

Aus dem
CharitéCentrum für Grundlagenmedizin
Centrum für Anatomie
Institut für Zell- und Neurobiologie
Charité Campus Mitte
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Kommissarische Direktoren:
Prof. Dr. Anja Bräuer / Prof. Dr. Viktor Tarabykin

Habilitationsschrift

Der hyperpolarisationsaktivierte unselektive Kationenstrom I_h als Determinante neuronaler Erregbarkeit

Zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach

Anatomie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von

Dr. med. Ulf Strauß
geboren am 17.04.1968 in Schwerin

Eingereicht:	09/2010
Dekanin:	Prof. Dr. Anette Grüters-Kieslich
1. Gutachter	Prof. Dr. Heiko Luhmann
2. Gutachter	Prof. Dr. Dr. Oliver Ullrich

*In Wahrheit heißt etwas wollen, ein Experiment machen, um zu erfahren, was wir können;
darüber kann uns allein der Erfolg oder Misserfolg belehren.*

Friedrich Nietzsche

Inhaltsverzeichnis*

Abkürzungen	4
1. Einleitung.....	5
1.1. Molekulare Identität der <i>h</i> -Kanäle	5
1.2. Modifikation der <i>h</i> /HCN-Kanäle	7
1.3. Das Zentralnervensystem und <i>h</i> /HCN Kanäle	8
2. HCN1 mediierte Ströme – Charakteristika und Besonderheiten	10
3. <i>h</i>/HCN mediierte Ströme bei Erkrankungen des ZNS.....	13
3.1. Entzündliche ZNS-Erkrankungen.....	13
3.2. HCN und Epilepsie.....	18
3.2.1. <i>Absence-Epilepsie und neocorticaler I_h</i>	19
3.2.2. <i>Effekte perinataler Manipulationen auf HCN1 Expression und Anfälle</i>	21
4. HCN mediierte Ströme in der neuronalen Entwicklung	22
4.1. Allgemeine Implikationen von I_h für die neuronale Entwicklung.....	24
4.2. HCN2/3-mediierte I_h in der striatalen Entwicklung	27
5. Diskussion	29
5.1. Modulation von I_h	30
5.2. Modulation durch I_h	34
6. Zusammenfassung	38
7. Literaturverzeichnis	39

* für die elektronische Bibliotheksversion wurden aus Verlagsgenehmigungsgründen Originalarbeiten durch Literaturhinweise und Abstracts ersetzt

Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin
ACSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-(Isoxazol) Propionat
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
CA	Cornu Ammonis
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
CNG	<i>cyclic nucleotide gated</i>
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion
DAP-5	D-2-Amino-5-Phosphonovaleronat
DCS	<i>divalent cation solution</i>
EEG	Elektroenzephalogramm
EGTA	Ethylenglycol-1,2-Bis(2-Aminoethoxyethan)-N,N,N',N-Tetraacetat
GYG	Glycin-Tyrosin-Glycin
GABA	γ -Aminobuttersäure
HCN	<i>hyperpolarisationsactivated cyclic nucleotide gated</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
I_h	hyperpolarisationsaktivierter unselektiver Kationenstrom
I_{Kir}	einwärtsgleichrichtender Kaliumstrom
IFN	Interferon
K_v	spannungsabhängige Kaliumkanäle
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PLC	Phospholipase C
WAG/Rij	Wistar Albino Glaxo / Rijswijk
TEA	Tetraethylammonium
TTX	Tetrodotoxin
ZD7288	4-(N-ethyl-N-Phenyamino)1,2-Dimethyl-6-(Methylamino) Pyridiniumchlorid

1. Einleitung

Der hyperpolarisationsaktivierte unselektive Kationenstrom I_h (synonym I_f für *funny* oder I_q für *queer*) wurde in den frühen 1980ern zunächst in Zellen des Sinusknotens des Herzens als „Schrittmacherstrom“ beschrieben (DiFrancesco, 1981). Die beiden -jetzt obsoleten- Synonyme deuten auf funktionelle Besonderheiten der I_h leitenden Kanäle, die eine eigene Gruppe in der Familie der spannungsabhängigen Ionenkanäle bilden und phylogenetisch den Kaliumkanälen nahe stehen (Robinson and Siegelbaum, 2003). Erstens ist das *gating* der h -Kanäle - anders als bei den meisten spannungsabhängigen Kaliumkanälen, jedoch ähnlich $I_{K(IR)}$ - abhängig von hyperpolarisierenden Spannungen (DiFrancesco and Ferroni, 1983). Das *gating* der h -Kanäle ist zeitabhängig, das heißt, I_h aktiviert und inaktiviert mit einem sigmoidalen Zeitverlauf (Altomare *et al.*, 2001). Zweitens sind h -Kanäle wenig selektiv für Kationen und hauptsächlich durchlässig für Na^+ und K^+ . Die Aktivierung bei neuronalen Ruhemembranpotentialen resultiert in einem tonischen Natriumeinwärtsstrom (Trevillion *et al.*, 2010). Drittens ist die Spannungsabhängigkeit des I_h *gating* direkt durch cyclische Nukleotide - hauptsächlich cAMP - phosphorylierungsunabhängig beeinflussbar (DiFrancesco and Tortora, 1991).

1.1. Molekulare Identität der h -Kanäle

Die Klonierung der I_h unterliegenden α -Kanaleinheiten – in Säugetieren vier Gene, aus drei verschiedenen Duplikationen (Ludwig *et al.*, 1998; Santoro *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2007) - ermöglichte die Untersuchung des ungewöhnlichen Stromes auf molekularer Ebene. Die Gene werden jetzt übereinstimmend als hyperpolarisationsaktiviert und durch cyclische Nukleotide gesteuert (*HCN*) bezeichnet. Humane *HCN* Gene sind auf 4 separaten Chromosomen lokalisiert: *HCN1*, 5p12; *Hcn2*, 19p13.3; *Hcn3*, 1q22; und *Hcn4* 15q24–25 (Vaccari *et al.*, 1999; Seifert *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1999). h/HCN Kanaluntereinheiten (Abbildung 1) bilden eine intrazelluläre N-terminale Region, sechs transmembranäre α -helicale Domänen (S1–S6) mit einer Pore zwischen S5 und S6, sowie ein cytoplasmatisches C-Ende gebildet aus einer *Cyclic Nucleotide Binding Domain* (CNBD) die zwischen dem kurzen C-linker und dem C-terminalen Ende liegt. Die CNBD ist ebenfalls bei den eng verwandten *Cyclic Nucleotide-Gated* (CNG) Kanälen, bei *Ether A Go-go* (EAG) und *EAG-Related Gene* (ERG) K^+ Kanälen vorhanden (Zagotta *et al.*, 2003; Brelidze *et al.*, 2009). Eine regelrechte Expression an der Zelloberfläche wird durch die Glycosylierung eines hochkonservierten Asparaginrests (N380 für *HCN2*) in der extracellulären Schleife zwischen S5 und der Pore ermöglicht (Much 2003).

Während die Primärsequenz der Säuger *HCN* Untereinheiten (*HCN1-4*) vom Beginn von S1 bis zum Ende der CNBD in hohem Maß (80–90%) identisch sind, finden sich die meisten Abweichungen im N-Terminus und im distalen Teil des C-Terminus (Viscomi *et al.*, 2001). Obwohl die Porenregion das für spannungssensitive K^+ Kanäle typische GYG-Motif enthält, sind *HCN* Kanäle auch für Na^+ Ionen permeabel. Die Na^+/K^+ - Permeabilitätsrate beträgt etwa 1 : 4. h/HCN Kanäle scheinen auch eine geringe Permeabilität für Ca^{2+} Ionen aufzuweisen (Yu *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2007). Allerdings

erreicht der fraktionale Ca^{2+} Strom bei einer externen Ca^{2+} Konzentration von 2.5 mM lediglich 0.5% des gesamten HCN2 und HCN4 Stromes. Die geringe Sensitivität ist derzeit nicht gänzlich verstanden, deutet aber auf eine geringere Rigidität der inneren Pore von tetrameren HCN Kanälen hin (Giorgetti *et al.*, 2005). Die innere Wand der Pore wird vom transmembranären Segment S6 begrenzt (Shin *et al.*, 2001; Doyle *et al.*, 1998).

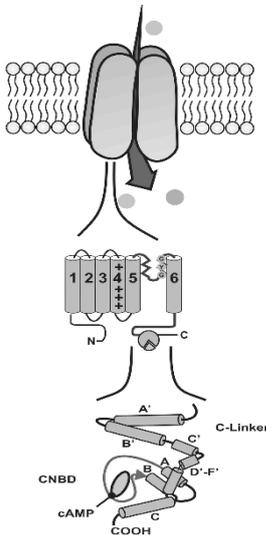


Abbildung 1. Aufbau der HCN Kanäle.

Oben: Tetramerische Struktur der HCN Kanäle.

Mitte: Eine monomerische Untereinheit besteht aus 6 transmembranären Segmenten. Das Segment S4 bildet den Spannungssensor, die Segmente S5 und S6 den Selektivitätsfilter sowie die Porenregion. Als wichtige Region im C-terminalen Ende des Kanals ist die *cyclic nucleotide-binding domain* (CNBD) hervorzuheben.

Unten: Der C Terminus ist aus zwei wesentlichen Domänen aufgebaut: Der C-linker Domäne mit 6 α -Helices (hier A' – F' genannt) und der nachfolgenden CNBD. Letztere besteht aus 3 α -Helices (A–C) und einer β -Untereinheit (zwischen A und B). Nach (Wahl-Schott and Biel, 2009)

Vergleichbar mit „klassischen“ depolarisationsaktivierten Kanälen verursacht eine Spannungsänderung eine Konfigurationsänderung des HCN-Kanalproteins initialisiert durch eine Bewegung des S4 Segmentes. Diese Konfigurationsänderung führt zu Änderungen im *gating* (Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000; Chen *et al.*, 2001a; Vaca *et al.*, 2000; Decher *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2005). Im Detail handelt es sich bei dieser Konfigurationsänderung wahrscheinlich um eine(n) S4-bedingte(n) Rotation / Zug am cytoplasmatischen S4–S5 *linker* (Chen *et al.*, 2001a; Long *et al.*, 2005). Das führt zu einer Interaktion des S4–S5 *linkers* mit einer in der S6 Region liegenden *gating* Domäne. Die These einer derartigen Rolle des S4-S5 *linkers* wird durch verschiedene Befunde gestützt: (1) Der geschlossene Zustand von HCN2 Kanälen wird durch elektrostatische Interaktion zwischen dem S4–S5 *linker* (Arg-339) und dem C-linker (Asp-443) stabilisiert (Decher *et al.*, 2004). (2) Beim *gating* von HCN Kanälen des Seesterns (spHCN) nähern sich S4–S5 und C-*linker* einander stark an. Die Vernetzung dieser beiden Domänen verändert das *gating* (Prole and Yellen, 2006). (3) Die S4 – S5 Domäne fungiert in einigen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen ebenfalls als verbindendes Element (Ferrer *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2005).

Die Untereinheiten bilden Homo- oder Heterotetramere, eine strukturelle Anordnung, die sie mit den eng verwandten K_v und CNG Kanälen teilen (Zagotta *et al.*, 2003; Ulens and Tytgat, 2001; Chen *et al.*, 2001c; Much *et al.*, 2003). Homomere Kanäle in heterologen Expressionssystemen leiten Ströme mit unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften (Santoro *et al.*, 2000; Frere *et al.*, 2004). Ein wesentliches Unterscheidungskriterium der HCN-Untereinheiten ist ihre Aktivierungskinetik. Homomere HCN2 Kanäle aktivieren und deaktivieren schneller als HCN4 Kanäle, jedoch langsamer als HCN1 Kanäle (Chen *et al.*, 2001c). Homomere HCN3- (wie HCN4-)

Kanäle aktivieren sehr langsam (Moosmang et al., 2001; Ishii et al., 1999). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal stellt die Sensitivität gegenüber cAMP dar: HCN1 und HCN3 reagieren viel geringer auf cAMP als HCN2 (Santoro and Tibbs, 1999; Chen et al., 2001c) und HCN4-Kanäle (Seifert et al., 1999; Ishii et al., 1999). Dies wird kompliziert durch die häufige Bildung von Heterotetrameren mit verschiedenen biophysikalischen Eigenschaften, wobei sich die Eigenschaften der Homomere nicht linear summieren (Chen et al., 2001c; Santoro and Tibbs, 1999; Ulens and Tytgat, 2001). So bildet zum Beispiel HCN1 mit HCN2 Heteromere mit originären Eigenschaften (Ulens and Tytgat, 2001). Offen ist derzeit die Frage nach der Einzelkanalleitfähigkeit. Einerseits wird die Einzelkanalleitfähigkeit in Messungen an cardialen *h*/HCN Kanälen (DiFrancesco et al., 1986) und direkt an neuronalen Dedriten (Kole et al., 2006) als sehr gering (ca. 1 pS) beschrieben, andererseits finden sich 10 – 30 fach höhere Werte für klonierte / native cardiale (Michels et al., 2005) und neuronale (Simeone et al., 2005) HCN Kanäle. Dies kann entweder in den verschiedenen Präparationen oder Ableitetechniken oder in einer dynamischen Regulation der Einzelkanalleitfähigkeit durch Modulatoren *in vivo* begründet sein.

1.2. Modifikation der *h*/HCN-Kanäle

Biophysikalische Eigenschaften der HCN-Kanäle hängen nicht nur von ihrer Untereinheitszusammensetzung sondern auch von der Spezies, dem Zelltyp, der Phosphorylierung, der Interaktion mit auxilatorischen oder modulierenden Untereinheiten und den intrazellulären Gegebenheiten ab (Altomare et al., 2001; Altomare et al., 2003; Barbuti et al., 2004; Pian et al., 2007). Dieses "kontextabhängige" Verhalten der Kanäle ist bereits hochkomplex, obwohl es erst am Beginn seiner Aufklärung steht (zeitgemäße Übersichtsartikel: Frere et al., 2004; Wahl-Schott and Biel, 2009). Im Folgenden werden daher nur die wichtigsten Modulatoren kurz skizziert.

