgte bei der Deaktivierung nach 30 s Depolarisation auf -30 mV. (b) IFN- β führte zu einer Reduktion des Stromes in allen gemessenen Neuronen.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen neuronale Ionenkanalmodulationen hervorgerufen durch Interferonapplikation. Die in einer vorangegangenen Arbeit (Hadjilambrea et al. 2005) beschriebenen Veränderungen neuronaler Parameter (Eingangswiderstand und Feuerverhalten) können mit diesen Kanalmodulationen erklärt werden. Als Verbindung von der Interferonsignalkaskade zu den Kanälen postuliere ich eine Aktivierung der Protein Kinase C (PKC).

Detailliert wurde eine dieser Modulationen, die des *hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated* (HCN), untersucht. Auf dieser beruht die von Hadjilambrea et al. (2005) festgestellte Veränderung des Eingangswiderstandes. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass durch die festgestellte Reduktion und Verlangsamung des durch diesen Kanal geleiteten Stromes, I_h , darüber hinaus eine Verschiebung der neuronalen Resonanzfrequenz auftritt. Alle getesteten Typ I und Typ II Interferone modulierten den I_h , notwendig für die Modulation sind neuronale Interferonrezeptoren mit funktioneller intrazellulärer Signalkaskade.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Neuromodulatorische Auswirkungen von Cytokinen wurden bislang beinahe ausschließlich im Zusammenhang mit einer vermehrten Ausschüttung von Hormonen und Neurotransmittern (bzw. Expression deren Rezeptoren) diskutiert (Schiepers et al. 2005; Dantzer et al. 2008; Camacho-Arroyo et al. 2009; McAfoose und Baune 2009). Im Gegensatz dazu zeigt die vorliegende Arbeit eine direkte Wirkung der Cytokingruppe Interferone auf neuronale Ionenkanäle.

Dies bestätigt die zentrale Arbeitshypothese dieser Arbeit: „Interferon moduliert neuronale Ionenkanäle“. Nicht ausgeschlossen werden (und außerhalb des Fokus dieser Arbeit liegend) kann allerdings eine zusätzliche Wirkung der Interferone als Modulator der synaptischen Übertragung.

4.1.1 Interferon moduliert HCN Kanäle

Mehrere Vorarbeiten (Hadjilambrea et al. 2005; Daten aus der Dissertation von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.) gaben Hinweise auf eine Modulation des HCN Kanals im Zuge einer Interferonapplikation. Dies wurde in dieser Arbeit, unter Verwendung von *patch clamp in vitro* Messungen in Layer V Pyramidenneuronen des somatosensorischen Cortex, detailliert untersucht.

4.1.1.1 Typ I und Typ II Interferone vermindern den I_h

Bestätigung des Effekts mit alternativem cAMP Gehalt

Bisher konnte eine Modulation des I_h nur für IFN- β gezeigt werden (Daten aus der Dissertation von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.). Zur Stabilisierung des I_h im

Experimentverlauf wurde für diese Messungen eine supramaximale cAMP Konzentration verwendet (siehe 3.1.1.1 auf Seite 46). Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Modulation des I_h durch IFN- β nur bei dieser speziellen cAMP Konzentration zu beobachten wäre. Deshalb wurden diese Versuche mit einer intrazellulären Lösung ohne cAMP wiederholt. Auch hierbei trat eine Modulation des I_h auf, die in Ausmaß (Reduktion des Stromes auf $73\% \pm 16\%$ des Ausgangswertes im Vergleich zu $76\% \pm 15\%$ mit supramaximalem cAMP Gehalt) und weiteren Parametern (Verlangsamung der Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik) den vorangegangenen Ergebnissen glich.

Test verschiedener Interferonarten

Alle zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Untersuchungen zum Einfluss von Interferon auf den HCN Kanal fanden unter Verwendung des Typ I Interferons IFN- β statt. Neben diesem bindet auch das Typ I Interferon IFN- α an denselben Rezeptortyp. Dies wies auf ein ähnliches Potential als Modulator von HCN Kanälen wie IFN- β hin. Die vorliegenden Resultate bestätigen diese Vermutung, der Effekt gleicht jenem von IFN- β .

Das Typ II Interferon IFN- γ bindet an eine eigene Rezeptorklasse mit einer vom Typ I Interferonsignalweg in weiten Teilen unterschiedlichen Signalkaskade (siehe 1.2 auf Seite 3). In den Vorarbeiten (Daten aus der Dissertation von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.) und hier (siehe 3.1.3.1 auf Seite 55) konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Typ I Interferonsignalweges für die Modulation des I_h notwendig ist. Beides zusammen ließ initial das Fehlen einer I_h Modulation durch IFN- γ vermuten. Diese Vermutung stellte sich als falsch heraus. IFN- γ führte zu einer mit Typ I Interferon vergleichbaren Modulation des I_h . Als einfachste Erklärung hierfür kommen Überschneidungen beider Signalwege in Frage.

Bemerkenswert war die beobachtete Konstanz des Effekts. IFN- α führte zu einer Reduktion des I_h auf $80\% \pm 14\%$, IFN- β auf $73\% \pm 16\%$, IFN- γ auf $81\% \pm 10\%$ im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollmessungen. Bei keinem der getesteten Interferone konnte die Reduktion der Amplitude mit einer Verschiebung der Spannungssensitivität erklärt werden, d. h. die HCN Leitfähigkeit wurde durch Interferon reduziert. Das sowohl Typ I als auch Typ II Interferon zu einer vergleichbaren Reduktion des I_h führen, mag als weiterer Hinweis auf einen gemeinsamen Wirkmechanismus gewertet werden.

Alle getesteten Interferone (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) bewirkten eine Reduktion und Verlangsamung des I_h . Diese Modulation trat unabhängig vom cAMP Gehalt der intrazellulären Messlösung auf. Da in der *whole cell* Konfiguration eine starke Durchmischung und daher Verdünnung des intrazellulären Milieus des Neurons auftritt, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auch eine durch cAMP vermittelte Interaktion zwischen IFN- β und HCN ausgeschlossen werden.

4.1.1.2 Interferon moduliert den HCN1 Kanal

Alle getesteten Interferone veränderten neben der Amplitude auch die Kinetik des I_h . In dem gewählten Versuchssystem (Layer V Pyramidenneurone des somatosensorischen Cortex von Nagern im Alter von Tag 11 bis Tag 27 nach der Geburt) entsteht der I_h durch Öffnung der HCN Kanalsubtypen HCN1 und HCN2. Diese unterscheiden sich durch die

Kinetik ihres Wechsels zwischen verschiedenen Aktivierungszuständen. Phänomenologisch zeigt sich dies in zwei Zeitkonstanten, mit denen die Aktivierungskurve des I_h beschrieben werden kann. Methodisch verlässlich möglich war dies allerdings nur bei großen I_h Amplituden (d. h. bei der Aktivierung auf -130 mV und nicht bei der Deaktivierung auf -65 mV). Bei einem Fit mit zwei Zeitkonstanten trat nach Interferonapplikation jeweils eine signifikante Erhöhung der schnellen Zeitkonstante auf. Dies ist gleichbedeutend mit einer Reduktion des schnellen Anteils der Aktivierung und gab einen ersten Hinweis auf eine spezifische Modulation der „schnellen“ Untereinheit HCN1. Diese Vermutung wurde durch Simulationsergebnisse untermauert und schlussendlich durch Messungen in HCN1 $-/-$ Mäusen bestätigt. In letzteren konnte keine Modulation des I_h durch IFN- β beobachtet werden. Ungeklärt ist allerdings, wie die phänomenologische Reduktion der HCN1 Gesamtleitfähigkeit am Einzelkanal realisiert wird. Denkbar ist eine Reduktion der Einzelkanalleitfähigkeit oder eine Internalisierung der Kanäle.

4.1.1.3 Vermittlung des Effekts

Durch drei Wege könnte eine Modulation der HCN Kanäle durch Interferon erfolgen:

- Interferone wirken direkt auf den Kanal, eine Aktivierung des Interferonsignalweges ist für die Modulation nicht notwendig.

Gegen diese Hypothese spricht erstens, dass nach Block des Typ I Interferonsignalweges keine I_h Modulation mehr auftritt (Daten aus der Dissertation von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.). Zweitens konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in einer humanen Zelllinie exprimierte HCN Kanäle der Ratte nicht durch rIFN- β (welches nur eine geringe Affinität zu humanen Interferonrezeptoren aufweist, siehe 3.1.3.1 auf Seite 55) moduliert werden.

- Die Modulation des I_h erfolgt aufgrund einer Aktivierung des Interferonsignalweges in glialen Zellen, die in weiterer Folge durch eine Interaktion mit Neuronen Ionenkanäle beeinflussen.

Hierzu erfolgten Messungen in primär kultivierten corticalen Neuronen. In diesen Kulturen ist die Anzahl glialer Zellen drastisch reduziert, trotzdem fand eine mit den *in vitro* Ergebnissen vergleichbare Modulation des I_h statt (Reduktion in den kultivierten Neuronen auf $75\% \pm 15\%$ vs. *in vitro* $73\% \pm 16\%$).

- **Die HCN Modulation erfolgt aufgrund einer Aktivierung des neuronalen Interferonsignalweges.**

Dies verbleibt als einzige Erklärung.

Auch die diese Arbeit flankierenden molekularbiologischen Untersuchungen sprechen für eine Aktivierung der Interferonsignalkaskade in Neuronen: in Layer V Pyramidenneuronen konnte sowohl der Typ I Interferonrezeptor (IFNAR) als auch eine durch IFN- β Applikation induzierte Aktivierung des nachgeschalteten Signalweges nachgewiesen werden (Stadler et al. in Rev.).

4.1.1.4 Funktionelle Konsequenzen der I_h Modulation durch Interferon

I_h bestimmt mehrere bedeutende neuronale Parameter, vor allem im Bereich des Ruhemembranpotentials (RMP). Inwieweit die Reduktion des I_h um ca. 25 % sowie die beobachtete Verlangsamung der Kinetik für eine Veränderung dieser Parameter ausreichen, wurde in mehreren Experimenten untersucht.

Neben der schon von Hadjilambrea et al. (2005) gezeigten (und hier bestätigten) Erhöhung des Membranwiderstandes führte die Reduktion des I_h zu einer Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials (im Mittel um $3,31 \text{ mV} \pm 2,24 \text{ mV}$).

I_h ist einer der das neuronale Frequenzverhalten bestimmenden Ströme (Hutcheon et al. 1996a; Hutcheon et al. 1996b). Die durchgeführten *in silico* Versuche zeigten, dass die durch IFN- β Applikation induzierte Modulation des I_h (Reduktion der Amplitude und Verlangsamung der Kinetik) ausreichend für eine Veränderung des neuronalen Frequenzverhaltens sein könnten. Genauer ergaben die Berechnungen, dass sich durch IFN- β die Resonanzfrequenz vermindern und die Impedanz erhöhen sollte. Des Weiteren trat bei der Simulation eine Verschiebung des Nulldurchgangs der Phasenfunktion hin zu niedrigeren Werten auf. Die Berechnungen wurden daraufhin *in vitro* bestätigt.

Weder *in silico* noch *in vitro* konnte eine Veränderung der Stärke der Resonanz, Q , festgestellt werden. Dies lässt sich durch die Art der Modulation des Frequenzverhaltens erklären: durch die Verminderung des I_h (bei gleichzeitig stabilen passiven Zellparametern) erhöht sich sowohl der Eingangswiderstand (gleichbedeutend mit der Impedanz bei $f = 0 \text{ Hz}$) als auch die Impedanz bei der Resonanzfrequenz. Es kommt also zu einer \pm Parallelverschiebung der Frequenzkurve, die Stärke der Resonanz ($Q = Z_{\text{Res}}/Z_0$) verbleibt somit in etwa gleich.

Neben dem absoluten Wert der Resonanzfrequenz verminderte sich auch die halbe Bandbreite HBW . Dies weist auf einen geringeren präferierten Frequenzbereich hin. Postuliert werden kann des Weiteren, dass diese Veränderung nicht nur das Soma betrifft, sondern auch die Übertragungsfunktion vom Dendriten zum Soma (Ulrich 2002) zu niedrigeren Frequenzen hin verschoben wird. Dass die generelle Auswirkung synaptischer Signale auf das Soma zunimmt, erscheint ebenfalls wahrscheinlich: zum einem steigt die Impedanz über den gesamten gemessenen Frequenzbereich, zum anderen haben frühere Arbeiten gezeigt, dass eine Verminderung des I_h zu einer stärkeren Kopplung zwischen dem distalen Eingangsbereich (*tuft zone* am Dendriten) und dem Soma führt (Berger et al. 2003).

Während die Rolle des Scheinwiderstandes (des Amplitudenanteils der Impedanz) bei der neuronalen Integration offensichtlich ist, liegt der Fall bei der Phasenverschiebung anders. Diese positive Phasenverschiebung (Spannung eilt dem Strom voraus) entsteht durch die phänomenologische Induktivität des I_h , die negative Phasenverschiebung durch die Kapazität der Zellmembran. Narayanan und Johnston (2008) postulieren, dass diese Phasenverschiebung einen Mechanismus darstellt, um die Ankunftszeit der Signale von den Synapsen zum Soma zu kontrollieren. Diese hätte einen hohen Einfluss auf die neuronale Integration, die wahrscheinlich zu einem hohen Maß vom exakten Zeitpunkt der Aktionspotentialauslösung abhängt (VanRullen et al. 2005). Allerdings darf bezweifelt werden, dass die Phasenverschiebung als Modulator der Ankunftszeit bei so komplexen

Signalen wie Aktionspotentialen oder dendritischen Spikes (die sich aus einer Vielzahl von Frequenzanteilen zusammensetzen) zum Tragen kommt. Wichtiger mag dabei der Nulldurchgang des Phasenplots sein, bei dem der Blindwiderstand der dendritischen Leitung Null beträgt (Spannung und Strom sind in Phase, keine Energie wird für den Aufbau des magnetischen Feldes verbraucht). Hierbei gelangt die meiste Wirkleistung aus den synaptischen Eingängen an das Soma und steht somit zur Depolarisation zur Verfügung.

