

# Die Protein Kinase C als Bindeglied von Ionenkanalmodulation und Interferon Signalweg

- über den Protein Kinase C vermittelten Einfluss auf die überschwellige  
Erregbarkeit und den hyperpolarisationsaktivierten unselektiven  
Kationenstrom ( $I_h$ ) -

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  
**Olivia Reetz**  
aus Potsdam  
2015

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde an der

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

im Bearbeitungszeitraum vom 01.06.2011 – 03.03.2015

unter der Leitung von PD Dr. Ulf Strauß  
angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Ulf Strauß
2. Gutachter: Prof. Constance Scharff, Ph.D.

Disputation am: 01.07.15

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	iv
Abstract.....	vi
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
Das neocortikale Pyramidenneuron der Schicht 5.....	1
Ionenkanäle im neocortikalen Pyramidenneuron der Schicht 5 .....	2
Typ I Interferon als Modulator von Ionenkanälen.....	5
Hypothesen .....	9
<b>2. Ergebnisse.....</b>	<b>10</b>
Typ I Interferon hemmt den HCN1 vermittelten $I_h$ und verlangsamt die neuronale Oszillation.....	10
Eine PKC Aktivierung hemmt HCN1 medierte Ströme im Zellkulturmodell.....	24
Die Interferon- $\beta$ induzierte Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit ist PKC vermittelt.....	36
<b>3. Diskussion .....</b>	<b>52</b>
Die Typ I Interferon vermittelte Erhöhung der unter-schwel-ligen Erregbarkeit ist an HCN Kanal Veränderungen gebunden.....	52
Der Typ I Interferonrezeptorsignalweg vermittelt $I_h$ Modulationen .....	53
Die Erhöhung der überschwelligen Erregbarkeit ist an multiple Kanäle gebunden .....	54
Typ I Interferon-induzierte Kanalmodulationen sind PKC vermittelt.....	55
Ausblick .....	58
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>67</b>
Abkürzungsverzeichnis und <i>engl. Fachvokabular</i> .....	67
Abbildungsverzeichnis.....	68
Publikationsliste mit Stellungnahme zur erbrachten Einzelleistung .....	69
Lebenslauf .....	70
Danksagung .....	71
Eidesstaatliche Erklärung.....	72

## Zusammenfassung

Das Immun- und Nervensystem stehen in gegenseitiger Kommunikation. So wurde schon früh ein Zusammenhang zwischen Stress und einem geschwächten Immunsystem gefunden. Dass dieser Weg auch in entgegen gesetzter Richtung möglich ist, also die Beeinflussung des Nervensystems durch das Immunsystem, wurde bereits für Interleukine, die zur Gruppe der Cytokine gehören, gezeigt.

Das, in meinem Fokus stehende, Typ I Interferon (IFN) gehört zur Gruppe der Cytokine und besitzt immunmodulatorische und antivirale Eigenschaften. Typ I IFN aktiviert über seinen Rezeptor verschiedene Signalwege, die in den klassischen Signalweg und in alternative Signalwege unterteilt werden. Da Typ I IFN auch direkt von Neuronen gebildet wird, lag die Vermutung nah, dass es neuromodulatorische Eigenschaften besitzt. Die Hinweise auf eine Typ I IFN induzierte Beeinflussung des hyperpolarisationsaktivierten unselektiven Kationenstroms ( $I_h$ ) und dessen Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit, stellten die Basis meiner Arbeit dar.

Der  $I_h$  ist beim Ruhemembranpotential (RMP) von Neuronen partiell aktiviert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle neuronaler Informationsverarbeitung. Aufgrund seiner Eigenschaften gilt er als einer der bestimmenden Faktoren der neuronalen Erregbarkeit.

$I_h$  wird über hyperpolarisationsaktivierte, von cyclischen Nukleotiden modulierte (HCN)-Kanäle geleitet. Diese werden von vier Untereinheiten (HCN1-4) gebildet und liegen als Homo- oder Heterotetramere im Gehirn vor. In den verschiedenen Arealen des Gehirns ist ihre Expression unterschiedlich stark ausgeprägt. In den von uns untersuchten neocortikalen Pyramidenzellen der Schicht 5 wird der  $I_h$  durch die Untereinheiten HCN1 und HCN2 vermittelt. HCN Kanäle werden durch verschiedene Modulatoren beeinflusst. Im Fokus meiner Arbeit steht seine Modulation durch Protein Kinase C (PKC), die auch bei alternativen Typ I IFN-Rezeptorsignalwegen eine Rolle spielt.

Die Arbeit klärt die Modulation der unter- und überschwellig neuronalen Erregbarkeit durch das Typ I IFN IFN- $\beta$  und PKC. PKC dient hypothetisch als Bindeglied zwischen IFN-Signalweg und multiplen neuronalen Ionenkanälen. Mein Fokus liegt auf den im Neocortex  $I_h$  medierenden HCN Kanälen.

Unsere Befunde basieren auf elektrophysiologischen *ex vivo* Messungen an neocortikalen Pyramidenzellen der Schicht 5 in Hirnschnitten von Maus- bzw. Ratten im *whole cell* Modus oder *in vitro* im Kulturmodell an Säugerzellen im *whole cell* und *cell attached* Modus mittels pharmakologischer Aktivierung oder Inhibition der neuronalen Typ I IFN Effekte. Zusätzlich nahmen wir *in vivo* Virusinfektionen vor oder analysierten das Maus- bzw. Rattengehirn elektroenzephalografische (EEG) nach direkter IFN- $\beta$  Applikation. Alle Messungen erfolgten bei Typ I IFN Konzentrationen mit pathophysiologischer Relevanz. Die Wirkung verschiedener einzelner und kombinierter Ionenkanalmodulationen überprüften wir anhand eines *in silico* Computermodells. Des Weiteren untersuchten wir mittels Western blot und Immunohistochemie das Vorhandensein des Typ I IFN Rezeptors und die Aktivierung einiger seiner Signalwegsbestandteile.

So konnten wir zeigen, dass Typ I IFN sowohl über eine virale Infektion als auch über die direkte Applikation den  $I_h$  reduziert und dass der Typ I IFN Effekt auf den  $I_h$  HCN1 spezifisch ist. Voraussetzung dafür ist ein intakter Typ I IFN-Rezeptorsignalweg. Für alternative Typ I IFN-Rezeptorsignalwege spielt PKC eine wichtige Rolle.

Für PKC konnte von uns gezeigt werden, dass sie den HCN1 Kanal moduliert. Im Kulturmodell ist für den PKC mediierten Effekt auf den HCN1 Kanal eine intakte intrazelluläre Umgebung notwendig. Dabei wird der  $I_h$  durch die Aktivierung von PKC auf 60-70 % reduziert, wohingegen die vorherige Inhibition von PKC eine solche Reduktion verhindert. Nahezu gleiche Effektgrößen bei unterschiedlichen Säugerzellen-Kulturmodellen machen eine Speziespezifität unwahrscheinlich.

Eine Beeinflussbarkeit durch PKC ist den im *in silico* Modell modulierten Strömen gemein, die für die Nachahmung des *ex vivo* IFN Effekts auf die neuronale Erregbarkeit notwendig waren. Wodurch wir PKC als Verbindung zwischen Typ I IFN Signalkaskade und Ionenkanalmodulation schlussfolgern. In gleicher Weise verursachte eine PKC Aktivierung oder eine IFN- $\beta$  Applikation in neocortikalen Pyramidenzellen der Schicht 5 eine Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit. Dabei blieb jeweils die Aktionspotentialschwelle unverändert. Zusätzlich beobachteten wir eine reduzierte Nachhyperpolarisation (AHP) nach PKC Aktivierung wie auch nach Applikation von IFN- $\beta$ . Übereinstimmend mit unseren Erkenntnissen reduziert eine IFN- $\beta$  Applikation den M-Typ Kalium Strom ( $I_M$ ), der an der AHP beteiligt ist. Eine vorherige Inhibierung der PKC verhinderte die Wirkung von IFN- $\beta$  auf die Erregbarkeit.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse, dass IFN- $\beta$  unter pathophysiologischen Bedingungen als Neuromodulator wirkt und zeigen erstmals dass diese Funktion durch PKC vermittelt wird. Dabei haben wir gezeigt, dass multiple Ionenkanäle, wie der HCN1 oder M-Typ Kalium Kanal, ihrer Wirkung unterliegen. Für die Vermittlung des Typ I IFN Effekts ist die PKC Aktivierung hinreichend und notwendig. Dadurch werden die Typ I IFN Signalkaskade und die Ionenkanäle miteinander verbunden. Daher sehen wir die Aktivierung von PKC als einheitlichen Mechanismus für das neuromodulatorische Potential von Typ I IFN in neocortikalen Neuronen an. Dadurch ist der Grundstein für eine Regulation neuronaler Antworten während einer Entzündung des zentralen Nervensystems gelegt. IFN- $\beta$  konnte ebenfalls im gesunden ZNS nachgewiesen werden, was für IFN- $\beta$  auch eine Rolle in der physiologischen Neuromodulation impliziert. Somit könnte die Neuromodulation durch IFN- $\beta$  neben ihrer pathophysiologischen Relevanz auch unter physiologischen Bedingungen von großer Wichtigkeit sein.

## Abstract

The immune and nervous system appear to communicate with each other. Early research uncovered that nervous structures influence the immune system, i. e. stress weakens the immune system. Further the immune system affects the nervous system for instance via interleukins, a class of cytokines.

Here I focused on the cytokine type I Interferon (IFN) that has immunomodulatory and antiviral properties. It activates via its receptor different signal pathways, which were separated in the classical pathway and several alternative pathways. Because type I IFN is also directly produced by neurons, we assume additional neuromodulatory properties. Implications of a type I IFN induced influence on hyperpolarization-activated nonselective cation current ( $I_h$ ) and its influence on neuronal excitability were the basis of my work.

$I_h$  is partially activated at resting membrane potential (RMP) of neurons and has an important role in the control of neuronal information processing. Because of its properties it is considered as one of the determinants of neuronal excitability.

$I_h$  is mediated by hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels, which are formed by 4 subunits (HCN1-4) and assembled as homo- or heterotetrameric complexes. Their expression pattern differs depending on the brain area. In neocortical layer 5 pyramidal neurons, which we used for our studies,  $I_h$  is mediated by HCN1 and HCN2 subunits. Different modulators influence the properties of HCN channels. I focused on its modulation via protein kinase C (PKC) that plays an important role in alternative IFN signaling pathways.

This work clarifies the type I IFN, IFN- $\beta$  and PKC mediated modulations of the sub- and suprathreshold neuronal excitability. Hypothetically, PKC links IFN signaling pathway and multiple neuronal ion channels. I focused on the  $I_h$  mediating HCN channels in the neocortex.

Our findings are based on electrophysiological *ex vivo* whole cell recordings in neocortical layer 5 pyramidal neurons of mouse and rat brain as well as *in vitro* whole cell and cell attached recordings in mammalian cell culture systems with pharmacological activation or inhibition of the neuronal IFN effects. Additionally we elevated intracerebral type I IFNs by *in vivo* virus infection or analyzed mouse and rat brains activity via electroencephalography (EEG) after direct IFN application. We performed all measurements with pathophysiological relevant IFN concentrations. We tested the effect of different single and combined ion channel modulations in an *in silico* computer model. Furthermore we analyzed the presence of type I IFN receptors in neocortical layer 5 pyramidal neurons via immunohistochemistry and the activation of some components of its pathway via Western blotting.

Therewith we could show that type I IFN reduced the  $I_h$  after virus infection and after a direct type I IFN application and that this type I IFN effect is HCN1 specific. Type I IFN effects depend on an intact type I IFN receptor signaling pathway. For alternative type I IFN receptor signaling pathways PKC plays an important role.

Our findings demonstrate that PKC modulates HCN1 channels. For PKC mediated effects on HCN1 channels an intact intracellular environment of the cultured cells is necessary. PKC

activation reduced  $I_h$  to 60-70 %, whereas a prior inhibition of the PKC prevents the PKC dependent  $I_h$  reduction. Because of similar magnitude of effects in different mammalian cell systems species specificity is unlikely.

All currents necessary for mimicking the *ex vivo* IFN effects on neuronal excitability *in silico* are modulated by PKC. Therefore we reasoned that PKC links the type I IFN signaling cascade and ion channel modulations. An activation of PKC or an IFN- $\beta$  application in neocortical layer 5 pyramidal neurons increased the neuronal excitability in the same manner. However, the threshold of the action potential remained constant. Additionally, after PKC activation or IFN- $\beta$  application we observed a reduced after-hyperpolarisation (AHP). Consistent with our findings, we also observed a reduced M-type potassium current ( $I_M$ ) after IFN- $\beta$  application. Prior inhibition of PKC prevents the type I IFN effects on neuronal excitability.

In summary, these findings confirm the neuromodulatory effect of IFN- $\beta$  under pathophysiological conditions and show for the first time that this effect is PKC mediated. Accordingly we could show that multiple ion channels, such as HCN1 or M-type potassium channel underlie this effect. For mediating the type I IFN effect, PKC activation is both sufficient and necessary and links IFN signaling cascade and ion channels. Therefore we propose PKC activation as unitary mechanism for the neuromodulatory potential of type I IFN in neocortical neurons. This represents the basis for regulation of neuronal response during an inflammation of the central nervous system (CNS). IFN- $\beta$  was also detected in a healthy CNS implying a role in the physiological neuromodulation. Because of that neuromodulation via IFN- $\beta$  may not only be pathophysiological relevant, but also important under physiological conditions.

## 1. Einleitung

### Das neocortikale Pyramidenneuron der Schicht 5

Das Gehirn des Säugetiers ist gekennzeichnet durch die einzigartige Struktur des evolutionär jüngsten Parts, den Neocortex. Dieser dient als „Schaltzentrum“ und Sitz höherer kognitiver Funktionen (Florio und Huttner 2014). Im Laufe der Evolution vergrößerte sich der Neocortex, sodass er heute im Menschen bis zu zwei-Drittel der gesamten Hirnmasse ausmacht und ca. 16 Milliarden Neurone enthält (Azevedo *et al.* 2009).

Schon Anfang des 20. Jahrhunderts konnte von Korbinian Brodmann gezeigt werden, dass der Neocortex aus 6 verschiedenen Schichten besteht, wobei die erste Schicht die äußerste und die sechste Schicht die innerste darstellt. Diesen Schichten wurden jeweils unterschiedliche Eigenschaften und Aufgaben in der Reizweiterleitung zugeschrieben (Brodmann 1909). Dabei wird die Weiterleitung von Informationen in andere Areale des Gehirns neben Pyramidenneuronen der Schichten 2 und 3, die hauptsächlich die intracortikalen Verbindungen und von Pyramidenneuronen der Schicht 5 kontrolliert. Diese berechnen Signale aus anderen Neuronen ihrer Schicht und der Schicht 2/3 und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Generierung von neocortikalen Ausgangssignalen (Douglas und Martin 2004).

Das Soma eines Pyramidenneurons der Schicht 5 hat namensgebend eine pyramidale Morphologie, an deren Spitze der Dendritenbaum ansetzt (Zhu 2000). Alle Strukturen des Pyramidenneurons besitzen synaptische Eingänge, sodass sie Signale, größtenteils aus anderen Arealen des Neocortex, empfangen können. Dabei unterscheidet man inhibitorische und exzitatorische Signale, die an den Kompartimenten des Neurons unterschiedlich verteilt sind. Soma und Axon empfangen die inhibitorischen  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-ergen Eingänge, wohin gegen die meisten exzitatorischen glutamatergen Synapsen am Dendriten lokalisiert sind. Dabei empfangen die nahen Dendriten Signale aus der lokalen Umgebung, wohingegen die distal, apikalen Dendriten mit Büschelstruktur eher Signale aus größerer Entfernung von neocortikalen oder thalamischen Neuronen erhalten (Spruston 2008).