Der namensgebende Modulator des *gating* der HCN Kanäle, vor allem in HCN2 und 4 Untereinheiten, ist das cyclische Nukleotid cAMP. Es verschiebt die Offenwahrscheinlichkeitskurve zu deutlich depolarisierten Potentialen (etwa 10–20 mV für HCN2 und HCN4, jedoch nur ~5 mV für HCN1 und nicht für HCN3 Kanäle (Baruscotti et al., 2005)). Aus kinetischer Sicht ist die Wirkung von cAMP analog zur Hyperpolarisation, da beide das *gating* durch Modifikation der Kanalstruktur unter Benutzung eines gemeinsamen Weges beeinflussen (DiFrancesco, 1999; Altomare et al., 2001). Die Wirkung von cAMP beruht im Kern auf der Verringerung der intrinsischen Inhibition der Kanäle (Barbuti et al., 1999; Wainger et al., 2001; Ulens and Siegelbaum, 2003; Zhou and Siegelbaum, 2007). Daneben werden HCN Kanäle von weiteren intrazellulären Komponenten wie Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) (Zolles et al., 2006; Pian et al., 2007) oder Prozessen wie Interaktion mit Proteinen (Gravante et al., 2004; Kimura et al., 2004; Santoro et al., 2004; Santoro et al., 2009), Tyrosin-Phosphorylierung mittels Src-Kinase (Zong et al., 2005) oder post-translationalen Veränderungen wie N-Glykosylierung (Much et al., 2003) beeinflusst. Auch die Änderung der intrazellulären ATP-Konzentration führt zu einer Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung der Spannungsabhängigkeit (Komagiri and Kitamura, 2003). Andere Proteinkinasen, wie

PKA und PKC (Chang *et al.*, 1991) oder Tyrosinkinase (Wu and Cohen, 1997) scheinen an der I_h -Regulation beteiligt, ein direkter Nachweis der Phosphorylierung von h -Kanälen steht jedoch aus. Assoziationen mit zusätzlichen Untereinheiten wie dem integralen Membranprotein *MinK-related peptide 1* (Yu *et al.*, 2001) oder mit *lipid rafts* (Barbuti *et al.*, 2004) üben einen regulatorischen Einfluss auf I_h aus. Das "Auswaschen" einer oder mehrerer dieser Komponenten gilt als Grund einer möglichen Abnahme (*rundown*) und Veränderung des I_h während langer *whole-cell*-Ableitungen oder bei zellfreien Präparaten (DiFrancesco *et al.*, 1986).

Monovalente Ionen wie H^+ oder Cl^- modulieren bestimmte HCN Kanäle sowohl von extra- als auch von intrazellulär. Intrazelluläre Protonen verschieben die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung in Richtung Hyperpolarisation und verlangsamen die Kanalöffnung besonders für HCN2 Kanäle (Zong *et al.*, 2001). Dies ist von Bedeutung für die cerebrale HCN Modulation durch Regulation der thalamischen Oszillationen oder der respiratorischen Frequenz (Munsch and Pape, 1999a). Dagegen führt extrazelluläre Ansäuerung ($pH < 5$) zu einer Aktivierung von I_h , was wesentlich für die Vermittlung des sauren Geschmacks ist (Stevens *et al.*, 2001). Intrazelluläres Cl^- wirkt als Suppressor der instantanen Komponente von I_h (Mistrik *et al.*, 2006), während extrazelluläres Cl^- die *steady-state* Leitfähigkeit, besonders der „langsamen“ Untereinheiten HCN2 und HCN4, reguliert (Wahl-Schott *et al.*, 2005).

HCN Kanäle werden auch von extrazellulär moduliert, wobei einige der Modulatoren bekannte intrazelluläre Wege anstoßen. Extrazelluläre Modulatoren können I_h steigern, wie *Corticotropin-Releasing-Factor* (Qiu *et al.*, 2005), Gabapentin (Surges *et al.*, 2003), Vitronectin als Komponente der extrazellulären Matrix (Vasilyev and Barish, 2003), Noradrenalin und Serotonin (Pape and McCormick, 1989), Stickstoffmonoxid (NO) über Stimulation der intrazellulären Guanylzyklase (Pape and Mager, 1992) oder Acetazolamid (Munsch and Pape, 1999b). Seltener kommt es zur Senkung von I_h , wie bei Reduktion der extrazellulären Kaliumkonzentration unter Normwerte (2-4 mmol/l) (Robinson and Siegelbaum, 2003).

1.3. Das Zentralnervensystem und h /HCN Kanäle

HCN Untereinheiten sind im ZNS exprimiert und spezifisch verteilt (Santoro *et al.*, 2000). HCN2 ist ubiquitär im Gehirn, HCN3 ist außer im Bulbus olfactorius, Hypothalamus und Zapfen der Retina (Robinson and Siegelbaum, 2003; Biel *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 2003) kaum nachweisbar. Die beiden anderen Untereinheiten sind selektiver in spezifischen Gebieten des ZNS exprimiert. HCN1 zeigt eine kortikale Präferenz (besonders Neokortex, Hippocampus, Colliculus superior und Cerebellum) kommt aber auch im Hirnstamm (Moosmang *et al.*, 2001; Notomi and Shigemoto, 2004; Milligan *et al.*, 2006; Santoro *et al.*, 2000) und in Photorezeptoren (Demontis *et al.*, 2002) vor. HCN4 findet sich vorwiegend subkortikal, hauptsächlich im Hypothalamus, einigen Thalamuskernen, den Basalganglien und im Bulbus olfactorius (Moosmang *et al.*, 2001; Notomi and Shigemoto, 2004; Santoro *et al.*, 2000). h /HCN Kanäle sind auch in verschiedenen sensorischen Neuronen vorhanden (Photorezeptoren und retinale Neurone, Olfaktorische Neurone, Geschmacks- und

Schmerzrezeptoren, mechanosensitive Neurone und Ganglienzellen der Radix dorsalis (Biel *et al.*, 2009; Doan *et al.*, 2004).

Die unterschiedliche Verteilung im Nervensystem und die Einbettung in verschiedene Ionenkanalensembles spiegeln sich auch funktionell wider. Die intrinsische neuronale Erregbarkeit wird unter physiologischen Bedingungen von spannungsabhängigen Strömen bestimmt (van Welie *et al.*, 2004). Wegen seiner Aktivität beim Ruhemembranpotential von Neuronen und der Übernahme wichtiger zellulärer Funktionen gilt I_h als eine der wesentlichen Determinanten der neuronalen Erregbarkeit. Exemplarisch seien hier einige der derzeit bekannten Funktionen erwähnt.

I_h treibt neuronale Oszillatoren als primärer Schrittmacher an (Pape, 1996). In thalamokortikalen Relaisneuronen (McCormick and Pape, 1990), hippocampalen Interneuronen (Maccaferri and McBain, 1996) und Neuronen der Oliva inferior (Bal and McCormick, 1997) wirkt I_h als primärer Schrittmacherstrom.

In neokortikalen Neuronen ohne Schrittmacheraktivität ist I_h eine wichtige Komponente des unterschwelligen Stromes. Die Expression von HCN-Kanälen stabilisiert das Membranpotential gegen jede Art von Störung (Robinson and Siegelbaum, 2003). Durch Hyperpolarisation wird I_h aktiviert und erzeugt einen Einwärtsstrom, welcher zu einer Depolarisation führt und damit die Inaktivierung der h -Kanäle bedingt. Durch dieses negative Feedback ist I_h selbstlimitierend. Umgekehrt führt eine Depolarisation einer Zelle zu einer Inaktivierung von I_h und so zur Rückkehr zum Ruhemembranpotential (Poolos, 2004).

I_h vermittelt den *rebound* von De- und Hyperpolarisation und verändert die dendritische Filterung. Durch seine dendritische Prävalenz in Pyramidenzellen verkürzt der I_h die Längskonstante des Dendriten (Berger *et al.*, 2001; Zhu, 2000) und erhöht damit die Abhängigkeit der Summation synaptischer Signale von der Synapsenlokalisierung (Williams and Stuart, 2000; Williams and Stuart, 2002). Das führt zu einer Dämpfung von distalen excitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP) beim Erreichen des Soma und normalisiert so die zeitliche Summierung der synaptischen Eingänge (Magee, 1999; Strauss *et al.*, 2004).

I_h vermittelt Zellen unterschwellige Membranresonanz im Niederfrequenzbereich (Tanaka *et al.*, 2003) und kontrolliert die temporäre Beziehung zwischen der Phase der Strominjektion und der Phase der Aktionspotentialauslösung (Ulrich, 2003). Dies ermöglicht der Zelle die Unterscheidung von Eingangssignalen auf der Basis des Frequenzinhaltes, wobei „angemessene“ Signale verstärkt und „falsche“ Eingänge unterdrückt werden (Hutcheon and Yarom, 2000). Die Detektion kleiner, sinusoider Signale wird dabei allein durch das aufgrund der geringen Einzelkanalleitfähigkeit entstehende weiße Rauschen verbessert (Kole *et al.*, 2006).

Zusätzlich zu diesen unterschwelligen Funktionen trägt I_h zur Aktionspotentialrepolarisierung bei und kontrolliert Amplitude und Zeitverlauf der Aktionspotentialnachhyperpolarisation. Beides beeinflusst die Aktionspotentialfrequenz (Velumian *et al.*, 1997). Auf Netzwerkebene moduliert I_h dadurch übergreifende Aktivitäten und höhere Funktionen, wie lernbasierte Modifikation motorischen Verhaltens (Nolan *et al.*, 2003) und Gedächtnisbildung (Nolan *et al.*, 2004) (Details siehe 2.). Dabei scheint der Einfluss des I_h auf das Lernpotential wesentlich vom zellulären Kontext und von der Art des Lernens abhängig zu sein. Ein Fehlen von HCN-Untereinheiten führt zu tiefgreifenden

Störungen des motorischen Lernens und Gedächtnisses für HCN1 (Nolan et al., 2003; Nolan et al., 2004) oder zu Absence-Epilepsie für HCN2 (Ludwig et al., 2003).

Für eine detaillierte Beschreibung der neuronalen Funktionen von *h*/HCN Kanälen im Nervensystem sei auf Übersichtsartikel verwiesen (Robinson and Siegelbaum, 2003; Wahl-Schott and Biel, 2009; Biel et al., 2009; Wickenden et al., 2009).

Aus den bisherigen Erkenntnissen über Verteilung und Funktion von HCN Kanälen im Zentralnervensystem haben sich die folgenden zentralen forschungstreibenden Fragestellungen ergeben:

1. Wie werden HCN Kanäle in verschiedenen Neuronen reguliert / welche Möglichkeiten der Intervention ergeben sich?
2. In welcher Beziehung stehen HCN Kanäle zu physiologischen und pathologischen cerebralen Prozessen?

2. HCN1 medierte Ströme – Charakteristika und Besonderheiten

Die HCN1 Untereinheit steht im Zentrum der hier vorgestellten Arbeiten, da sie die dominierende Untereinheit im hauptsächlich untersuchten Neocortex ist (Santoro *et al.*, 2004). In Pyramidenzellen (cortikal und hippocampal) wird I_h durch die Untereinheiten HCN1 und HCN2 vermittelt (Lorincz *et al.*, 2002; Notomi and Shigemoto, 2004; Kole *et al.*, 2006). Die relativen Anteile am gesamten I_h lassen sich über *knockout* Experimente abschätzen und auf ca. 2/3 für HCN1 (Nolan *et al.*, 2003; Nolan *et al.*, 2004) und ca. 1/3 für HCN2 (Ludwig *et al.*, 2003) beziffern. Humane und murine HCN1 Kanäle wurden extensiv in heterologen Systemen exprimiert und untersucht (Moroni *et al.*, 2001; Wainger *et al.*, 2001; Proenza *et al.*, 2002; Much *et al.*, 2003; Gravante *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2004). Dadurch gelang eine Charakterisierung hinsichtlich der biophysikalischen Eigenschaften und basaler Regulationsmechanismen. Bekannte Besonderheiten von HCN1 Homomeren sind schnelle Aktivierung und geringe cAMP-Modulation. Mutagenese-Studien zeigten, dass der C-Terminus von HCN1 wesentlich weniger basal inhibierend auf die Kerndomänen des Kanals wirkt, als z. B. bei HCN2 (Wainger *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001), was auch seine weniger hyperpolarisierten Aktivierungsspannungen erklärt. In Pyramidenzellen – sowohl corticalen als auch hippocampalen – nimmt die relative Anzahl der HCN Kanäle, vor allem HCN1, am Dendriten mit der Entfernung vom Soma zu (Kole *et al.*, 2007; Magee, 1998; Davie *et al.*, 2006; Kole *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2001). Kürzlich konnte weiter gezeigt werden, dass die HCN1 Verteilungsmuster von neuronaler Aktivität beeinflusst werden können. Wird der synchronisierte neuronale *Input* in distale Dendriten von hippocampalen CA1 Neuronen eliminiert, verschwindet der Gradient der HCN1 Verteilung (Shin and Chetkovich, 2007). Durch direkte Visualisierung von HCN1 Kanälen konnte eine Form der untereinheitenspezifischen dynamischen HCN1 Regulation aufgedeckt werden (Noam *et al.*, 2010). HCN1 Kanäle befinden sich demnach in vesikelartigen Organellen, die sich in bestimmten Mustern

entlang neuronaler Dendriten bewegen. Diese HCN1 Bewegungen bedürfen intakter Filamente wie Actin und Tubulin und werden calciumabhängig durch eine Aktivierung von AMPA oder NMDA Rezeptoren unterbrochen, was zu einer lokal vermehrten Membraninsertion der Kanäle führt. Die Manipulation der Aktivität modifiziert auch die axonale präsynaptische Expression von HCN1 im entorhinalen Cortex (Bender et al., 2007). Einer experimentellen Untersuchung einzelner HCN Untereinheiten steht derzeit noch das Fehlen spezifischer Blocker entgegen, obwohl für einige volatile Anästhetika wie Halothan eine HCN Untereinheitenselektivität diskutiert wird (Chen et al., 2005; Chen et al., 2009a).

Die besonderen biophysikalischen Eigenschaften von HCN1 Kanälen, verbunden mit dem Verteilungsmuster innerhalb des ZNS bedingen seine immense Bedeutung, die sich in vielfältigen Funktionsverlusten bei HCN1-Deletionen (Nolan et al., 2003; Nolan et al., 2004; Nolan et al., 2007) oder pharmakologischer I_h Blockade (Klink and Alonso, 1993; Jones, 1994; Gasparini and DiFrancesco, 1997; Magee, 1998; Stuart and Spruston, 1998; van Der et al., 1999; Dickson et al., 2000; Williams and Stuart, 2000; Day et al., 2005) manifestiert. So beeinflussen HCN1-Kanal generierte Ströme auf der Verhaltensebene unterschiedliche Formen von Lernen und Gedächtnis. Gedächtnisprozesse im Hippokampus oder präfrontalen Cortex (Nolan et al., 2004; Wang et al., 2007) werden gehemmt. Im entorhinalen Cortex führt die unterschiedliche HCN1-Verteilung entlang einer dorsoventralen Achse zur Modulation der synaptischen Integration und trägt so zu Orientierung im Raum bei (Garden et al., 2008; Giocomo and Hasselmo, 2008). In Sternzellen der *layer II* des entorhinalen Cortex dominieren HCN1 Kanäle die Membranleitfähigkeit in Ruhe, supprimieren niederfrequente Komponenten (< 4 Hz) spontaner und evozierter Membranpotentialaktivität und kontrollieren das Muster der Aktionspotentiale durch Verkürzung der Nachhyperpolarisation (Nolan et al., 2007). Dadurch bestimmt HCN1 die integrativen Eigenschaften der Neuronen der hauptsächlichen Eingangsstruktur des Hippocampus unabhängig vom ihrem Aktivitätsstatus. Auch in den Schlüsselneuronen für das cerebelläre Lernen, den Purkinje Zellen stabilisiert HCN1 die integrativen Eigenschaften und sichert so die Unabhängigkeit der Eingangs-Ausgangs Beziehung von der Vorgeschichte (Nolan 2003). Das begründet seine Rolle bei der lerninduzierten Modifikation des motorischen Verhaltens.