Die Messungen dieser Arbeit zeigen, dass der Nulldurchgang des Phasenplots analog zur Resonanzfrequenz zu niedrigeren Frequenzen verschoben wird. In Übereinstimmung mit der Verschiebung der Resonanzfrequenz und der Erhöhung des Scheinwiderstandes führt dies zu einem Frequenzverhalten, bei dem bei niedrigeren Frequenzen die maximale Erregung des Soma stattfindet.

Die I_h bedingte Resonanz tritt bei Spannungen um das Ruhemembranpotential und darunter auf. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen diese Resonanzfrequenz die Aktionspotentialfrequenz des Neurons bestimmt (Richardson et al. 2003): Wenn die Feuerfrequenz des Neurons gering ist, werden Eingangssignale mit einer Frequenz nahe der Resonanzfrequenz präferentiell verstärkt und üben den größten Einfluss auf die Feuerfrequenz auf. Die Feuerrate der Neurone im Cortex ist sehr gering (im Durchschnitt weniger als ein Aktionspotential alle 15 s, Margrie et al. 2002)) und erfüllt somit die Voraussetzung für einen signifikanten Einfluss des untersuchten Frequenzverhaltens auf die Feuerrate.

Die durch IFN- β ausgelöste Modulation des I_h führt zu einer Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials und einer Erhöhung des Eingangswiderstandes und der Eingangsimpedanz (über den gesamten getesteten Frequenzbereich, quantifiziert für den Impedanzwert bei der Resonanzfrequenz). Des Weiteren bewirkt IFN- β eine Verminderung der Resonanzfrequenz und einen kleineren Bereich präferierter Eingangsfrequenzen.

4.1.2 Interferon moduliert weitere Ionenkanäle

4.1.2.1 Bestätigung der Modulation des Feuerverhaltens

Von Hadjilambrea et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass die Gabe von IFN- β zu einer Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit führt (Erhöhung des *gains* und Verschiebung der Rheobase zu kleineren Stromwerten). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit mit der *whole cell patch clamp* Methode qualitativ bestätigt werden. Allerdings wurde ein geringerer Effekt als in den Vorarbeiten beobachtet (siehe 3.2.1 auf Seite 66). Dies könnte an den unterschiedlichen Messmethoden liegen: bei den von Hadjilambrea et al. (2005) verwendeten Einstichelektroden kommt es zu keiner Verdünnung der intrazellulären Flüssigkeit, wie sie hingegen beim *patch clamp* durch den Austausch zwischen der Pipettenlösung und dem Cytosol auftritt. Die Verringerung der intrazellulären Substanzen könnte kritisch auf die Signalkaskade wirken und damit den verringerten Effekt erklären. Aufgrund dessen kann spekuliert werden, dass sich *in vivo* Interferone

stärker auf neuronale Ionenkanäle auswirken als *in vitro* (mit der *whole cell patch clamp* Konfiguration) beobachtet.

4.1.2.2 Multiple Ionenkanalmodulationen durch IFN

Unklar waren bislang die der Änderung des Feuerverhaltens zugrundeliegenden Ionenkanalmodulationen; die Modulation des I_h war für die beobachtete Veränderung des Feuerverhaltens nicht notwendig. Die Aufklärung der Ionenkanalmodulationen mittels kombinierter Blockersubstanzen hatte sich als nicht zielführend herausgestellt, da die verwendeten Substanzen nicht spezifisch genug auf einen bestimmten Ionenkanal wirken (Hadjilambrea et al. 2005).

Um die Frage zu klären, wurde ein *in silico* Modell erstellt, welches das *in vitro* beobachtbare Feuerverhalten ausreichend genau reproduzieren konnte. Die Modelle der unterschiedlichen Ionenkanäle wurde dafür zum größten Teil aus der NEURON Modell Datenbank übernommen. Für den I_h konnte das zuvor erstellte HCN1 und HCN2 explizite Modell übernommen werden; somit war eine Reproduktion der spezifischen HCN1 Modulation durch IFN- β möglich. Auch für den großen Kalzium abhängigen Kaliumkanal (BK) wurde ein neues Modell erstellt, da die duale Abhängigkeit von der Spannung und dem Kalziumgehalt (und auch die Kalziumabhängigkeit der U_h) in keinem gefunden Modell zufriedenstellend gelöst war. Das neue BK Modell (siehe 3.2.2.1 auf Seite 68) erlaubt eine explizite Angabe der verschiedenen Abhängigkeiten der Aktivierung. Aufgrund der unzureichenden experimentellen Daten war allerdings die Einarbeitung einer spannungs- und kalziumabhängigen Kinetik nicht möglich. Die Zeitkonstante der Kinetik wurde deshalb konstant mit 1 ms angenommen, die Anpassung der Öffnungswahrscheinlichkeit aufgrund einer Veränderung des Kalziumspiegels erfolgte instantan. Somit war das BK-Kanalmodell schnell genug, um auf ein Aktionspotential mit einer Änderung des Aktivierungszustandes zu reagieren (Womack und Khodakhah 2002).

Die Kompartiment- und Distanzabhängigkeit der Kanäle wurden dem Modell aufgrund experimenteller Ergebnisse zugewiesen (siehe Tabelle 3.3 auf Seite 72). Danach erfolgte eine Anpassung der maximalen Leitfähigkeiten der zugewiesenen Kanäle, um (1) die *in vitro* Befunde unserer Arbeitsgruppe und (2) publizierte Parameter (Verhalten nach Blockade bestimmter Kanäle, Ausmaß der *backpropagation*) zu reproduzieren.

In dem fertig gestellten Modell erfolgte die Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Kanalmodulationen. Dabei stellte sich heraus, dass die wahrscheinlichste Erklärung für das veränderte Feuerverhalten eine kombinierte Modulation der folgenden Ionenkanäle ist:

- HCN1 Kanal,
- M - Typ Kalium Kanal,
- großer Kalzium abhängiger Kaliumkanal (BK),
- persistierend öffnender Natriumkanal durch U_h Verschiebung.

Neben der Modulation des I_h konnte für einen weiteren, der durch das Modell postulierten Ströme, den I_m , eine Modulation durch IFN- β auch bereits nachgewiesen werden (siehe 3.2.3 auf Seite 75).

Ein gemeinsamer Bestandteil sowohl der Typ I als auch der Typ II Interferonsignalkaskade ist die Aktivierung der Protein Kinase C (PKC). Für alle oben angeführten Ionenkanäle konnte eine Modulation durch PKC entweder bereits gezeigt werden (I_m : Lee et al. 2010; BK: Kizub et al. 2010; Zhou et al. 2010; I_{nap} : Curia et al. 2004) oder wird stark vermutet (HCN(1): Cathala und Paupardin-Tritsch 1997; Liu et al. 2003; Brager und Johnston 2007; Carr et al. 2007; Li et al. 2010). Die Aktivierung von PKC könnte somit die gemeinsame Ursache für alle durch Interferon ausgelösten Ionenkanalmodulationen darstellen (siehe 4.2.3 auf Seite 84).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen z. T. die von Hadjilambrea et al. (2005) durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung der dem veränderten Feuerverhalten zugrundeliegenden Ionenkanäle. Diese deuteten auf eine Involvierung des I_m , des kalziumaktivierten Kaliumstromes und des T - Typ Kalziumstromes hin. Die Modulation der beiden ersten Ströme ist für die Modulation des Feuerverhaltens notwendig, die des T - Typ Kalziumstromes nicht (die PKC Abhängigkeit dieses Stromes wird zu Zeit kontrovers diskutiert, siehe 4.2.3). Ausgeschlossen wurde in der Arbeit von Hadjilambrea et al. (2005) eine Rolle des I_{nap} bei der Veränderung des Feuerverhaltens, da keine Veränderung der Aktionspotentialschwelle festgestellt werden konnte. I_{nap} spielt allerdings eine große Rolle bei der Bestimmung der Rheobase (Curia et al. 2004), und eine Modulation dieses Stromes ist für die Reproduktion des *in vitro* Ergebnisse notwendig (Abb. 3.16c). Warum sich diese Modulation nicht in einer Veränderung der Aktionspotentialschwelle widerspiegelt, muss noch geklärt werden.

Multiple Kanalmodulationen liegen der erhöhten Erregbarkeit nach IFN- β Applikation zugrunde. Durch die postulierte Aktivierung von PKC können alle notwendigen Kanalmodulationen mit dem Interferonsignalweg gekoppelt werden.

4.2 Implikationen

4.2.1 Erregungssteigerung durch I_h Verminderung

Bisherige Veröffentlichungen zur neuronalen Wirkung von Interferonen (Calvet und Gresser 1979; Reyes-Vazquez et al. 1982; Müller et al. 1993; Dafny et al. 1996) zeigen durchgehend eine Erhöhung der Erregbarkeit (siehe 1.2.5 auf Seite 7). Die Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Hadjilambrea et al. 2005, Resultate der vorliegenden Arbeit; Stadler et al. in Rev.) stimmen in weiten Teilen damit überein. Diskutiert werden muss allerdings, inwieweit die Reduktion des I_h , die sowohl eine Reduktion des Ruhemembranpotentials als auch ein Erhöhung des Eingangswiderstandes bewirkt, in dieses Bild passt:

Der I_h zeigt eine kontextabhängige Wirkung auf die neuronale Erregbarkeit (George et al. 2009):

1. Für sich alleine betrachtet weist der I_h eine rein erregungssteigernde Wirkung auf. Die depolarisierende Wirkung des Na^+ und K^+ Einstromes überwiegt über die Verminderung des Eingangswiderstandes; die Spitzendepolarisation, die durch ein EPSP erreicht wird, vermindert sich nach Block des I_h (George et al. 2009).
2. Im Zusammenspiel mit anderen Kanälen verändert sich das Bild. I_h bewirkt weiter eine Depolarisation der Zellmembran, diese verursacht allerdings die Aktivierung von weiteren Ionenströmen. Diese verringern den Eingangswiderstand für Eingangssignale, die somit zu einer geringeren Auslenkung der Spannungsamplitude führen. Als modulierender Kaliumstrom konnte dafür am Soma der I_m identifiziert werden (George et al. 2009). Für Dendriten (Tsay et al. 2007) und die Präsynapse (Huang et al. 2011) kann ein ähnlicher Mechanismus für Kalziumkanäle postuliert werden. Die konstante Depolarisation durch den I_h führt zu einer Inaktivierung der Kalziumkanäle (vor allem des T-Typ), die somit nicht für einen depolarisierenden Ca^{2+} Einstrom im Zuge eines EPSP zur Verfügung stehen.

Aus 2. kann auf die Erregungssteigerung der I_h Reduktion durch Interferon geschlossen werden: die Reduktion des I_h hyperpolarisiert das Ruhemembranpotential und verringert somit den Aktivierungszustand der M - Typ Kaliumkanäle. Dass diese durch Interferon ebenfalls vermindert werden (siehe 3.2.3 auf Seite 75), verstärkt die Wirkung.

4.2.2 Vergleich mit anderen I_h reduzierenden Substanzen

Einige Anästhetika verursachen eine mit der Interferonwirkung z. T. vergleichbare I_h Reduktion:

- Ketamin bewirkt eine Reduktion der I_h Amplitude um etwa 30 %, die durch eine spezifische Interaktion mit HCN1 vermittelt wird. Dabei tritt, wie in der vorliegenden Arbeit, eine Verschiebung der Resonanzfrequenz bei gleichzeitiger Erhöhung der Impedanz auf. Allerdings war diese mit einer Verminderung der Stärke der Resonanz, Q , verbunden, ebenfalls im Unterschied zu den Interferonresultaten führt Ketamin auch zu einer Verschiebung der U_h der Aktivierungsfunktion (Chen et al. 2009a).
- Propofol bewirkt ebenfalls eine Verminderung des I_h , wie bei Ketamin ist diese mit einer Verschiebung der U_h verbunden (Lyashchenko et al. 2007).
- Isofluran verringert den I_h in *wild type* als auch in HCN1 -/- Mäusen, allerdings ist die Verminderung nur in ersteren mit einer Verschiebung der U_h verbunden (Chen et al. 2009b).

Die Verschiebung der U_h bei diesen Substanzen deutet auf eine von der Vermittlung des Interferoneffekts unterschiedliche Ionenkanalmodulation¹² hin (wahrscheinlich durch

¹²Unter Umständen sorgen auch die durch die Anästhetika zusätzlich hervorgerufenen Änderungen, hervorgehoben sei hier der Block der NMDA Kanäle, für weitere Unterschiede zwischen den beiden Substanzen.

eine Veränderung der Wechselraten zwischen verschiedenen Aktivierungszuständen, Lyashchenko et al. 2007). Allerdings kann die Auswirkung der Anästhetika einen Hinweis auf die Rolle der I_h Reduktion liefern: Ketamin (zusammen mit Xylazin) verursacht eine Erhöhung der dendritischen Erregung mit deutlichen Auswirkungen auf das Feuerverhalten (Potez und Larkum 2008). Zurückgeführt werden kann dieser Befund auf die Verminderung des I_h , die eine stärkere Kopplung des distalen Eingangsbereiches am dendritischen *tuft* mit dem Soma bewirkt (Berger et al. 2003) und das Zeitfenster für Koinzidenzdetektion der Eingangssignale verlängert (Berger und Lüscher 2003).