Die glutamatergen Signale auf Pyramidenzellen werden von dendritischen Dornenstrukturen, den *spines* empfangen. Diese *spines* sind distal betont über die gesamte Pyramidenzelle verteilt und an ihren Köpfen befinden sich die exzitatorischen ionotropen A-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-(Isoxazol) Propionat- (AMPA) und N-methyl D-aspartat- (NMDA) Rezeptoren, die synaptische Potentiale und  $\text{Ca}^{2+}$  Signale generieren.

Die AMPA Rezeptoren binden Glutamat und öffnen den Kanal für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  Ionen, was ein schnelles, kurzes exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bewirkt. Während der frühen postnatalen Entwicklung kommt es zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der Untereinheiten, wodurch eine zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$  Durchlässigkeit entsteht, die wahrscheinlich wichtige funktionale Auswirkungen auf die Entwicklung und synaptische Plastizität im Neocortex hat (Kumar *et al.* 2002).

Die NMDA Rezeptoren, die ebenfalls eine Kanalöffnung für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  bewirken, verursachen hingegen einen Ionenstrom mit langsamerer Kinetik und aktivieren nur, wenn zur

gleichen Zeit eine Depolarisation, u. a. ausgelöst durch AMPA Rezeptoren, stattfindet. Durch Aktivierung von mehreren NMDA Rezeptoren wird so am Dendriten ein  $\text{Ca}^{2+}$  Spike provoziert, der nach Weiterleiten zum Soma eine Aktivierung von Natriumkanälen bewirkt, wodurch ein Aktionspotential (AP) generiert wird (Larkum *et al.* 2009).

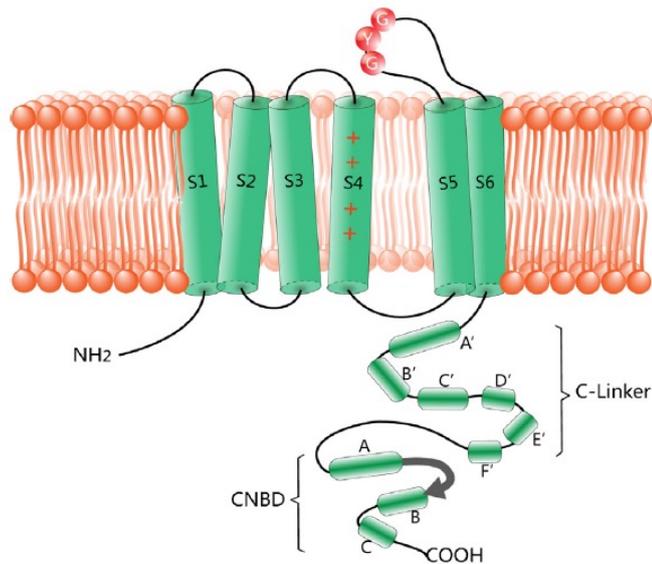
AP, die am Axonhügel (Kole *et al.* 2008) initiiert werden, können einerseits zur Präsynapse und andererseits zum Dendritenbaum zurück geleitet werden. Diese rückwärts gerichtete Weiterleitung, auch *backpropagation* genannt, ermöglicht eine Rückkopplung des axonalen Ausgangs zum Dendriten. So wird durch Verminderung der Schwelle für dendritische AP und durch einen direkten Einfluss auf die synaptische Effizienz das Feuerverhalten des Neurons moduliert (Waters *et al.* 2005).

Einen weiteren Einfluss auf das Feuerverhalten und die synaptische Transmission haben die inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (IPSP), die durch  $\text{GABA}_A$  Rezeptoren generiert werden. Diese werden durch den Neurotransmitter GABA aktiviert, der eine entscheidende Rolle in der Inhibition im zentralen Nervensystem (ZNS) übernimmt.  $\text{GABA}_A$  Rezeptoren sind ionotrope ligandengesteuerte Ionenkanäle, die eine schnelle synaptische Inhibition auslösen, hervorgerufen durch einen  $\text{Cl}^-$ -Einstrom und einer damit verbundenden hyperpolarisierten postsynaptischen Antwort (Farrant und Nusser 2005). Zusätzlich gibt es noch metabotrope G-Protein gekoppelte  $\text{GABA}_B$  Rezeptoren, die eine langsame synaptische Inhibition aktivieren (Huang 2006) und dadurch komplexere Effekte auf die postsynaptische Erregbarkeit durch Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$  Leitfähigkeit ausüben können.

Die ausbalancierte Funktionalität zwischen Erregbarkeit und Hemmung ist für das ZNS von elementarer Bedeutung, da es sonst zu Erkrankungen des Nervensystems, wie z.B. Epilepsie, Depression oder Abhängigkeiten kommen kann (Bettler *et al.* 2004).

## **Ionenkanäle im neocortikalen Pyramidenneuron der Schicht 5**

Ionenkanäle bieten neben Ionenpumpen den einzigen möglichen Transport von Ionen durch Membranen. Die Erregbarkeit von Neuronen beruht auf ihren intrinsischen Eigenschaften, wie der Kanalverteilung, aber auch auf ihrer synaptischen Verschaltung und dem Ionengradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum. Der Ionenfluss verursacht durch die elektrisch geladenen Ionen eine Spannungsänderung der Membran, woraus ein elektrisches Signal resultiert. Bei der Generierung von Signalen kommt es zu einer Umverteilung von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Cl}^-$  Ionen durch verschiedene Kanäle (Johnston und Wu 1994). Im Fokus dieser Arbeit liegt der hyperpolarisationsaktivierter unselektive Kationenstrom ( $I_h$ ), der über hyperpolarisationsaktivierte, von cyclischen Nukleotiden modulierte (HCN)-Kanäle geleitet wird und eine wichtige Rolle bei der Kontrolle neuronaler Informationsverarbeitung spielt (Magee und Johnston 2005). Der HCN Kanal gehört zur Familie der spannungsabhängigen Ionenkanäle, aktiviert bei Hyperpolarisation und leitet unselektiv Kationen. Er ist für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  Ionen durchlässig und darüber hinaus besteht eine geringe Leitfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen (Wahl-Schott und Biel 2009).



**Abbildung 1: Struktur einer HCN Kanaluntereinheit**

Der HCN Kanal wird von 4 Untereinheiten gebildet, die jeweils von 6 Transmembrandomänen (TMD) aufgespannt werden. Dabei liegen sowohl der N-terminale, wie der C-terminale Rest intrazellulär. Die C-terminale Domäne an der sechsten TMD beinhaltet den C-linker und die zyklische Nucleotidbindungsdomäne (CNBD). Die fünfte und sechste TMD bilden die porenbildene Region und die vierte TMD bildet den Spannungssensor. Quelle: He et al. 2014

Der molekulare Aufbau einer Kanaluntereinheit ähnelt prinzipiell vielen Kaliumkanälen (Abb. 1). Sechs Transmembrandomänen (TMD) bilden eine Kanaluntereinheit, wobei die vierte TMD der positiv geladene Spannungssensor ist. Die porenbildende Region, die das GYG Motiv trägt, wird von der fünften und sechsten TMD gebildet (Macri *et al.* 2012). An der sechsten Domäne befindet sich der C-Linker, der 6  $\alpha$ -Helices und die anschließende Bindungsdomäne für zyklische Nucleotide (CNBD) umfasst (Abb 1., He *et al.* 2014). Funktionelle HCN Kanäle sind Tetramere, die aus 4 Kanaluntereinheiten, von den Genen (HCN1-4) generiert, gebildet werden. Die 4 Untereinheiten zeigen unterschiedliche Eigenschaften in ihrer Kinetik und in ihrer Sensitivität gegenüber zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP).

So besitzt der homomere, aus HCN1 Untereinheiten bestehende, Kanal die schnellste Kinetik und eine geringe Sensitivität gegenüber cAMP, wohingegen homomere aus HCN2 oder HCN4 Untereinheiten gebildete Kanäle eine langsamere Kinetik besitzen aber sehr cAMP-sensitiv sind (He *et al.* 2014). Die große Vielfalt von HCN Kanälen wird durch heterotetramere Konfigurationen der funktionellen Kanäle hervorgerufen. Dabei entstehen eine Vielzahl von biophysikalischen Eigenschaften, wobei es jedoch nicht zu einer linearen Summierung der Eigenschaften der Homomere kommt (Chen *et al.* 2001, Ulens und Tytgat 2001, Much *et al.* 2003). Die Subtypen weisen verschiedene Eigenschaften auf und sind in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns verschieden stark exprimiert. In den von uns untersuchten Pyramidenneuronen der Schicht 5 wird der  $I_h$  durch die Subtypen HCN1 und HCN2 generiert (Santoro *et al.* 2000, Notomi und Shigemoto 2004). Des Weiteren ist HCN2 in fast allen Regionen des Gehirns vorhanden, wohingegen HCN1 vorrangig im Neocortex, im

Hippocampus, im zerebellaren Cortex und im Hirnstamm exprimiert wird. Das Verteilungsmuster von HCN4 besitzt zwar (im ZNS) ein komplementäres Expressionsmuster zu HCN1, ist aber gemessen an der quantitativen Expression eher im Herzen zu finden. Ebenso ist HCN3 nur in geringen Mengen im Nervensystem exprimiert (Calejo *et al.* 2014, He *et al.* 2014). HCN Kanäle werden durch verschiedene Modulatoren beeinflusst. Zu den bekanntesten zählt das schon erwähnte cAMP, das Membranphospholipid Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), die p38-mitogen-aktivierte Protein Kinase (p38MAPK) und die Protein Kinase C (PKC). Der Modulator cAMP bindet mit unterschiedlicher Sensitivität an der CNBD und verursacht eine Depolarisation der Spannungsabhängigkeit (angegeben als halbe Aktivierungsspannung ( $V_{1/2}$ )) und eine Beschleunigung der Aktivierungskinetik (Wahl-Schott und Biel 2009). Eine ähnliche Wirkung zeigt das PIP<sub>2</sub> auf den HCN2 Kanal. Auch hier wird die  $V_{1/2}$  depolarisiert, jedoch ohne eine Änderung der Aktivierungskinetik zu verursachen (Pian *et al.* 2006). Auch durch Aktivieren oder Inhibieren von Proteinkinasen wird  $I_h$  in unterschiedlichster Weise moduliert. So führt das Blocken der p38MAPK zu einer Reduktion des  $I_h$  und einer  $V_{1/2}$  Verschiebung in den hyperpolarisierenden Bereich (Poolos *et al.* 2006). Im Gegensatz dazu verursacht eine PKC Aktivierung eine Reduktion der  $I_h$ -Amplitude und eine Veränderung der  $V_{1/2}$  in den depolarisierenden Bereich in Amphibienzellen (Fogle *et al.* 2007).

Der  $I_h$  ist beim Ruhemembranpotential (RMP) von Neuronen aktiv und übernimmt wichtige zelluläre Funktionen, wie die Beeinflussung des Eingangswiderstandes und des RMP, Erzeugen neuronaler Oszillationen und Regulation von dendritischer Integration und synaptischer Transmission. Dadurch gilt er als einer der bestimmenden Faktoren der neuronalen Erregbarkeit (He *et al.* 2014). Wird der  $I_h$  durch Hyperpolarisation aktiviert, folgt ein Einwärtsstrom und somit eine Depolarisation der Zelle. Diese Depolarisation inaktiviert den  $I_h$  wiederum, wodurch der  $I_h$  selbstlimitierend wirkt und es zur Rückkehr zum RMP kommt (Poolos 2004). Zusätzlich kontrolliert der  $I_h$  die Beziehung zwischen den Phasen der Strominjektion und AP-Auslösung, wodurch die Zelle Eingangssignale auf Basis des Frequenzinhalts unterscheiden kann und sie verstärkt oder unterdrückt (Hutcheon und Yarom 2000, Ulrich 2003). Des Weiteren spielt der  $I_h$  auch eine Rolle bei der Kontrolle von Amplitude und Zeitverlauf der AP-Nachhyperpolarisation (AHP), wodurch er die AP-Frequenz beeinflusst (Velumian *et al.* 1997). Weitere Ionenströme, denen ebenfalls die Funktion der Beeinflussung der neuronalen Erregbarkeit zugesprochen wird, sind der M-Typ Kaliumstrom ( $I_M$ ), der Calcium abhängiger Kaliumstrom mit großer Leitfähigkeit ( $I_{BK}$ ) und der persistierender Natriumstrom ( $I_{Nap}$ ).

Der M-Typ Kaliumkanal besitzt wie der HCN-Kanal 6 TMD und unterteilt sich in bis jetzt 5 bekannte Subtypen (KCNQ1-5), die ähnlich wie die des HCN Kanals, in unterschiedlichen Regionen des Gehirns verschieden stark exprimiert werden. In zerebralen kortikalen Pyramidalneuronen sind die Subtypen KCNQ2 und KCNQ3 am stärksten exprimiert und formen den  $I_M$  (Cooper *et al.* 2001). Dies konnte in primären kortikalen Neuronen in Kultur bestätigt werden (Zhou *et al.* 2011). Ähnlich dem  $I_h$  ist der  $I_M$  spannungsabhängig, bereits bei RMP aktiviert und bestimmt so dieses mit und stabilisiert es. Im Gegensatz zum  $I_h$  wird bei einer

Depolarisation, z. B. hervorgerufen durch exzitatorische Signale, der  $I_M$  aktiviert und kann durch den resultierenden Kaliumstrom den Einfluss der Signale schwächen (George *et al.* 2009), wodurch sich die AP-Schwelle erhöht. Kommt es zur Ausbildung von APs, ist der  $I_M$  an der Generierung der AHP beteiligt. Da  $I_M$  eine langsame Kinetik besitzt, ist er noch aktiviert, obwohl die maximale Depolarisation schon erreicht wurde, wodurch es zu einem Kaliumausstrom kommt, der zur Hyperpolarisation führt (Gu *et al.* 2005). Aktuelle Ergebnisse im *knock out* Modell weisen darauf hin, dass KCNQ2 den größeren Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit und die AHP ausübt (Mausmodell, Soh *et al.* 2014).

Ein weiterer Kaliumstrom, dem ein Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit zugesprochen wird, ist der  $I_{BK}$ . Der  $I_{BK}$  erhielt seinen Namen aufgrund seiner, im Vergleich zu anderen spannungsabhängigen Kaliumströmen, etwa 10-mal größeren Einzelkanalleitfähigkeit (Benhassine und Berger 2005). Die BK Kanäle werden nur in Anwesenheit einer ausreichenden Konzentration an  $Ca^{2+}$  aktiviert und befinden sich in räumlicher Nähe zu Calciumkanälen (Neher 1998). Zusätzlich zeigen sie eine gleichmäßige Dichteverteilung im Soma und am Dendriten, hierbei weisen sie aber unterschiedliche Rollen auf. So tragen die somatischen BK Kanäle zur Repolarisation nach einem  $Na^+$ -induzierten AP bei, was in einer Verkürzung des APs resultiert. Dendritische,  $Ca^{2+}$ -induzierten APs werden durch die Reduktion ihrer Spannungsauslenkung vermindert. Somit kommt es durch die Aktivierung der BK Kanäle zur Beeinflussung der zellulären Erregbarkeit, hervorgerufen durch eine hohe Reizschwelle im distalen AP-Initiationsbereich (Benhassine und Berger 2009).