Trotz der skizzierten Bedeutung stand eine Charakterisierung von HCN1-Kanälen der Ratte, einem in physiologischen Experimenten häufig untersuchten Tiermodell, aus. Die folgende Arbeit sollte belastbare Daten zur mathematischen Simulation von spezifischen Untereinheiten-Veränderungen und zur Durchführung von *dynamic-clamp* Experimenten erbringen. Bereits veröffentlichte Modelle sind zur Beschreibung untereinheitenspezifischer Veränderungen nicht geeignet, da sie auf einer Beschreibung des gesamten I_h innerhalb eines Neurons basieren. Bei dieser Untersuchung fand sich neben der beabsichtigten Charakterisierung von HCN1 der Ratte ein cytosolischer Mechanismus, der in intakten Zellen HCN1-mediierte Ströme reduziert. Derzeit gehe ich davon aus, dass es sich hierbei um eine Form der Inaktivierung handelt. Ein Versuch der genauen elektrophysiologischen und molekularen Beschreibung wird derzeit von uns unternommen.

***I*(h) "run-up" in rat neocortical neurons and transiently rat or human HCN1-expressing HEK293 cells.**

Battefeld A, Bierwirth C, Li YC, Barthel L, Velmans T, Strauss U. Institute of Cell Biology and Neurobiology, Center for Anatomy, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.

*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (HCN) are key determinants of CNS functions. Here we describe an increase in hyperpolarization-activated current (*I*(h)) at the beginning of whole-cell recordings in rat layer 5 cortical neurons. For a closer investigation of this *I*(h) increase, we overexpressed the predominant layer 5 rat subunit HCN1 in HEK293 cells. We characterized the resulting *I*(h) in the cell-attached and whole-cell configurations. Breaking into whole-cell configuration led to about a 30% enhancement of rat HCN1-mediated *I*(h) accompanied by a depolarizing shift in voltage dependence and an accelerated time course of activation. This current enhancement is not species specific; for human HCN1, the current similarly increases in amount and kinetics. Although the changes were bound to cytosolic solution exchange, they were independent of cAMP, ATP, GTP, and the phosphate group donor phosphocreatine. Together, these data provide a characterization of heterologous expression of rat HCN1 and suggest that cytosolic contents suppress *I*(h). Such a mechanism might constitute a reserve in h-channel function in vivo.*

J Neurosci Res. 2010 Nov 1; 88(14): 3067-78. PMID: 20806410

3. h/HCN medierte Ströme bei Erkrankungen des ZNS

3.1. Entzündliche ZNS-Erkrankungen

Aus der zentralen Stellung bei der Steuerung der neuronalen Erregbarkeit und den multiplen Beeinflussungsmöglichkeiten ergibt sich eine Kandidatenrolle für HCN Kanäle als Vermittler neuronaler Veränderungen bei pathophysiologischen Prozessen. Eine solche Verbindung bei Entzündungen wurde im Folgenden untersucht. Aus klinischer Sicht bei Entzündungen sind die als Typ I Interferone bezeichneten Interferone α und β (IFN- α und IFN- β) bedeutsam, da sie sowohl im Hirn gebildet werden können (Delhaye et al., 2006; Prinz et al., 2008), als auch therapeutische Anwendung finden. Interferone wirken generell antiviral (Goodbourn *et al.*, 2000) und immunmodulatorisch, wobei Typ I IFNe als überwiegend antiinflammatorisch (Tsanev and Ivanov, 2002) bekannt sind. Das ursprünglich aus Leukozyten isolierte IFN- α und das aus Fibroblasten stammende IFN- β teilen sich den gleichen Rezeptor (IFNAR), der von fast allen Körperzellen exprimiert wird. Die intrazelluläre Signaltransduktion beruht im wesentlichen auf der Aktivierung (Phosphorylierung) von JAK- und STAT-Molekülen (David, 2002). Beide IFNs induzieren aber nicht immer exakt die gleichen Signalwege und wirken nicht immer synergistisch (Pfeffer, 1997). Außer Unterschieden in der zelltypspezifischen antiviralen und antiproliferativen Effektivität, ist von Bedeutung, dass der JAK/STAT-Signalweg in IFN- α -resistenten Zellmutanten, zumindest partiell IFN- β -sensitiv bleibt (Pellegrini et al., 1989; Velazquez et al., 1992). IFN- β induziert die IFN- α -Expression, aber nicht umgekehrt (Asano *et al.*, 1990). Obwohl beide Typ I IFNs im Tiermodell autoimmun-demyelinisierende Erkrankungen supprimieren (Zou *et al.*, 1999), hat für die Behandlung der multiplen Sklerose nur IFN- β klinisch-praktische Bedeutung erlangt (Coyle and Hartung, 2002; Noseworthy, 2003). Der immunsuppressorische Effekt IFN- β kann transient sein (Mix *et al.*, 2003), gelegentlich steigert IFN- β Immureaktionen und löst bei demyelinisierenden Erkrankungen paradoxe und Rebound-Phänomene aus (van der Meide et al., 1998; Njenga et al., 2000). Eine ältere Studie (Liberati *et al.*, 1990), nach der peripher appliziertes IFN- β keinen signifikanten Einfluss auf das Elektroenzephalogramm (EEG), visuell evozierte Potentiale (VEP) und die motorische Nervenleitgeschwindigkeit hat, spricht nicht gegen eine direkte neuronale Wirkung von IFN- β .

Ausgangspunkt der Untersuchungen zu kortikalen IFN- β Effekten waren auch bekannte Wirkungen von IFN- α auf Nervenzellfunktionen. IFN- α wirkt exzitatorisch auf Pyramidenzellen des Rattenhippocampus (CA3) (Muller *et al.*, 1993), supprimiert aber *short-* und *long-term potentiation* im Rattenhippocampus (D'Arcangelo *et al.*, 1991) und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) induzierte Antworten im Hypothalamus der Ratte (Katafuchi *et al.*, 1995). Für eine IFN- α -induzierte Hemmung der synaptischen Transmission spricht die Verminderung von Dopamin und seiner Metaboliten im Gehirn der Maus (Shuto *et al.*, 1997). Einzelzelleitungen *in vivo* ergaben eine Unterdrückung der Aktivität im Hypothalamus, jedoch eine Steigerung im Thalamus, Hippocampus und somatosensorischen Cortex der Ratte durch IFN- α (Dafny *et al.*, 1996). In der folgenden Arbeit ging

es zunächst darum, neuronale Effekte von IFN- β nachzuweisen und zu beginnen diese dem Mechanismus nach einzugrenzen.

Neuromodulation by a cytokine: interferon-beta differentially augments neocortical neuronal activity and excitability.

Hadjilambrea G, Mix E, Rolfs A, Müller J, Strauss U. Department of Neurology, Neurobiological Laboratory, University of Rostock, Gehlsheimer Strasse 20, 18147 Rostock, Germany.

The immunomodulatory cytokine interferon-beta (IFN-beta) is used in the treatment of autoimmune diseases such as multiple sclerosis. However, the effect of IFN-beta on neuronal functions is currently unknown. Intracellular recordings were conducted on somatosensory neurons of neocortical layers 2/3 and 5 exposed to IFN-beta. The excitability of neurons was increased by IFN-beta (10-10,000 U/ml) in two kinetically distinct, putatively independent manners. First IFN-beta reversibly influenced the subthreshold membrane response by raising the membrane resistance $R(M)$ 2.5-fold and the membrane time constant τ 1.7-fold dose-dependently. The effect required permanent exposure to IFN-beta and was reduced in magnitude if the extracellular K^+ was lowered. However, the membrane response to IFN-beta in the subthreshold range was prevented by ZD7288 (a specific blocker of $I(h)$) but not by Ni^{2+} , carbachol, or bicuculline, pointing to a dependence on an intact $I(h)$. Second, IFN-beta enhanced the rate of action potential firing. This effect was observed to develop for >1 h when the cell was exposed to IFN-beta for 5 min or >5 min and showed no reversibility ($<$ or ≈ 210 min). Current-discharge ($F-I$) curves revealed a shift (prevented by bicuculline) as well as an increase in slope (prevented by carbachol and Ni^{2+}). Layer specificity was not observed with any of the described effects. In conclusion, IFN-beta influences the neuronal excitability in neocortical pyramidal neurons in vitro, especially under conditions of slightly increased extracellular K^+ . Our blocker experiments indicate that changes in various ionic conductances with different voltage dependencies cause different IFN-beta influences on sub- and suprathreshold behavior, suggesting a more general intracellular process induced by IFN-beta.

J Neurophysiol. 2005 Feb; 93(2):843-52. PMID: 15385586

Aufbauend auf die Versuche unter Vorbehandlung mit ZD7288, einem spezifischen Blocker von HCN Kanälen, und mit veränderten extracellulären K^+ Konzentrationen, zeigen wir in einer derzeit in Begutachtung befindlichen Studie (Stadler et al.), dass die cortical gesteigerte Erregbarkeit zum großen Teil über I_h vermittelt ist. Die direkte Superfusion von Hirnschnitten mit IFN- β verringert und verlangsamt pharmakologisch isolierten I_h in somatischen *whole-cell* Messungen (Abbildung 2). Der kanonische HCN Modulator cAMP ist nicht direkt an der Vermittlung des IFN- β Effektes beteiligt. IFN- β wirkt hauptsächlich direkt neuronal, wie wir in primär kultivierten corticalen Kulturen zeigen. IFN- β führt auch in neuronalen Primärkulturen, das heißt bei einem sehr geringen Anteil an Astrozyten, zu Amplitudenreduktion des für den unterschwelligeren Effekt maßgeblichen I_h . Die verringerte I_h Leitfähigkeit bedingt einen deutlich erhöhten Eingangswiderstand und eine Hyperpolarisation der Neurone. Die Ergebnisse stimmen mit denen an akuten Hirnschnitten überein.

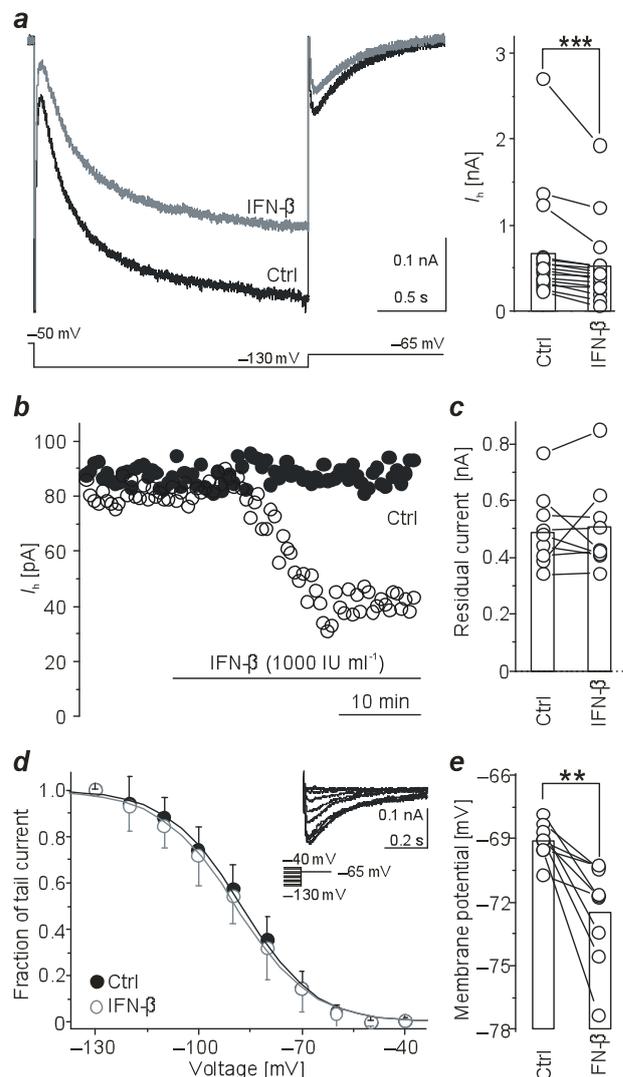


Abbildung 2 1,000 IU ml⁻¹ IFN- β vermindern den hyperpolarisationsaktivierten Strom I_h neocorticaler Neurone im somatosensorischen Kortex. **a links:** pharmakologisch isolierter I_h eines layer 5 Neurons als Antwort auf einen hyperpolarisierenden (-130 mV) Spannungsschritt (*darunter*). Wurde IFN- β für 15 min der Badlösung zugesetzt, führte das zu einer I_h Verminderung auf 72% (*grauer trace*). **Rechts:** IFN- β reduzierte I_h in allen Neuronen nach 15 - 45 min. Die mittlere I_h Amplitude änderte sich von 681 ± 626 pA auf 521 ± 460 pA ($n = 16$). **b** Verlauf der I_h Reduktion durch IFN- β bei einem layer 5 Neuron (*offene Kreise*) verglichen mit dem eines unbehandelten Neurons (*gefüllte Kreise*). Zum Zweck der Erhaltung der Langzeitstabilität wurden die Hyperpolarisation auf -100 mV für 2 Sekunden begrenzt. **c** Von I_h verschiedene Stromkomponenten wurden nicht von IFN- β beeinflusst, da der hyperpolarisationsaktivierte Strom nach Blockade der HCN Kanäle mit 50 μ M ZD7288 gefolgt von IFN- β -Applikation stabil blieb. **d** Die Spannungsabhängigkeit von I_h wurde nicht durch IFN- β (*offene Kreise*) beeinflusst, wie aus den *steady state* Aktivierungskurven hervorgeht, die aus den gegen das Testpotential geplotteten relativen *tail* Strömen (*Einschub*) berechnet wurden. **e** IFN- β Applikation führte zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials von im Mittel -69.1 ± 0.8 mV auf -72.4 ± 2 mV. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ für diese und die folgenden 2 Abbildungen. (aus Stadler et al., *under review*)

Die bisher bekannten Effekte von IFN- β werden durch Typ-1 IFN Membranrezeptoren (IFNAR), die sich aus 2 Ketten IFNAR1 und IFNAR2 zusammensetzen, mediiert (Brierley and Fish, 2002). Zur zentralnervösen IFNAR Expression (Okada et al., 2005) zeigen wir erstmals die Expression von IFNAR1 und 2 mRNA und Protein sowohl im gesamten Neocortex der Ratte als auch - durch

differentielle Analyse an primär kultivierten Zellen – in Neuronen, Astrozyten und Microglia. Dass die neuronalen Rezeptoren funktionell sind, zeigt die Phosphorylierung von Tyk2, einem Element der IFNAR Sinalkaskade nach Stimulierung von Neuronen mit IFN- β . Der neuronale IFNAR – Signalweg ist an der Wirkung von IFN- β auf I_h essentiell beteiligt. Dies wird durch eine Reihe von elektrophysiologischen Befunde belegt: Erstens hat IFN- β auf rHCN1 medierte I_h keine direkte Wirkung. Dieses Resultat ergibt sich aus Transfektionsexperimenten, bei denen HCN1 und 2 der Ratte in HEK293 Zellen überexprimiert wurden. Die HEK293 Zellen tragen an ihrer Oberfläche den humanen Typ I IFN Rezeptor, an dem aber das verwendete Ratten IFN- β nur eine im Höchstfall 10%ige Wirkung entfalten kann (Datenblatt U-cytech). Zweitens zeigt IFN- β nach Behandlung der Hirnschnitte mit dem Tyk2 / JAK1 selektiven Blocker (JAK1-inhibitor) keinen Effekt. Andererseits konnte AG490, ein eher unspezifischer JAK2 Blocker, die IFN- β Modulation von I_h nicht verhindern.