Im Zusammenhang mit der I_h Reduktion durch Ketamin wird als mögliche Ursache für die anästhetische Wirkung eben diese engere Kopplung zwischen distalen Dendriten und Soma postuliert (Chen et al. 2009a). Diese soll niederfrequente kohärente Oszillationen innerhalb des Cortex ermöglichen. In Übereinstimmung damit kann bei der Anästhesie mittels Ketamin eine langsame EEG Oszillation ($f < 1$ Hz) beobachtet werden, die den langsamen Oszillationen des Schlafes gleicht. Eine Verschiebung des EEG hin zu niedrigeren Frequenzen konnte von unserer Arbeitsgruppe auch für IFN- β nachgewiesen werden (Stadler et al. in Rev.) und treten auch im Zuge einer IFN- α Applikation auf (Kamei et al. 2005).

4.2.3 PKC verbindet die Interferonsignalkaskaden mit den Ionenkanälen

Die Veränderung des neuronalen Feuerverhaltens aufgrund einer IFN- β Applikation kann im Modell nur durch multiplen Ionenkanalmodulationen reproduziert werden. In einer vorangegangenen Arbeit (Beyer et al. 2009) konnten wir zeigen, dass auch bei einem Block der Proteinsynthese eine Steigerung der überschwelligeren Erregbarkeit in Folge von IFN- β auftritt. Somit kann eine Verbindung zwischen dem IFN- β Signalweg und den Ionenkanälen durch die Synthese von Proteinen, die durch interferonstimulierte Gene codiert werden, ausgeschlossen werden. Als Alternative verbleibt eine Aktivierung diverser Signalkaskadenbestandteile, die sekundär auch auf Ionenkanäle wirken.

Für die mitogenaktivierte Proteinkinase p38 könnte eine solche Rolle postuliert werden: Sie wird sowohl innerhalb des Typ I als auch des Typ II Interferonsignalweges aktiviert (Abb. 4.1) und ein Einfluss der p38 auf Ionenkanäle (für I_h z. B. in Poolos et al. 2006) und neuronale Parameter (Kelly et al. 2003) konnte bereits gezeigt werden. Allerdings werden nicht alle möglichen Bestandteile des Interferonsignalweges in allen Zelltypen aktiviert. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass p38 in corticalen Neuronen durch IFN- β nicht aktiviert wird (Stadler et al. in Rev.). Gegen p38 spricht auch, dass diese zu einer Erhöhung des I_h , bedingt durch eine Depolarisation der U_h , führen sollte (Poolos et al. 2006).

Ein weiterer ubiquitärer Bestandteil der Interferonsignalketten ist die Protein Kinase C (PKC). Verschiedene Arten der PKC werden sowohl von Typ I Interferonen (Uddin et al. 2002; Kaur et al. 2005a; Redig et al. 2009) als auch Typ II Interferonen (Deb et al. 2003; Gough et al. 2008; Seo et al. 2009) aktiviert (Abb. 4.1). Aktuell finden sich zunehmend Hinweise, dass PKC eine bedeutende Rolle bei der Modulation von Ionenkanälen aufweist.

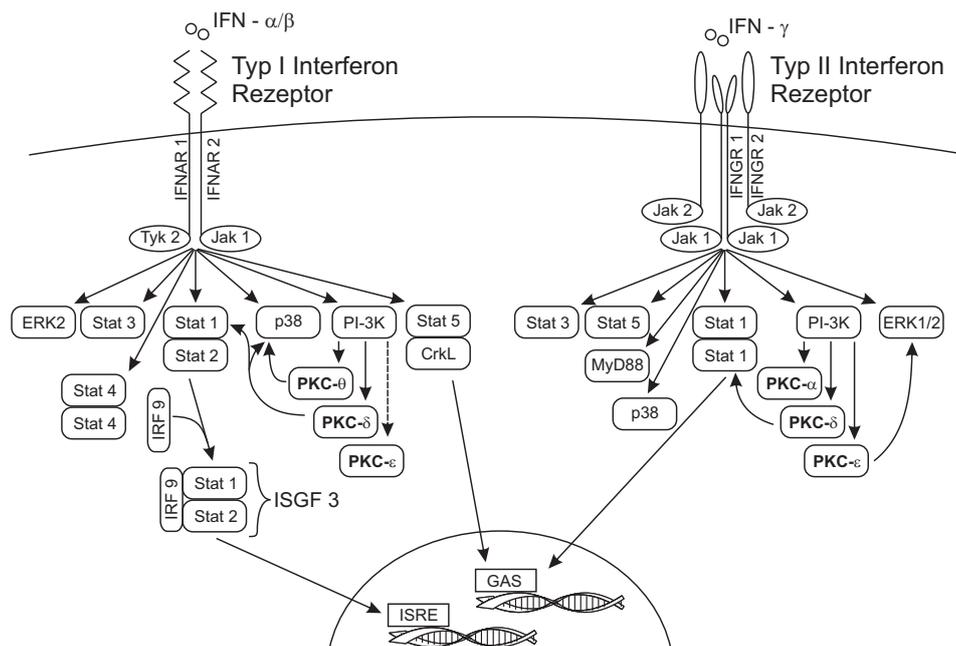


Abbildung 4.1: PKC Aktivierung im Typ I als auch Typ II Interferonsignalweg. Zwischen dem Typ I und Typ II Signalweg kommt es zu mehreren Überschneidungen: für die Aktivierung der p38 kann ein Einfluss auf die Ionenkanalmodulationen in Layer V Pyramidenneuronen ausgeschlossen werden (siehe Text), ebenso eine Synthese der gleichen Proteine (Beyer et al. 2009). Eine weitere Überschneidung besteht in der Aktivierung unterschiedlicher Typen der PKC in beiden Signalwegen. Aktuelle Veröffentlichungen zeigen, dass mehrere Ionenkanäle durch PKC moduliert werden und in dem *in silico* Modell in dieser Arbeit konnten die *in vitro* Ergebnisse nach Einarbeiten der postulierten PKC Abhängigkeiten reproduziert werden. Die Abbildung wurde anhand der Daten in Uddin et al. (2002); Srivastava et al. (2004); Bekisz et al. (2004); Pestka et al. (2004); Kaur et al. (2005b); Kaur et al. (2005a); Katsoulidis et al. (2005); Takaoka und Yanai (2006); Stark (2007); Gough et al. (2008); Redig et al. (2009) angefertigt.

- Die Aktivierung von PKC führt zu einer beinahe sofort einsetzenden Reduktion des M - Typ Kaliumstromes durch eine Phosphorylierung des Kanals (Lee et al. 2010).
- PKC vermindert die Öffnungswahrscheinlichkeit der großen kalziumabhängigen Kaliumkanäle (Zhou et al. 2010).
- PKC verschiebt die Aktivierungskurve der persistierenden Natriumkanäle näher ans Ruhemembranpotential und reduziert die Rheobase (Curia et al. 2004).
- Für den T - Typ Kalziumstrom gibt es sowohl Berichte, dass PKC zu einer Verminderung (Rangel et al. 2010) als auch zu einer Erhöhung des Stromes führt (Zheng et al. 2010).

Aufgrund der widersprüchlichen Berichte hinsichtlich des Einflusses der PKC auf den T - Typ Kalziumstrom wurden nur die ersten drei Modulationen in das *in silico*

Modell eingearbeitet. Dies war hinreichend, um die *in vitro* beobachtete Veränderung des Feuerverhaltens durch IFN- β zu reproduzieren (siehe 3.2.2.3 auf Seite 73).

PKC könnte somit die Verbindung zwischen dem Interferonsignalweg und den für die Änderung der überschweligen Erregbarkeit notwendigen Kanalmodulationen darstellen. Des Weiteren könnte die Aktivierung der PKC auch die Modulation der HCN Kanäle durch Interferon vermitteln. Es gibt mehrere Hinweise, dass PKC einen Einfluss auf HCN Kanäle ausübt (Cathala und Paupardin-Tritsch 1997; Liu et al. 2003; Brager und Johnston 2007; Carr et al. 2007; Li et al. 2010). In letzterer Arbeit konnte gezeigt werden, dass Orexin A (ein Neuropeptidhormon, das PKC aktiviert) zu einer Reduktion des I_h führt. Wie in der vorliegenden Arbeit für Interferon gezeigt, verursachte Orexin A neben einer Reduktion des Stromes auch eine Verlangsamung der Kinetik (aus den Abbildungen in Li et al. 2010 ersichtlich). Die Autoren postulieren auch eine spezifische Reduktion von HCN1, da nach der Applikation von Orexin A eine Verschiebung der U_h auftrat. Dies hängt wahrscheinlich mit dem höheren Anteil von HCN2 in dem verwendeten Expressionssystem (Layer V Neurone des prelimbischen Cortex) zusammen, da in diesen Zellen auch eine Erhöhung des I_h durch cAMP Gabe erreicht werden konnte. In Layer V Pyramidenneuronen des somatosensorischen Cortex kann hingegen durch Veränderung des cAMP Gehalts keine Modulation des I_h erzielt werden (Kole et al. 2006, siehe auch 3.1.4.1 auf Seite 60). Bis dato fehlt aber ein direkter Nachweis einer I_h Modulation in Layer V Pyramidenneuronen durch PKC. Unklar ist auch, warum die potentielle Modulation des I_h durch PKC von der Proteinsynthese abhängt. Spekuliert wird, dass zwischen dem Interferonsignalweg und dem HCN Kanal ein Protein mit hoher Umsatzrate vermittelt (Beyer et al. 2009).

Eine messbare Zunahme der aktivierten PKC erfolgt bereits fünf Minuten nach Applikation von Interferon (gezeigt für IFN- α , Zhao et al. 2005) und wäre somit schnell genug, um den Zeitverlauf der beobachteten Ionenkanalmodulation zu erklären (Abb. 3.1c).

PKC wird im Zuge der Interferonsignalkette aktiviert. Neuere Arbeiten zeigen auch multiple Kanalmodulationen durch PKC, deren Implementierung im *in silico* Modell die vorgefundenen *in vitro* Ergebnisse reproduzieren lassen.

4.2.4 Betrachtung des gesamten Effekts - *sickness behaviour*

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Auswirkungen von Interferon auf einzelne Neurone. Von diesen Befunden einen Schluss auf die Veränderungen durch Interferon im neuronalen Verbund und darüber hinaus auf eine Änderung des Motivationszustandes zu ziehen, erscheint schwierig. Einige Hinweise sprechen allerdings für eine bedeutende Rolle der Interferone bei der Generierung des *sickness behaviour*:

4.2.4.1 I_h Veränderung aufgrund von Erkrankungen

Derzeit wird intensiv an dem Zusammenhang zwischen neuronalen Ionenkanalveränderungen und diversen Krankheiten geforscht, wenn auch mit Hauptaugenmerk auf vererbte Veränderungen (Kullmann und Waxman 2010). So konnten auch für den I_h Veränderung

im Zuge von unterschiedlichen Erkrankungen nachgewiesen werden (Linden et al. 2003; Strauss et al. 2004; Lewis und Chetkovich 2011). Dabei treten mitunter widersprüchliche Effekte auf: so soll die erhöhte Erregbarkeit durch die Verminderung des I_h einerseits für den erhöhten Wachsamkeit in Zusammenhang mit Orexin A verantwortlich sein (Li et al. 2010) als auch für die Schläfrigkeit im Zuge einer Ketamin Anästhesie (Chen et al. 2009a). Schlussfolgern kann man daraus, dass die Auswirkung einer I_h Modulation kontextabhängig ist und keine Verallgemeinerungen zulässt.

4.2.4.2 Interferon und Verhaltensänderungen

Die (therapeutische) Applikation von Interferon führt zu Verhaltensänderungen im Menschen (siehe 1.2.4 auf Seite 7) und im Tiermodell (Segall und Crnic 1990; Plata-Salamán 1992; Wang et al. 2009). Trotzdem wird derzeit hauptsächlich die Rolle der Interleukine (IL) im Zusammenhang mit *sickness behaviour* diskutiert (Clark et al. 2008; McAfoose und Baune 2009; Dantzer 2009). Dabei wird vor allem die Rolle von IL-1 betont, da nach Blockade des IL-1 Rezeptors (mittels geeigneter Substanzen oder in der IL-1 $-/-$ Maus) verschiedene Aspekte des *sickness behaviour* (Reduktion des Sozialverhaltens, Verminderung der Futteraufnahme) nur noch vermindert auftreten (Dantzer 2009). Inwieweit diese Effekte aber direkt durch IL-1 ausgelöst werden oder auf anderen, der IL-1 Aktivierung nachgeschalteten Cytokinen, beruhen, konnte bisher nicht geklärt werden. Neuere Befunde zeigen, dass Typ I Interferone die Produktion von IL-1 hemmen (Guarda et al. 2011). Dies spricht stark für eine eigene, nicht über die Aktivierung von IL-1 vermittelte, Rolle der Interferone bei der Ausbildung des *sickness behaviour*.

Mit der gewählten Methode, *whole cell patch clamp*, können neuronale Veränderungen innerhalb der ersten Stunde nach Interferonapplikation beobachtet werden. Diese weichen unter Umständen von den Auswirkungen eines permanent erhöhten Interferonspiegels ab. So zeigt z. B. eine Verhaltensstudie von Wang et al. (2009) einen zu den bekannten Interferontherapieebenenwirkungen im Gegensatz stehenden antidepressiven Effekt von IFN- α in Mäusen während eines Schwimmtests. Die Autoren führen dies auf eine mögliche primäre Wirkung von Interferon zurück, die wie im Menschen eine (erhöhte) Verwirrtheit sein soll. Rein spekulativ könnte man diese auf die veränderte dendritische Integration und die Modulation des Feuerverhaltens zurückführen. Bei einer reinen Messung der Aktivität nach einer Interferonapplikation tritt eine Reduktion der Bewegung und des Fressverhaltens nach zwei bis vier Stunden auf (Segall und Crnic 1990).