Die Initiierung eines APs wird erst durch das Öffnen von Natriumkanälen und einer daraus resultierenden, schnellen Depolarisation ausgelöst. Dies geschieht durch die transienten, also kurzfristig geöffneten, Natriumkanäle. Es gibt jedoch noch eine geringe Menge (ca. 5 % der Natriumströme)  $I_{Nap}$ , die eine stark verlängerte bzw. gar keine Inaktivierung besitzen (Kiss 2008). Trotz ihrer geringen Menge haben sie einen großen Einfluss auf das Feuerverhalten von Neuronen besonders im unterschweligen Bereich. So sorgt der  $I_{Nap}$ , lokalisiert an den neuronalen Dendriten, für ein Anheben des distalen synaptischen Potentials und am proximalen Axon beeinflusst er die AP Initiierung und verstärkt deren AHP (Stafstrom 2007).

Bei verschiedenen Krankheitsbildern (wie Epilepsie oder Depression), die mit einer gesteigerten oder geschwächten Erregbarkeit einhergehen, versucht man durch verschiedene Modulatoren die unterschiedlichen Kanäle im Gehirn wieder auf ihre eigentliche Funktionalität zu reduzieren bzw. zu steigern.

## Typ I Interferon als Modulator von Ionenkanälen

Bei Infektionskrankheiten besteht eine Interaktion zwischen dem Nerven- und Immunsystem. So werden zum Beispiel Interleukine, die zur Gruppe der Cytokine gehören, aufgrund ihrer immunmodulatorischen Wirkung klinisch erfolgreich bei diversen Erkrankungen, die mit

Entzündungen des Gehirns verbunden sind, eingesetzt und weisen zusätzlich einen neuromodulatorischen Effekt auf (Galic *et al.* 2012).

Interferon (IFN) gehört zur Gruppe der Cytokine und besitzt eine Vielzahl von biologischen Eigenschaften, die von antiviralen bis zu immunmodulatorischen Wirkungen reichen. Interferon wird von einer Vielzahl von Zellen des ZNS, wie Gliazellen, Astrozyten aber auch direkt von Neuronen gebildet und bei Entzündungen im Gehirn ausgeschüttet (Savarin und Bergmann 2008).

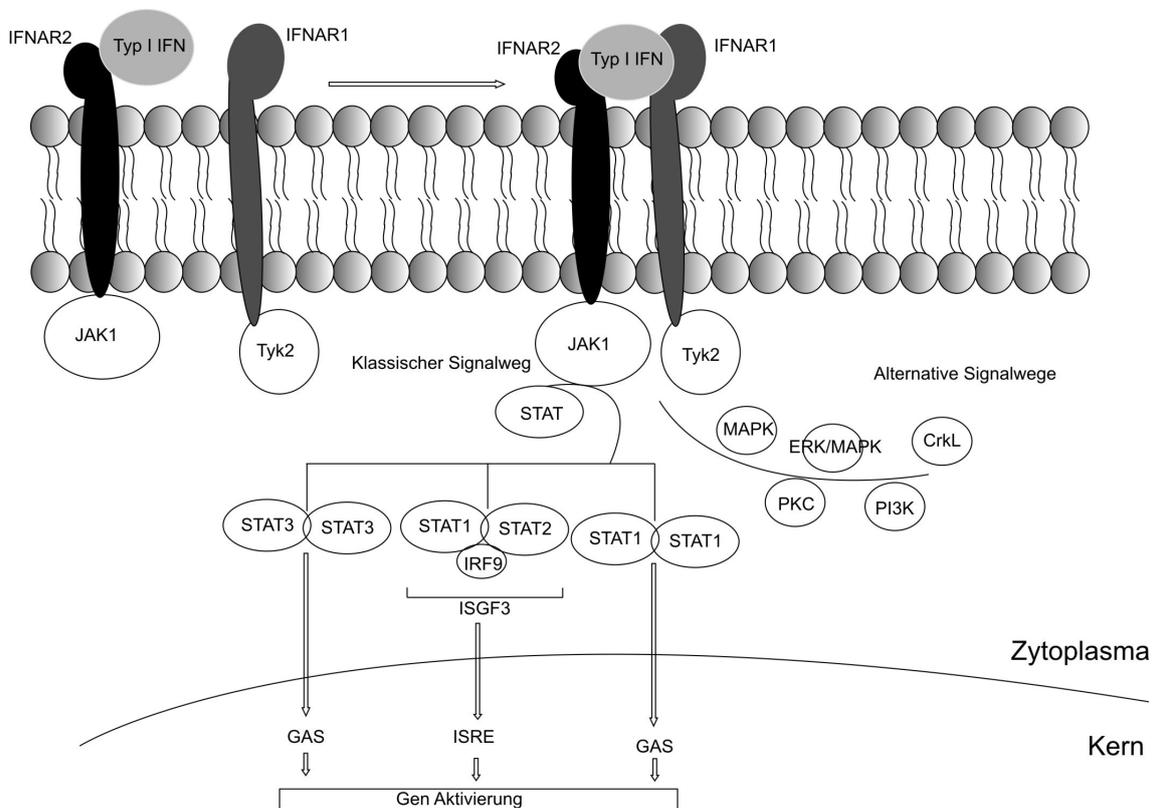
IFN wird in 3 Untergruppen (Typ I-III IFN) aufgeteilt. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf Typ I IFN. Die Familie der Typ I IFN beinhalten 7 Klassen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\omega$ ,  $\delta$  und  $\tau$ ) von denen allerdings nur die ersten 5 Klassen in humanen Zellen gefunden wurden (George *et al.* 2012). IFN- $\alpha$  und - $\beta$ , die für die ersten antiviralen Reaktionen nach einer Infektion verantwortlich sind (Savarin und Bergmann 2008), stehen im Fokus der meisten großen Studien im ZNS (Owens *et al.* 2014), weshalb nur diese beiden besprochen werden, zusätzlich sind die genauen Funktionen und Rollen der anderen Mitglieder der Typ I IFN Familie noch nicht vollständig verstanden (George *et al.* 2012).

Die frühere Bezeichnung von IFN- $\alpha$  wurde aufgrund ihres zellulären Ursprungs, der Leukozyten vorgenommen, wonach IFN- $\alpha$  als Leukozyteninterferon bezeichnet wurde (Bekisz *et al.* 2004). Zurzeit sind 12 Untergruppen des humanen IFN- $\alpha$  bekannt, die sich in ihrer Aminosäure (AS)-sequenz nur geringfügig unterscheiden. Zusätzlich existiert noch eine 13te Untereinheit, die jedoch mit  $\alpha 1$  identisch ist (Chen und Johnston 2004, Moll *et al.* 2011). Alle Gene des humanen IFN- $\alpha$  sind auf dem Chromosom 9 lokalisiert. IFN- $\alpha$  besteht aus einer 165-166 AS langen Peptidstruktur. Die von den Genen kodierten Proteine werden über 2 Disulfidbrücken stabilisiert (Antonelli 2008). IFN- $\alpha$  gehört zu den pleiotropen Cytokinen, die vom angeborenen Immunsystem als Antwort auf Viren, Bakterien, Parasiten oder Tumorzellen ausgeschüttet werden (Hoyo-Becerra *et al.* 2014). Aufgrund seiner vielfältigen Wirkweisen findet IFN- $\alpha$  zahlreiche medizinische Anwendungen. So kommt es bei bestimmten Krebserkrankungen wie malignen Melanomen oder Leukämien, sowie bei chronischer Hepatitis B und C zum Einsatz (Bekisz *et al.* 2004).

IFN- $\beta$  hieß nach der klassischen Bezeichnung, aufgrund seines zellulären Ursprungs Fibroblasteninterferon (Bekisz *et al.* 2004). Im Gegensatz zu IFN- $\alpha$  besitzt es nur eine Untereinheit, die auch von 166 AS kodiert wird und auf dem Chromosom 9 lokalisiert ist. Das gebildete Protein wird allerdings nur von einer Disulfidbrücke gestützt (Antonelli 2008). IFN- $\beta$  wird zurzeit therapeutisch bei Multipler Sklerose eingesetzt. Studien zeigen im Mausmodell ein vermindertes endometriales Tumorwachstum nach Koexpression von INF- $\beta$  mit Cytosin-Deaminase, woraus ein weiterer therapeutischer Ansatz folgen könnte (Yi *et al.* 2011).

Obwohl IFN- $\alpha$  und - $\beta$  verschiedene biologische Eigenschaften aufweisen, agieren beide über den gleichen Typ I IFN Rezeptor. Dieser besteht aus 2 Rezeptorkomplexen, IFNAR1 und IFNAR2. Diese gehören zur Klasse II helikaler Cytokinrezeptoren (De Weerd *et al.* 2007) und besitzen je eine extrazelluläre Domäne, je eine TDM und je eine intrazelluläre Domäne, die sich in ihrer Größe unterscheiden. So besteht IFNAR1 aus insgesamt 530 und IFNAR2 aus 487 AS-

Resten. Für IFNAR2 wurden bis jetzt 3 (a-c) Formen gefunden, die sich in ihrer Größe und Zusammensetzung unterscheiden, jedoch konnte nur für IFNAR2c die volle Funktionalität gezeigt werden (Bekisz *et al.* 2004), wodurch dieser allgemein als IFNAR2 bezeichnet wird. Die Rezeptorkomplexe weisen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu Typ I IFN auf, die sich auch in ihrer biologischen Aktivität widerspiegeln. Analysen konnten zeigen, dass z.B. die antiproliferativen Eigenschaften vor allem durch die Ligandenaffinität bestimmt werden. Weiterhin besteht ohne den Liganden keine Interaktion zwischen den beiden Komplexen. Erst nach der Bindung von IFN an den hochaffinen IFNAR2, kommt es zur Bildung des vollständigen Komplexes mit IFNAR1 (Piehler *et al.* 2012). Dabei kommt es zu einer Transphosphorylierung der mit den Rezeptorkomplexen assoziierten Kinasen Tyrosinkinase-2 (Tyk2) und Janus Kinase-1 (JAK1), wodurch direkte zelluläre Verteidigungsmechanismen und Elemente der angeborenen und adaptiven Immunantwort aktiviert werden (Piehler *et al.* 2012, Owens *et al.* 2014, Abb. 2).



**Abbildung 2: Komplexbildung und Signalwege vom Typ I IFN Rezeptor**

Die Interferonrezeptorketten 1 und 2 (IFNAR1 und IFNAR2) bilden erst durch die Bindung von Interferon (IFN) einen Komplex. Dabei kommt es zu einer Transphosphorylierung der assoziierten Tyrosinkinase 2 (Tyk2) und Januskinase 1 (JAK1) wodurch weitere Tyrosinreste phosphoryliert werden und so der klassische Signalweg oder alternative Signalwege aktiviert werden.

Durch die Transphosphorylierung von Tyk2 und JAK1 werden weitere Tyrosinreste phosphoryliert, wodurch der klassischen JAK/STAT (*signal transducers and activators of transcription*) oder ein alternativer Signalweg aktiviert wird (Hofer und Campbell 2013).

Beim klassischen Signalweg kommt es zur Bindung von STAT Proteinen, die dann von JAK1 phosphoryliert werden. Diese phosphorylierten STAT Proteine bilden Homo- und Heteromere, die in den Kern wandern, um dort die Transkription verschiedener Gene zu regulieren. So binden STAT1 oder STAT3 Homomere im Kern an Gamma aktivierende Sequenzen (GAS), die Gene aktivieren, die eine entzündliche Antwort hervorrufen (STAT1) oder unterdrücken (STAT3). Bei der Bildung des Heteromeres STAT1/STAT2 kommt es durch die Bindung des IFN Regulationsfaktors 9 (IRF9) zur Bildung des Komplexes ISGF3 (Interferon-stimulierender Gen Faktor 3), der im Kern IFN-stimulierende Antwort Elemente (ISRE) bindet, die antivirale Gene aktivieren (Ivashkiv und Donlin 2014).

Neben dem klassischen Signalweg existieren noch eine Vielzahl alternativer Signalwege, die eine zelltypspezifische Relevanz haben. Zu den Mediatoren alternativer Signalwege gehören das multifunktionale Adapter Protein CrkL, Mitglieder des p38MAPK Signalwegs, der phosphoinositol 3-kinase (PI3K) Signalweg, der extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK)/MAPK Signalweg und Isoformen der PKC (Platanias 2005, De Weerd und Nguyen 2012).

Neben der Aktivierung verschiedener Signalwege, hat IFN auch neuromodulatorische Eigenschaften. So konnte bereits für hippocampale Zellen gezeigt werden, dass IFN- $\alpha$  die Kurzzeit-Potenzierung (STP) reduziert, die Langzeit-Potenzierung (LTP) unterdrückt und die basale synaptische Transmission bei sehr hohen IFN Konzentrationen beeinflusst (D'Arcangelo *et al.* 1991). Des Weiteren reduzieren sowohl Typ I IFN als auch Typ II IFN die inhibitorischen postsynaptischen Potentiale in hippocampalen CA3 Pyramidenzellen, wodurch die neuronale Erregbarkeit gesteigert wird (Müller *et al.* 1993). Auch im Neocortex kommt es nach IFN Applikation zu einer Beeinflussung der über- und unterschwelligen Erregbarkeit (Hadjilambrea *et al.* 2005).

Aufgrund dessen, dass Ionenkanäle Zielstrukturen von Neuromodulatoren sind und eine neuro-modulatorische Wirkung anderer Cytokine gezeigt werden konnte (Viviani und Boraso 2011), kann man von Typ I IFN einen ähnlichen Effekt erwarten.

Die Kommunikation zwischen Nerven- und Immunsystem konnte in der Beeinflussung des Immunsystems durch das Nervensystem gezeigt werden (Godbout und Glaser 2006). Auch die Beeinflussung des Nervensystems durch das Immunsystem ist für bestimmte Bereiche des Gehirns bewiesen (Dantzer *et al.* 2008). Dabei galt die besondere Aufmerksamkeit den Cytokinen, da diese sowohl von Immunzellen im Blut als auch von Zellen des ZNS gebildet werden können (Lichtblau *et al.* 2013).

Beginnend konnte für den Neocortex diese Art der Kommunikation bereits gezeigt werden (Hadjilambrea *et al.* 2005), woran unsere Bemühungen knüpfen. Dabei rückt das Typ I IFN für unsere Studien in den Vordergrund.

## Hypothesen

Die den hier zusammengefassten Arbeiten zugrundeliegenden Hypothesen lauten:

- Eine IFN vermittelte Erhöhung der unterschwelligen Erregbarkeit ist an HCN Kanal Veränderungen gebunden
- $I_h$  Modulationen sind vermittelt durch den IFN-Rezeptorsignalweg
- Die Erhöhung der überschwelligen Erregbarkeit ist an multiple Kanäle gebunden
- Die IFN-induzierten Kanalmodulationen sind PKC vermittelt
  - HCN Kanäle werden durch PKC moduliert
  - Eine PKC Aktivierung imitiert die überschwelligen IFN Effekte
  - Eine PKC Inhibition verhindert IFN Effekt

## 2. Ergebnisse

### **Typ I Interferon hemmt den HCN1 vermittelten $I_h$ und verlangsamt die neuronale Oszillation.**

Die Behandlung von verschiedenen Krankheiten mit Hilfe von Typ I IFN verursacht zum Teil gravierende Nebenwirkungen, die - wenngleich selten - sogar die Beendigung der Behandlung erfordern können. Die Nebenwirkungen werden durch bei einer Therapie verabreichten Cytokine hervorgerufen, die dabei auf das Gehirn wirken und von grippeähnlichen Symptomen wie Appetitlosigkeit oder Benommenheit bis hin zu reversiblen Depression reichen können (George *et al.* 2012). Somit besteht eine Kommunikation zwischen Immun- und Nervensystem (Dantzer *et al.* 2008).