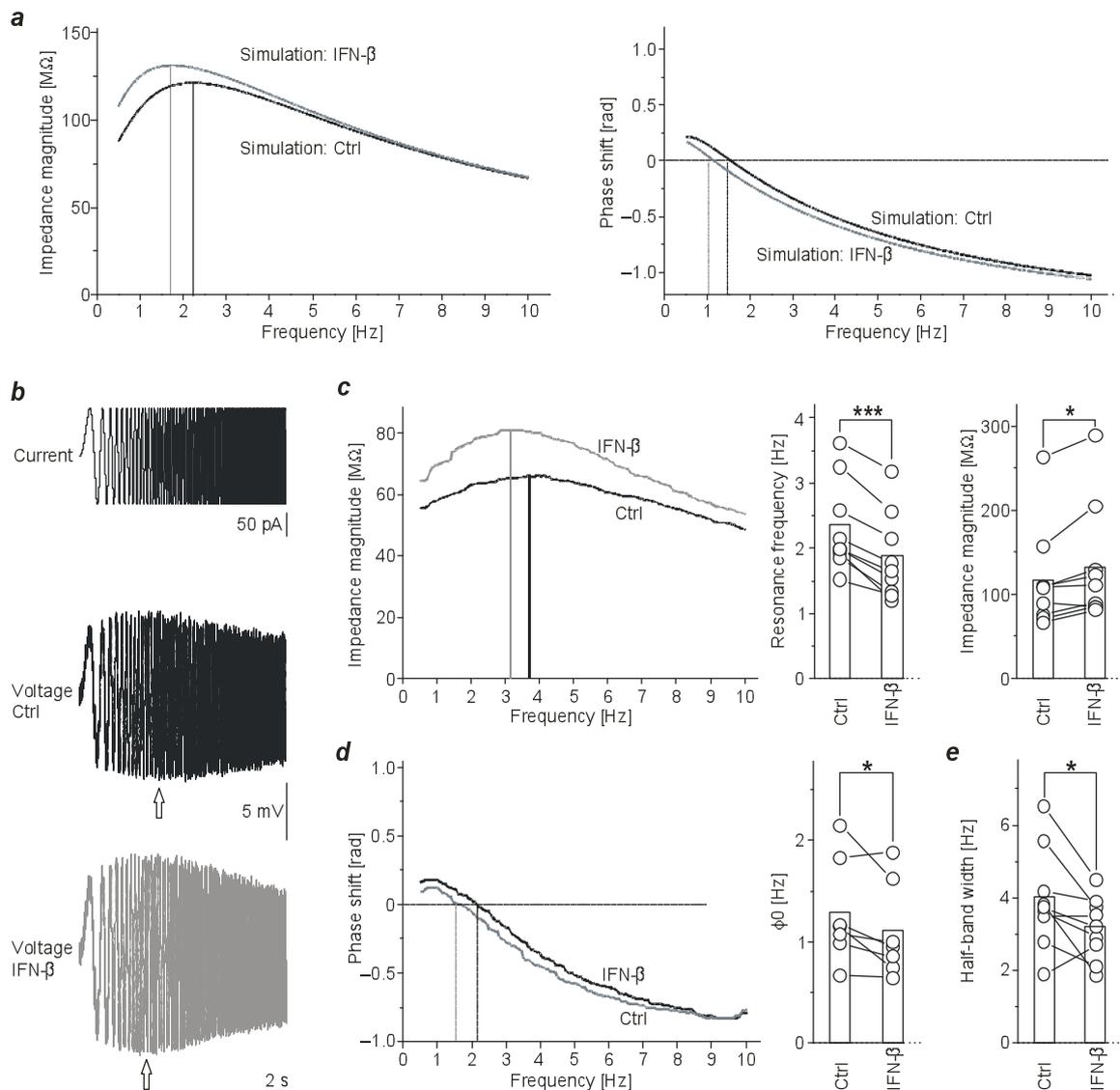


Abbildung 3. 1,000 IU ml⁻¹ IFN- β verändert die unterschwellige Membranresonanz von neocorticalen layer 5 Neuronen. **a** *In silico* Voraussage von durch die I_h Reduktion bedingten Veränderungen (grau). Links: Die I_h Reduktion verringert die Spitzenfrequenz der Impedanz von 2.4 Hz auf 1.8 Hz und die Impedanzspitze von 119.9 M Ω auf 136.5 M Ω . Rechts: Simulierte Phasenverschiebung vor und nach I_h Reduktion. ϕ_0 , die Frequenz des Nulldurchganges, verschob sich von 1.5 zu

1.0 Hz. **b** Im Einklang mit den Voraussagen verschob IFN- β die Spitzenfrequenz und erhöhte die maximale Amplitude der Impedanz von *in vitro* whole-cell abgeleiteten Neuronen. *Oben*: Injizierter ZAP Strom. *Mitte*: Dazugehörige Ableitungen der Membranspannung ergaben ein umschriebenes Frequenzmaximum (*Pfeil*), welches sich unter dem Einfluß von IFN- β verschob (*unten*). **c Links**: Das Impedanzprofil (*schwarze Linie*) zeigte eine Verschiebung der Resonanzspitze nach IFN- β von 3.62 Hz / 67 M Ω auf 3.14 Hz / 81 M Ω . Dieses Verhalten der Impedanzkurve zeigten alle Neurone unter dem Einfluß von IFN- β (*rechts*). **d Links**: Beispiel einer *in vitro* Phasenverschiebung. Die induktive Komponente (der positive Teil der Kurve, Spannung vor Strom) vermindert sich nach IFN- β . *Rechts*: Quantitativer Vergleich von Φ_0 vor und nach IFN- β Applikation. **e** Die Bandbreite des Impedanzprofils wurde nach IFN- β Behandlung schmaler (aus Stadler et al., *under revision*).

Eine funktionelle Konsequenz der exogenen Applikation von IFN- β auf akute Hirnschnitte ist die IFN- β induzierte Verminderung der neuronalen Resonanzfrequenz und Vergrößerung der Impedanz im cerebalen Cortex (Abbildung 3). Über die direkte Einflussnahme auf das Resonanzverhalten von neuronalen Membranen verändert IFN- β Netzwerkoszillationen.

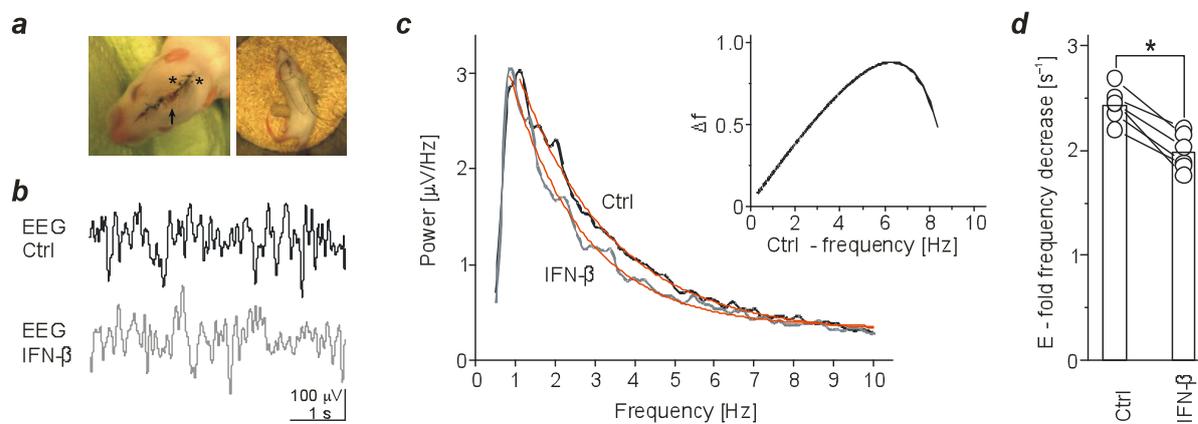


Abbildung 4 IFN- β verlangsamt das cortikale EEG von Ratten. **a** Lokalisation von Ableite- und Referenzelektrode (Stern) sowie des wegweisenden Plastikschlauches (Pfeil) für die IFN- β Applikation (*links*). Ratte unter Ableitebedingungen (*rechts*). **b** Beispielableitungen von einer P11 Ratte unter Kontrollbedingungen (*obere schwarze Linie*) und nach Applikation von 5,000 IU IFN- β (*untere graue Linie*). **c** Charakteristisches power Spectrum motorisch ruhiger Perioden einer P11 Ratte unter Kontrollbedingungen (*schwarz*) und innerhalb von 30 min nach Applikation von IFN- β (*grau*). Der Abfall der *power* wurde durch einfache Exponentialfunktionen (*red lines*) gut abgebildet. *Inset*: Frequenzdifferenz eines bestimmten *power level* als Funktion der Frequenz unter Kontrollbedingungen. **d** Gruppendaten zeigen, dass IFN- β Behandlung zu einer Verminderung der *power* im EEG führt (aus Stadler et al., *under revision*, Untersuchung von Dr. rer. nat. Sebastian Schuchmann, NWFZ).

Experimente unter direkter corticaler Applikation von IFN- β zeigten eine Verlangsamung der corticalen elektroenzephalographischen Aktivität in wachen Ratten (Abbildung 4). Dieser Befund könnte dazu beitragen, die bei einer viralen Enzephalitis beim Menschen in vielen Fällen auftretende Veränderung des Elektroenzephalogramms (EEG), unter anderem in einer Verschiebung zu niedrigeren Frequenzen, besser zu verstehen. Die Befunde zeigen auch klar die Möglichkeit einer I_h Veränderung durch pathologische Prozesse mit ihren kurzfristigen Konsequenzen.

3.2. HCN und Epilepsie

Spezifische neurologische Erkrankungen, die seit Jahren mit HCN Kanalveränderungen verknüpft werden, sind verschiedene Formen der Epilepsien. Epilepsien sind definiert als chronische Erkrankung mit wiederkehrenden unprovokierten Anfällen, die durch transiente, abnorm exzessive oder synchrone neuronale Aktivität im Gehirn verursacht werden. Synchrone Entladungen können einerseits durch eine Veränderung intrinsischer Ströme einzelner Neurone und andererseits durch eine Imbalance von Exzitation und Inhibition innerhalb eines neuronalen Netzwerkes bestimmt werden. Obwohl die klinischen epileptischen Syndrome verschieden sind, verdichten sich die Anzeichen eines gemeinsamen Mechanismus der Anfallsauslösung auf zellulärer Ebene (McCormick and Contreras, 2001). Wenngleich erbliche Formen der Epilepsie eher selten sind (Catterall et al., 2008), wurde bei diesen in fast allen hereditären Epilepsien ein Gendefekt in Ionenkanälen oder Ionenkanal-modulierenden Untereinheiten identifiziert. Die häufigsten epilepsieassoziierten Mutationen finden sich an verschiedenen Natriumkanaluntereinheiten (sowohl als Funktionssteigerung als auch als -verlust), aber auch für Mutationen anderer Ionenkanalfamilien, wie spannungsabhängige Kalium-, Calcium- und Chloridkanäle sowie ligandengesteuerte Kanäle gibt es deutliche Hinweise (Reid et al., 2009; Mulley et al., 2003; Heron et al., 2007; Planells-Cases and Jentsch, 2009). Da dem dendrito-somatischen I_h bei der neuronalen unterschwelligen Erregbarkeit und beim Feuerverhalten eine besondere Bedeutung zukommt und schon bei kleinen Veränderungen schwerwiegende Störungen der Hirnerregbarkeit auftreten (Luthi and McCormick, 1998), ist zu erwarten, dass dysfunktionale HCN Kanäle auch eine Rolle bei der Entwicklung epileptischer Aktivität spielen. Allerdings konnte bislang keine mit Epilepsie assoziierte HCN Mutation identifiziert werden. Demgegenüber mehrten sich vor und während unserer Studie (3.2.1.) Hinweise auf eine Beteiligung von HCN-Abberationen bei verschiedenen Formen von Epilepsien im Menschen und im Tiermodell (DiPasquale et al., 1997; Chen et al., 2001b; Brewster et al., 2002; Poolos et al., 2002; Chen et al., 1999). Zudem könnten *bursts* von Aktionspotentialen als zugrundeliegendes und aufrechterhaltendes Moment von Epilepsien in verschiedenen Regionen im Säugetierhirn (Jensen and Yaari, 1997; Wellmer et al., 2002; Yaari and Beck, 2002; Sanabria et al., 2001) durch einen verringerten dendritischen I_h bedingt sein. Interessanterweise fiel bei *chattering* Neuronen (Gray and McCormick, 1996; Brumberg et al., 2000), die *bursts* mit hohen Frequenzen zeigten, ein völliges Fehlen einer langsam depolarisierende Komponente bei Hyperpolarisation auf, was für ein Defizit an I_h spricht. Evidenzen für eine Verbindung von I_h und Epilepsie kommen auch aus der Pharmakologie. Pharmakologische Steigerungen von I_h über die Verschiebung der Strom-Spannungsbeziehung konnten durch in der Epilepsitherapie gebräuchliche Substanzen wie Acetazolamid für thalamische Neurone (Munsch and Pape, 1999b) und Lamotrigin für hippocampale Pyramidenzellen (Poolos et al., 2002) erreicht werden.