Erschwert wird eine Rückführung des *sickness behaviour* auf bestimmte Ionenkanalveränderungen aufgrund von Interferon durch die Aktivierung unterschiedlicher, potentiell ebenfalls neuromodulatorisch wirksamer Cytokine durch eine Infektion (Schiepers et al. 2005; Takaoka und Yanai 2006; Takeuchi und Akira 2009; Flannery und Bowie 2010). Wahrscheinlich lassen sich nicht bestimmte Eigenschaften der *sickness behaviour* auf bestimmte Cytokine, im speziellen Interferon, zurückführen, hingegen ist Interferon an der Ausbildung des gesamten Symptomkomplexes beteiligt.

Bemerkenswert bei der Betrachtung der neuromodulatorischen Wirkung von Interferonen ist die gerichtete Auswirkung der Effekte. Interferon reduziert I_h (mit den unter

4.2.1 auf Seite 82 besprochenen erregungssteigernden Wirkungen), reduziert diverse Kaliumströme (I_m , I_{BK}) und verschiebt die Aktivierung von I_{NaP} mit ebenfalls erregungssteigernden Konsequenzen. Dabei kommt es zu keinen großen Veränderungen bei einzelnen Kanalparametern, sondern zu vielen kleinen Modifikationen. Dies stimmt überein mit der Theorie, dass dadurch ein effektiverer Wechsel zwischen verschiedenen neuronalen Zuständen ermöglicht wird (Goldman et al. 2001).

Die durch Interferon ausgelösten Ionenkanalmodulationen bewirken einen durch eine höhere Erregbarkeit gekennzeichneten neuronalen Zustand. Dieser bewirkt funktionelle Änderungen neuronaler Parameter (siehe 4.1.1.4 auf Seite 79), für die aufgrund der prominenten Rolle der Layer V Pyramidenneurone in der Signalverarbeitung innerhalb des Cortex (siehe 1.3.1 auf Seite 9) eine Verhaltensrelevanz postuliert werden kann. Dies könnte eine der zellulären Grundlagen des *sickness behaviour* darstellen.

4.2.5 IFN, ein universeller Neuromodulator?

Interferon wird nicht nur im Zuge von Infektionserkrankungen ausgeschüttet, sondern z. B. auch bei Verletzungen des Gehirns (Khorrooshi und Owens 2010). Entzündungsassoziierte Cytokine werden auch durch Stress hochreguliert (Kemeny 2003) und stellen somit einen der Verbindungswege zwischen dem Neuro- und Immunsystem dar (Ziemssen und Kern 2007). Des Weiteren konnte ein geringer konstitutiver Interferonspiegel im Organismus (Takaoka und Yanai 2006), spezifischer im ZNS (Prinz et al. 2008) nachgewiesen werden. Dass Interferone somit als generelle Neuromodulatoren wirken, erscheint möglich. Allerdings müsste geklärt werden, ob die erreichten Interferonkonzentrationen für eine wirksame Modulation ausreichen. Eine ähnliche Rolle als generelle Neuromodulatoren wird auch für die Cytokine IL-1 und TNF- α postuliert (Vitkovic et al. 2000).

4.3 Methodenkritik

4.3.1 Patch clamp

Die verwendete Messmethode *whole cell patch clamp* ermöglicht eine niederohmige Verbindung zwischen dem Messverstärker und dem Zellinneren. Damit ist eine genaue Bestimmung der Amplituden und Kinetik der Ionenströme möglich. In Kauf genommen wird dabei eine Vermischung des Cytosols mit der Messlösung in der Pipette. Dies bewirkt eine Störung der intrazellulären Signalkaskade und u. U. die Verminderung diverser Ströme während des Experimentverlaufs (*run down*).

Die dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen (Hadjilambreva et al. 2005) konnten jedoch zeigen, dass der Effekt auch bei ungestörter Cytosolzusammensetzung auftritt. Interessanterweise wurde dabei eine stärkere Veränderung des Feuerverhaltens nach IFN- β beobachtet. Dies deutet daraufhin, dass mittels *whole cell patch clamp* das Ausmaß des Effekts eher unterschätzt wird (siehe 3.2.1 auf Seite 66).

Eine Alternative zu der gewählten Methode bestünde in der Verwendung von *cell attached* Messungen. Dabei wird die Zellmembran nicht aufgerissen und der Ionenstrom

von der Außenseite der Zelle gemessen. Da die Interaktion zwischen IFN- β und HCN Kanal nicht direkt über eine Bindung am Kanal vermittelt wird (siehe 3.1.3.1 auf Seite 55), wäre mit dieser Methode auch eine Messung des Interferoneffekts auf I_h möglich. Jedoch ist die Dichte an HCN Kanälen am Soma zu klein für eine verlässliche Bestimmung der I_h Amplitude, es müssten Messungen am Dendriten erfolgen. Dort kann der *cell attached* Modus allerdings nicht für die zur Ausbildung des Interferoneffekts notwendige Zeitdauer stabil aufrechterhalten werden (Kole, pers. comm.).

Als alternative Messmethode stünde noch *perforated patch clamp* zur Verfügung. Dabei erfolgt ähnlich dem *whole cell* Modus eine Messung des Stromes durch den Stromfluss zwischen Cytosol und Messverstärker. Allerdings wird der Zugang zum Zellinneren durch Perforation der Zellmembran erreicht. Der dabei entstehende Zugang ermöglicht nur den Austausch monovalenter Ionen, die intrazellulären Signalwege blieben weitgehend erhalten. In Kauf genommen wird dabei ein höherer serieller Widerstand, der unter Umständen die präzise Messung von Aktionspotentialen und Kanalkinetik erschweren könnte. Trotzdem wäre diese Messmethode für die Bestätigung des postulierten PKC Vermittlung des Effekts zu erwägen.

4.3.2 Verwendete Interferonkonzentration

Für die Messungen in dieser Arbeit wurden durchgehend 1000 U ml^{-1} Interferon verwendet. Diese Konzentration hat sich bei Vorarbeiten als wirksam für die Neuromodulation erwiesen (Hadjilambrea et al. 2005; Daten aus der Dissertation von Claudia Bierwirth in Stadler et al. in Rev.) und liegt im Bereich der Konzentration, wie sie auch im Serum von mit Mengo Virus infizierten Mäusen (über 300 U ml^{-1}) erreicht wird (Heremans et al. 1980). Wichtiger als die generelle Interferonkonzentration ist wahrscheinlich die kleinräumig erreichte in den Interzellularräumen, vor allem angesichts der Tatsache, dass sowohl Neurone (Delhaye et al. 2006) als auch gliale Zellen (Paul et al. 2007) Interferon produzieren.

Dass die durch eine Virusinfektion erhöhte Interferonkonzentration zur Reduzierung des I_h ausreicht, wurde vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Nach einer Infektion mit dem Theiler Virus (GDVII Linie, Delhaye et al. 2006) konnte am Tag 4 bis 5 nach der Infektion eine signifikante Reduktion des I_h festgestellt werden (Stadler et al. in Rev.).

4.3.3 *In silico* Modell

Das erstellte Modell zur Simulation des Feuerverhaltens beinhaltet nicht alle bekannten Ionenströme. So wurden z. B. die unterschiedlichen Kaliumkanäle mit vier transmembranen Domänen (*2 pore domain* K^+ Kanäle, siehe 1.3.3.2 auf Seite 12) in einer einzigen Leckleitfähigkeit zusammengefasst. Des Weiteren fehlen Kanalmodelle für Kaliumkanäle mit zwei transmembranen Domänen (Kir) und den kleinen kalziumabhängigen Kalium (SK) - Kanal. Synaptische Eingänge wurden dem Modell ebenfalls nicht zugewiesen, da sich

die Untersuchungen auf die neuromodulatorischen Wirkungen auf spannungsabhängige Ionenkanäle konzentrierten¹³.

Trotz dieser Einschränkungen reproduziert das Modell das *in vitro* beobachtete Feuerverhalten (Abb. 3.16b) und, nach Kanalmodulation aufgrund bekannter PKC Abhängigkeiten, dessen Veränderung nach Interferonapplikation (Abb. 3.16c).

Im Sinne von Ockhams Skalpell wurde versucht, ein möglichst einfaches Modell zu erstellen, das die oben genannten Voraussetzung erfüllt. Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch, dass die nicht eingearbeiteten Kanäle ebenfalls von Interferon moduliert werden. Der weitere Ablauf zur Bestätigung des Modells bestünde in der Messung der Interferonabhängigkeit der gefunden Kanäle. Das Ausmaß der Modulation müsste dann in das Modell eingearbeitet werden, um zu überprüfen, ob auch mit diesen *in vitro* Befunden die gleiche Änderung des Feuerverhaltens auftritt. Falls nicht, müsste versucht werden durch Einarbeitung der fehlenden Kanäle eine solche zu erreichen.

Prinzipiell eingeschränkt (hinsichtlich der Reproduzierung der *in vitro* Messungen) wird das Modell durch die unzureichende Datenlage zur Verteilung und Kinetik mehrerer Ionenkanäle. Wünschenswert wäre für jeden Kanal eine Bestimmung der Leitfähigkeit in den unterschiedlichen Kompartimenten, vor allem entlang des apikalen Dendriten. Diese Daten stehen allerdings nur für wenige Kanäle zur Verfügung, falls möglich, wurde bei fehlenden Daten auf publizierte Messungen in CA1 Pyramidenneuronen ausgewichen.

4.4 Ausblick

4.4.1 Überprüfung der Rolle von PKC

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die beobachtete Steigerung der neuronalen Erregung durch Interferon nur mit multiplen Kanalmodulationen erklärt werden kann. Als gemeinsamer Mechanismus, der diese Modulationen mit dem Interferonsignalweg verbindet, postuliere ich eine Aktivierung von PKC. Daraus ergeben sich drei notwendige Experimentsätze:

1. Werden die in der *in silico* Simulation gefunden Ionenkanäle auch tatsächlich durch Interferon moduliert?
2. Kommt es in Neuronen zu einer Aktivierung von PKC nach Interferonapplikation?
3. Werden die gefundenen Ionenkanäle auch durch PKC moduliert?

Punkt 1 dient der Bestätigung des erstellten Modells. Falls die gefundenen Modulationen nicht den *in silico* Voraussagen folgen, müsste nach alternativen Veränderungen gesucht werden. Einerseits bestünde die Möglichkeit, dass einer der nicht eingearbeiteten spannungsabhängigen Kanäle eine wichtigere Rolle spielt als angenommen (siehe 4.3.3

¹³Allerdings fand (wahrscheinlich) eine implizite Zuweisung aufgrund der sigmoidalen Verteilung des Eingangswiderstandes statt. Dies wurde aus der Originalbeschreibung (Stuart und Spruston 1998) übernommen. Wahrscheinlich ist diese, unabhängig von I_h , auf eine distanzabhängige Verteilung synaptischer Kanäle zurückzuführen (Kole & Stuart/Strauss, pers. comm.).

auf Seite 89) oder dass eine Modulation der synaptischen Ionenkanäle stattfindet. Um letzteres auszuschließen, sollten Voruntersuchungen zur Modulation des Feuerverhaltens bei einem vollständigen Block der synaptischen Kanäle erfolgen. Auch davon unabhängig erscheint eine Untersuchung der synaptischen Übertragungsfunktion nach Interferon sinnvoll, da IFN- β zu einer Veränderung der Synthese von Transportproteinen führt (Beyer et al. 2009). Für IFN- α konnte ein Einfluss auf das Neurotransmittersystem bereits nachgewiesen werden (Schaefer et al. 2003).

Punkt 2 ist eine notwendige Voraussetzung für die postulierte PKC abhängige Modulation neuronaler Ionenkanäle durch Interferon. Nicht alle Bestandteile des Interferonsignalweges werden in allen Zelltypen aktiviert. So konnte z. B. unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass p38 in corticalen Neuronen durch IFN- β nicht aktiviert wird. Die ubiquitäre Rolle von PKC in der Interferonsignalkaskade (Abb. 4.1) spricht allerdings für eine Aktivierung auch in Neuronen.

Punkt 3 scheint weitgehend geklärt, da in das Modell die veröffentlichten Kanalmodulation durch PKC eingearbeitet wurden (obschon keine dieser Kanalmodulationen in Layer V Pyramidenneuronen gezeigt wurde). Unbestätigt, aber vermutet (Cathala und Paupardin-Tritsch 1997; Liu et al. 2003; Brager und Johnston 2007; Carr et al. 2007; Li et al. 2010), ist bisher die Modulation des HCN Kanals durch PKC. Diese müsste, um die vorliegenden Ergebnisse zu bestätigen, HCN1 spezifisch erfolgen. Wenig sinnvoll erscheint eine Überprüfung, ob durch Blockade des PKC die Modulation der Ionenkanäle verhindert werden kann: aufgrund der ubiquitären Rolle der PKC in der Interferonsignalkaskade (Abb. 4.1) würde nach einem Block dieses Schrittes vermutlich die gesamte Signalkette blockiert werden (so ist z. B. einer der zentralen Schritte in der Interferonsignalkette, die Aktivierung von STAT1, abhängig von PKC, Uddin et al. 2002).

4.4.2 Ausweitung der Untersuchungen

Bisher konnte nur die Modulation des I_h durch Typ I und Typ II Interferone nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zur Änderung des Feuerverhaltens erfolgten ausschließlich mit dem Typ I Interferon IFN- β . Zumindest für das andere Typ I Interferon, IFN- α , erscheint eine ähnliche Modulation sehr wahrscheinlich (Dafny et al. 1996).