In 2005 konnten Hadjilambrea *et al.* zeigen, dass Typ I IFN neuromodulatorische Effekte im Nagerneocortex bewirken. In *ex vivo* Experimenten mit scharfen Einstichelektroden wurden die Eigenschaften von neocorticalen Schicht 5 Pyramidenzellen vor und nach einer direkten Applikation von Typ I IFN untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich der Membranwiderstand nach IFN- $\beta$  erhöht. Die Applikation von IFN- $\beta$  erhöhte somit die unterschwellige neuronalen Erregbarkeit. Dieser Effekt blieb bei vorheriger Zugabe des  $I_h$  Inhibitors ZD7288 aus. Zusätzlich testete man noch die Blocker  $Ni^{2+}$ , Carbachol und Bicucullin, die entsprechend BK-Kanäle, die M-Typ Kaliumkanäle und die GABA<sub>A</sub> Rezeptoren blockieren. Diese konnten entgegen ZD7288 die Erhöhung des Membranwiderstandes durch IFN- $\beta$  Applikation nicht verhindern. Daraus resultiert unsere Hypothese, dass intakte HCN Kanäle bei dem IFN- $\beta$  Effekt auf die unterschwellige Erregbarkeit involviert sind. Zusätzlich konnte durch die Gabe von IFN- $\beta$  eine Erhöhung der AP Feuerrate beobachtet werden, womit IFN- $\beta$  auch einen Einfluss auf die überschwellige neuronale Erregbarkeit zeigt.

Gestützt auf diese Daten folgten weitere Versuche zur funktionalen Relevanz der IFN- $\beta$  induzierten Proteinänderungen aufgrund der beschriebenen neuromodulatorischen Effekte. So konnte nachgewiesen werden, dass eine, durch IFN- $\beta$  bedingte, Steigerung des Membranwiderstandes abhängig von der *de novo* Protein Synthese ist, diese jedoch keine Wirkung auf den zweiten Effekt, die gesteigerte überschwellige Erregbarkeit, hat (Beyer *et al.* 2009).

Aufgrund dieser Ergebnisse, ergaben sich neue Fragestellungen. Zum einen stellte sich die Frage nach der pathophysiologischen Relevanz von IFN und ihrer Auswirkungen auf das Gehirn. Zum anderen sollten die indirekten Hinweise der HCN Abhängigkeit des Typ I IFN Effekts auf die neuronale Erregbarkeit (Hadjilambrea *et al.* 2005) durch direkte Untersuchungen der HCN-Kanäle mit einer zusätzlichen Spezifikation welche HCN Kanaluntereinheiten an der durch Typ I IFN induzierten Neuromodulation beteiligt sind, bestätigt werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob Typ I IFN an Neuronen wirkt oder ob gliale Strukturen von Nöten. Darüber hinaus erschien es uns wichtig, ob Typ I IFN einen direkten

Ergebnisse

Effekt auf die HCN Kanäle ausübt, oder ob dazu die Aktivierung eines Typ I IFN Rezeptor Signalweg benötigt wird und um welchen es sich handelt.

Cereb Cortex. 2014 Jan;24(1):199-210. doi: 10.1093/cercor/bhs305. Epub 2012 Oct 4.

**Elevation in type I interferons inhibits HCN1 and slows cortical neuronal oscillations.**

Stadler K<sup>1</sup>, Bierwirth C, Stoenica L, Bettefeld A, Reetz O, Mix E, Schuchmann S, Velmans T, Rosenberger K, Bräuer AU, Lehnardt S, Nitsch R, Budt M, Wolff T, Kole MH, Strauss U.

**Abstract**

Central nervous system (CNS) inflammation involves the generation of inducible cytokines such as interferons (IFNs) and alterations in brain activity, yet the interplay of both is not well understood. Here, we show that in vivo elevation of IFNs by viral brain infection reduced hyperpolarization-activated currents (I<sub>h</sub>) in cortical pyramidal neurons. In rodent brain slices directly exposed to type I IFNs, the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide (HCN)-gated channel subunit HCN1 was specifically affected. The effect required an intact type I receptor (IFNAR) signaling cascade. Consistent with I<sub>h</sub> inhibition, IFNs hyperpolarized the resting membrane potential, shifted the resonance frequency, and increased the membrane impedance. In vivo application of IFN- $\beta$  to the rat and to the mouse cerebral cortex reduced the power of higher frequencies in the cortical electroencephalographic activity only in the presence of HCN1. In summary, these findings identify HCN1 channels as a novel neural target for type I IFNs providing the possibility to tune neural responses during the complex event of a CNS inflammation.

**KEYWORDS:**

EEG; ion channels; neuroinflammation; viral infection

<http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhs305>

## Eine PKC Aktivierung hemmt HCN1 medierte Ströme im Zellkulturmodell

In Stadler *et al* (2014) konnten wir eine HCN1 Spezifität für den unterschweligen Typ I IFN Effekt zeigen und haben nachgewiesen, dass der IFN- $\beta$  Effekt auf HCN Kanäle rezeptorvermittelt ist. So konnte eine Interaktion zwischen IFN- $\beta$  und HCN Kanäle durch das Blocken von JAK1 verhindert werden, durch dessen Transphosphorylierung mit Tyk2 sowohl der klassische Typ I IFN-Rezeptorsignalweg, als auch alternative Typ I IFN-Rezeptorsignalwege aktiviert werden.

Die genaue Beziehung zwischen Typ I IFN Rezeptor Aktivierung und HCN Kanälen blieb unklar, jedoch vermuteten wir, nach dem Ausschluss der p38MAPK, die in neocortikalen Pyramidenzellen der Schicht 5 nicht durch IFN- $\beta$  phosphoryliert werden konnte, eine Beteiligung der PKC.

PKCs regulieren verschiedene zelluläre Mechanismen wie Zellwachstum, Proliferation, Migration und Apoptose. Daraus resultiert, dass eine Fehlregulation mit vielen krankhaften Veränderungen einhergeht (Wu-Zhang und Newton 2013). Es gibt 3 Isoformen der PKC, die klassische, die neue und die atypische PKC. Diese unterscheiden sich im Aufbau und ihrer Aktivierung. Die klassische PKC beinhaltet die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ I und  $\beta$ II und  $\gamma$ . Sie besitzen eine C1A und C1B Domäne, die Diacylglycerol (DAG) oder Phorbolster binden und eine C2 Domäne, die in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  an die Membran bindet. Zu den Isoformen der neuen PKC gehören  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$ . Sie sind  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängig, benötigen jedoch für ihre Aktivierung DAG. Die atypischen PKC Isoformen  $\xi$  und  $\lambda$ I sind komplett unempfindlich gegen  $\text{Ca}^{2+}$  und DAG (Metzger und Kapfhammer 2003). Alle PKCs besitzen eine regulative Domäne, die sich aufgrund der C-Domänen und der damit zusammenhängenden Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  und DAG zwischen den Isoformen unterscheidet, jedoch bei allen Isoformen eine kurze autoinhibitorische Pseudosubstratsequenz hat. Die katalytische Domäne ist bei allen PKCs vorhanden und gleich aufgebaut. Sie besteht aus einer hoch konservierten Kinasedomäne, die die Substratbindungsstelle enthält, gefolgt vom C-terminalen Rest (Wu-Zhang und Newton 2013). Ist die PKC im inaktiven Zustand, wird diese durch die Pseudosubstratsequenz, die sich in diesem Zustand in der Substratbindungstasche befindet, autoinhibiert. Sobald *second messenger* und/oder allosterische Effektoren an der regulatorischen Domäne binden, wird die Bindung des Pseudosubstrats aufgehoben und ermöglicht so die Aktivierung der PKC (Rosse *et al.* 2010).

Die PKC Aktivität kann durch eine Vielzahl von Aktivatoren und Inhibitoren gesteigert oder gehemmt werden. Diese unterscheiden sich in ihrer Wirkweise durch die Bindung an die verschiedenen Domänen der PKC. Zu den meist verwendeten und damit am besten charakterisierten Aktivatoren gehören DAG, Phorbolster wie PMA und makrozyklische Laktone wie Bryostatin1. Diese wirken alle über die C1 Region am regulatorischen Zentrum, können aber aufgrund von Unterschieden in Aufbau und Kettenlänge die Orientierung der C1 Domäne zur Membran variieren und somit unterschiedliche biologische Antworten auslösen. So werden z.B. kurzkettige synthetisierte DAGs wie Oleoacetylglycerol (OAG) aufgrund ihrer höheren

Wasserlöslichkeit dafür eingesetzt, stoßartig PKC zu aktivieren (Wu-Zhang und Newton 2013). Dagegen wird 4 $\beta$ -phorbol 12-myristat 13-acetat (4 $\beta$ -PMA) gern aufgrund seiner hohen PKC Aktivierung und tumorfördernden Wirkung eingesetzt. Obwohl Bryostatins teilweise ähnliche Effekte zeigt wie 4 $\beta$ -PMA, wirkt es tendenziell flüchtiger und teilweise sogar entgegen der Wirkung von 4 $\beta$ -PMA (Wu-Zhang und Newton 2013).

Zusätzlich gibt es eine Vielzahl von Inhibitoren der PKC, die sich in ihrer Wirkweise und in ihrer Spezifität unterscheiden. Der von mir verwendete Blocker GF109203X gehört zu den unspezifischen PKC Blockern, zeigt jedoch eine größere Wirksamkeit für neue und klassische Subtypen, als für die Gruppe der atypischen PKCs. GF109203X ist auch unter den Namen Gö6850 oder Bisl bekannt und bindet an der katalytischen Domäne in der Adenosin-5-Triphosphat (ATP)-Bindungsstelle (Martiny-Baron et al. 1993, Son et al. 2011).

Durch den Einsatz von PKC Aktivatoren und Inhibitoren wollte ich im Säuger-Zellkulturmodell herauszufinden, ob eine direkte HCN1 Modulation durch die PKC möglich ist, um Rückschlüsse für das Verhalten von Neuronen auf den Einfluss einer PKC Aktivierung ziehen zu können.

Cell Physiol Biochem. 2013;31(4-5):532-41. doi: 10.1159/000350074. Epub 2013 Apr 3.

**Protein kinase C activation inhibits rat and human hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel (HCN)1--mediated current in mammalian cells.**

Reetz O<sup>1</sup>, Strauss U.

**Abstract**

**BACKGROUND/AIMS:**

Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated 1 (HCN1) channels determine neuronal excitability in several brain regions. In contrast to HCN2 and HCN4, HCN1 is less sensitive to cAMP and the number of other known modulators is limited. One of those, the protein kinase C (PKC), showed opposing effects on mouse HCN1 channels expressed in *Xenopus* oocytes.

**METHODS:**

In order to study PKC effects on HCN1 mediated currents in a mammalian environment we expressed rat HCN1 or human HCN1 in human embryonic kidney (HEK293) cells and rat HCN1 in murine neuroblastoma (N1E-115) cells. We recorded the resulting I<sub>h</sub> before and during the application of the membrane permeable non-metabolizable PKC-activator 4βPMA in cell-attached mode of the patch-clamp technique, leaving the intracellular environment intact.

**RESULTS:**

4βPMA reduced maximal HCN1 mediated currents to about 60-70 % and slowed its activation, but left its voltage sensitivity unchanged. The effect was neither due to species-related differences nor restricted to HEK293 cells, because it was comparable for human and rat HCN1 in HEK293 and for rat HCN1 in N1E-115 cells. However, pre-treatment with the PKC blocker GF109203X abolished 4βPMA induced I<sub>h</sub> changes. Disrupting the intracellular environment by recording in whole-cell mode drastically reduced the 4βPMA effect.

**CONCLUSION:**

PKC activation reduces and slows I<sub>h</sub> in non-neuronal and neuronal mammalian cells transfected with rat or human HCN1 if the intracellular content remains intact.

<http://dx.doi.org/10.1159/000350074>

## Die Interferon- $\beta$ induzierte Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit ist PKC vermittelt

In den vorherigen Arbeiten konnten wir zeigen, dass die maximale Stromamplitude des HCN Kanals in Säugerzellen sowohl durch die Zugabe von IFN- $\beta$  (Stadler *et al.* 2014) als auch durch die Aktivierung der PKC (Reetz und Strauss 2013) reduziert wird.

Der HCN Kanal hat neben weiteren Kanälen einen Einfluss auf die unterschwellige neuronale Erregbarkeit.

Da wir die Mechanismen einer Neuromodulation durch IFN- $\beta$  näher verfolgen wollten, haben wir in einer an die Morphologie und das Feuerverhalten einer Schicht 5 Pyramidenzelle angepassten Computersimulation den Einfluss weiterer Kanäle, vor allem PKC abhängiger Kanäle, auf die neuronale Erregbarkeit getestet. Gleichzeitig überprüften wir *ex vivo* diese Hypothese, dass eine PKC Aktivierung das Bindeglied zwischen der IFN Signalkaskade und den PKC abhängigen Ionenkanälen bildet. Zu diesem Zweck verwendeten wir neben dem bereits von mir verwendeten PKC Blocker GF109203X (Reetz und Strauss 2013), einen weiteren PKC Blocker, Calphostin C.

Calphostin C blockiert im Gegensatz zu GF109203X die Phorbolster/DAG Bindungsstelle und agiert irreversibel am regulatorischen Zentrum. Zusätzlich benötigt Calphostin C für seine Aktivierung Licht (Kobayashi *et al.* 1989, Bruns *et al.* 1991, Son *et al.* 2011).

PKCs werden teilweise durch Gerüstproteine, wie A-Kinase Anker Protein (AKAP), in der Membran organisiert. AKAPs wurden zunächst als Gerüstproteine für die Protein Kinase A (PKA) identifiziert, jedoch wurden nach und nach weitere assoziierte Moleküle, darunter auch die PKC entdeckt. Der AKAP79/150 Komplex wurde dabei als Komplex mit großer Kapazität zur Bindung mit vielen verschiedenen Partnern beschrieben. Dieser befindet sich in der inneren Plasmamembran von Neuronen und einer Vielzahl anderer Zelltypen und verankert PKCs (Welch *et al.* 2010). Durch die Verankerung werden teilweise die Eigenschaften der PKC verändert. So verhindert eine Komplexbildung mit AKAP79 die Hemmung von PKC durch ATP-kompetitive Blocker wie GF109203X (Hoshi *et al.* 2010). Man vermutet, dass die Konzentration des Substrats durch die unmittelbare Nähe zum Enzym so hoch ist, dass die Blocker, die das katalytische Zentrum angreifen, ineffizient werden (Wu-Zhang und Newton 2013). Die Wirkung von Inhibitoren, wie Calphostin C, die am regulatorischen Zentrum agieren, werden nicht von AKAPs beeinflusst (Hoshi *et al.* 2010).

Neben der Aktivierung von Signalwegen moduliert PKC auf eine Vielzahl von Ionenkanälen. Darunter auch die, für die durch Typ I IFN ausgelösten Erregbarkeitsänderungen (Hadjilambrea *et al.* 2005) wahrscheinlich wichtigen Ionenkanäle  $I_{\text{Nap}}$ ,  $I_{\text{BK}}$ ,  $I_{\text{M}}$  und  $I_{\text{h}}$ .

Eine Erhöhung von PKC verschiebt die Aktivierungsschwelle von  $I_{\text{Nap}}$  in ein negativeres Potential und ändert so die neuronale Erregbarkeit (Astman *et al.* 1998, Franceschetti *et al.* 2000).