3.2.1. Absence-Epilepsie und neocorticaler I_h

Absencen oder „*petit mal*“ Anfälle sind eine Form generalisierter Epilepsie, bei der ein plötzliches Sistieren von Verhalten mit einer Bewusstseinsstörung verbunden ist. Der Neocortex spielt in der Epileptogenese eine entscheidende Rolle (zur Übersicht McCormick and Contreras, 2001). Pharmakologische, neurochemische und neurophysiologische Daten zeigen, dass ein im somatosensorischen Cortex gelegener ursächlicher Focus spontan oscillierender Neuronen eine Kaskade von Ereignissen initiiert, die letztlich zum Auftreten von bilateralen und generalisierten *spike-wave* Entladungen im wachen Zustand und bei Schläfrigkeit führen. Epileptiforme Aktivität wird besonders in *layer 2/3* (Meeren et al., 2002) initiiert und breitet sich dort aus (Albowitz et al., 1998). Dass spezifisch die periorale Region übererregbar ist, könnte durch eine lokale Minderung der GABAergen Aktivität bedingt sein. Der *spike-wave* Entladungen generierende cortikale und subcortikale Neuronenkreis ist Teil eines oszillatorischen Systems, das bei der Ratte auch andere cerebrale Rhythmen erzeugt, z. B. während Tasthaarbewegungen.

Die folgende Studie konnte den direkten Beitrag von I_h zur neuronalen Übererregbarkeit im Tiermodell für Absence-Epilepsien (Wistar Albino Glaxo / Rijswijk (kurz WAG/Rij) Ratten) aufzeigen. Absencen in WAG/Rij Ratten werden als valides Modell für humane Absencen angesehen, da sie phänomenologisch und elektrophysiologisch sehr ähnlich sind. So zeigen WAG/Rij Ratten spontan auftretende *spike-wave* Entladungen im EEG, die in *bursts* von 1 – 30 Sekunden (im Mittel 5 Sekunden) und mit einer *spike-wave* Frequenz von 7 – 10 Hz auftreten. Die Anzahl der *spike-wave* Entladungen ist altersabhängig; ab einem Alter von 6 Monaten erleiden die Ratten ca. 16-18 *spike-wave* Entladungen pro Stunde. Klassische Anti-Absence Medikamente, wie Ethosuximide, Valproate und Trimethadione unterdrücken in WAG/Rij Ratten die *spike-wave* Entladungen, wogegen Diphenylhydantoin and Carbamazepin, als klassisch anticonvulsive Substanzen, einen deutlichen Anstieg der *spike-wave* Entladungen verursachen. Zur Klärung der Frage ob I_h , eine wesentliche Determinante cortikaler Erregbarkeit, bei Absence Epilepsien verändert ist, verglichen wir I_h -vermittelte Funktionen von Pyramidenzellen des somatosensorischen Cortex von WAG/Rij Ratten, Wistar Ratten und August Copenhagen Irish (ACI) Ratten. Dieser Vergleich war notwendig, da Wistar Ratten den gleichen genetischen Hintergrund wie WAG/Rij Ratten aufweisen, und daher zwar weit weniger, trotzdem aber manifeste epileptische Anfälle im Erwachsenenalter entwickeln; und nur nicht ingezüchtete ACI Ratten nahezu keine Epilepsie ausbilden. Die elektrophysiologischen Untersuchungen belegen eine 50%ige Reduktion von I_h in WAG/Rij Ratten, die vornehmlich die schnelle Komponente des Stromes betrifft. Diese Reduktion ist bedingt von einer ebenfalls deutlichen 34%igen Reduktion des HCN1 Proteins im Neocortex epileptischer Ratten. Die Reduktion führt, wie wir erstmalig für den Cortex zeigen, zu veränderten integrativen Eigenschaften der Pyramidenzellen sowie zu einem veränderten Feuerverhalten.

An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy.

Strauss U, Kole MH, Bräuer AU, Pahnke J, Bajorat R, Rolfs A, Nitsch R, Deisz RA. Department of Neurology, University Rostock, Gehlsheimer Strasse 20, 18147 Rostock, Germany.

Neuronal subthreshold excitability and firing behaviour are markedly influenced by the activation and deactivation of the somato-dendritic hyperpolarization-activated cation current (I_h). Here, we evaluated possible contributions of I_h to hyperexcitability in an animal model of absence seizures (WAG/Rij rats). We investigated pyramidal neurons of the somatosensory neocortex, the site of generation of spike-wave discharges. I_h-mediated functions in neurons from WAG/Rij rats, Wistar rats (sharing the same genetic background with WAG/Rij, but less epilepsy-prone) and ACI rats (an inbred strain, virtually free of seizures) were compared. We complemented whole-cell recordings from layer 2-3 pyramidal neurons with immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR analysis of the h-channel subunits HCN1-4. The fast component of I_h activation in WAG/Rij neurons was significantly reduced (50% reduction in the h-current density) and four times slower than in neurons from nonepileptic Wistar or ACI rats. The results showing decreases in currents corresponded to a 34% reduction in HCN1 protein in the WAG/Rij compared to the Wistar neocortex, but HCN1 mRNA showed stable expression. The other three I_h subunit mRNAs and proteins (HCN2-4) were not affected. The alterations in I_h magnitude and kinetics of gating in WAG/Rij neurons may contribute to augmented excitatory postsynaptic potentials, the increase in their temporal summation and the facilitation of burst firing of these neurons because each of these effects could be mimicked by the selective I_h antagonist ZD 7288. We suggest that the deficit in I_h-mediated functions may contribute to the development and onset of spontaneously occurring hyperexcitability in a rat model of absence seizures.

Eur J Neurosci. 2004 Jun; 19(11):3048-58. PMID: 15182313

3.2.2. Effekte perinataler Manipulationen auf HCN1 Expression und Anfälle

Die Vorarbeit zeigt deutlich eine Assoziation von HCN1 Reduktion und Absence-Epilepsie. Die I_h Reduktion in WAG/Rij Ratten ist konsistent mit dem epileptischen Phänotyp in HCN2 *knockout* Mäusen (Ludwig et al. 2003). Andererseits finden sich in experimentellen (Di Pasquale et al. 1997; Budde et al. 2005) und Simulationsstudien (Timofeev et al. 2002) Hinweise für eine I_h Erhöhung in Assoziation mit epilepsietypischen Entladungen (*spike-wave*). Zusätzlich wird die Folgerung einer kausalen Beziehung zwischen HCN Funktion und Epilepsie durch Befunde erschwert, die zeigen, dass Veränderungen in HCN Untereinheiten durch Kainat oder hyperthermieinduzierte Anfälle erworben werden können (Chen et al. 2001; Shah et al. 2004; Brewster et al. 2005). Dies könnte bedeuten, dass HCN Veränderungen sekundär zur Anfallsaktivität entstehen. Derartige Erwägungen führten zu einer Vielzahl von Ansichten über die Rolle von HCN Kanälen bei Epilepsie (Poolos, 2004). Vergleicht man jedoch den Zeitpunkt des Beginns der Anfälle mit den zeitlichen Veränderungen der I_h Expression wird deutlich, dass ein schneller Verlust von dendritischem HCN1 (im 1-2 postnatalen Monat) dem Anfallsbeginn in WAG/Rij Ratten (ab dem 3 postnatalen Monat - (Coenen & van Luijckelaar, 2003)) vorausgeht (Kole et al., 2007). Dieser dendritische HCN1 Verlust ist direkt mit der frequenzabhängigen Verstärkung rückpropagierender Aktionspotentiale und der Generierung hochfrequenter *bursts* von Aktionspotentialen in *layer 5* Pyramidenzellen verbunden und begünstigt damit Initiation und Propagierung spontaner generalisierter Anfälle.

Unklar blieb jedoch, ob die aus diesem Grund als ererbt angenommenen HCN1 Veränderungen vorgegeben oder im Laufe der Entwicklung modulierbar sind.

Die folgende Untersuchung zur Beeinflussung des Verlaufs der Absence-Epilepsie in eben diesem Modell (WAG/Rij) ergab, dass trotz der genetischen Ursache der Absence eine Sensitivität der Anfälle gegenüber Manipulationen der Umwelt zumindest im Tiermodell WAG/Rij besteht. Sie zeigt, dass sehr frühe Manipulationen der Aufzuchtumgebung (neonatale Behandlung und maternale Deprivation) von WAG/Rij Ratten zu einer deutlichen Verringerung der Anfallsaktivität, nicht aber der Anfallslänge im späteren Leben führen. Verbunden mit der verringerten Anfallshäufigkeit fanden wir in Ganzzelleableitungen von *layer 5* Pyramidenzellen eine Vergrößerung von I_h . In den folgenden *in situ* Hybridisierungen und Western Blot Untersuchungen des somatosensorischen Kortex stellten wir als Ursache einen anhaltenden Anstieg von HCN1 Protein in neonatal behandelten und maternal depravierten WAG/Rij Ratten im Vergleich zu Kontroll-WAG/Rij Ratten fest. Der Anstieg war spezifisch für HCN1 Protein, da er weder die HCN2/4 Protein Expression noch die durch quantitative PCR bestimmte HCN1, 2 und 4 mRNA Expression betraf. Diese Befunde weisen erstmalig darauf hin, dass milde Veränderungen in einem engen Zeitfenster der Neonatalphase einen Langzeiteinfluß auf epileptische Aktivität I_h und HCN1 haben und unterstützen unsere Befunde zur Verbindung von neocortikalem I_h und HCN1 und der Epileptogenese.

Environmental manipulations early in development alter seizure activity, I_h and HCN1 protein expression later in life.

Schridde U, Strauss U, Bräuer AU, van Luijtelea G. Department of Neurology, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street, New Haven, CT 06520-8018, USA.

Although absence epilepsy has a genetic origin, evidence from an animal model (Wistar Albino Glaxo/Rijswijk; WAG/Rij) suggests that seizures are sensitive to environmental manipulations. Here, we show that manipulations of the early rearing environment (neonatal handling, maternal deprivation) of WAG/Rij rats leads to a pronounced decrease in seizure activity later in life. Recent observations link seizure activity in WAG/Rij rats to the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the somatosensory cortex, the site of seizure generation. Therefore, we investigated whether the alterations in seizure activity between rats reared differently might be correlated with changes in I_h and its channel subunits hyperpolarization-activated cation channel HCN1, 2 and 4. Whole-cell recordings from layer 5 pyramidal neurons, in situ hybridization and Western blot of the somatosensory cortex revealed an increase in I_h and HCN1 in neonatal handled and maternal deprived, compared to control rats. The increase was specific to HCN1 protein expression and did not involve HCN2/4 protein expression, or mRNA expression of any of the subunits (HCN1, 2, 4). Our findings provide the first evidence that relatively mild changes in the neonatal environment have a long-term impact of absence seizures, I_h and HCN1, and suggest that an increase of I_h and HCN1 is associated with absence seizure reduction. Our findings shed new light on the role of I_h and HCN in brain functioning and development and demonstrate that genetically determined absence seizures are quite sensitive for early interventions.

Eur J Neurosci. 2006 Jun; 23(12): 3346-58. PMID: 16820024

4. HCN medierter Ströme in der neuronalen Entwicklung

Aufgrund der deutlichen Beeinflussbarkeit von I_h durch frühe Interventionen begannen wir uns für die Entwicklung der HCN Kanäle zunächst im Neocortex zu interessieren. Es existierten lediglich Berichte über die Abnahme der Größe des *sag* (eines dem I_h zugeschriebenen depolarisierendes Phänomen nach Hyperpolarisation) in den Somata von Pyramidenzellen (Kim et al., 1995; Zhu, 2000; Zhang, 2004) und Beobachtungen der dendritischen Zunahme des *sag* (Zhu, 2000).

Um die I_h -Expression während der Entwicklung des somatosensorischen Kortex zu untersuchen, wurden elektrophysiologische (*whole cell patch clamp*) und molekularbiologische Methoden angewendet. I_h verändert sich in einem engen perinatalen Zeitfenster. Die Veränderungen lassen sich in zwei Gruppen mit unterschiedlicher Kinetik einteilen. Unmittelbar nach der Geburt kommt es

zu einer hyperpolarisierenden Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (Abbildung 5), zur Verminderung des neuronalen Eingangswiderstandes und der Deaktivierungszeitkonstanten (Abbildung 6).

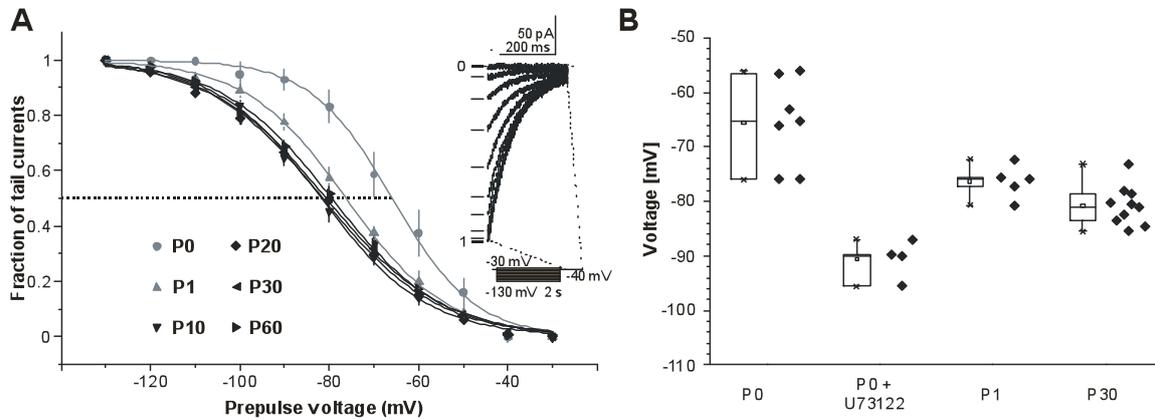


Abbildung 5. Altersabhängige Veränderungen in der Spannungsabhängigkeit des pharmakologisch isolierten I_h

A *Steady-state* Aktivierungskurven aus den gemittelten ($n = 8 - 15$) relativen *tail* Strömen (rechts oben), aufgetragen gegen das vorausgehende Testpotential. Die halbmaximale Aktivierungsspannung ($V_{1/2}$) verschiebt sich zwischen den postnatalen Tagen P0 und P1 deutlich in den hyperpolarisierenden Bereich. **B** Boxplots der halbmaximalen Aktivierungsspannung zu verschiedenen postnatalen Zeitpunkten (P0, P1, P30) und an P0 mit dem Phospholipase C (PLC) Blocker U73122 in der intrazellulären Lösung. Die PLC Blockade lässt die Depolarisation der $V_{1/2}$ an P0 verschwinden (aus Bättefeld et al., in preparation).

Mit einer Zeitkonstante von 10 bis 15 Tagen verändern sich I_h -Amplitude, Leitfähigkeit und Stromdichte sowie Aktivierungskinetik. Die Zunahme des I_h ist auch hier mit einer Reduktion des somatischen sag verbunden (Zhu 2000; Zhang 2004). Dies ist Ergebnis der durch I_h -Zunahme hervorgerufenen vergrößerten elektrotonischen Distanz. Die I_h -Zunahme führt auch zu einem Abfall des neuronalen Eingangswiderstandes und einer leichten somatischen Depolarisation. Auf molekularer Ebene ist eine Verschiebung der Untereinheitenzusammensetzung mit besonderer Betonung der "langsamen" Untereinheiten (vor allem HCN3) in späten embryonalen und frühen postnatalen Phasen am wahrscheinlichsten als ursächlich für die I_h Veränderungen anzusehen.