Die vorliegende Arbeit verwendete Layer V Pyramidenneurone als Versuchssystem. Zur Klärung der Bedeutung der gefundenen Ergebnisse wären vergleichende Messungen in unterschiedlichen Hirnregionen und Neuronentypen wünschenswert. Bisherige Veröffentlichungen zeigen auch eine Reduktion der *long term potentiation* (LTP) im Hippocampus nach IFN- α (Mendoza-Fernández et al. 2000). Dabei kann, allerdings bei einer geringen Interferondosis von 300 U ml^{-1} , keine Veränderung des Ruhemembranpotentials oder des Eingangswiderstandes beobachtet werden. Ob Interferone im Hippocampus anders wirken als im Cortex und ob die Reduktion der LTP auch mit IFN- β oder IFN- γ erreicht werden kann, muss noch geklärt werden.

Derzeit wird hauptsächlich die Rolle von IL-1 bei der Auslösung des *sickness behaviour* diskutiert (siehe 4.2.4.2 auf Seite 87). Einige Veröffentlichungen lassen aber eine eigene, von der IL-1 Wirkung unabhängige Rolle von Interferon bei der Ausbildung des Syndroms erwarten: die Applikation von IFN- β und IFN- γ bewirkt in Astrozyten keine IL-1

Expression (Okada et al. 2005) und Typ I Interferone hemmen die Produktion von IL-1 (Guarda et al. 2011). Für weitere Hinweise auf eine interferoninduzierte Auslösung des *sickness behaviour* müsste versucht werden, ob in IL1 -/- Mäusen (oder bei der Blockade des Rezeptors) durch Applikation von Interferon *sickness behaviour* ausgelöst werden kann und welche Aspekte im Vergleich zu den Kontrolltieren fehlen. Dies, im Vergleich zu ähnlichen Experimenten in Interferonrezeptor -/- Mäusen, könnte helfen, die Bedeutung der unterschiedlichen Cytokine auf die Ausbildung des *sickness behaviour* aufzuklären.

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass Typ I und Typ II Interferon als Ionenkanalmodulatoren in Layer V Pyramidenzellen des somatosensorischen Cortex wirken. Die durch Interferon ausgelösten multiplen Ionenkanalmodulationen bewirken eine erhöhte Erregbarkeit der Neuronen. Die vorliegenden Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass Interferone über eine PKC Aktivierung auf neuronale Ionenkanäle wirken. Die Neuromodulation durch Interferon könnte eine der zellulären Grundlagen des *sickness behaviour* darstellen.

5 Literatur

- Abel, H. J., Lee, J. C., Callaway, J. C. und Foehring, R. C. (2004). Relationships between intracellular calcium and afterhyperpolarizations in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 91(1): 324–335.
- Aboitiz, F. (1999). Evolution of isocortical organization. A tentative scenario including roles of reelin, p35/cdk5 and the subplate zone. *Cereb Cortex* 9(7): 655–661.
- Acker, C. D. und Antic, S. D. (2009). Quantitative assessment of the distributions of membrane conductances involved in action potential backpropagation along basal dendrites. *J Neurophysiol* 101(3): 1524–1541.
- Almog, M. und Korngreen, A. (2009). Characterization of voltage-gated Ca(2+) conductances in layer 5 neocortical pyramidal neurons from rats. *PLoS One* 4(4): e4841.
- Astman, N., Gutnick, M. J. und Fleidervish, I. A. (2006). Persistent sodium current in layer 5 neocortical neurons is primarily generated in the proximal axon. *J Neurosci* 26(13): 3465–3473.
- Atkinson, S. E. und Williams, S. R. (2009). Postnatal development of dendritic synaptic integration in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 102(2): 735–751.
- Aubert, A. (1999). Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. *Neurosci Biobehav Rev* 23(7): 1029–1036.
- Banks, W. A. und Erickson, M. A. (2010). The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis* 37(1): 26–32.
- Battefeld, A., Bierwirth, C., Li, Y. C., Barthel, L., Velmans, T. und Strauss, U. (2010). I(h) “run-up” in rat neocortical neurons and transiently rat or human HCN1-expressing HEK293 cells. *J Neurosci Res* 88(14): 3067–3078.
- Bekisz, J., Schmeisser, H., Hernandez, J., Goldman, N. D. und Zoon, K. C. (2004). Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors* 22(4): 243–251.
- Bekkers, J. M. (2000a). Distribution and activation of voltage-gated potassium channels in cell-attached and outside-out patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *J Physiol* 525 Pt 3: 611–620.
- Bekkers, J. M. (2000b). Properties of voltage-gated potassium currents in nucleated patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *J Physiol* 525 Pt 3: 593–609.
- Bemiller, L. S., Roberts, D. H., Starko, K. M. und Curnutte, J. T. (1995). Safety and effectiveness of long-term interferon gamma therapy in patients with chronic granulomatous disease. *Blood Cells Mol Dis* 21(3): 239–247.
- Benhassine, N. und Berger, T. (2005). Homogeneous distribution of large-conductance calcium-dependent potassium channels on soma and apical dendrite of rat neocortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 21(4): 914–926.
- Benhassine, N. und Berger, T. (2009). Large-conductance calcium-dependent potassium channels prevent dendritic excitability in neocortical pyramidal neurons. *Pflugers Arch* 457(5): 1133–1145.

- Berger, T. und Lüscher, H. R. (2003). Timing and precision of spike initiation in layer V pyramidal cells of the rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 13(3):274–281.
- Berger, T., Senn, W. und Lüscher, H. R. (2003). Hyperpolarization-activated current Ih disconnects somatic and dendritic spike initiation zones in layer V pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 90(4):2428–2437.
- Bermel, R. A. und Rudick, R. A. (2007). Interferon-beta treatment for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 4(4):633–646.
- Beyer, S., Raether, G., Stadler, K., Hoffrogge, R., Scharf, C., Rolfs, A., Mix, E. und Strauss, U. (2009). Interferon-beta modulates protein synthesis in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 213(1-2):31–38.
- Bond, C. T., Maylie, J. und Adelman, J. P. (2005). SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Curr Opin Neurobiol* 15(3):305–311.
- Borden, E. C., Sen, G. C., Uze, G., Silverman, R. H., Ransohoff, R. M., Foster, G. R. und Stark, G. R. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6(12):975–990.
- Brager, D. H. und Johnston, D. (2007). Plasticity of intrinsic excitability during long-term depression is mediated through mGluR-dependent changes in I(h) in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 27(51):13926–13937.
- Brecht, M. (2007). Barrel cortex and whisker-mediated behaviors. *Curr Opin Neurobiol* 17(4):408–416.
- Brown, D. A. und Passmore, G. M. (2009). Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol* 156(8):1185–1195.
- Cain, S. M. und Snutch, T. P. (2010). Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing. *Channels (Austin)* 4(6):475–482.
- Calvet, M. C. und Gresser, I. (1979). Interferon enhances the excitability of cultured neurones. *Nature* 278(5704):558–560.
- Camacho-Arroyo, I., López-Griego, L. und Morales-Montor, J. (2009). The role of cytokines in the regulation of neurotransmission. *Neuroimmunomodulation* 16(1):1.
- Capuron, L., Fornwalt, F. B., Knight, B. T., Harvey, P. D., Ninan, P. T. und Miller, A. H. (2009). Does cytokine-induced depression differ from idiopathic major depression in medically healthy individuals? *J Affect Disord* 119(1-3):181–185.
- Carnevale, Nicholas T. und Hines, Michael L. (2006). *The NEURON Book*. Cambridge University Press.
- Carr, D. B., Andrews, G. D., Glen, W. B. und Lavin, A. (2007). alpha2-Noradrenergic receptors activation enhances excitability and synaptic integration in rat prefrontal cortex pyramidal neurons via inhibition of HCN currents. *J Physiol* 584(Pt 2):437–450.
- Cathala, L. und Paupardin-Tritsch, D. (1997). Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (Ih) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway. *J Physiol* 503 (Pt 1):87–97.
- Chakraborty, S., Nazmi, A., Dutta, K. und Basu, A. (2010). Neurons under viral attack: victims or warriors? *Neurochem Int* 56(6-7):727–735.

- Chen, S., Wang, J. und Siegelbaum, S. A. (2001). Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 117(5): 491–504.
- Chen, X. und Johnston, D. (2004). Properties of single voltage-dependent K⁺ channels in dendrites of CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus. *J Physiol* 559(Pt 1): 187–203.
- Chen, X., Shu, S. und Bayliss, D. A. (2009a). HCN1 channel subunits are a molecular substrate for hypnotic actions of ketamine. *J Neurosci* 29(3): 600–609.
- Chen, X., Shu, S., Kennedy, D. P., Willcox, S. C. und Bayliss, D. A. (2009b). Subunit-specific effects of isoflurane on neuronal Ih in HCN1 knockout mice. *J Neurophysiol* 101(1): 129–140.
- Chesler, D. A. und Reiss, C. S. (2002). The role of IFN-gamma in immune responses to viral infections of the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(6): 441–454.
- Clark, I. A., Budd, A. C. und Alleva, L. M. (2008). Sickness behaviour pushed too far—the basis of the syndrome seen in severe protozoal, bacterial and viral diseases and post-trauma. *Malar J* 7: 1–8.
- Cleeland, C. S., Bennett, G. J., Dantzer, R., Dougherty, P. M., Dunn, A. J., Meyers, C. A., Miller, A. H., Payne, R., Reuben, J. M., Wang, X. S. und Lee, B. N. (2003). Are the symptoms of cancer and cancer treatment due to a shared biologic mechanism?: A cytokine-immunologic model of cancer symptoms. *Cancer* 97(11): 2919–2925.
- Clerico, M., Contessa, G. und Durelli, L. (2007). Interferon-beta1a for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther* 7(4): 535–542.
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Miera, E. Vega-Saenz de und Rudy, B. (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 233–285.
- Covarrubias, M., Bhattacharji, A., De Santiago-Castillo, J. A., Dougherty, K., Kaulin, Y. A., Na-Phuket, T. R. und Wang, G. (2008). The neuronal Kv4 channel complex. *Neurochem Res* 33(8): 1558–1567.
- Curia, G., Aracri, P., Sancini, G., Mantegazza, M., Avanzini, G. und Franceschetti, S. (2004). Protein-kinase C-dependent phosphorylation inhibits the effect of the antiepileptic drug topiramate on the persistent fraction of sodium currents. *Neuroscience* 127(1): 63–68.
- Dafny, N., Prieto-Gomez, B., Dong, W. Q. und Reyes-Vazquez, C. (1996). Interferon modulates neuronal activity recorded from the hypothalamus, thalamus, hippocampus, amygdala and the somatosensory cortex. *Brain Res* 734(1-2): 269–274.
- Dantzer, R. (2009). Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol Allergy Clin North Am* 29(2): 247–264.
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W. und Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9(1): 46–56.

- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Lawson, M. A. und Kelley, K. W. (2010). Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology*.
- D'Arcangelo, G., Grassi, F., Ragozzino, D., Santoni, A., Tancredi, V. und Eusebi, F. (1991). Interferon inhibits synaptic potentiation in rat hippocampus. *Brain Res* 564(2): 245–248.
- Deb, D. K., Sassano, A., Lekmine, F., Majchrzak, B., Verma, A., Kambhampati, S., Uddin, S., Rahman, A., Fish, E. N. und Plataniias, L. C. (2003). Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma. *J Immunol* 171(1): 267–273.
- Debanne, D. (2004). Information processing in the axon. *Nat Rev Neurosci* 5(4): 304–316.
- Delhaye, S., Paul, S., Blakqori, G., Minet, M., Weber, F., Staeheli, P. und Michiels, T. (2006). Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(20): 7835–7840.
- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. und Silverman, R. H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15623–15628.
- Dolphin, A. C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: 56–62.
- Donnelly, R. P. und Kotenko, S. V. (2010). Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res* 30(8): 555–564.
- Douglas, R. J. und Martin, K. A. (2004). Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci* 27: 419–451.
- Drews, D., Klar, M., Dame, C. und Bräuer, A. U. (2009). Developmental expression profile of the YY2 gene in mice. *BMC Dev Biol* 9: 1–7.
- Du, J., Haak, L. L., Phillips-Tansey, E., Russell, J. T. und McBain, C. J. (2000). Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K⁺ channel subunit Kv2.1. *J Physiol* 522 Pt 1: 19–31.
- Enyedi, P. und Czirják, G. (2010). Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 90(2): 559–605.
- Erchova, I., Kreck, G., Heinemann, U. und Herz, A. V. (2004). Dynamics of rat entorhinal cortex layer II and III cells: characteristics of membrane potential resonance at rest predict oscillation properties near threshold. *J Physiol* 560(Pt 1): 89.
- Faber, E. S. und Sah, P. (2007). Functions of SK channels in central neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(10): 1077–1083.
- Feldman, D. E. (2009). Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu Rev Neurosci* 32: 33–55.
- Flannery, S. und Bowie, A. G. (2010). The interleukin-1 receptor-associated kinases: critical regulators of innate immune signalling. *Biochem Pharmacol* 80(12): 1981–1991.
- Foerster, H. von (1988). On constructing a reality. *Adolesc Psychiatry* 15: 77–95.
- Fragoso, Y. D., Frota, E. R., Lopes, J. S., Noal, J. S., Giacomo, M. C., Gomes, S., Gonçalves, M. V., Gama, P. D. da und Finkelsztein, A. (2010). Severe Depression, Suicide Attempts, and Ideation During the Use of Interferon Beta by Patients With Multiple Sclerosis. *Clin Neuropharmacol* 33(6): 312–316.