Bei BK Kanälen reduziert die PKC Aktivierung die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle, indem es die Öffnungszeit verkürzt. Das stabilisiert die nichtleitende Konformation (Zhou *et al.* 2010).

Der  $I_M$  wird ebenfalls durch PKC moduliert. Hier gibt es verschiedene Möglichkeiten der Regulation. So wurde eine cholesterolinduzierte Inhibition des  $I_M$ , vermittelt über eine PKC Phosphorylierung, gezeigt (Lee *et al.* 2010). Außerdem wird der  $I_M$  auch durch eine Verankerung der PKC mit AKAPs reduziert (Hoshi *et al.* 2010). Aber auch durch eine direkte Beeinflussung, durch Phosphorylierung der KCNQ2 Untereinheit moduliert den  $I_M$  (Lee *et al.* 2010).

Eine PKC Aktivierung verändert auch die Eigenschaften des HCN-Kanals in verschiedenen Zelltypen (Cathala und Paupardin-Tritsch 1997, Fogle *et al.* 2007, Reetz und Strauss 2013, und siehe oben).

PKCs sind in vielfältige zelluläre Mechanismen involviert und werden durch *second messenger* wie  $Ca^{2+}$  oder verschiedene Proteine, unter anderem auch durch Typ I IFN aktiviert (Uddin *et al.* 2002, Redig *et al.* 2009).

Da Typ I IFN auch als Neuromodulator fungiert, untersuchten wir, ob PKC vermittelte Änderungen in der neuronalen Erregbarkeit und damit einhergehende Ionenkanalmodulation durch Typ I IFN induziert werden. Aus unseren bisherigen Erkenntnissen (Reetz und Strauss 2013, Stadler *et al.* 2014) postulierte ich eine PKC abhängige Beeinflussbarkeit von HCN1 und damit eine mögliche Verbindung des Typ I IFN Signalweges mit Änderungen in der neuronalen Erregbarkeit. Zur Überprüfung wurden von uns verschiedene Kanalmodulationen zum Typ I IFN Effekt am Computer simuliert. Zusätzlich haben wir den Einfluss einer direkten PKC Aktivierung oder IFN- $\beta$  Applikation auf die neuronale Erregbarkeit in neocortikalen Pyramidenzellen überprüft und versucht, über IFN- $\beta$  Applikation nach pharmakologischer Inhibition der PKC eine direkte Verbindung zwischen IFN- $\beta$  induzierter erhöhter neuronalen Erregbarkeit und neuronalen Ionenkanälen nachzuweisen.

J Neuroinflammation. 2014 Oct 29;11:185. doi: 10.1186/s12974-014-0185-4.

**Protein kinase C activation mediates interferon- $\beta$ -induced neuronal excitability changes in neocortical pyramidal neurons.**

Reetz O, Stadler K, Strauss U.

**Abstract**

**BACKGROUND:**

Cytokines are key players in the interactions of the immune and nervous systems. Recently, we showed that such interplay is mediated by type I interferons (IFNs), which elevate the excitability of neocortical pyramidal neurons. A line of indirect evidence suggested that modulation of multiple ion channels underlies the effect. However, which currents are principally involved and how the IFN signaling cascade is linked to the respective ion channels remains elusive.

**METHODS:**

We tested several single and combined ionic current modulations using an in silico model of a neocortical layer 5 neuron. Subsequently we investigated resulting predictions by whole-cell patch-clamp recordings in layer 5 neurons of ex vivo neocortical rat brain slices pharmacologically reproducing or prohibiting neuronal IFN effects.

**RESULTS:**

The amount and type of modulation necessary to replicate IFN effects in silico suggested protein kinase C (PKC) activation as link between the type I IFN signaling and ion channel modulations. In line with this, PKC activation with 4 $\beta$ -phorbol 12-myristate 13-acetate (4 $\beta$ -PMA) or Bryostatin1 augmented the excitability of neocortical layer 5 neurons comparable to IFN- $\beta$  in our ex vivo recordings. In detail, both PKC activators attenuated the rheobase and increased the input-output gain as well as the input resistance, thereby augmenting the neuronal excitability. Similar to IFN- $\beta$  they also left the threshold of action potential generation unaffected. In further support of PKC mediating type I IFN effects, IFN- $\beta$ , 4 $\beta$ -PMA and Bryostatin1 reduced the amplitude of post-train after-hyperpolarizations in a similar manner. In conjunction with this finding, IFN- $\beta$  reduced M-currents, which contribute to after-hyperpolarizations and are modulated by PKC. Finally, blocking PKC activation with GF109203X at the catalytic site or calphostin C at the regulatory site prevented the main excitatory effects of IFN- $\beta$ .

**CONCLUSION:**

Multiple ion channel modulations underlie the neuromodulatory effect of type I IFNs. PKC activation is both sufficient and necessary for mediating the effect, and links the IFN signaling

cascade to the intrinsic ion channels. Therefore, we regard PKC activation as unitary mechanism for the neuromodulatory potential of type I IFNs in neocortical neurons.

<http://dx.doi.org/10.1186/s12974-014-0185-4>

### 3. Diskussion

Die zusammengestellten Arbeiten bestätigen eine Kommunikation zwischen Immunsystem und Nervensystem im Neocortex. Diese geht vom Immunsystem aus und wird, zumindest teilweise, durch Typ I IFNs vermittelt, die verschiedene neuronale Ionenkanäle modulieren. Letztere werden durch extrazelluläre Neurotransmitter oder intrazelluläre Moleküle, wie zum Beispiel PKC, beeinflusst. Für die PKC wurde bereits für verschiedene Kanäle eine Modulationsfähigkeit postuliert und in einen regulatorischen Zusammenhang mit dem IFN-Rezeptorsignalweg gebracht. Mir gelangen jetzt die Verknüpfung und die Identifikation der PKC als Bindeglied zwischen Signalkaskade und Ionenkanalmodulation. Die Bedeutung der Ergebnisse diskutiere ich zusammenfassend anhand der von mir aufgestellten Hypothesen.

#### **Die Typ I Interferon vermittelte Erhöhung der unter-schweligen Erregbarkeit ist an HCN Kanal Veränderungen gebunden**

Eine Entzündung des ZNS, hervorgerufen durch virale oder bakterielle Infekte verursacht die Produktion von Typ I IFN (Delhaye *et al.* 2006), die für die erste Immunantwort zuständig sind (Pestka 2007). Die vermehrte Produktion von IFN- $\alpha$  (Typ I) erhöht die Expression weiterer Cytokine, wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin-6 (IL-6) (Mehta *et al.* 2014), wohingegen die Produktion von Interleukin-1 (IL-1) gehemmt wird (Guarda *et al.* 2011). Somit spielt Typ I IFN bei der Regulation weiterer Cytokine bzw. Chemokine eine wichtige Rolle. Bislang wurde jedoch eine neuromodulatorische Wirkung von Cytokinen hauptsächlich mit einer vermehrten Ausschüttung von Hormonen bzw. Neurotransmittern in Verbindung gebracht (Dantzer *et al.* 2008, McAfoose und Baune 2009). Die direkte Wirkung von Cytokinen, wie IL-1 oder TNF- $\alpha$  auf Ionenkanäle, Calciumgleichgewicht und Langzeitpotenzierungen (Koller *et al.* 1997) ließ auf eine Beteiligung von Typ I IFN bei der Neuromodulation von Ionenkanälen schlussfolgern.

Die neuronale Erregbarkeit wird, zumindest teilweise, durch den  $I_h$  reguliert, der beim RMP der Zelle fließt (Wahl-Schott und Biel 2009). So fand unsere Arbeitsgruppe erste Hinweise auf eine Beteiligung des  $I_h$  bei IFN- $\beta$  (Typ I) vermittelten immunoneuronalen Interaktionen, aufgrund der beobachteten Erhöhung des Eingangswiderstandes nach Typ I IFN Applikation und durch Tests mit verschiedenen Blockersubstanzen (Hadjilambrea *et al.* 2005). Diesen Hinweisen folgend, konnten wir beobachten, dass nach einer viralen Infektion mit dem Theiler murinen encephalomyelitis Virus (TMEV), der die Produktion von Typ I IFN anregt (Delhaye *et al.* 2006), der  $I_h$  in neocortikalen Pyramidenzellen reduziert war. Eine direkte Typ I IFN Applikation im Gewebeschnitt ahmt diesen Effekt nach und bestätigt ihn (Stadler *et al.* 2014). Das unterstützt die pathophysiologische Relevanz der Interaktion von Typ I IFN und Neuronen während einer Entzündung.

Der  $I_h$  kontrolliert außerdem zum Teil die Rhythmizität neuronaler Netzwerke (Wahl-Schott und Biel 2009); so führt eine  $I_h$  Inhibierung (zum Beispiel bei Epilepsien) im Frontallappen des Gehirns zur Reduktion der Frequenz im Elektroenzephalogramm (EEG) (Marcelin *et al.* 2009). Im Neocortex besteht ein Zusammenhang zwischen einer verminderten HCN1 Expression und einer Absence-Epilepsie (Strauss *et al.* 2004). Überraschenderweise sind HCN1 *knockout* Mäuse nicht epileptisch, zeigen aber Defizite im motorischen Lernen und Erinnern (Nolan *et al.* 2003). Auch die Einschränkung bzw. das Fehlen der HCN2 Funktion führt zu einer gesteigerten Erregbarkeit in neocortikaler Neuronenkultur (DiFrancesco *et al.* 2011). Des Weiteren weisen HCN2 *knockout* Mäuse eine Absence-Epilepsie auf (Ludwig *et al.* 2003). Somit zeigen HCN1 wie auch HCN2 Kanäle Wirkungen auf die neuronale Erregbarkeit. Ein Einfluss von Cytokinen auf HCN2 wurde bis jetzt jedoch noch nicht untersucht. In den von uns untersuchten neocortikalen Pyramidenzellen wird der  $I_h$  nicht nur von HCN1 sondern auch von HCN2 generiert. Bei der Deletion von HCN1 kommt es zwar zu einer geringen Änderung der Expression der anderen HCN Untereinheiten, jedoch lassen die kinetischen Analysen der von uns gemessenen Ströme auf die alleinige Beteiligung der schnelle HCN1 Komponente bei der Ausprägung des IFN- $\beta$  Effekts schließen. Unterstützt werden unsere Beobachtungen durch *in vivo* EEG Messung und *ex vivo whole cell* Messung, bei denen ein HCN1 *knockout* den Typ I IFN Effekt auf den  $I_h$  verhindert (Stadler *et al.* 2014). Schlussfolgernd nehme ich an, dass obwohl HCN1 und HCN2 Kanäle einen Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit besitzen, für die Wirkung von IFN- $\beta$  im Neocortex der HCN1 Kanal von entscheidender Bedeutung ist.

Flüchtige Anästhetika, wie zum Beispiel Isofluran, verursachen eine dem IFN- $\beta$  Effekt ähnliche reduzierende Wirkung auf den  $I_h$  (Chen *et al.* 2009). Diese geht jedoch mit einer Verschiebung der  $V_{1/2}$  einher, die wir nach einer IFN- $\beta$  Applikation nicht beobachtet haben. Somit gehen wir von einer dem Typ I IFN Effekt verschiedenen Kanalmodulation aus. Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass eine durch IFN- $\beta$  hervorgerufene Änderung der neuronalen Erregung von einer Reduktion des HCN1 vermittelten  $I_h$  mit verursacht ist.

IFN- $\beta$  befindet sich auch im gesunden ZNS (Prinz *et al.* 2008), was für IFN- $\beta$  eine Rolle in der physiologischen Neuromodulation impliziert. Eine Neuromodulation durch IFN- $\beta$  und die dahinter stehenden Mechanismen könnten daher von größerer Wichtigkeit unter physiologischen Bedingungen sein.

## Der Typ I Interferonrezeptorsignalweg vermittelt $I_h$ Modulationen

Bekannt ist, dass Typ I IFN über seine Rezeptoraktivierung den klassischen Signalweg oder verschiedene alternative Signalwege anstößt und dadurch unterschiedliche immunregulatorische Prozesse auslöst (Ivashkiv und Donlin 2014). Dazu kommt, dass die Deletion des Typ I sowie des Typ II Rezeptors in Mäusen diese für die Wirkung von IFN unempfindlich macht, was eine schnelle virale Ausbreitung zur Folge hat. Die Deletion des STAT1 dagegen führt zwar zu einer Verminderung der IFN Antwort, jedoch ist diese noch in der

Lage, die virale Ausbreitung im Vergleich zur Rezeptor *knockout*-Maus zu reduzieren (Pasieka *et al.* 2011).

HCN1 homomere und HCN1/HCN2 heteromere Kanäle sind im Neocortex im Wesentlichen für die Generierung des  $I_h$  verantwortlich (Herrmann *et al.* 2015). Im HEK293 Kulturmodell ist der Typ I IFN-Rezeptorsignalweg nicht vorhanden, sodass wir den hier fehlenden direkte IFN- $\beta$  Effekt, auf den HCN1 homomeren Kanal oder HCN1/HCN2 heteromeren Kanal (Stadler *et al.* 2014), auf die Notwendigkeit des Typ I IFN-Rezeptorsignalwegs zurückführen. Im Kulturmodell, ohne entsprechende Signalkaskade, beobachtete ich die  $I_h$  Reduktion durch die Aktivierung der PKC (Reetz und Strauss 2013). Dies impliziert das Anstoßen einer Signalkaskade durch Phosphorylierung. Das Fehlen der IFN- $\beta$  Wirkung auf den  $I_h$  nach JAK1 Inhibition (Stadler *et al.* 2014), durch dessen Transphosphorylierung mit Tyk2 sowohl der klassische Typ I IFN-Rezeptorsignalweg, als auch alternative Typ I IFN-Rezeptorsignalwege aktiviert werden, bestätigt unsere Ansichten.

Da für uns die Auswirkungen und Kommunikation von IFN- $\beta$  im Gehirn im Fokus stehen und IFN auch selbst von Neuronen produziert werden kann (Savarin und Bergmann 2008), haben wir unsere Ergebnisse auf ihre Relevanz für Neurone getestet. Auch Astrozyten, die die Mehrheit der Gliazellen im ZNS bilden, weisen neuromodulatorische Funktionen auf und produzieren Cytokine (Fellin 2009). Ein durch Gliazellen vermittelter Effekt von IFN- $\beta$  wurde von uns weitgehend ausgeschlossen, da in deren Abwesenheit in primärer Neuronenkultur trotzdem der IFN- $\beta$  induzierte Effekt auf den  $I_h$  dargestellt werden konnte. Für den IFN- $\beta$  induzierten Effekt ist also eine funktionierende Typ I IFN-Rezeptor Signalkaskade notwendig. Durch immunohistologische Untersuchungen konnte die Anwesenheit des Typ I IFN Rezeptors in neocortikalen Schicht 5 Pyramidenzellen (Stadler *et al.* 2014) überprüft und eine neuronale Relevanz unserer Ergebnisse weiter bestätigt werden.

## **Die Erhöhung der überschweligen Erregbarkeit ist an multiple Kanäle gebunden**

Eine Neuromodulation durch Typ I IFN habe ich in den vorangegangenen Abschnitten hinsichtlich der unterschwelligen Erregbarkeit diskutiert. Dabei haben wir als Erklärungsansatz vor allem die Erhöhung des Membranwiderstandes, die durch die Typ I IFN induzierte Modulation des  $I_h$  entsteht, postuliert (Hadjilambreva *et al.* 2005) und bestätigt (Stadler *et al.* 2014).