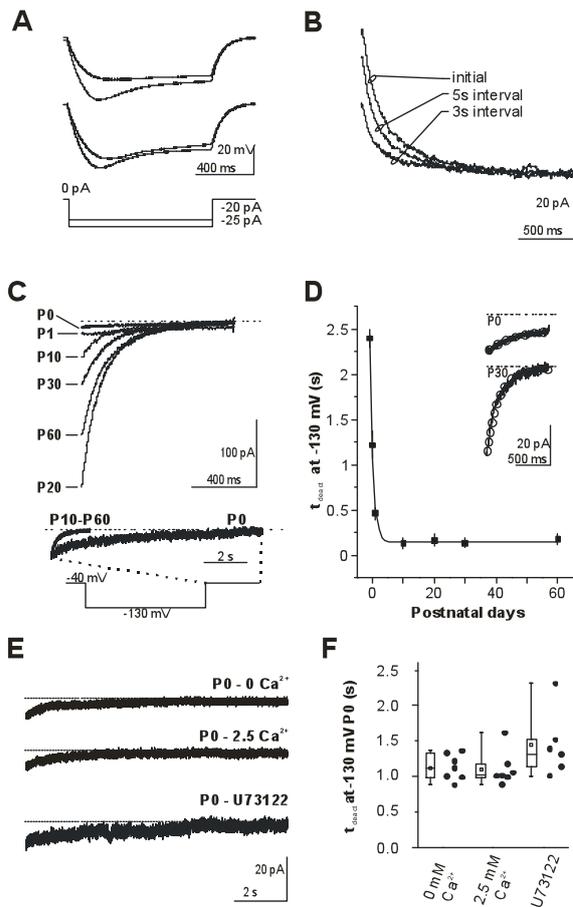


Abbildung 6. Die I_h Deaktivierungszeit nimmt mit zunehmendem Alter stark ab

A Spannungsantworten auf kurz aufeinanderfolgende hyperpolarisierende Strominjektionen (unten) im Intervall von 1 Sekunde (oben) oder 10 Sekunden (mitte). Besonders zu beachten ist hier die Reduktion des sag bei Stimulation mit 1 Hz.

B Abhängigkeit der I_h Aktivierung und der instantanen Stromkomponente vom Intervall der aufeinanderfolgenden Spannungspulse zu -130 mV ohne vorherigen Puls und bei 3- und 5-s Intervallen.

C *Oben*: Representative tail Ströme abgeleitet zum Zeitpunkt P0 – P60 bei einer Spannung von -40 mV nach einem 2-s Spannungspuls auf -130 mV. *Unten*: Normalisierte Stromamplituden verdeutlichen die viel langsamere I_h Deaktivierung in sehr früh postnatalen Neuron. Von P10 an verändert sich die Deaktivierungskinetik nicht mehr.

D Die Deaktivierungszeitkonstante (τ_{deact}) verringert sich exponentiell während der postnatalen Entwicklung. Tail Ströme wurden wie in C evoziert und lassen sich ausreichend mit monoexponentiellen Funktionen beschreiben. Mittelwerte \pm SEM, $n = 2 - 19$.

E/F Weder die Veränderung des extracellulären Ca^{2+} Spiegels noch die intracelluläre Blockade der PLC konnten die Deaktivierungszeitkonstante zum Zeitpunkt P0 beeinflussen (aus Battfeld et al., *in preparation*).

Die beiden wesentlichen perinatalen Veränderungen des I_h , depolarisierte Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und stark verlängerte Deaktivierung sorgen für eine Zunahme des „standing“ I_h , und kompensieren so die während dieser vulnerablen Phasen noch sehr geringe Stromexpression.

4.1. Allgemeine Implikationen von I_h für die neuronale Entwicklung

Derartige Befunde führen zu der Frage, ob ähnliche HCN Veränderungen in anderen Regionen des Gehirns während der Entwicklung zu beobachten sind und welchen Einfluß die HCN Entwicklung auf die Hirnentwicklung hat. Diesen Fragen geht die folgende Übersichtsarbeit nach. Während der neuronalen Entwicklung werden Ionenströme in den meisten Fällen durch das Entfernen oder Hinzufügen zusätzlicher Kanaltypen oder -subtypen realisiert (Spitzer, 2006). Die Expression unterschiedlicher Kombinationen von HCN-Untereinheiten erklärt wahrscheinlich die diversen Eigenschaften des nativ beobachteten I_h in verschiedenen Neuronenpopulationen (Santoro et al., 2000). Derselbe Prozess könnte den molekularen Mechanismus darstellen, durch den bestimmte Aktivitätsmuster während der Entwicklung gebildet und geformt werden (Frere et al., 2004), das heißt, die Homo- und Heteromerisation von HCN-Untereinheiten und deren Lokalisation

in der Zellmembran werden aktiv gesteuert. Die *h*-Kanäle aus nativen Gewebepräparationen werden prinzipiell durch transiente und persistierende aktivitätsabhängige und auch aktivitätsunabhängige Veränderung der HCN-mRNA und -Proteinexpression reguliert (Santoro and Baram, 2003). Detaillierte Analysen der zeit- und raumabhängigen Expression von HCN-Transkripten zeigten im Hippocampus Alterationen der HCN-Untereinheiten- und -Heteromerisationsmuster während der perinatalen Entwicklung (Bender et al., 2001; Vasilyev and Barish, 2002; Bender et al., 2007). Im entorhinalen Cortex z. B. sind HCN1 Kanäle während der Entwicklung in Axonteminalen angereichert. Diese spezielle Lokalisation von HCN1 ist über die Entwicklung reguliert, im adulten Tier findet sich dort kaum HCN1 (Bender et al., 2007). Diese Muster sind einzigartig für den zellulären Kontext und somit nicht zwischen unterschiedlichen Hirnregionen übertragbar.

Auch alle bekannten Modulatoren von HCN Kanälen können prinzipiell zu funktionellen I_h Veränderungen während der Entwicklung beitragen. Die Bindung von cAMP an HCN2-Untereinheiten ruft eine starke Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Deaktivierungskinetik hervor (Wang *et al.*, 2002). Modifikation der CNBD sind beschrieben (Ulens and Siegelbaum, 2003; Wainger et al., 2001) und um diesen Teil der Aminosäuresequenz verkürzte Kanäle zeigen eine akzelerierte Aktivierungskinetik (Wainger *et al.*, 2001). Zudem können cAMP-abhängige Einflüsse auf den I_h durch Proteinkinaseinhibitoren vollständig eliminiert werden (Chang *et al.*, 1991). Andere transient aktive regulatorische Faktoren neben cAMP (Wainger *et al.*, 2001), wie ATP (Raes *et al.*, 1997) und der pH-Wert (Wellner-Kienitz et al., 1998; Zong et al., 2001) sind involviert in die Entwicklung des Stroms. Die maximale Stromamplitude steht unter dem Einfluss von Proteinkinase C und PTKs (Shibata et al., 1999; Wu and Cohen, 1997), die wiederum selbst unter dem regulatorischen Einfluss von Wachstumsfaktoren stehen (Thoby-Brisson *et al.*, 2003). Diese zum Veröffentlichungszeitpunkt (2006) bekannten Modulationen und ihr mutmaßlicher Einfluß auf die Hirnentwicklung sind im Folgenden wertend zusammengefasst.

Ih is maturing: implications for neuronal development.

Rocha N, Rolfs A, Strauss U. Neurobiological Laboratory, Department of Neurology, University of Rostock, Rostock, Germany.

Vast electrophysiological activity near resting potential, including rhythmic oscillatory activity, is a hallmark of many brain regions and a motor of the developing CNS. This activity is mediated and influenced by diverse receptor-operated and voltage-gated ion channels. In turn, these channels are modulated during the course of development by altering their density, distribution and properties. The hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation current, Ih, impacts on the resting membrane potential and is involved in the generation and modulation of neuronal oscillatory activity. Therefore, it is conceivable that Ih is well suited to govern the specific processes involved in activity-dependent neuronal development. Here, we review the evidence that maturation of Ih accounts, at least in part, for the control of membrane properties during neuronal development of various parts of the brain. The temporal and regional variations in Ih development might underlie the normal maturation of neuronal circuits and, consequently, the perturbations of this might account for some of the neuropathology of the brain. This review summarizes the evidence for the stage and localization dependence of Ih in CNS development with a focus on arborized cells with high dendritic Ih. Further, it outlines hypotheses on the contribution of Ih to neuronal and network maturation.

Neurodegener Dis. 2006; 3(1-2): 27-31. PMID: 16909033

4.2. HCN2/3-medierter I_h in der striatalen Entwicklung

Detaillierte Kenntnisse über die morphologische und funktionelle Entwicklung neuronaler Strukturen sind auch Voraussetzung für neuroregenerative Therapieansätze. Bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, wie dem Parkinson Syndrom, wäre die Erneuerung untergegangener Neurone durch die Transplantation neuronaler Vorläuferzellen eine Option. Zielstruktur für derartige Therapien sind z.B. die Basalganglien, subkortikale Kerngebiete, die u. a. aus Nucleus caudatus und Putamen bestehen. Letztere liegen in der frühen Embryonalentwicklung als Teile des Telenzephalons zusammen, später sind sie durch die Capsula interna getrennt, bleiben jedoch durch feine Streifen grauer Substanz in Verbindung, weshalb sie als Striatum bezeichnet werden. In klinischen Studien an Patienten mit Parkinson-Syndrom erreichte die Transplantation adrener chromaffiner Zellen (Madrazo et al., 1987) oder dopaminergere Neuronen (Spencer et al., 1992; Freed, 1993; Freed, 2004; Mendez et al., 2002) teilweise eine Besserung. Die transplantierten Zellen integrierten sich funktionell ins Hirngewebe und setzten Dopamin frei. Jedoch traten im Verlauf teils schwere Dyskinesien auf (Freed, 2004; Olanow et al., 2009; Lindvall and Bjoerklund, 2004; Lindvall and Kokaia, 2006; Hagell and Cenci, 2005).

Funktionelle Eigenschaften adulter striataler Neurone, darunter auch I_h (Kawaguchi, 1993) sind, im Gegensatz zu denen unter Ontogenese, bekannt. Striatale Neurone durchlaufen ihre finale Mitose zwischen dem embryonischen Tag E12 und dem postnatalen Tag P2 (Bayer, 1983; Marchand and Lajoie, 1986). Drei Arten der Migration sind an der Entwicklung des Striatum beteiligt: einwärtsgerichtete Migration der Neurone aus der *preplate*, radiale Migration der striatalen Projektionsneurone aus der lateralen ganglionischen Eminenz (LGE) und tangential Migration der Interneurone aus der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) (Hamasaki et al., 2003). **(1)** Die proliferativen Zonen im sich entwickelnden Telenzephalon der Mammaliae befinden sich Neuroepithelium in der ventrikulären Zone (VZ) und in der subventrikulären Zone (SVZ) (Bhide, 1996). Von dort migrieren die neuronalen Progenitorzellen und differenzieren in eine vorgegebene Struktur des adulten Gehirns (Hamasaki et al., 2003). **(2)** Von der LGE migrieren Progenitorzellen zur lateroventralen Seite des Telenzephalon (de Carlos et al., 1996) und differenzieren zu striatalen Projektionsneuronen (Olsson et al., 1998; Hamasaki et al., 2001). **(3)** Auch die tangential Migration findet in verschiedenen Regionen des Telenzephalon statt (de Carlos et al., 1996). So differenzieren Vorläuferzellen, die das Protein des Transkriptionsfaktorgens Nkx2.1 exprimierten, nach tangentialer Migration in cholinerge, Calretinin-positive oder Parvalbumin-positive Interneurone (Marin et al., 2000; Wichterle et al., 2001). Die normale Entwicklung des Striatum setzt eine Mischung aus verschiedenen Zelltypen, deren Ursprung in weiter auseinanderliegenden Teilen des Telenzephalon liegt, voraus (Hamasaki et al., 2003). Eine wachsende Anzahl von Studien beschreibt dieses Phänomen auch für die kortikale Entwicklung, wo aus der VZ des Pallium radial kortikale Projektionsneurone und tangential aus der ganglionischen Eminenz des Subpallium kortikale Interneurone migrieren (Marin-Padilla, 1998).

Zur genauen elektrophysiologischen Beschreibung striataler Progenitorzellen benutzten wir die striatale Progenitorzelllinie ST14A aus Primärzellen des Striatums von Sprague-Dawley-Ratten als Modellsystem für multipotente neuronale Vorläufer. Die Zellen wurden den Embryonen am 14. Tag *post conceptionem* entnommen und mittels Retroviren mit der temperatursensitiven Mutante des Protoonkogens SV40-*Large-T*-Antigen transfiziert (Cattaneo and Conti, 1998). Die so transfizierten Zellen sind temperaturabhängig immortalisiert, bei Kultivierung unter permissiven Temperaturbedingungen von 33°C kommt es zur Expression des immortalisierenden Onkogens und die Zellen teilen sich uneingeschränkt, wobei sie Progenitorzellen bleiben (Redies et al., 1991). Dabei exprimieren sie Nestin (Barresi et al., 2003), ein Intermediärfilament-Protein, welches als Marker für neuronale Vorläuferzellen gilt, da es während der Neurogenese im ZNS nachweisbar ist (Frederiksen and McKay, 1988).