- Frahm, T., Hauser, H. und Köster, M. (2006). IFN-type-I-mediated signaling is regulated by modulation of STAT2 nuclear export. *J Cell Sci* 119(Pt 6):1092–1104.
- Franceschetti, S., Taverna, S., Sancini, G., Panzica, F., Lombardi, R. und Avanzini, G. (2000). Protein kinase C-dependent modulation of Na⁺ currents increases the excitability of rat neocortical pyramidal neurones. *J Physiol* 528 Pt 2:291–304.
- Gasparini, S. (2011). Distance- and activity-dependent modulation of spike back-propagation in layer V pyramidal neurons of the medial entorhinal cortex. *J Neurophysiol* 105(3):1372–1379.
- George, M. S., Abbott, L. F. und Siegelbaum, S. A. (2009). HCN hyperpolarization-activated cation channels inhibit EPSPs by interactions with M-type K(+) channels. *Nat Neurosci* 12(5):577–584.
- Goldman, M. S., Golowasch, J., Marder, E. und Abbott, L. F. (2001). Global structure, robustness, and modulation of neuronal models. *J Neurosci* 21(14):5229–5238.
- Gong, L. W., Gao, T. M., Huang, H. und Tong, Z. (2001). Properties of large conductance calcium-activated potassium channels in pyramidal neurons from the hippocampal CA1 region of adult rats. *Jpn J Physiol* 51(6):725–731.
- Gough, D. J., Levy, D. E., Johnstone, R. W. und Clarke, C. J. (2008). IFN γ signaling—does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev* 19(5-6):383–394.
- Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H. und Storm, J. F. (2005). Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 566(Pt 3):689–715.
- Gu, N., Hu, H., Vervaeke, K. und Storm, J. F. (2008). SK (KCa2) channels do not control somatic excitability in CA1 pyramidal neurons but can be activated by dendritic excitatory synapses and regulate their impact. *J Neurophysiol* 100(5):2589–2604.
- Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., Tardivel, A., Mattmann, C., Förster, I., Farlik, M., Decker, T., Du Pasquier, R. A., Romero, P. und Tschopp, J. (2011). Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 34(2):213–223.
- Hadjilambreva, G., Mix, E., Rolfs, A., Müller, J. und Strauss, U. (2005). Neuromodulation by a cytokine: interferon-beta differentially augments neocortical neuronal activity and excitability. *J Neurophysiol* 93(2):843–852.
- Hart, B. L. (1988). Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 12(2):123–137.
- Hattox, A. M. und Nelson, S. B. (2007). Layer V neurons in mouse cortex projecting to different targets have distinct physiological properties. *J Neurophysiol* 98(6):3330–3340.
- Heremans, H., Billiau, A. und De Somer, P. (1980). Interferon in experimental viral infections in mice: tissue interferon levels resulting from the virus infection and from exogenous interferon therapy. *Infect Immun* 30(2):513–522.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I. und Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90(1):291–366.

- Hines, M. L. und Carnevale, N. T. (2000). Expanding NEURON's repertoire of mechanisms with NMODL. *Neural Comput* 12(5): 995.
- Honoré, E. (2007). The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci* 8(4): 251–261.
- Hu, H., Vervaeke, K. und Storm, J. F. (2002). Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 545(Pt 3): 783–805.
- Hu, H., Vervaeke, K. und Storm, J. F. (2007). M-channels (Kv7/KCNQ channels) that regulate synaptic integration, excitability, and spike pattern of CA1 pyramidal cells are located in the perisomatic region. *J Neurosci* 27(8): 1853–1867.
- Huang, Z., Lujan, R., Kadurin, I., Uebele, V. N., Renger, J. J., Dolphin, A. C. und Shah, M. M. (2011). Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat Neurosci* 14(4): 478–486.
- Hutcheon, B. und Yarom, Y. (2000). Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci* 23(5): 216–222.
- Hutcheon, B., Miura, R. M. und Pail, E. (1996a). Models of subthreshold membrane resonance in neocortical neurons. *J Neurophysiol* 76(2): 698–714.
- Hutcheon, B., Miura, R. M. und Pail, E. (1996b). Subthreshold membrane resonance in neocortical neurons. *J Neurophysiol* 76(2): 683–697.
- Isaacs, A. und Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147(927): 258–267.
- Jaitin, D. A., Roisman, L. C., Jaks, E., Gavutis, M., Piehler, J., Heyden, J. Van der, Uze, G. und Schreiber, G. (2006). Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN-beta. *Mol Cell Biol* 26(5): 1888–1897.
- Jaks, E., Gavutis, M., Uzé, G., Martal, J. und Piehler, J. (2007). Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J Mol Biol* 366(2): 525–539.
- Jensen, H. S., Grunnet, M. und Olesen, S. P. (2007). Inactivation as a new regulatory mechanism for neuronal Kv7 channels. *Biophys J* 92(8): 2747–2756.
- Johnston, D. und Narayanan, R. (2008). Active dendrites: colorful wings of the mysterious butterflies. *Trends Neurosci* 31(6): 309–316.
- Johnston, Daniel und Wu, Samuel Maio-Sin (1994). *Foundations of Cellular Neurophysiology*. MIT Press.
- Kamei, S., Oga, K., Matsuura, M., Tanaka, N., Kojima, T., Arakawa, Y., Matsukawa, Y., Mizutani, T., Sakai, T., Ohkubo, H., Matsumura, H., Moriyama, M. und Hirayanagi, K. (2005). Correlation between quantitative-EEG alterations and age in patients with interferon-alpha-treated hepatitis C. *J Clin Neurophysiol* 22(1): 49–52.
- Katsoulidis, E., Li, Y., Mears, H. und Plataniias, L. C. (2005). The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction. *J Interferon Cytokine Res* 25(12): 749–756.

- Kaur, S., Parmar, S., Smith, J., Katsoulidis, E., Li, Y., Sassano, A., Majchrzak, B., Uddin, S., Tallman, M. S., Fish, E. N. und Plataniias, L. C. (2005a). Role of protein kinase C-delta (PKC-delta) in the generation of the effects of IFN-alpha in chronic myelogenous leukemia cells. *Exp Hematol* 33(5): 550–557.
- Kaur, S., Uddin, S. und Plataniias, L. C. (2005b). The PI3' kinase pathway in interferon signaling. *J Interferon Cytokine Res* 25(12): 780–787.
- Kelly, A., Vereker, E., Nolan, Y., Brady, M., Barry, C., Loscher, C. E., Mills, K. H. und Lynch, M. A. (2003). Activation of p38 plays a pivotal role in the inhibitory effect of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta on long term potentiation in rat dentate gyrus. *J Biol Chem* 278(21): 19453–19462.
- Kemeny, M. E. (2003). The psychobiology of stress. 12(4): 124–129.
- Kent, S., Bluthé, R. M., Kelley, K. W. und Dantzer, R. (1992). Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 13(1): 24–28.
- Khorooshi, R. und Owens, T. (2010). Injury-induced type I IFN signaling regulates inflammatory responses in the central nervous system. *J Immunol* 185(2): 1258–1264.
- Kizub, I. V., Pavlova, O. O., Ivanova, I. V. und Soloviev, A. I. (2010). Protein kinase C-dependent inhibition of BK(Ca) current in rat aorta smooth muscle cells following gamma-irradiation. *Int J Radiat Biol* 86(4): 291–299.
- Kole, M. H. (2011). First node of ranvier facilitates high-frequency burst encoding. *Neuron* 71(4): 671–682.
- Kole, M. H., Hallermann, S. und Stuart, G. J. (2006). Single Ih channels in pyramidal neuron dendrites: properties, distribution, and impact on action potential output. *J Neurosci* 26(6): 1677–1687.
- Kole, M. H., Letzkus, J. J. und Stuart, G. J. (2007). Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron* 55(4): 633–647.
- Kole, M. H., Ilschner, S. U., Kampa, B. M., Williams, S. R., Ruben, P. C. und Stuart, G. J. (2008). Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci* 11(2): 178–186.
- Konsman, J. P., Parnet, P. und Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 25(3): 154–159.
- Krause, C. D., Mei, E., Xie, J., Jia, Y., Bopp, M. A., Hochstrasser, R. M. und Pestka, S. (2002). Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells. *Mol Cell Proteomics* 1(10): 805–815.
- Kullmann, D. M. und Waxman, S. G. (2010). Neurological channelopathies: new insights into disease mechanisms and ion channel function. *J Physiol* 588(Pt 11): 1823–1827.
- Lacinová, L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1: 1.
- Larkum, M. E., Nevian, T., Sandler, M., Polsky, A. und Schiller, J. (2009). Synaptic integration in tuft dendrites of layer 5 pyramidal neurons: a new unifying principle. *Science* 325(5941): 756–760.
- Larson, S. J. und Dunn, A. J. (2001). Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun* 15(4): 371–387.

- Lee, S. Y., Choi, H. K., Kim, S. T., Chung, S., Park, M. K., Cho, J. H., Ho, W. K. und Cho, H. (2010). Cholesterol inhibits M-type K⁺ channels via protein kinase C-dependent phosphorylation in sympathetic neurons. *J Biol Chem* 285(14):10939–10950.
- Lesage, F. und Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279(5):793–801.
- Lewis, A. S. und Chetkovich, D. M. (2011). HCN channels in behavior and neurological disease: too hyper or not active enough? *Mol Cell Neurosci* 46(2):357–367.
- Li, B., Chen, F., Ye, J., Chen, X., Yan, J., Li, Y., Xiong, Y., Zhou, Z., Xia, J. und Hu, Z. (2010). The modulation of orexin A on HCN currents of pyramidal neurons in mouse prelimbic cortex. *Cereb Cortex* 20(7):1756–1767.
- Li, L., Bischofberger, J. und Jonas, P. (2007). Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci* 27(49):13420–13429.
- Linden, D. R., Sharkey, K. A. und Mawe, G. M. (2003). Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. *J Physiol* 547(Pt 2):589–601.
- Lippiat, J. D. (2008). Whole-cell recording using the perforated patch clamp technique. *Methods Mol Biol* 491:141–149.
- Liu, Z., Bunney, E. B., Appel, S. B. und Brodie, M. S. (2003). Serotonin reduces the hyperpolarization-activated current (I_h) in ventral tegmental area dopamine neurons: involvement of 5-HT₂ receptors and protein kinase C. *J Neurophysiol* 90(5):3201–3212.
- Locke, R. E. und Nerbonne, J. M. (1997). Three kinetically distinct Ca²⁺-independent depolarization-activated K⁺ currents in callosal-projecting rat visual cortical neurons. *J Neurophysiol* 78(5):2309–2320.
- London, M. und Häusser, M. (2005). Dendritic computation. *Annu Rev Neurosci* 28:503–532.
- Lörincz, A., Notomi, T., Tamás, G., Shigemoto, R. und Nusser, Z. (2002). Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci* 5(11):1185–1193.
- Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K. R., Konnerth, A., Pape, H. C., Biel, M. und Hofmann, F. (2003). Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J* 22(2):216–224.
- Lyashchenko, A. K., Redd, K. J., Yang, J. und Tibbs, G. R. (2007). Propofol inhibits HCN1 pacemaker channels by selective association with the closed states of the membrane embedded channel core. *J Physiol* 583(Pt 1):37–56.
- Magee, J. C. (1998). Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 18(19):7613–7624.
- Magee, J. C. und Johnston, D. (2005). Plasticity of dendritic function. *Curr Opin Neurobiol* 15(3):334–342.

- Margrie, T. W., Brecht, M. und Sakmann, B. (2002). In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflugers Arch* 444(4): 491–498.
- Marques-Deak, A., Cizza, G. und Sternberg, E. (2005). Brain-immune interactions and disease susceptibility. *Mol Psychiatry* 10(3): 239–250.
- McAfoose, J. und Baune, B. T. (2009). Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci Biobehav Rev* 33(3): 355–366.
- Mendoza-Fernández, V., Andrew, R. D. und Barajas-López, C. (2000). Interferon-alpha inhibits long-term potentiation and unmasks a long-term depression in the rat hippocampus. *Brain Res* 885(1): 14–24.
- Meuth, S. G., Kanyshkova, T., Meuth, P., Landgraf, P., Munsch, T., Ludwig, A., Hofmann, F., Pape, H. C. und Budde, T. (2006). Membrane resting potential of thalamocortical relay neurons is shaped by the interaction among TASK3 and HCN2 channels. *J Neurophysiol* 96(3): 1517–1529.
- Migliore, M. und Shepherd, G. M. (2002). Emerging rules for the distributions of active dendritic conductances. *Nat Rev Neurosci* 3(5): 362–370.
- Migliore, M., Hoffman, D. A., Magee, J. C. und Johnston, D. (1999). Role of an A-type K⁺ conductance in the back-propagation of action potentials in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *J Comput Neurosci* 7(1): 5.
- Migliore, M., Messineo, L. und Ferrante, M. (2004). Dendritic I_h selectively blocks temporal summation of unsynchronized distal inputs in CA1 pyramidal neurons. *J Comput Neurosci* 16(1): 5.
- Mistrík, P., Pfeifer, A. und Biel, M. (2006). The enhancement of HCN channel instantaneous current facilitated by slow deactivation is regulated by intracellular chloride concentration. *Pflugers Arch* 452(6): 718–727.
- Moll, H. P., Maier, T., Zommer, A., Lavoie, T. und Brostjan, C. (2011). The differential activity of interferon- α subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. *Cytokine* 53(1): 52–59.
- Molnár, Z. und Cheung, A. F. (2006). Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci Res* 55(2): 105–115.
- Monroe, K. M., McWhirter, S. M. und Vance, R. E. (2010). Induction of type I interferons by bacteria. *Cell Microbiol* 12(7): 881–890.
- Müller, M., Fontana, A., Zbinden, G. und Gähwiler, B. H. (1993). Effects of interferons and hydrogen peroxide on CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res* 619(1-2): 157–162.
- Narayanan, R. und Johnston, D. (2008). The h channel mediates location dependence and plasticity of intrinsic phase response in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 28(22): 5846–5860.
- Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20(3): 389–399.
- Neher, E. und Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260(5554): 799–802.