Zusätzlich steigerte IFN- $\beta$  die neuronale Erregbarkeit im überschweligen Bereich für neocortikale Pyramidenzellen der Schicht 5 (Hadjilambreva *et al.* 2005). Diese initiale Studie, die auch pharmakologische Hinweise auf eine Beteiligung des  $I_h$  an der Neuromodulation durch IFN- $\beta$  gab, stellte die Basis für unser *in silico* Modell dar.

Die Wirkung vom  $I_h$  verändert sich im Gewebe durch die Beeinflussung weiterer Kanäle. Durch die Depolarisation werden Kaliumströme aktiviert, die den Eingangswiderstand für Signale

verringern, was zu einer geringeren Auslenkung der Spannungsamplitude führt. Am Soma ist dafür der  $I_M$  (George *et al.* 2009) verantwortlich. Da eine IFN- $\beta$  Applikation sowohl den  $I_h$  (Stadler *et al.* 2014) als auch den  $I_M$  (Reetz *et al.* 2014) reduziert, trägt die Beeinflussung beider Ströme zur Steigerung der neuronalen Erregbarkeit durch IFN- $\beta$  bei.

Eine hypothesenfreie Simulation verschiedener einzelner und multipler Kanalmodulationen bestätigte die Idee der Beeinflussung vieler Ionenkanäle auf die neuronale Erregbarkeit (Reetz *et al.* 2014). Trotzdem ist das Modell als erstes Screening und nicht als exaktes Ionenkanalmodell der neocortikalen Pyramidenzellen zu verstehen. So wurden einige Kaliumkanäle, wie Kaliumkanäle mit 2 Porendomänen, zu einer Leckleitfähigkeit zusammengefasst, oder der Calcium abhängiger Kaliumkanal mit kleiner Leitfähigkeit (SK) und synaptische Leitfähigkeiten vernachlässigt. Trotz dieser Einschränkungen konnten die 2005 *ex vivo* beobachteten Änderungen in der Erregbarkeit reproduziert werden. *Whole cell* Untersuchungen an neocortikalen Pyramidenzellen der Schicht 5 unterstützten die *in silico* Ergebnisse. Neben einer Reduktion des  $I_h$  (Stadler *et al.* 2014) beobachteten wir auch eine Reduktion des  $I_M$  nach IFN- $\beta$  Applikation. Zusätzlich wurde die Wirkung durch die Messung der AHP bestätigt (Reetz *et al.* 2014), da diese sowohl vom  $I_M$  wie auch der  $I_h$  abhängt (Velumian *et al.* 1997). Mit unseren *in silico* und *ex vivo* Daten zeigen wir, dass Typ I IFN neben ihren vielzähligen Eigenschaften auch multiple neuronale Ionenkanäle moduliert, wodurch es zu einer deutlichen Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit kommt (Reetz *et al.* 2014). So stimmen unsere Daten mit früheren Erkenntnissen überein, dass kleine Änderungen von sensiblen Leitfähigkeiten einen großen Effekt ausüben (Goldman *et al.* 2001) und weiten diese auf das Säuger ZNS aus, wodurch ein klinisch relevanter Kontext entstehen könnte.

In unserem Modell üben diese beiden Ströme den scheinbar geringsten Einfluss auf die überschwellige Erregbarkeit aus. Um die Simulation weiter zu bestätigen, müssten wir die Untersuchung zur Typ I IFN Abhängigkeit auf  $I_{BK}$  und  $I_{Nap}$  ausweiten. Allerdings war die Erschließung des Mechanismus hinter dem IFN- $\beta$  Effekt von größerem Erkenntnisgewinn.

## Typ I Interferon-induzierte Kanalmodulationen sind PKC vermittelt

Auf der Suche nach einer möglichen Verbindung zwischen Typ I IFN und den beobachteten Kanalmodulation haben wir den Typ I IFN Signalweg genauer betrachtet. Für die einzelnen Bestandteile ist eine Neuromodulation nur für p38 bekannt. So wurde für hippocampale Zellen, ein Einfluss von p38 auf den  $I_h$  (Poolos *et al.* 2006), auf die Langzeitpotenzierung und damit auf die Neuroplastizität (Kelly *et al.* 2003) gezeigt.

Jedoch konnten wir die Aktivierung der p38MAPK durch Typ I IFN in neocortikalen Pyramidenzellen ausschließen, da diese bei einer IFN- $\beta$  Applikation nicht phosphoryliert wird (Stadler *et al.* 2014). Damit schlossen wir auch eine Beteiligung der MAPK induzierten Arachidonsäure (Fogle *et al.* 2007) aus. Dies führe ich auf eine unterschiedliche Aktivierung der Typ I IFN Signalweg Kompartimente in verschiedenen Zelltypen zurück.

Um den *ex vivo* IFN- $\beta$  Effekt (Hadjilambrea *et al.* 2005) in unserer Computersimulation nachzuahmen, war die abgestimmte Modulation des HCN1 vermittelten  $I_h$ , des  $I_M$ , des  $I_{BK}$  und des  $I_{Nap}$  notwendig, die alle über die PKC moduliert werden können (Reetz und Strauss 2013, Lee *et al.* 2010, Zhou *et al.* 2010, Curia *et al.* 2004). Die Ansicht wurde bekräftigt durch das Vorwissen, dass PKC durch Typ I IFN aktiviert wird (De Weerd und Nguyen 2012). Damit ergab sich als weitere mögliche Komponente des Typ I IFN Signalwegs die PKC.

Mit unserer Computersimulation haben wir eine Vielzahl von Studien zur PKC Wirkung auf die Einzelleitfähigkeit beziehungsweise Verschiebung der Strom-Spannungskurve verschiedener Ionenkanäle miteinander verbunden. Eine Modulation der neuronalen Erregbarkeit durch PKC erschien in der initialen Arbeit (Hadjilambrea *et al.* 2005) durch das Fehlen einer depolarisierten AP Spannungsschwelle (Astman *et al.* 1998) unwahrscheinlich. Erste Zweifel an dieser früheren Ansicht traten auf, da der *ex vivo* IFN- $\beta$  Effekt (Hadjilambrea *et al.* 2005) *in silico* nur nachgeahmt werden konnte, wenn die PKC abhängigen Ströme kombiniert moduliert wurden. Den Einwand, dass PKC eine depolarisierte AP-Spannungsschwelle, durch seinen Einfluss auf den  $I_{Nap}$ , verursacht (Astman *et al.* 1998) widerlegten wir durch unser *in silico*  $I_{Nap}$  Modell und durch unsere *ex vivo* Daten.

Den postulierten Einfluss einer PKC Aktivierung auf die neuronale Erregbarkeit bestätigte ich mittels Einwaschung zwei verschiedener PKC Aktivatoren 4 $\beta$ -PMA und Bryostatin1 (Reetz *et al.* 2014). Obwohl beide Aktivatoren an der C1 Domäne binden (Wu-Zhang und Newton 2013), zeigen sie leichte Unterschiede in ihren Eigenschaften, woher die geringen Abweichungen in den Änderungen der neuronalen Erregbarkeit zu erklären sind. Interessanterweise zeigt, trotz des im Modell berechneten geringen Einflusses von  $I_h$  auf die neuronale Erregbarkeit, die Applikation von IFN- $\beta$  eine, der PKC Aktivierung ähnlichen Wirkung (Stadler *et al.* 2014). Den postulierten Mechanismus hinter der Neuromodulation durch IFN- $\beta$  bestätigte ich durch pharmakologische Experimente. Dabei zeigte sich, dass nach einer vorangegangenen Inhibition der PKC, der IFN- $\beta$  Effekt auf die neuronale Erregbarkeit verhindert wird (Reetz *et al.* 2014).

Beide PKC Aktivatoren aktivieren sowohl die klassischen als auch die neuen PKC Isoformen (Sun und Alkon 2006). Der PKC Blocker GF109203X inhibiert hingegen alle drei Klassen der PKC Isoformen, agiert jedoch am effektivsten an den klassischen und neuen Isoformen (Wu-Zhang und Newton 2013). Dementsprechend nehmen wir an, dass die PKC Isoformen, die die neuronale Typ I IFN Wirkung vermitteln, zu den klassischen und/ oder neuen Isoformen gehören.

Wenn zur Ausübung des IFN- $\beta$  Effekts die PKC Aktivierung nötig ist, sollten der durch IFN- $\beta$  indirekt modulierbare  $I_h$  auch über eine direkte PKC Aktivierung beeinflusst werden. Widersprüchliche Angaben zum Effekt der PKC Aktivierung auf den HCN1 Kanal in Amphibienzellen (Fogle *et al.* 2007) veranlassten uns, aufgrund von vermuteten Unterschieden in den Expressionssystemen, den PKC Effekt auf den  $I_h$  in dem für uns relevanteren Säugerzellen untersuchten. Um zusätzlich die postulierte pathophysiologische Relevanz der Typ I IFN – Neuron Interaktion herzustellen und diese auf neuronale Relevanz hin zu untersuchen, weiteten wir unsere Messungen auf ein weiteres Kulturmodell, den

Neuroblastoma (N1E) Zellen auf (Reetz und Strauss 2013). Der dem im HEK293 Kulturmodell ähnlichen reduzierenden Effekt nach PKC Aktivierung zeigt, dass die PKC Wirkung nicht von spesiesabhängigen Unterschieden oder Unverträglichkeiten bedingt ist.

4 $\beta$ -PMA aktiviert neben PKC zusätzlich ERK sowie p38 (Simon *et al.* 1998), Akt/Protein Kinase B (PKB) (Kubohara und Hosaka 1999) oder Rac2 (Akasaki *et al.* 1999), die die Unterfamilien der MAPK bilden. Da eine Inhibierung der PKC in HEK293 Zellen eine Reduktion des  $I_h$  nach PKC Aktivierung durch 4 $\beta$ -PMA verhinderte (Reetz und Strauss 2013), schließe ich auf eine spezifische 4 $\beta$ -PMA induzierte PKC Aktivierung. Obwohl HCN1 Kanäle wahrscheinlich auch Phosphorylierungsstellen besitzen (Poolos *et al.* 2006), gilt eine direkte Phosphorylierung des Kanals als unwahrscheinlich, da der 4 $\beta$ -PMA Effekt auch nach Deletion der meisten cytoplasmatischen Serin, Threonin und Tyrosin Reste durch Mutagenese bestehen bleibt (Fogle *et al.* 2007).

Unterstützt wurde diese Sicht dadurch, dass im HEK293 Kulturmodell eine Reduktion des  $I_h$  nach PKC Aktivierung nur in *cell attached* und nicht in *whole cell* Messungen nachgewiesen werden konnte (Reetz und Strauss 2013), was zeigt, dass ein intaktes Zellinneres und somit intakte Signalkaskaden benötigt werden, die auf eine PKC Aktivierung entsprechend antworten können. Die Reduktion der maximalen  $I_h$  Amplitude ist somit auf die Wirkung der PKC und eine damit verbundene Aktivierung eines PKC vermittelten Signalweges zurückzuführen. Sowohl in HEK293 Zellen, als auch in N1E Zellen sind verschiedene PKC Isoformen exprimiert, wodurch die Anwesenheit verschiedener PKC Signalkaskaden sichergestellt ist. Zusätzlich zeigte sich, dass im humanen sowie im murinen Kulturmodell die biophysikalischen Eigenschaften der HCN1 Kanäle zu den neuronalen HCN Kanälen, aufgenommen im *cell attached* Modus am Dendriten hippocampaler sowie neocortikaler Pyramidenzellen, ähnlich sind bzw. übereinstimmen (Kole *et al.* 2006, Atkinson und Williams 2009, Dougherty *et al.* 2013). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten könnten die HEK293 und N1E Zellen Modellsystem für die weitere Klärung neuronaler Mechanismen von PKC Aktionen sein. Dennoch bieten vor allem Kulturmodelle viele Limitationen, da zum Beispiel bei der Transfektion von Kanälen zwar die Eigenschaften, jedoch nicht ihre eigentliche Auswirkungen im Organismus auf zellulärer und molekularer Ebene genauer untersucht werden können.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Arbeiten, dass Typ I IFN als Ionenkanalmodulator in neocortikalen Pyramidenzellen der Schicht 5 wirken und dass diese Modulation der verschiedenen Ionenkanäle über die Aktivierung der PKC induziert wird. Somit können andere PKC vermittelte neuronale Effekte, wie das Verhindern der Regeneration von verletzten Axonen (Wang *et al.* 2014) oder die Kontrolle der dendritischen Verzweigung während der Entwicklung (Garrett *et al.* 2012) ausgehend von unseren Studien, mit der Wirkung und dem Rezeptorsignalweg von Typ I IFN verbunden werden.

## Ausblick

Die Ergebnisse der dargestellten Arbeiten zeigen die PKC als Bindeglied zwischen Ionenkanalmodulation und Typ I IFN Signalweg. Die Ergebnisse sind klinisch bedeutsam, da wir die PKC Aktivierung als einheitlichen Mechanismus für das neuromodulatorische Potential von Typ I IFN in neocortikalen Neuronen sehen. Derzeit besteht noch keine konkrete Anwendung aber unsere Studien fördern das Verständnis der Regulation neuronaler Antworten über Cytokine während einer Entzündung des ZNS. Einige Fragen blieben jedoch unbeantwortet oder haben sich aus den Ergebnissen ergeben. So könnten weitere Versuchsansätze lauten:

- Weisen die verbleibenden PKC abhängigen Kanäle, die in der Computersimulation als die mit dem entscheidenden Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit genannt wurden, ebenfalls eine Modulierbarkeit durch IFN- $\beta$  auf?
- Welche PKC Isoformen bedingen den IFN- $\beta$  induzierten Effekt?
- Bestehen zelluläre bzw. subzelluläre Unterschiede?
- Können die Ergebnisse mit Typ II IFN, IFN- $\gamma$  reproduziert werden?

Der erste Versuchsansatz dient der Überprüfung und Bestätigung der Computersimulation. Falls es zwischen den *ex vivo* und *in silico* Analysen zu Diskrepanzen kommen sollte, wäre ein Erklärungspunkt die nicht eingearbeiteten Kanäle, die möglicherweise eine größere Rolle in der Beeinflussung der neuronalen Erregbarkeit spielen als jetzt vermutet. Zum anderen könnte auch eine Modulation der synaptischen Ionenkanäle stattfinden. Da für IFN- $\beta$  bereits gezeigt wurde, dass nach einer IFN- $\beta$  Behandlung von 3 Stunden die Synthese der Transportproteine Clathrin B und Amphiphysin 2 hochreguliert ist (Beyer et al. 2009) könnten zusätzlich Analysen zur synaptischen Übertragungsfunktion weitere Hinweise auf andere Modulationsarten geben.

Der zweite Versuchsansatz würde eine spezifische Inhibition einzelner PKC Isoformen gewährleisten. PKC ist an vielzähligen Signalkaskaden und zellulären Prozessen beteiligt, sodass eine unspezifische Inhibition das Risiko einer Dysregulation beinhalten würde, d. h. andere wichtige und nicht involvierte Prozesse beeinflusst werden könnten (Wu-Zhang und Newton 2013). PKC ist auch in kognitive Prozesse involviert, wobei das Fehlen von PKC Signalkaskaden in Neuronen bei frühen Veränderung des Gehirns von Alzheimer Patienten festgestellt wurde. Dadurch wird die Aktivierung der PKC als möglicher Therapieansatz bei Demenz gesehen (Sun und Alkon 2012). Unsere Daten zeigen, dass durch die PKC Aktivierung der Typ I IFN Effekt auf Neurone vermittelt wird. Die Kommunikation von Typ I IFN mit dem ZNS verursacht Symptome des *sickness behaviour* (Dantzer et al. 2008), die bei ihrem Einsatz bei Krebserkrankung und Hepatitis, sowie in der Therapie von Multipler Sklerose bis zum Abbruch der Behandlung führen können. Diese Kommunikation und die daraus resultierenden Nebenwirkungen des *sickness behaviour* könnte man durch spezifische Inhibition der beteiligten PKC und dem daraus resultierenden Ausbleiben des Typ I IFN Effekts auf Neurone abschwächen bzw. unterbinden. Da jedoch eine unspezifische Inhibition schwerwiegende

Folgen für den Patienten haben könnte, wie unter anderem die Ausbildung einer Alzheimer Demenz, würde das Wissen über die spezifisch involvierten PKC Isoformen im Typ I IFN Signalweg die Möglichkeit ergeben, gezielt therapeutische Regime zu entwickeln, um die unerwünschten Nebenwirkungen eindämmen zu können.