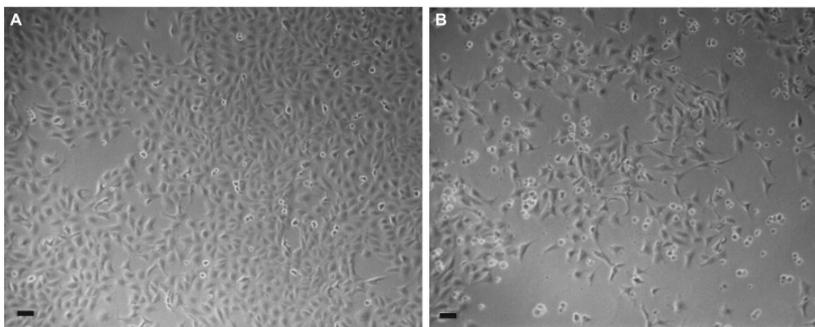


Abb. 3: ST14A-Zellen bei 33°C bzw. 39°C
 A: uneingeschränkte Proliferation der ST14A-Zellen bei 33°C aufgrund der Expression eines immortalisierenden Protoonkogens; B: Differenzierung der ST14A-Zellen und Hemmung der Proliferation bei 39°C.
 Maßstab: 10 µm

Nach einer Temperaturerhöhung auf 39°C wird das Onkoprotein herunterreguliert und die Proliferation gehemmt (Jat and Sharp, 1989) sowie die Differenzierung eingeleitet (Ehrlich et al., 2001). Während sich *in vivo* vor allem Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten) entwickeln (Lundberg et al., 1996), kann *in vitro* durch geeignete Kulturbedingungen eine betont GABA-erge Differenzierung erreicht werden (Bosch et al., 2004). Da die nicht-permissive Temperatur der physiologischen des Rattengehirns entspricht, eignen sich die ST14A-Zellen zur tierexperimentellen Zellersatztherapie (McKay, 1992; Gage et al., 1995). Die Transplantation von ST14A-Zellen in embryonale (Cattaneo et al., 1994) bzw. adulte (Lundberg et al., 1996; Lundberg et al., 1997) Gehirne von Ratten belegt deren Überleben und Differenzierung im Wirtsgewebe ohne maligne Entartung. Vorteile solcher immortalisierten Vorläuferzellen sind die beinahe unbegrenzte Verfügbarkeit und die standardisierte Qualität aufgrund ihrer Langzeitstabilität *in vitro*. Der gut definierte Wechsel von Proliferation zu Differenzierung und die relative zelluläre Homogenität zusammen mit der Möglichkeit, molekularbiologische, histochemische und elektrophysiologische Methoden zu kombinieren, machen diese Zellen zu einem nützlichen Modell.

Um die direkte Bedeutung der Ergebnisse zu kontrollieren, welche an ST14A-Zellen gewonnen wurden, wurden diese mit denen von frisch isolierten und kurzzeitig kultivierten Zellen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen: E14 am embryonalen Tag 14, also im Alter der ST14A-Zelllinie entnommen, und P0 unmittelbar postnatal, zur Prüfung einer möglichen Veränderung *in vitro*.

Functional significance of HCN2/3-mediated $I(h)$ in striatal cells at early developmental stages.

Bajorat R, Bräuer AU, Wasner U, Rolfs A, Strauss U. Neurobiological Laboratory, Clinic for Neurology, University of Rostock, Rostock, Germany.

Hyperpolarization-activated cAMP-gated cation currents ($I(h)$) were recently linked to pre- and postnatal developmental processes in several brain regions, including the ventral telencephalon. To evaluate the role of $I(h)$ in striatal development, we used short-term cultured cells from the lateral ganglionic eminence at embryonic day 14 (E14) and postnatal days 1-3 (P1-3) as well as the embryonic striatal progenitor cell line ST14A. Western blot analysis of the $I(h)$ underlying subunit proteins HCN1-4 revealed strong HCN2 expression in proliferating ST14A cells and weak expression in postmitotic ST14A cells and in cells from the developing brain. We also found HCN3 expression only in ST14A cells at both proliferative and nonproliferative stages but not in short-term cultured striatal cells. In all cases, HCN1 and HCN4 transcripts were below the detection level. Despite the selective protein expression, RT-PCR analysis showed stable expression of HCN2-4 but not HCN1 mRNA in all short-term-cultured striatal cells and in the ST14A cell line. Consistent with the strong protein expression, an $I(h)$ was recorded with features of an HCN2-mediated current in ST14A cells at the proliferative stage and in short-term-cultured E14 cells. Of particular importance is that we detected no currents upon hyperpolarization in the ST14A cells at the nonproliferative stage when only HCN3 protein was present. These results suggest the potential importance of ST14A cells in defining the molecular mechanisms regulating $I(h)$ expression and function.

J Neurosci Res. 2005 Oct 15; 82(2): 206-13. PMID: 16175581

5. Diskussion

Die hier zusammengestellten Arbeiten zeigen den hyperpolarisationsaktivierten nichtselektiven Kationenstrom I_h als eine wesentliche Komponente intrinsischer Erregbarkeit in zentralen Neuronen. Durch die weite Verbreitung im Gehirn, seine Modulationsmöglichkeiten und seine vielfältigen Funktionen hat I_h klinische Bedeutung, die mit der wachsenden Zahl der Untersuchungen deutlicher wird. Die Ergebnisse werden im Folgenden hinsichtlich zweier forschungstreibenden Aspekten, erstens Modulation / der HCN medierten Ströme (Interventionsmöglichkeiten) und zweitens Modulation cerebraler Prozesse (physiologisch und pathophysiologisch) durch I_h diskutiert.

5.1. Modulation von I_h

Der unerwartete initiale Anstieg von I_h in neocortikalen Neuronen der Ratte nach Erreichen der *whole cell* Konfiguration ließ sich aufgrund technischer Limitationen nur im heterologen Expressionssystem sowohl für HCN1 der Ratte als auch für HCN1 des Menschen reproduzieren und weiter untersuchen (Kapitel 2, Battenfeld et al., 2010). Sicher ist, dass es sich ursächlich bei der (physiologischen) I_h Minderung in intakten Zellen um einen cytosolisch mediierten Mechanismus handelt. Nach Ausschluss von cAMP, cGMP, ATP, GTP und dem Phosphatgruppendonor Phosphocreatin bleibt allerdings das auslösende Agens zunächst unklar. Hinsichtlich des Mechanismus hypothetisieren wir eine in der intakten Zelle bestehende Inaktivierung von HCN1 Kanälen, die schnell gelöst werden kann und somit eine funktionelle HCN1 Reserve darstellen könnte. Interessanterweise ist für Halothan eine HCN Untereinheitenbeeinflussung abhängig vom Aktivierungsstatus des cAMP *gating* Ringes beschrieben worden (Chen et al., 2005). Die Reaktion von HCN1 und HCN2 Kanälen auf Halothan sind im Wesentlichen gleich, wenn cAMP erhöht oder die inhibitorischen Effekte durch Deletion eliminiert worden sind (Chen et al., 2005; Chen et al., 2009a). Ein vereinfachtes Modell des HCN Kanal *gating* (Shin et al., 2004) suggeriert eine Beteiligung der C-Terminal mediierten basalen Inhibition, die den geschlossenen Zustand des Kanals stabilisiert. Übertragen auf unsere Befunde würde das eine stärkere Rolle der basalen Inhibition für HCN1 implizieren, als bisher angenommen. Allerdings ist anzumerken, dass die heterologe Expression die gesamte Komplexität von Kanalverhalten und –regulation in Neuronen nicht abbildet. So kann z. B. die aktivierungsabhängige Heteromerisierung von HCN Kanaluntereinheiten nicht untersucht werden, da diese im Expressionssystem fast ausschließlich nichtselektiv ist (Zha et al., 2007; Much et al., 2003). Zudem hängt die Untersuchung von aktivierungsgesteuertem Transport und Oberflächenexpression von der Erregbarkeit der Membran ab, was neuronale Systeme voraussetzt.

Neben den bekannten I_h Modulatoren im Zentralnervensystem (Kapitel 1.2.) sind Zytokine, und hier besonders das Typ I Interferon IFN- β von Bedeutung (Kapitel 3.1., Hadjilambrea et al., 2005). Direkte IFN- β -Effekte wurden bisher hauptsächlich in Astrozyten gefunden. Sie bestehen überwiegend in einem antagonistischen Einfluss gegenüber IFN- γ . So unterdrückt IFN- β erstens die Aktivierung von IFN- γ induzierten Genen über die Hemmung der *IFN- γ -activated sequence* (GAS)-Bindung (Hua et al., 2002) und zweitens die Interleukin-1- und IFN- γ -induzierte Inhibition der Glutamataufnahme und NO-Produktion in Primärkulturen humaner Astrozyten (Hu et al., 2000). Die Arbeit an akuten Coronarschnitten vom somatosensorischen Cortex der adulten Ratte zeigt, dass IFN- β dosisabhängig die neuronale Erregbarkeit steigert (Kapitel 3.1., Hadjilambrea et al., 2005). Einerseits wird im unterschwelligen Bereich durch IFN- β der Eingangswiderstand der Neurone bis zu verdoppelt. Dieser Effekt ist reversibel und bedarf der ständigen Anwesenheit von IFN- β . Er ist hauptsächlich über I_h mediiert und scheint HCN1 spezifisch zu sein (Kapitel 3.1.; Stadler et al., under review). Diese HCN1 Spezifität rückt IFN- β in die Nähe volatiler Anästhetika und Ketamin, die ebenfalls eine HCN1 Reduktion bewirken (Chen et al., 2005; Chen et al., 2009a; Chen et al., 2009b).

Die I_h Modulation ist abhängig vom Typ I Interferon Rezeptor und seiner initialen Signalkaskade. Versuche mit Blockade der Proteinsynthese durch Cycloheximid legen eine Beteiligung der Proteinsynthese am IFN- β Effekt nahe, obwohl sich in der darauffolgenden differentiellen Proteinanalyse kein eindeutiges Bindeglied zwischen IFNAR Signalkaskade und bekannten intrazellulären HCN Regulatoren fand: In einer 2D Gelanalyse wurden nach IFN- β Einwirkung 19 regulierte Proteine in 6 funktionellen Kategorien identifiziert, von denen die meisten hochreguliert waren (Tabelle 1 in Beyer *et al.*, 2009). Vor allem Strukturproteine, Transportproteine und Schlüsselenzyme des Stoffwechsels (Figure 2, Tabelle 1 in Beyer *et al.*, 2009) nahmen zu, was auf einen bisher unbekanntem Einfluss von IFN- β auf Funktionen neuronaler und / oder glialer Zellen, wie Entwicklung, Neuroprotektion und –regeneration hinweist. Sie sind zwei Gruppen zuzuordnen, einer, die für basale Zellfunktionen wie Bildung des Zytoskeletts, Proteintransport und Zellstoffwechsel, und einer anderen, die für strikt neuronale Prozesse wie Axonbildung und synaptischen Vesikeltransport von Bedeutung sind. Im Einzelnen handelt es sich um: (1) drei Dihydropyrimidinase-assoziierte Proteine (DRPs), welche an mit der neuronalen Differenzierung verbundenen cytoskelettalen Veränderungen beteiligt sind (Kitamura *et al.*, 1999; Quinn *et al.*, 2003). Gleichzeitig waren auch die cytoskelettalen Proteine Ezrin, Internexin- α und drei Tubulin- β Ketten hochreguliert. Ezrin findet sich in neuronalen Progenitorzellen und Astrocyten (Gronholm *et al.*, 2005) und Internexin- α ist an der Anordnung neuronaler Intermediärfilamente notwendig beteiligt (Ching and Liem, 1999). (2) zwei Proteine mit Schlüsselrolle im Proteintransport (z. B. synaptische Vesikelendozytose und Membranrecycling) namentlich Clathrin B (hirnspezifische leichtkettige und nicht hirnspezifische Isoform) und Amphiphysin 2. Im Rattenhirn interagiert das Ca^{2+} bindende Clathrin spezifisch mit Amphiphysin 2 wohingegen Dynamin Clathrin vom N-terminus der *src homology 3* (SH3) Domäne von Amphiphysin 2 verdrängt. Damit könnte die Dynamin Anlagerung an Clathrin in Axonterminalien erklärt werden (Wigge and McMahon, 1998). Wenngleich aus den elektrophysiologischen Experimenten hervorgeht, dass der klassische Modulator von HCN Kanälen, cAMP, nicht an der IFN- β Modulation beteiligt ist, bleiben PKA induzierte Veränderungen, die sich, trotz maximaler cAMP Konzentrationen, auswirken können (Raes *et al.*, 1997) oder eine direkte Phosphorylierung der HCN Kanäle durch Tyrosinkinase-Aktivität (Zong *et al.*, 2005) möglich.

Für die IFN- β induzierte Steigerung der Aktionspotentialfrequenz, die nach Abklingen der Erhöhung des Eingangswiderstandes bei Auswaschen persistiert, scheint I_h nur zu einem geringen Teil verantwortlich zu sein. Für diesen Effekt ist nur eine kurze Einwirkzeit von IFN- β notwendig (5 min). Die Steigerung der Frequenz ergibt sich sowohl aus einer Steigerung des *gains* (Veränderung der Sensitivität) als auch aus einer Verschiebung des *offsets* (Verminderung der neuronalen Diskriminierungsfähigkeit zwischen Grunderregung und Signal) der Strom-Frequenz (*I-F*) Kurve. Das Verhalten von Neuronen wird durch eine Vielzahl von miteinander interagierenden Kanälen bestimmt (Goldman *et al.*, 2001). Experimente unter Vorbehandlung mit Ionenkanalblockern ergaben, vor allem für die überschwelligeren Effekte, weitere möglicher zugrundeliegende Ionenkanalmodulationen: M-Ströme, Ni^{2+} sensitive (T-type) Ca^{2+} oder Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Strömen zur Steigerung des *gains*. Die Vorbehandlungsexperimente mit Bicucullin deuten auf eine Beteiligung der tonischen Inhibition durch eine Verschiebung des *offsets* der *I-F* Kurve hin (siehe auch Ulrich, 2003). Diese Ergebnisse sind

jedoch nicht als spezifisch für die Beteiligung von GABA_A mediierten Prozessen zu sehen, da Bicucullin auch *small conductance* Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle blockiert (Khawaled *et al.*, 1999) und müssen weiter abgeklärt werden. Folgeuntersuchungen sind ebenfalls notwendig, um zu klären, ob die Modulation von durch IFN-β eine umfassende Konsequenz entzündlicher Prozesse im Gehirn ist. Vor dem Hintergrund der Rolle von Cytokinen (hier bislang vor allem IFN-α) bei Depressionen (Krishnan and Nestler, 2008) ist dies jedoch denkbar. Unterstützt wird diese Theorie durch Befunde, die Veränderung von I_h sogar in myenterischen Neuronen durch Entzündungen wie Colitis zeigten (Linden *et al.*, 2003).