- Nolan, M. F., Malleret, G., Lee, K. H., Gibbs, E., Dudman, J. T., Santoro, B., Yin, D., Thompson, R. F., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R. und Morozov, A. (2003). The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* 115(5): 551–564.
- Nolan, M. F., Malleret, G., Dudman, J. T., Buhl, D. L., Santoro, B., Gibbs, E., Vronskaya, S., Buzsáki, G., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R. und Morozov, A. (2004). A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* 119(5): 719–732.
- Notomi, T. und Shigemoto, R. (2004). Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 471(3): 241–276.
- Novick, D., Cohen, B. und Rubinstein, M. (1994). The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77(3): 391–400.
- Okada, K., Kuroda, E., Yoshida, Y., Yamashita, U., Suzumura, A. und Tsuji, S. (2005). Effects of interferon-beta on the cytokine production of astrocytes. *J Neuroimmunol* 159(1-2): 48–54.
- O’Neill, L. A. und Bowie, A. G. (2010). Sensing and signaling in antiviral innate immunity. *Curr Biol* 20(7): R328–R333.
- Otsuka, T. und Kawaguchi, Y. (2008). Firing-pattern-dependent specificity of cortical excitatory feed-forward subnetworks. *J Neurosci* 28(44): 11186–11195.
- Pape, H. C. (1996). Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58: 299–327.
- Patten Scott, B., Francis, Gordon, Metz Luanne, M., Lopez-bresnahan, Maria, Chang, Peter und Curtin, Francois (2005). The relationship between depression and interferon beta-1a therapy in patients with multiple sclerosis. 11(2): 175–181.
- Paul, S., Ricour, C., Sommereyns, C., Sorgeloos, F. und Michiels, T. (2007). Type I interferon response in the central nervous system. *Biochimie* 89(6-7): 770–778.
- Paxinos, George (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. San Diego: Academic Press.
- Pedarzani, P. und Stocker, M. (2008). Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol Life Sci* 65(20): 3196–3217.
- Pestka, S., Krause, C. D. und Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202: 8.
- Pian, P., Bucchi, A., Robinson, R. B. und Siegelbaum, S. A. (2006). Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP2. *J Gen Physiol* 128(5): 593–604.
- Pierani, A. und Wassef, M. (2009). Cerebral cortex development: From progenitors patterning to neocortical size during evolution. *Dev Growth Differ* 51(3): 325–342.
- Plata-Salamán, C. R. (1992). Interferons and central regulation of feeding. *Am J Physiol* 263(6 Pt 2): R1222–R1227.
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5(5): 375–386.

- Poolos, N. P., Bullis, J. B. und Roth, M. K. (2006). Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 26(30): 7995–8003.
- Potez, S. und Larkum, M. E. (2008). Effect of common anesthetics on dendritic properties in layer 5 neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 99(3): 1394–1407.
- Price, D. J., Kennedy, H., Dehay, C., Zhou, L., Mercier, M., Jossin, Y., Goffinet, A. M., Tissir, F., Blakey, D. und Molnár, Z. (2006). The development of cortical connections. *Eur J Neurosci* 23(4): 910–920.
- Prinz, M., Schmidt, H., Mildner, A., Knobloch, K. P., Hanisch, U. K., Raasch, J., Merkler, D., Detje, C., Gutcher, I., Mages, J., Lang, R., Martin, R., Gold, R., Becher, B., Brück, W. und Kalinke, U. (2008). Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 28(5): 675–686.
- Puil, E., Gimbarzevsky, B. und Miura, R. M. (1986). Quantification of membrane properties of trigeminal root ganglion neurons in guinea pigs. *J Neurophysiol* 55(5): 995.
- Randall, R. E. und Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89(Pt 1): 1.
- Rangel, A., Sánchez-Armass, S. und Meza, U. (2010). Protein kinase C-mediated inhibition of recombinant T-type Cav3.2 channels by neurokinin 1 receptors. *Mol Pharmacol* 77(2): 202–210.
- Redig, A. J., Sassano, A., Majchrzak-Kita, B., Katsoulidis, E., Liu, H., Altman, J. K., Fish, E. N., Wickrema, A. und Plataniias, L. C. (2009). Activation of protein kinase C $\{\eta\}$ by type I interferons. *J Biol Chem* 284(16): 10301–10314.
- Reyes-Vazquez, C., Prieto-Gomez, B. und Dafny, N. (1982). Novel effects of interferon on the brain: microiontophoretic application and single cell recording in the rat. *Neurosci Lett* 34(2): 201–206.
- Richardson, M. J., Brunel, N. und Hakim, V. (2003). From subthreshold to firing-rate resonance. *J Neurophysiol* 89(5): 2538–2554.
- Rohatiner, A. Z., Prior, P., Burton, A., Balkwill, F. und Lister, T. A. (1985). Central nervous system toxicity of interferon. *Prog Exp Tumor Res* 29: 197–202.
- Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G. P., Tibbs, G. R. und Siegelbaum, S. A. (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* 20(14): 5264–5275.
- Sarmiere, P. D., Weigle, C. M. und Tamkun, M. M. (2008). The Kv2.1 K⁺ channel targets to the axon initial segment of hippocampal and cortical neurons in culture and in situ. *BMC Neurosci* 9: 1.
- Sas, A. R., Bimonte-Nelson, H., Smothers, C. T., Woodward, J. und Tyor, W. R. (2009). Interferon-alpha causes neuronal dysfunction in encephalitis. *J Neurosci* 29(12): 3948–3955.

- Savarin, C. und Bergmann, C. C. (2008). Neuroimmunology of central nervous system viral infections: the cells, molecules and mechanisms involved. *Curr Opin Pharmacol* 8(4): 472–479.
- Schaefer, A. T., Helmstaedter, M., Schmitt, A. C., Bar-Yehuda, D., Almog, M., Ben-Porat, H., Sakmann, B. und Korngreen, A. (2007). Dendritic voltage-gated K⁺ conductance gradient in pyramidal neurones of neocortical layer 5B from rats. *J Physiol* 579(Pt 3): 737–752.
- Schaefer, M., Schwaiger, M., Pich, M., Lieb, K. und Heinz, A. (2003). Neurotransmitter changes by interferon-alpha and therapeutic implications. *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 3: 203–206.
- Schiepers, O. J., Wichers, M. C. und Maes, M. (2005). Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(2): 201–217.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. und Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75(2): 163–189.
- Schubert, D., Kötter, R. und Staiger, J. F. (2007). Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits. *Brain Struct Funct* 212(2): 107–119.
- Segall, M. A. und Crnic, L. S. (1990). An animal model for the behavioral effects of interferon. *Behav Neurosci* 104(4): 612–618.
- Seo, J. Y., Kim, D. Y., Lee, Y. S. und Ro, J. Y. (2009). Cytokine production through PKC/p38 signaling pathways, not through JAK/STAT1 pathway, in mast cells stimulated with IFNgamma. *Cytokine* 46(1): 51–60.
- Shah, M. M., Mistry, M., Marsh, S. J., Brown, D. A. und Delmas, P. (2002). Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 544(Pt 1): 29–37.
- Shah, M. M., Migliore, M., Valencia, I., Cooper, E. C. und Brown, D. A. (2008). Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22): 7869–7874.
- Sherman, S. (2005). Thalamic relays and cortical functioning. 149: 107–126.
- Silva, A. J. da, Brickelmaier, M., Majeau, G. R., Lukashin, A. V., Peyman, J., Whitty, A. und Hochman, P. S. (2002). Comparison of gene expression patterns induced by treatment of human umbilical vein endothelial cells with IFN-alpha 2b vs. IFN-beta 1a: understanding the functional relationship between distinct type I interferons that act through a common receptor. *J Interferon Cytokine Res* 22(2): 173–188.
- Smedley, H., Katrak, M., Sikora, K. und Wheeler, T. (1983). Neurological effects of recombinant human interferon. *Br Med J (Clin Res Ed)* 286(6361): 262–264.
- Smith, A., Tyrrell, D., Coyle, K. und Higgins, P. (1988). Effects of interferon alpha on performance in man: a preliminary report. *Psychopharmacology (Berl)* 96(3): 414–416.
- Smith, A., Thomas, M., Kent, J. und Nicholson, K. (1998). Effects of the common cold on mood and performance. *Psychoneuroendocrinology* 23(7): 733–739.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9(3): 206–221.

- Srivastava, K. K., Batra, S., Sassano, A., Li, Y., Majchrzak, B., Kiyokawa, H., Altman, A., Fish, E. N. und Plataniias, L. C. (2004). Engagement of protein kinase C-theta in interferon signaling in T-cells. *J Biol Chem* 279(29):29911–29920.
- Stadler, K., Bierwirth, C., Schuchmann, S., Bettefeld, A., Mix, E., Bräuer, A. U., Velmans, T., Nitsch, R., Kole, M. H. P. und Strauss, U. (in Rev.). Type I IFN inhibition of h-channels modulates cortical excitability.
- Stark, G. R. (2007). How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. *Cytokine Growth Factor Rev* 18(5-6):419–423.
- Strauss, U., Kole, M. H., Bräuer, A. U., Pahnke, J., Bajorat, R., Rolfs, A., Nitsch, R. und Deisz, R. A. (2004). An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci* 19(11):3048–3058.
- Stuart, G. und Spruston, N. (1998). Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J Neurosci* 18(10):3501–3510.
- Stuart, G., Schiller, J. und Sakmann, B. (1997). Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 505 (Pt 3):617–632.
- Stuart, G. J. und Sakmann, B. (1994). Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367(6458):69–72.
- Stubblefield Park, S. R., Widness, M., Levine, A. D. und Patterson, C. E. (2011). T cell-, interleukin-12-, and gamma interferon-driven viral clearance in measles virus-infected brain tissue. *J Virol* 85(7):3664–3676.
- Südhof, T. C. und Malenka, R. C. (2008). Understanding synapses: past, present, and future. *Neuron* 60(3):469–476.
- Surges, R., Freiman, T. M. und Feuerstein, T. J. (2004). Input resistance is voltage dependent due to activation of Ih channels in rat CA1 pyramidal cells. *J Neurosci Res* 76(4):475–480.
- Takaoka, A. und Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 8(6):907–922.
- Takeuchi, O. und Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* 227(1):75–86.
- Talley, E. M., Cribbs, L. L., Lee, J. H., Daud, A., Perez-Reyes, E. und Bayliss, D. A. (1999). Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19(6):1895–1911.
- Talley, E. M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D. und Bayliss, D. A. (2001). Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 21(19):7491–7505.
- Tayal, V. und Kalra, B. S. (2008). Cytokines and anti-cytokines as therapeutics—an update. *Eur J Pharmacol* 579(1-3):1.
- Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B. und Kono, D. H. (2005). Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23:307–336.
- Thomson, A. M. und Lamy, C. (2007). Functional maps of neocortical local circuitry. *Front Neurosci* 1(1):19–42.

- Tsay, D., Dudman, J. T. und Siegelbaum, S. A. (2007). HCN1 channels constrain synaptically evoked Ca²⁺ spikes in distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 56(6): 1076–1089.
- Uddin, S., Sassano, A., Deb, D. K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A. B., Fish, E. N. und Platanius, L. C. (2002). Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *J Biol Chem* 277(17): 14408–14416.
- Ulens, C. und Tytgat, J. (2001). Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem* 276(9): 6069–6072.
- Ulrich, D. (2002). Dendritic resonance in rat neocortical pyramidal cells. *J Neurophysiol* 87(6): 2753–2759.
- VanRullen, R., Guyonneau, R. und Thorpe, S. J. (2005). Spike times make sense. *Trends Neurosci* 28(1): 1–4.
- Vitkovic, L., Bockaert, J. und Jacque, C. (2000). “Inflammatory” cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74(2): 457–471.
- Wahl-Schott, C. und Biel, M. (2009). HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci* 66(3): 470–494.
- Wang, J., Campbell, I. L. und Zhang, H. (2008). Systemic interferon-alpha regulates interferon-stimulated genes in the central nervous system. *Mol Psychiatry* 13(3): 293–301.
- Wang, J., Dunn, A. J., Roberts, A. J. und Zhang, H. (2009). Decreased immobility in swimming test by homologous interferon-alpha in mice accompanied with increased cerebral tryptophan level and serotonin turnover. *Neurosci Lett* 452(2): 96.
- Waters, J., Schaefer, A. und Sakmann, B. (2005). Backpropagating action potentials in neurones: measurement, mechanisms and potential functions. *Prog Biophys Mol Biol* 87(1): 145–170.
- Womack, M. D. und Khodakhah, K. (2002). Characterization of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in cerebellar Purkinje neurons. *Eur J Neurosci* 16(7): 1214–1222.
- Xue, T., Marbán, E. und Li, R. A. (2002). Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization. *Circ Res* 90(12): 1267–1273.
- Yu, F. H. und Catterall, W. A. (2004). The VGL-channome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE* 2004(253): 1.
- Yuan, L. L. und Chen, X. (2006). Diversity of potassium channels in neuronal dendrites. *Prog Neurobiol* 78(6): 374–389.
- Yue, C. und Yaari, Y. (2004). KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24(19): 4614–4624.
- Zephir, Hélène, De Seze, Jérôme, Stojkovic, Tanya, Delisse, Brigitte, Ferriby, Didier, Cabaret, Marilyn und Vermersch, Patrick (2003). Multiple sclerosis and depression: influence of interferon β therapy. 9(3): 284–288.