Der dritte Versuchsansatz wäre für den therapeutischen Bezug eine wichtige Voraussetzung. Bis jetzt gelten unsere Ergebnisse nur für neocortikalen Pyramidenzellen der Schicht 5. Da allerdings die Funktions- und Wirkweise vieler Modulatoren sich in den verschiedenen Zelltypen unterscheiden, wäre ein bedeutender Erkenntnisgewinn, die Erweiterung unser Resultate auf andere wichtige Zelltypen.

Der vierte Versuchsansatz würde unsere Ergebnisse auf Typ II IFN erweitern. Obwohl die unterschiedlichen Typen von IFN an ihre spezifischen Rezeptoren binden, haben sie sehr ähnliche Signalwege und desweiteren gibt es Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung (Gough et al. 2010). Zusätzlich ist bekannt, dass in anderen Zelltypen eine STAT1 Phosphorylierung induziert durch Typ II IFN über PKC vermittelt ist (Hald et al. 2013), wodurch ein ähnliches Verhalten von Typ II IFN auf die neuronale Erregbarkeit denkbar ist. Somit gäben Analysen von Typ II IFN darüber Aufschluss, ob eine vergleichbare Neuromodulation stattfindet und somit ein unitärer Mechanismus bei der Regulation gültig ist.

## Literaturverzeichnis

Akasaki, T., H. Koga und H. Sumimoto (1999). "Phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent activation of the small GTPase Rac2 in human neutrophils." J Biol Chem **274**(25): 18055-18059.

Antonelli, G. (2008). "Biological basis for a proper clinical application of alpha interferons." New Microbiol **31**(3): 305-318.

Astman, N., M. J. Gutnick und I. A. Fleidervish (1998). "Activation of protein kinase C increases neuronal excitability by regulating persistent Na<sup>+</sup> current in mouse neocortical slices." J.Neurophysiol. **80**(3): 1547-1551.

Atkinson, S. E. und S. R. Williams (2009). "Postnatal development of dendritic synaptic integration in rat neocortical pyramidal neurons." J.Neurophysiol. **102**(2): 735-751.

Azevedo, F. A., L. R. Carvalho, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, R. E. Ferretti, R. E. Leite, W. Jacob Filho, R. Lent und S. Herculano-Houzel (2009). "Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain." J Comp Neurol **513**(5): 532-541.

Bekisz, J., H. Schmeisser, J. Hernandez, N. D. Goldman und K. C. Zoon (2004). "Human interferons alpha, beta and omega." Growth Factors **22**(4): 243-251.

Benhassine, N. und T. Berger (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 T. Berger (2009). "Large-conductance calcium-dependent potassium channels prevent dendritic excitability in neocortical pyramidal neurons." Pflugers Arch. **457**(5): 1133-1145.

Bettler, B., K. Kaupmann, J. Mosbacher und M. Gassmann (2004). "Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors." Physiol Rev **84**(3): 835-867.

Beyer, S., G. Raether, K. Stadler, R. Hoffrogge, C. Scharf, A. Rolfs, E. Mix und U. Strauss (2009). "Interferon-beta modulates protein synthesis in the central nervous system." J.Neuroimmunol.

Brodmann, K. (1909). "Brodmann's Localisation in the Cerebral Cortex The Principles of Comparative Localisation in the Cerebral Cortex Based on Cytoarchitectonics." Dritte Auflage, Springer Science + Business Media, Inc.

Bruns, R. F., F. D. Miller, R. L. Merriman, J. J. Howbert, W. F. Heath, E. Kobayashi, I. Takahashi, T. Tamaoki und H. Nakano (1991). "Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light-dependent." Biochem Biophys Res Commun **176**(1): 288-293.

Calejo, A. I., M. Reverendo, V. S. Silva, P. M. Pereira, M. A. Santos, R. Zorec und P. P. Goncalves (2014). "Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues: sources and implications." Mol Biol Rep **41**(1): 297-307.

Cathala, L. und D. Paupardin-Tritsch (1997). "Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway." J.Physiol **503 ( Pt 1)**: 87-97.

Chen, S., J. Wang und S. A. Siegelbaum (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 D. Johnston (2004). "Properties of single voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in dendrites of CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus." J.Physiol **559**(Pt 1): 187-203.
- Chen, X., S. Shu, D. P. Kennedy, S. C. Willcox und D. A. Bayliss (2009). "Subunit-specific effects of isoflurane on neuronal Ih in HCN1 knockout mice." J.Neurophysiol. **101**(1): 129-140.
- Cooper, E. C., E. Harrington, Y. N. Jan und L. Y. Jan (2001). "M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain." J Neurosci **21**(24): 9529-9540.
- Curia, G., P. Aracri, G. Sancini, M. Mantegazza, G. Avanzini und S. Franceschetti (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.
- D'Arcangelo, G., F. Grassi, D. Ragozzino, A. Santoni, V. Tancredi und F. Eusebi (1991). "Interferon inhibits synaptic potentiation in rat hippocampus." Brain Res. **564**(2): 245-248.
- Dantzer, R., J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson und K. W. Kelley (2008). "From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain." Nat.Rev.Neurosci. **9**(1): 46-56.
- De Weerd, N. A. und T. Nguyen (2012). "The interferons and their receptors--distribution and regulation." Immunol Cell Biol **90**(5): 483-491.
- De Weerd, N. A., S. A. Samarajiva und P. J. Hertzog (2007). "Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions." J Biol Chem **282**(28): 20053-20057.
- Delhaye, S., S. Paul, G. Blakqori, M. Minet, F. Weber, P. Staeheli und T. Michiels (2006). "Neurons produce type I interferon during viral encephalitis." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A **103**(20): 7835-7840.
- DiFrancesco, J. C., A. Barbuti, R. Milanese, S. Coco, A. Bucchi, G. Bottelli, C. Ferrarese, S. Franceschetti, B. Terragni, M. Baruscotti und D. DiFrancesco (2011). "Recessive loss-of-function mutation in the pacemaker HCN2 channel causing increased neuronal excitability in a patient with idiopathic generalized epilepsy." J Neurosci **31**(48): 17327-17337.
- Dougherty, K. A., D. A. Nicholson, L. Diaz, E. W. Buss, K. M. Neuman, D. M. Chetkovich und D. Johnston (2013). "Differential expression of HCN subunits alters voltage-dependent gating of h-channels in CA1 pyramidal neurons from dorsal and ventral hippocampus." J Neurophysiol **109**(7): 1940-1953.
- Douglas, R. J. und K. A. Martin (2004). "Neuronal circuits of the neocortex." Annu Rev Neurosci **27**: 419-451.
- Farrant, M. und Z. Nusser (2005). "Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors." Nat Rev Neurosci **6**(3): 215-229.
- Fellin, T. (2009). "Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity." J Neurochem **108**(3): 533-544.
- Florio, M. und W. B. Huttner (2014). "Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex." Development **141**(11): 2182-2194.
- Fogle, K. J., A. K. Lyashchenko, H. K. Turbendian und G. R. Tibbs (2007). "HCN pacemaker channel activation is controlled by acidic lipids downstream of diacylglycerol kinase and phospholipase A2." J Neurosci **27**(11): 2802-2814.
- Franceschetti, S., S. Taverna, G. Sancini, F. Panzica, R. Lombardi und G. Avanzini (2000). "Protein kinase C-dependent modulation of Na<sup>+</sup> currents increases the excitability of rat neocortical pyramidal neurones." J Physiol **528 Pt 2**: 291-304.

- Galic, M. A., K. Riazi und Q. J. Pittman (2012). "Cytokines and brain excitability." Front Neuroendocrinol **33**(1): 116-125.
- Garrett, A. M., D. Schreiner, M. A. Lobas und J. A. Weiner (2012). "gamma-protocadherins control cortical dendrite arborization by regulating the activity of a FAK/PKC/MARCKS signaling pathway." Neuron **74**(2): 269-276.
- George, M. S., L. F. Abbott and S. A. Siegelbaum (2009). "HCN hyperpolarization-activated cation channels inhibit EPSPs by interactions with M-type K(+) channels." Nat.Neurosci. **12**(5): 577-584.
- George, P. M., R. Badiger, W. Alazawi, G. R. Foster und J. A. Mitchell (2012). "Pharmacology and therapeutic potential of interferons." Pharmacol Ther **135**(1): 44-53.
- Godbout, J. P. und R. Glaser (2006). "Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer." J Neuroimmune Pharmacol **1**(4): 421-427.
- Goldman, M. S., J. Golowasch, E. Marder und L. F. Abbott (2001). "Global structure, robustness, and modulation of neuronal models." J.Neurosci. **21**(14): 5229-5238.
- Gough, D. J., N. L. Messina, L. Hii, J. A. Gould, K. Sabapathy, A. P. Robertson, J. A. Trapani, D. E. Levy, P. J. Hertzog, C. J. Clarke und R. W. Johnstone (2010). "Functional crosstalk between type I and II interferon through the regulated expression of STAT1." PLoS Biol **8**(4): e1000361.
- Gu, N., K. Vervaeke, H. Hu und J. F. Storm (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.
- Guarda, G., M. Braun, F. Staehli, A. Tardivel, C. Mattmann, I. Forster, M. Farlik, T. Decker, R. A. Du Pasquier, P. Romero und J. Tschopp (2011). "Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation." Immunity **34**(2): 213-223.
- Hadjilambrea, G., E. Mix, A. Rolfs, J. Muller und U. Strauss (2005). "Neuromodulation by a cytokine: interferon-beta differentially augments neocortical neuronal activity and excitability." J.Neurophysiol. **93**(2): 843-852.
- Hald, A., R. M. Andres, M. L. Salskov-Iversen, R. B. Kjellerup, L. Iversen und C. Johansen (2013). "STAT1 expression and activation is increased in lesional psoriatic skin." Br J Dermatol **168**(2): 302-310.
- He, C., F. Chen, B. Li und Z. Hu (2014). "Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations." Prog Neurobiol **112**: 1-23.
- Herrmann, S., S. Schnorr und A. Ludwig (2015). "HCN Channels-Modulators of Cardiac and Neuronal Excitability." Int J Mol Sci **16**(1): 1429-1447.
- Hofer, M. J. und I. L. Campbell (2013). "Type I interferon in neurological disease-the devil from within." Cytokine Growth Factor Rev **24**(3): 257-267.
- Hoshi, N., L. K. Langeberg, C. M. Gould, A. C. Newton und J. D. Scott (2010). "Interaction with AKAP79 modifies the cellular pharmacology of PKC." Mol Cell **37**(4): 541-550.
- Hoyo-Becerra, C., J. F. Schlaak und D. M. Hermann (2014). "Insights from interferon-alpha-related depression for the pathogenesis of depression associated with inflammation." Brain Behav Immun **42**: 222-231.
- Huang, Z. J. (2006). "GABAB receptor isoforms caught in action at the scene." Neuron **50**(4): 521-524.

Hutcheon, B. und Y. Yarom (2000). "Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons." Trends in Neurosciences **23**(5): 216-222.

Ivashkiv, L. B. und L. T. Donlin (2014). "Regulation of type I interferon responses." Nat Rev Immunol **14**(1): 36-49.

Johnston, D. und S. M. Wu (1994). "Foundations of Cellular Neurophysiology" Gebundene Ausgabe (Bradford Books), MIT Press.

Kelly, A., E. Vereker, Y. Nolan, M. Brady, C. Barry, C. E. Loscher, K. H. Mills und M. A. Lynch (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.

Kiss, T. (2008). "Persistent Na-channels: origin and function. A review." Acta Biol Hung **59 Suppl**: 1-12.

Kobayashi, E., H. Nakano, M. Morimoto und T. Tamaoki (1989). "Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C." Biochem Biophys Res Commun **159**(2): 548-553.

Kole, M. H., S. Hallermann und G. J. Stuart (2006). "Single I-h channels in pyramidal neuron dendrites: Properties, distribution, and impact on action potential output." Journal of Neuroscience **26**(6): 1677-1687.

Kole, M. H., S. U. IIschner, B. M. Kampa, S. R. Williams, P. C. Ruben und G. J. Stuart (2008). "Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment." Nat. Neurosci. **11**(2): 178-186.

Koller, H., M. Siebler und H. P. Hartung (1997). "Immunologically induced electrophysiological dysfunction: implications for inflammatory diseases of the CNS and PNS." Prog Neurobiol **52**(1): 1-26.

Kubohara, Y. und K. Hosaka (1999). "The putative morphogen, DIF-1, of Dictyostelium discoideum activates Akt/PKB in human leukemia K562 cells." Biochem Biophys Res Commun **263**(3): 790-796.

Kumar, S. S., A. Bacci, V. Kharazia und J. R. Huguenard (2002). "A developmental switch of AMPA receptor subunits in neocortical pyramidal neurons." J Neurosci **22**(8): 3005-3015.

Larkum, M. E., T. Nevian, M. Sandler, A. Polsky und J. Schiller (2009). "Synaptic integration in tuft dendrites of layer 5 pyramidal neurons: a new unifying principle." Science **325**(5941): 756-760.

Lee, S. Y., H. K. Choi, S. T. Kim, S. Chung, M. K. Park, J. H. Cho, W. K. Ho und H. Cho (2010). "Cholesterol inhibits M-type K<sup>+</sup> channels via protein kinase C-dependent phosphorylation in sympathetic neurons." J Biol Chem **285**(14): 10939-10950.

Lichtblau, N., F. M. Schmidt, R. Schumann, K. C. Kirkby und H. Himmerich (2013). "Cytokines as biomarkers in depressive disorder: current standing and prospects." Int Rev Psychiatry **25**(5): 592-603.

Ludwig, A., T. Budde, J. Stieber, S. Moosmang, C. Wahl, K. Holthoff, A. Langebartels, C. Wotjak, T. Munsch, X. G. Zong, S. Feil, R. Feil, M. Lancel, K. R. Chien, A. Konnerth, H. C. Pape, M. Biel und F. Hofmann (2003). "Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2." Embo Journal **22**(2): 216-224.

Macri, V., D. Angoli und E. A. Accili (2012). "Architecture of the HCN selectivity filter and control of cation permeation." Sci Rep **2**: 894.