- Zhao, K. W., Li, D., Zhao, Q., Huang, Y., Silverman, R. H., Sims, P. J. und Chen, G. Q. (2005). Interferon-alpha-induced expression of phospholipid scramblase 1 through STAT1 requires the sequential activation of protein kinase Cdelta and JNK. *J Biol Chem* 280(52): 42707–42714.
- Zheng, M., Wang, Y., Kang, L., Shimaoka, T., Marni, F. und Ono, K. (2010). Intracellular Ca(2+)- and PKC-dependent upregulation of T-type Ca(2+) channels in LPC-stimulated cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 48(1): 131–139.
- Zhou, X., Wei, J., Song, M., Francis, K. und Yu, S. P. (2011). Novel role of KCNQ2/3 channels in regulating neuronal cell viability. *Cell Death Differ* 18(3): 493–505.
- Zhou, X. B., Wulfsen, I., Utku, E., Sausbier, U., Sausbier, M., Wieland, T., Ruth, P. und Korth, M. (2010). Dual role of protein kinase C on BK channel regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(17): 8005–8010.
- Zhu, J. J. (2000). Maturation of layer 5 neocortical pyramidal neurons: amplifying salient layer 1 and layer 4 inputs by Ca²⁺ action potentials in adult rat tuft dendrites. *J Physiol* 526 Pt 3: 571–587.
- Ziemssen, T. und Kern, S. (2007). Psychoneuroimmunology—cross-talk between the immune and nervous systems. *J Neurol* 254 Suppl 2: II8–II1.

A Abkürzungen und englisches Fachvokabular

- Abb. ... Abbildung
abh. ... abhängig
ACSF ... artifizielle-cerebro-spinal-Flüssigkeit
AD ... Analog-Digital
AMPA ... α -amino- β -hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, Neurotransmitter
AP ... Aktionspotential
ATP ... Adenosintriphosphat
backpropagation ... retrograde Leitung eines somatischen APs in den Dendriten
BK ... großer (*big*) kalziumabhängiger Kaliumkanal
C ... Zellkapazität
C ... Programmiersprache
CA1 ... Cornu Ammonis Region 1
cAMP ... cyclisches Adenosinmonophosphat
cell attached ... Messkonfiguration der *patch clamp* Methode mit auf der intakten Membran aufgesetzten Pipette
CNBD ... *cyclic nucleotide-binding domain*, Bindungsstelle für cAMP an den HCN Kanälen
current clamp ... Messmethode des *patch clamp*, bei der der Eingangstrom in das Neuron kontrolliert wird, während die Spannungsantwort aufgezeichnet wird
DA ... Digital-Analog
DCS ... *divalent cation solution*
DIV ... *days in vitro*; Tage in Kultur
DNS ... Desoxyribonukleinsäure
EEG ... Elektroenzephalografie
EPSP ... Exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERK ... Extrazellulärsignal regulierte Kinase
f ... Frequenz
 f_{Res} ... Resonanzfrequenz
FFT ... *Fast Fourier Transform*: Algorithmus zur effizienten Transformation eines zeitdiskreten periodischen Signals in den Frequenzbereich
gain ... Steigung des linearen Fits der AP-Frequenz/Strom Kurve
 \hat{g}_{BK} ... maximale Leitfähigkeit des BK Kanals
 \hat{g} ... maximale Leitfähigkeit eines bestimmten Kanals
 \hat{g}_{h} ... maximale Leitfähigkeit des HCN Kanals
 g_{leak} ... Leitfähigkeit der passiven Kanäle
giga seal ... hochohmige Verbindung zwischen der Zellmembran und der Messpipette im *patch clamp*
HBW ... halbe Bandbreite des Frequenzverhaltens
HCN ... *hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated* Ionenkanal; durch Hyperpolarisation aktivierter cyklo-nukleotid-regulierter Kationenkanal

HEK293 ... *Human Embryonic Kidney*, menschliche embryonale Nierenzelllinie
hotspots ... Areale auf einem Neuron mit vergleichsweise hoher Dichte eines bestimmten Ionenkanaltyps
HVA ... *high voltage activated*; Kalziumkanäle die erst bei relativ starken Depolarisationen aktivieren.
 I ... Strom
 I_{BK} ... Strom durch den BK Kanal
 I_p ... Maximalwert eines bestimmten Stromes, (*peak*)
 I_h ... Strom, der durch die Öffnung der HCN Kanäle entsteht
 I_m ... M - Typ Kaliumkanalstrom
 I_{leak} ... Leckstrom, Ionenkanalstrom durch passive Kanäle sowie durch den *giga seal*
IFNAR ... IFN- α/β -Rezeptor
IFNAR1/2 ... IFNAR Aminosäurenkette 1 und 2
IFNGR ... IFN- γ Rezeptor
IFNGR1/2 ... IFNGR Aminosäurenkette 1 und 2
IL ... Interleukin
 I_{nap} ... persistierender Natriumkanalstrom
IRF-9 ... Interferon Regulations Faktor 9
ISG ... Interferon stimulierte Gene
ISGF3 ... Interferon stimulierte Gen Faktor 3
ISRE ... IFN-stimuliertes *response* Element
JaK ... Janus Kinase
 k ... Steigung der Aktivierungskurve
Kir ... *inward rectifier* (einwärts gleichrichtende) K^+ Kanäle
knock out ... vollständige Abschaltung eines Gens im Genom eines Organismus
Layer ... Schicht (hier innerhalb des Cortex)
Leak subtracted ... Methode zur Bestimmung des I_h , (siehe 2.6.1.2 auf Seite 40)
liquid junction ... Grenzschichtpotential, hervorgerufen durch die unterschiedliche Ionen-zusammensetzung von intra- und extrazellulärer Lösung
littermate ... Nachkommen eines Wurfes, speziell aus einer Verpaarung heterozygoter Tiere, wobei dann in einem Wurf sowohl $+/+$ als auch $-/-$ Tiere vorhanden sind
LTD ... *long term depression*: Langzeit-Depression, eine dauerhafte Abschwächung der Signalübertragung an den Synapsen von Nervenzellen
LTP ... *long term potentiation*: Langzeit-Potenzierung, eine dauerhafte Verstärkung der Signalübertragung zwischen Nervenzellen
LVA ... *low voltage activated*; Kalziumkanäle, die bereits bei geringer Depolarisationen aktivieren
MAPK ... Mitogen-aktivierte Protein Kinasen
mIFN ... Interferon der Maus
 n ... Anzahl der Experimente innerhalb eines Experimentsatzes
NMDA ... *N-methyl D-aspartate*, Neurotransmitter
NMODL ... NEURON *Model Description Language*, Programmiersprache zur Implementierung neuer Kanalmodelle in NEURON

- offset* ... Von Null unterschiedliche Ausgangsspannung bei einer Eingangsspannung von 0 mV bei einer Verstärkerschaltung
- P ... postnataler Tag
- p38 ... p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
- patch clamp* ... Methode zur Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Zellen. Dabei wird eine Glaskapillare auf die Zellmembran aufgesetzt, die mit diesereine gegenüber der Umgebung hochohmig isolierte (*giga seal*) Verbindung eingeht.
- P - Domäne ... porenformende Region eines Kaliumkanals
- perforated patch* ... Konfiguration der *patch clamp* Methode, bei der das Membranstück unter der Messpipette kleinräumig perforiert wird
- PI3K ... Phosphoinositid-3-Kinasen
- PIP2 ... Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
- PKC ... Proteinkinase C
- PLC ... Phosphoinositid-Phospholipase C
- Q ... Stärke der Resonanz
- rHCN1/2 ... HCN1 und 2 Kanäle von *Rattus norvegicus*
- rIFN ... Interferon der Ratte
- Rheobase ... Schwellenstromintensität bei der ein Aktionspotential ausgelöst wird
- R_{in} ... Eingangswiderstand, Summe aus R_m und R_s
- R_m ... Membranwiderstand
- RNS ... Ribonukleinsäure
- R_s ... seriellen Widerstandes, Summe der Widerstände zwischen der Messelektrode und dem Zellinneren
- run down* ... kontinuierlichen Abnahme einer Stromamplitude im Laufe eines Experiments, wahrscheinlich durch Auswaschen notwendiger Cytosolbestandteile oder Internalisierung der zugrundeliegenden Ionenkanäle verursacht
- sACSF ... artifizielle-cerebro-spinal-Flüssigkeit mit erhöhter Sucrose
- sickness behaviour* ... angepasste Verhaltensänderungen eines Organismus als Antwort auf eine Infektion
- SK ... kleiner (*small*) kalziumabhängiger Kaliumkanal
- space clamp* ... Unzureichende Strom- oder Spannungskontrolle des gesamten Neurons aufgrund dessen räumlicher Ausdehnung
- spines* ... dornenartige Strukturen an Dendriten, an denen sich exzitatorische, glutamaterge Synapsen befinden
- STAT ... *signal transducer and activator of transcription*, Bestandteil des JAK/STAT Interferonsignalweges
- steady state* ... stabiler Zustand nach einem Spannungs-, Strom- oder Aktivierungszustandswechsel, überschlagsweise wird dieser nach 5τ erreicht
- subthreshold* ... Spannungs- und Stromänderungen eines Neurons, die nicht (direkt) zur Generierung eines Aktionspotentials führen
- tail current* ... Strom, der aufgrund einer langsamen Kinetik kurzzeitig nach Wechsel auf einen geringeren Aktivierungszustand eines Kanals fließt.
- TFN- α ... Tumornekrosefaktor- α

- TMD ... Transmembrane Domäne, Teil eines Proteins, der durch die Plasmamembran reicht
- tuft region* ... distaler Teil des Dendritenbaumes, der sich in viele kleine Dendritenstücke aufsplittet.
- TyK ... Tyrosin Kinase
- U ... Spannung
- U_h ... halbe Aktivierungsspannung, d. h. Spannung, bei der der Anteil der offenen Kanäle 0,5 beträgt
- $U \text{ ml}^{-1}$... Internationale Einheiten pro Milliliter
- U_{rev} ... Umkehrpotential eines Ionenstromes (*reversal potential*)
- voltage clamp* ... Messmethode des *patch clamp*, bei der die Spannung kontrolliert wird, während die Stromantwort aufgezeichnet wird
- whole cell* ... Konfiguration der *patch clamp* Methode, bei der das Membranstück unter der Messpipette aufgerissen wird und somit ein direkter elektrischer Kontakt zwischen Messverstärker und Zellinneren entsteht
- Z ... Scheinwiderstand
- \underline{Z} ... Impedanz
- Z_0 ... Scheinwiderstand bei $f = 0$ (= Impedanz = Eingangswiderstand)
- ZNS ... Zentralnervensystem
- Z_{Res} ... Scheinwiderstand bei Resonanz
- ϕ ... Phasenwinkel der Impedanz
- Φ_0 ... Nulldurchgang des Phasenwinkels
- τ ... Zeitkonstante einer Kinetik

B Abbildungsverzeichnis

1.1	Überblick über die Typ I und Typ II Interferonsignalkaskaden.	6
2.1	Einbindung des SinGenerators in den Messaufbau	37
3.1	IFN- β reduziert I_h	47
3.2	IFN- β reduziert I_h in allen untersuchten Neuronen bei gleichbleibender U_h . 48	
3.3	IFN- β verlangsamt die I_h Aktivierung	49
3.4	IFN- β hat keinen Einfluss auf den Leckstrom	51
3.5	IFN- α moduliert I_h	52
3.6	IFN- γ moduliert I_h	54
3.7	IFN- β zeigt keinen Einfluss auf in HEK293 Zellen exprimierte HCN Kanäle 55	
3.8	IFN- β moduliert I_h in primär kultivierten, corticalen Neuronen	57
3.9	Simulationsergebnis zweier möglicher IFN- β HCN Subtyp Interaktionen . 60	
3.10	HCN-Subtypspezifische mIFN- β Interaktion	62
3.11	Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials nach IFN- β	63
3.12	Simulierte Auswirkung einer Verminderung des I_h auf das neuronale Resonanzverhalten	64
3.13	IFN- β vermindert die Resonanzfrequenz und erhöht die Impedanz	65
3.14	IFN- β verändert das neuronale Feuerverhalten in Layer V Pyramidenneuronen	67
3.15	Öffnungswahrscheinlichkeit des modellierten BK Kanals	71
3.16	<i>In silico</i> Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Ionenkanalmodulationen auf das neuronale Feuerverhalten	74
3.17	IFN- β reduziert den M - Typ Kaliumstrom	75
4.1	PKC Aktivierung im Typ I als auch Typ II Interferonsignalweg	85

C Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Blocker	27
2.2	Extrazelluläre Lösungen	28
2.3	Parameter der Resonanzsimulation	32
2.4	Passive Parameter des NEURON Modells	33
2.5	Statistische Verfahren und Parameter	43
3.1	Parameter der HCN Modelle	59
3.2	Parameter des BK Modells	70
3.3	Aktive Kanäle des erweiterten Modells	72

D Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

E Selbstständigkeitserklärung

Bescheinigung

gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 04.09.2007
des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

Hierdurch versichere ich,

dass ich meine Dissertation mit dem Titel

*Ionenkanalmodulation durch Interferon in Layer V Pyramidenneuronen des
somatosensorischen Cortex*

Mechanismen und funktionelle Konsequenz

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe;

dass ich meine Dissertation, im Falle der Ablehnung, nur unter Hinweis auf diese Ablehnung für ein anderes Examen verwenden werde.

Berlin, den _____

Konstantin Stadler