- Magee, J. C. und D. Johnston (2005). "Plasticity of dendritic function." Curr Opin Neurobiol **15**(3): 334-342.
- Marcelin, B., L. Chauviere, A. Becker, M. Migliore, M. Esclapez und C. Bernard (2009). "h channel-dependent deficit of theta oscillation resonance and phase shift in temporal lobe epilepsy." Neurobiol.Dis. **33**(3): 436-447.
- Martiny-Baron, G., M. G. Kazanietz, H. Mischak, P. M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marme und C. Schachtele (1993). "Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976." J Biol Chem **268**(13): 9194-9197.
- McAfoose, J. und B. T. Baune (2009). "Evidence for a cytokine model of cognitive function." Neurosci.Biobehav.Rev. **33**(3): 355-366.
- Mehta, S., S. Mukherjee, D. Balasubramanian und A. Chowdhary (2014). "Evaluation of neuroimmunomodulatory activity of recombinant human interferon alpha." Neuroimmunomodulation **21**(5): 250-256.
- Metzger, F. und J. P. Kapfhammer (2003). "Protein kinase C: its role in activity-dependent Purkinje cell dendritic development and plasticity." Cerebellum **2**(3): 206-214.
- Moll, H. P., T. Maier, A. Zommer, T. Lavoie und C. Brostjan (2011). "The differential activity of interferon-alpha subtypes is consistent among distinct target genes and cell types." Cytokine **53**(1): 52-59.
- Much, B., C. Wahl-Schott, X. Zong, A. Schneider, L. Baumann, S. Moosmang, A. Ludwig und M. Biel (2003). "Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels." J.Biol.Chem. **278**(44): 43781-43786.
- Müller, M., A. Fontana, G. Zbinden und B. H. Gähwiler (1993). "Effects of interferons and hydrogen peroxide on CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures." Brain Res. **619**(1-2): 157-162.
- Neher, E. (1998). "Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release." Neuron **20**(3): 389-399.
- Nolan, M. F., G. Malleret, K. H. Lee, E. Gibbs, J. T. Dudman, B. Santoro, D. Q. Yin, R. F. Thompson, S. A. Siegelbaum, E. R. Kandel und A. Morozov (2003). "The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells." Cell **115**(5): 551-564.
- Notomi, T. und R. Shigemoto (2004). "Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain." J.Comp Neurol. **471**(3): 241-276.
- Owens, T., R. Khorrooshi, A. Wlodarczyk und N. Asgari (2014). "Interferons in the central nervous system: a few instruments play many tunes." Glia **62**(3): 339-355.
- Pasieka, T. J., L. Collins, M. A. O'Connor, Y. Chen, Z. M. Parker, B. L. Berwin, D. R. Pivnicka-Worms und D. A. Leib (2011). "Bioluminescent imaging reveals divergent viral pathogenesis in two strains of Stat1-deficient mice, and in alphassgamma interferon receptor-deficient mice." PLoS One **6**(9): e24018.
- Pestka, S. (2007). "The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn." J.Biol.Chem. **282**(28): 20047-20051.
- Pian, P., A. Bucchi, R. B. Robinson und S. A. Siegelbaum (2006). "Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP<sub>2</sub>." J.Gen.Physiol **128**(5): 593-604.

Piehler, J., C. Thomas, K. C. Garcia und G. Schreiber (2012). "Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation." Immunol Rev **250**(1): 317-334.

Platanias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." Nat.Rev.Immunol. **5**(5): 375-386.

Poolos, N. P. (2004). "The Yin and Yang of the H-Channel and Its Role in Epilepsy." Epilepsy Curr. **4**(1): 3-6.

Poolos, N. P., J. B. Bullis und M. K. Roth (2006). "Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase." J.Neurosci. **26**(30): 7995-8003.

Prinz, M., H. Schmidt, A. Mildner, K. P. Knobloch, U. K. Hanisch, J. Raasch, D. Merkler, C. Detje, I. Gutcher, J. Mages, R. Lang, R. Martin, R. Gold, B. Becher, W. Bruck und U. Kalinke (2008). "Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system." Immunity **28**(5): 675-686.

Redig, A. J., A. Sassano, B. Majchrzak-Kita, E. Katsoulidis, H. Liu, J. K. Altman, E. N. Fish, A. Wickrema und L. C. Platanias (2009). "Activation of protein kinase C{eta} by type I interferons." J Biol Chem **284**(16): 10301-10314.

Reetz, O., K. Stadler und U. Strauss (2014). "Protein kinase C activation mediates interferon-beta-induced neuronal excitability changes in neocortical pyramidal neurons." J Neuroinflammation **11**: 185.

Reetz, O. und U. Strauss (2013). "Protein kinase C activation inhibits rat and human hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel (HCN)1--mediated current in mammalian cells." Cell Physiol Biochem **31**(4-5): 532-541.

Rosse, C., M. Linch, S. Kermorgant, A. J. Cameron, K. Boeckeler und P. J. Parker (2010). "PKC and the control of localized signal dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(2): 103-112.

Santoro, B., S. Chen, A. Luthi, P. Pavlidis, G. P. Shumyatsky, G. R. Tibbs und S. A. Siegelbaum (2000). "Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS." J.Neurosci. **20**(14): 5264-5275.

Savarin, C. und C. C. Bergmann (2008). "Neuroimmunology of central nervous system viral infections: the cells, molecules and mechanisms involved." Curr Opin Pharmacol **8**(4): 472-479.

Simon, C., H. Goepfert und D. Boyd (1998). "Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion." Cancer Res **58**(6): 1135-1139.

Soh, H., Z. Niday und A. V. Tzingounis (2014). "Cortical KCNQ2/3 channels; insights from knockout mice." Channels (Austin) **8**(5): 389-390.

Son, Y. K., H. Hong da, D. J. Kim, A. L. Firth und W. S. Park (2011). "Direct effect of protein kinase C inhibitors on cardiovascular ion channels." BMB Rep **44**(9): 559-565.

Spruston, N. (2008). "Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration." Nat.Rev.Neurosci. **9**(3): 206-221.

Stadler, K., C. Bierwirth, L. Stoenica, A. Battefeld, O. Reetz, E. Mix, S. Schuchmann, T. Velmans, K. Rosenberger, A. U. Brauer, S. Lehnardt, R. Nitsch, M. Budt, T. Wolff, M. H. Kole und U. Strauss (2014). "Elevation in type I interferons inhibits HCN1 and slows cortical neuronal oscillations." Cereb Cortex **24**(1): 199-210.

Stafstrom, C. E. (2007). "Persistent sodium current and its role in epilepsy." Epilepsy Curr **7**(1): 15-22.

Strauss, U., M. H. P. Kole, A. U. Brauer, J. Pahnke, R. Bajorat, A. Rolfs, R. Nitsch und R. A. Deisz (2004). "An impaired neocortical I-h is associated with enhanced excitability and absence epilepsy." European Journal of Neuroscience **19**(11): 3048-3058.

Sun, M. K. und D. L. Alkon (2006). "Bryostatin-1: pharmacology and therapeutic potential as a CNS drug." CNS Drug Rev **12**(1): 1-8.

Sun, M. K. und D. L. Alkon (2012). "Activation of protein kinase C isozymes for the treatment of dementias." Adv Pharmacol **64**: 273-302.

Uddin, S., A. Sassano, D. K. Deb, A. Verma, B. Majchrzak, A. Rahman, A. B. Malik, E. N. Fish und L. C. Plataniias (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 J. Tytgat (2001). "Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels." J.Biol.Chem. **276**(9): 6069-6072.

Ulrich, D. (2003). "Differential arithmetic of shunting inhibition for voltage and spike rate in neocortical pyramidal cells." European Journal of Neuroscience **18**(8): 2159-2165.

Velumian, A. A., L. Zhang, P. Pennefather und P. L. Carlen (1997). "Reversible inhibition of IK, IAHP, Ih and ICa currents by internally applied gluconate in rat hippocampal pyramidal neurones." Pflugers Arch. **433**(3): 343-350.

Viviani, B. und M. Boraso (2011). "Cytokines and neuronal channels: a molecular basis for age-related decline of neuronal function?" Exp Gerontol **46**(2-3): 199-206.

Wahl-Schott, C. und M. Biel (2009). "HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function." Cell Mol.Life Sci. **66**(3): 470-494.

Wang, X., J. Hu, Y. She, G. M. Smith und X. M. Xu (2014). "Cortical PKC inhibition promotes axonal regeneration of the corticospinal tract and forelimb functional recovery after cervical dorsal spinal hemisection in adult rats." Cereb Cortex **24**(11): 3069-3079.

Waters, J., A. Schaefer und B. Sakmann (2005). "Backpropagating action potentials in neurones: measurement, mechanisms and potential functions." Prog Biophys Mol Biol **87**(1): 145-170.

Welch, E. J., B. W. Jones und J. D. Scott (2010). "Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes." Mol Interv **10**(2): 86-97.

Wu-Zhang, A. X. und A. C. Newton (2013). "Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox." Biochem J **452**(2): 195-209.

Yi, B. R., N. H. Kang, K. A. Hwang, S. U. Kim, E. B. Jeung und K. C. Choi (2011). "Antitumor therapeutic effects of cytosine deaminase and interferon-beta against endometrial cancer cells using genetically engineered stem cells in vitro." Anticancer Res **31**(9): 2853-2861.

Zhou, X., J. Wei, M. Song, K. Francis und S. P. Yu (2011). "Novel role of KCNQ2/3 channels in regulating neuronal cell viability." Cell Death Differ **18**(3): 493-505.

Zhou, X. B., I. Wulfsen, E. Utku, U. Sausbier, M. Sausbier, T. Wieland, P. Ruth und M. Korth (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 Ca<sup>2+</sup> action potentials in adult rat tuft dendrites." J.Physiol **526 Pt 3**: 571-587.

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis und *engl. Fachvokabular*

AHP	<i>Afterhyperpolarization</i> – Nachhyperpolarisation
AKAP	A-Kinase Anker Protein
AMPA	A-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-(Isoxazol) Propionat
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5-Triphosphat
<i>backpropagation</i>	Retrograde Leitung eines APs in den Dendriten
BK	Calcium abhängiger Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
<i>cell attached</i>	Elektrophysiologische Messkonfiguration bei der die Pipette mit der intakten Zellmembran verbunden ist.
CNBD	Zyklische Nukleotidbindungsdomäne
DAG	Diacylglycerol
EEG	Elektroenzephalografie
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERK	Extrazelluläre signalregulierende Kinase
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAS	Gamma aktivierende Sequenz
HCN	<i>Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel</i> – hyperpolarisationsaktivierte, von cyclischen Nukleotiden modulierter Kanal
HEK293	<i>Human embryonic kidney cells</i> – menschliche embryonale Nierenzellen
$I_h$	Durch HCN Kanalöffnung entstehender Strom
$I_{BK}$	Durch BK Kanalöffnung entstehender Strom
IFN	Interferon
IFNR1 (IFNR2)	Interferonrezeptorkomplex 1 (Interferonrezeptorkomplex 2)
IL-1, IL-6	Interleukin
$I_M$	M-Typ Kaliumkanal Strom
$I_{Nap}$	Persistierender Natriumkanalstrom
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
IRF9	IFN-Regulationsfaktor 9
ISGF3	IFN-stimulierende Gen Faktor 3
ISRE	IFN-stimulierendes Antwort Element
JAK1	Janus-Kinase-1

KCNQ	<i>Potassium voltage-gated channel</i> - Spannungsabhängiger Kalium Kanal
<i>Knock out</i>	Deaktivierung eines Gens im Organismus
LTP	Langzeit-Potentierung
p38MAPK	p38-mitogen-aktivierte Protein Kinase
NMDA	N-methyl D-aspartat
N1E	Neuroblastomazellen
OAG	Oleoacetylglycerol
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PI3K	Phosphoinositol 3-kinase
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
4 $\beta$ -PMA	4 $\beta$ -Phorbol 12 myristat 13-acetat
RMP	Ruhemembranpotential
SK	Calcium abhängige Kaliumkanal mit kleiner Leitfähigkeit
<i>sickness behaviour</i>	Einer Infektion angepasste Verhaltensveränderung
<i>spines</i>	Dornenartige Strukturen am Dendriten
STAT	Signal transducer and activator of transcription (Transkriptionsfaktoren)
STP	Kurzzeit Potentierung
TMD	Transmembrandomäne
TMEV	Theiler murinen encephalomyelitis Virus
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tyk2	Tyrosin Kinase 2
V <sub>1/2</sub>	Halbe Aktivierungsspannung
<i>whole cell</i>	Elektrophysiologische Messkonfiguration bei der mit der Pipette die darunter liegende Zellmembran aufgerissen wird.
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Struktur einer HCN Kanaluntereinheit
Abbildung 2	Komplexbildung und Signalwege vom Typ I IFN Rezeptor

## Publikationsliste mit Stellungnahme zur erbrachten Einzelleistung

Stadler, K., C. Bierwirth, L. Stoenica, A. Bettefeld, O. **Reetz**, E. Mix, S. Schuchmann, T. Velmans, K. Rosenberger, A. U. Brauer, S. Lehnardt, R. Nitsch, M. Budt, T. Wolff, M. H. Kole und U. Strauss (2014). "Elevation in type I interferons inhibits HCN1 and slows cortical neuronal oscillations." Cereb Cortex **24**(1): 199-210.

**Erbrachte Einzelleistung:** Mitarbeit bei der Planung und Durchführung der TMEV Versuche. Elektrophysiologische Messungen von HEK293 Zellen (HCN1/2 mit IFN- $\beta$ ) und neocortikalen Pyramidenzellen der Schicht 5 ( $I_h$  Kontrollmessungen). Auswerten der von mir erhobenen Daten und grafische Darstellung für die Publikation. Mitarbeit an der Publikation

**Reetz**, O. und U. Strauss (2013). "Protein kinase C activation inhibits rat and human hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated channel (HCN)1--mediated current in mammalian cells." Cell Physiol Biochem **31**(4-5): 532-541.

**Erbrachte Einzelleistung:** Planung und Durchführung der Experimente, sowie die komplette Auswertung und die grafische Darstellung für die Publikation. Publikationserstellung

**Reetz**, O., K. Stadler und U. Strauss (2014). "Protein kinase C activation mediates interferon-beta-induced neuronal excitability changes in neocortical pyramidal neurons." J Neuroinflammation **11**: 185.

**Erbrachte Einzelleistung:** Planung und Durchführung der Experimente zum Einfluss von 4 $\beta$ -PMA und Bryostatin1 auf die neuronale Erregbarkeit, sowie der Blockerexperimente. Die Berechnung der AHP und AP Schwellen (exklusive des Modells). Auswertung der von mir erhobenen Daten sowie die komplette grafische Darstellung. Mitarbeit an der Publikation

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht verfügbar

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die einen direkten oder auch indirekten Anteil am Zustandekommen der Arbeit hatten.

Ulf Strauß danke ich für die Vergabe des Themas, die fachliche Betreuung und die immerwährende Diskussionsbereitschaft. Konstantin Stadler danke ich für Unterstützung zu Beginn der Doktorarbeit und Anja Bräuer für die Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen bei molekularbiologischen Fragestellungen. Julia König und Rike Dannenberg danke ich für die Unterstützung im molekularbiologischen Labor und für die Gesellschaft beim Mittagessen.

Frau Prof. Constance Scharff danke ich für die Diskussionsbereitschaft und für die Begutachtung meiner Arbeit.

Ein großer Dank geht an die DFG und Sonnenfeld-Stiftung, durch deren finanzielle Unterstützung es mir möglich gemacht wurde, die Arbeit zu stellen.

Und zu guter Letzt, danke ich meinen Freunden und vor allem meiner Familie, die mich während dieser aufreibenden Zeit immer unterstützt haben.

## Eidesstaatliche Erklärung

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

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel:

*Die Protein Kinase C als Bindeglied von Ionenkanalmodulation und Interferon Signalweg*

*– über den Protein Kinase C vermittelten Einfluss auf die überschwellige Erregbarkeit und den hyperpolarisationsaktivierten unselektiven Kationenstroms ( $I_h$ ) –*

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und das ich meine Dissertation, im Falle einer Ablehnung, nur mit dem Hinweis auf diese Ablehnung für ein anderes Examen verwenden werde.

Berlin, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Olivia Reetz