Die Veränderung der HCN Untereinheitenzusammensetzung führt zu einer Veränderung von I_h. Bezüglich der mit Absence-Epilepsie assoziierten I_h Veränderungen ergaben Western Blot und *in situ* Hybridisierung, dass HCN1 Regulation auch auf Proteinebene und nicht nur auf mRNA-Ebene erfolgt (Kapitel 3.2.1., Strauss *et al.*, 2004). Die Verringerung von I_h korrespondierte zu einer immunhistochemisch gefundenen und im Western-Blot auf 34% zu beziffernden Reduktion des HCN1 Proteins im Neocortex von WAG/Rij Ratten im Vergleich zu Wistar Ratten. Die mRNA für HCN1 hingegen zeigte eine stabile Expression in der quantitativen RT-PCR. Die anderen drei HCN-Untereinheiten mRNAs und Proteine (HCN2-4) waren unverändert. Neben Veränderungen der spättranskriptionellen Regulationswege können vor allem verschiedene posttranskriptionell wirkende Mechanismen an der geänderten Regulation der Genexpression beteiligt sein. Obwohl mittlerweile eine Assoziation verschiedener Epilepsien mit HCN Veränderungen etabliert ist, bleibt die Beziehung (Ursache? Folge? Epiphänomen?) Gegenstand von Debatten. Für eine kausalen Beziehung zwischen HCN Reduktion und Absence-Epilepsie spricht, dass der die HCN1 Reduktion deutlich vor Beginn der Anfälle bei genetisch determinierter Epilepsie auftritt (Kole *et al.*, 2007). Ein weiteres Indiz stellt unser Befund, dass frühe Manipulationen eine HCN1 Reduktion teilweise verhindern könne und somit zu einer Verminderung von epileptischen Anfällen im Erwachsenenalter führen, dar (Kapitel 3.2.2. Schridde *et al.*, 2006). Die Darstellung einer direkt ursächliche Beziehung könnte in Zukunft auch bei anderen Epilepsien über Mutationsstudien oder detaillierte Studien des subzellulären HCN Transportes (Noam *et al.*, 2010) gelingen. Andererseits folgen HCN Veränderungen auch auf epileptische Ereignisse, was zunächst die kausale Beziehung zwischen HCN Veränderungen und Entwicklung von Epilepsien in Frage stellt, jedoch an der Assoziation transkriptioneller HCN Veränderungen mit Epilepsie nichts ändert (Santoro and Baram, 2003). Im Rattenmodell kindlicher Fieberkrämpfe führen epileptische Anfälle zur Verminderung von HCN1 bei Vermehrung von HCN2 in hippocampalen CA1 Neuronen (Chen *et al.*, 2001b; Chen *et al.*, 1999; Brewster *et al.*, 2002; Brewster *et al.*, 2005). Funktionelles Korrelat dieser Untereinheitenverschiebung ist die Verlangsamung der Aktivierungskinetik und eine depolarisierende Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der I_h Aktivierung. Interessant in diesem Kontext ist jedoch, dass durch einen Status epilepticus erworbene HCN Dysfunktionen sich im Laufe der weiteren Epileptogenese parallel zum Verlauf der Übererregbarkeit verschlechtern (Jung *et al.*, 2007; Marcelin *et al.*, 2009).

Dass eine Untereinheitenreorganisation neben der pathophysiologischen auch eine physiologische Relevanz hat, zeigen die Daten zur Entwicklungsregulation der verschiedenen HCN Untereinheiten (Kapitel 4.2., Bajorat et al., 2005; Vasilyev and Barish, 2002). In striatalen Progenitorzellen fand sich auf Transkriptionsebene mRNA von HCN2, 3 und 4. Das Fehlen HCN1-Expression war nicht überraschend, da HCN1 auch in den adulten subcortikalen Strukturen nicht präsent war (Santoro et al., 2000). Das Fehlen von HCN4 auf Proteinebene weist dagegen auf eine entwicklungsbedingte Regulation hin. Die mRNA-Expression von HCN2-4 unterscheidet sich zwischen den in unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen (33°C vs. 39°C) gehaltenen striatalen Progenitor (ST14A) Zellen. Dagegen gab es im direkten Vergleich von HCN2-4 zwischen den Zellen der LGE/Striatum zum Zeitpunkt E14 vs. denen zum Zeitpunkt P0 keinen signifikanten Unterschied. Die Unterschiede in der Proteinexpression der HCN-Subtypen in den primären E14-Neuronen (HCN2) und den ST14A-Zellen (HCN2, HCN3) vorausgesetzt, scheint der Unterschied in der Aktivierung auf unterschiedlicher Heteromerisation der HCN-Subtypen zu beruhen. Dagegen sprechen Ergebnisse, dass die Kanal-Subtypen HCN2 und HCN3 keine funktionellen Heteromere bildeten (Much et al., 2003). Diese Auffassung (dass HCN3-Kanäle keine funktionellen Homomultimere ausbilden (Santoro et al., 2000; Chen et al., 2001c)) wurde durch die Klonierung und Expression des humanen HCN3-Kanals in HEK293-Zellen (Stieber et al., 2005) wiederlegt. Die murinen HCN3-vermittelten Ströme waren jedoch klein und instabil (Stieber et al., 2005). In den bei 39°C kultivierten ST14A-Zellen wurde kein I_h gemessen. Daraus folgt, dass eine gleich bleibende (bei den kurzzeitkultivierten primären Neuronen zum Zeitpunkt E14 vs. P0) und auch eine zunehmende (bei der ST14A-Zelllinie proliferatives (Marchand and Lajoie, 1986) vs. nicht-proliferierendes {39°C} Stadium) mRNA-Expression von HCN2-4 nicht gleichzeitig den Nachweis einer funktionellen Expression entsprechender HCN-Kanäle bedeutet. Die Ergebnisse bestätigen die Schlussfolgerung aus Messungen im murinen Hippocampus und Thalamus, dass die einfache Präsenz von HCN-Kanal-Transkripten in einer Zelle keine verlässliche Auskunft einer funktionellen Expression des Kanals anzeigen (Santoro et al., 2000). Als Erklärung für vorhandene Transkripte aber fehlende Proteine und deren Funktion im Fall der nicht-proliferierenden ST14A-Zellen (39°C) für HCN2-4 und für HCN4 bei den embryonalen Zellen (ST14A bei 33°C und primäre E14) sind daher posttranskriptionale Mechanismen zu favorisieren.

Möglicherweise waren in den nicht-proliferierenden ST14A-Zellen (39°C) die HCN-Kanäle inaktiviert und zeigten deshalb keinen I_h . Diese Art der Betrachtung würde durch Ergebnisse aus ventrikulärem Herzmuskelgewebe von Ratten bestätigt, wo die Aktivierungsschwelle des I_h zu sehr negativen Potentialen verschoben war, die unter typischen *whole-cell* Ableitungen nicht erreicht werden (Yu et al., 1993; Robinson et al., 1997). Derartige Kanalmodulationen sind für verschiedene Phosphorylierungen und Glykosilierungen beschrieben. Bei HCN2 vermindert Deglykosylierung erheblich die Oberflächenexpression des Kanals (Much et al., 2003). HCN-Kanäle sind N-terminal glykosyliert (Santoro et al., 1997; Much et al., 2003). Ähnliche Mechanismen könnten auch für HCN3 oder 4 existieren. Alternativ könnten nicht hinreichend arbeitende Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsmechanismen oder Beeinträchtigung der Wechselwirkungen mit den zyklischen Nukleotiden durch Proteininteraktionen mit neuronalen Gerüstproteinen wie Tamalin, Mint-2, S-

SCAM beeinträchtigt (Kimura et al., 2004) ursächlich sein. Eine weitere Erklärung könnte in der entwicklungsbedingten Regulation des TRP-beinhaltenen Rab8b-interagierenden Proteins (TRIP8b) liegen, weil die Coexpression von TRIP8b und HCN2 die Amplitude von I_h massiv reduzierte (Santoro et al., 2004).

5.2. Modulation durch I_h

Die besonderen biophysikalischen Eigenschaften von I_h prädisponieren diesen Strom zur Kontrolle neuronaler Erregbarkeit. Eine der Funktionen von I_h ist die Frequenzkontrolle eingehender Signale. Die von den Synapsen aufgenommenen Informationen werden vom Dendritenbaum moduliert (analog verarbeitet) zum Soma übertragen. Im Gegensatz dazu werden im Axon Information rein binär in den Aktionspotentialen und deren Frequenz codiert. Neben der Summierung zeitnah eintreffender Potentiale werden ankommende Signale im Dendriten über die präferierte Übertragungsfrequenz selektiert (Ulrich, 2002). I_h ist daran entscheidend beteiligt. I_h ist auch, aufgrund seiner Aktivierungskinetik, maßgeblich am charakteristischen Frequenzverhalten bestimmter Neuronenklassen im hyperpolarisierten Bereich beteiligt. Neocorticale Zellen der Ratte weisen bei einer Temperatur von 35°C ein Maximum der Impedanz zwischen Dendriten und Soma bei etwa 6 Hz auf (Ulrich, 2002). Dendriten stellen für ankommende Signale einen Bandpassfilter dar, dessen Tiefpassteil hauptsächlich durch die passiven Membraneigenschaften bestimmt ist, während der I_h als Hochpass agiert. Folglich wurde dieser Bandpass nach einer Blockung von I_h in einen Tiefpass umgewandelt (Ulrich, 2002). Durch bei entzündlichen Prozessen freigesetztes IFN- β bleibt die grundsätzliche Bandpasscharakteristik zwar bestehen, die Grenzfrequenz wird aber zu tieferen Werten hin verschoben (Kapitel 3.1., Abbildung 3). Damit werden Signale mit niedriger Frequenz begünstigt, was zu einer generellen Verlangsamung im EEG (Kapitel 3.1., Abbildung 4) beitragen könnte.

Gleichzeitig sollte durch die herabgesetzte Aktionspotentialfeuerschwelle und durch die ebenfalls über I_h -Minderung erhöhte Eingangsimpedanz, bei gleichbleibender Strominjektion am Dendriten einen erweiterten Frequenzbereich bedingen, in dem am Soma Aktionspotentiale generiert werden. Zur Untersuchungen derartiger Mechanismen sind simultane Ableitungen am Dendriten und am Soma (Spruston and Johnston, 2008) notwendig.

Neue Befunde legen nahe, dass der M-Strom (I_M) direkt mit dem I_h bei der Kontrolle der Fortleitung von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen interagiert (George *et al.*, 2009). Der I_M unterliegende KCNQ Kanal ist durch eine dem I_h vergleichbare Kinetik, allerdings mit einer im depolarisierten Bereich befindlichen Aktivierungskurve, charakterisiert und kann somit für das Resonanzverhalten von Neuronen im depolarisierten Bereich verantwortlich sein (Hu *et al.*, 2002). Eine Beeinflussung dieses Stromes durch IFN- β , wird durch die Carbacholsensitivität (Hadjilambrea *et al.*, 2005) des IFN- β Effektes nahegelegt. Sollte I_M von IFN- β reguliert sein, ist eine Mediation des Effektes durch intrazelluläres Ca^{2+} möglich (Marrion, 1997; Brown and Yu, 2000), besonders da auch I_h durch $[Ca^{2+}]_i$ beeinflusst wird (Luthi and McCormick, 1999). Bei einer Beeinflussung dieses Stromes durch IFN- β , würde sich das Resonanzverhalten um die

Aktionspotentialfeuerschwelle verändern. CA1 Neurone des Hippocampus zeigen im depolarisierten Spannungsbereich für Werte zwischen -55 und -60 mV den ausgeprägtesten (Q Wert bei ca. 1,3) und hochfrequentesten (f_{peak} bei ca. 3,5 Hz) Resonanzpeak (Hu *et al.*, 2002). In ersten Versuchen konnten wir dies auch für *layer 5* Neurone des somatosensorischen Cortex bestätigen, allerdings fanden wir die maximalen Resonanzpeak bei -30 mV ($f_{\text{peak}} = 7.27$ Hz, $Q = 1.64$, $n = 2$).

EEG Untersuchungen zeigen, dass IFN- β induzierte Veränderungen hinreichend für eine Verschiebung der gesamten Netzwerkaktivität *in vivo* sind (Kapitel 3.1., Abbildung 4). Vor dem Hintergrund der endogenen IFN- β Produktion nach cerebralen Infektionen und der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, wie der Multiplen Sklerose mit IFN- β , sowie Erkenntnissen über eine Stimmungsbeeinflussung durch Cytokine hat dieser Befund eine neuroimmunologisch konzeptionelle und klinische Bedeutung. Fraglich ist, ob die gesicherten kortikalen I_h Veränderungen allein die im EEG manifestierte Änderung des zerebralen Funktionszustandes verursachen, oder ob Änderungen weiterer intrinsischer Ionenströme und / oder der synaptischen Transmission eine Rolle spielen. Befunde zur IFN- β induzierten Veränderungen von Clathrin, einem an der Vesikelwiederaufnahme beteiligten Protein (Gundelfinger *et al.*, 2003), sowie den Hinweisen über eine Beteiligung der Inhibition an den überschwelligeren Veränderungen und unterstützt durch die Befunde anderer Arbeitsgruppen zu Typ1 IFN (besonders IFN- α) Wirkungen auf die synaptische Transmission legen dies nahe. Hierbei kommt hauptsächlich die inhibitorischen Transmission in Betracht, da keine Änderungen des Ruhemembranpotentials festgestellt wurden und somit hauptsächlich die tonische Inhibition (Ulrich, 2003; Salin and Prince, 1996) ursächlich in Frage kommt.

Dass Störungen im I_h mit aberranter neuronaler Aktivität in verschiedenen Epilepsien assoziiert sind wird immer mehr anerkannt (Wahl-Schott and Biel, 2009; Baruscotti *et al.*, 2005; Robinson and Siegelbaum, 2003; Kole *et al.*, 2007; Marcelin *et al.*, 2009). Zwischen I_h Reduktion und Epileptogenese im Neocortex besteht funktionelle Assoziation bei Absence-Epilepsie (Kapitel 3.2.1., Strauss *et al.*, 2004; Kapitel 3.2.2., Schridde *et al.*, 2006). In den elektrophysiologischen Untersuchungen von *layer 2-3* Neuronen fanden wir in WAG/Rij Ratten eine Reduktion der schnell aktivierenden Komponente von I_h (50% Reduktion der h -Stromdichte) und eine 4-fache Verlangsamung der Aktivierung von I_h , verglichen mit Wistar oder ACI Ratten. Die Veränderungen von I_h Amplitude und Kinetik tragen zur Vergrößerung exzitatorischer postsynaptischer Potentiale und zu einer Zunahme von deren temporaler Summation bei. Eine zusätzliche Steigerung der überschwelligeren Erregbarkeit erfahren die I_h defizienten Pyramidenzellen durch eine Erleichterung des Feuerns in *bursts*. Jeder dieser Effekte konnte auch an Neuronen aus dem Kortex nicht epileptischer Tiere durch die Zugabe des selektiven I_h Antagonisten ZD7288 erzielt werden. Wir schlussfolgerten, dass das Defizit in I_h -medierten Funktionen zur Entwicklung und dem Beginn spontan auftretender Übererregbarkeit in dem Modell der Absence beiträgt, wofür auch Befunde zur veränderten Untereinheitenzusammensetzung vor Beginn der Anfälle (siehe oben) sprechen. In thalamocortikalen Relaisneuronen des in den Kapiteln 3.2.1. und 3.2.2. verwendeten Rattenmodells (WAG/Rij) der Absence-Epilepsie und in GEARS (*Genetic Absence Epilepsy in Rats from*

Strasbourg) fand sich eine Erhöhung von HCN1, was auf eine regionale und untereinheitenspezifische Regulation hinweist (Budde et al., 2005; Kuisle et al., 2006). Auch HCN2-defiziente Mäuse, bei denen ein fast vollständiges Verschwinden von I_h in thalamocortikalen und thalamischen Relaisneuronen zu ausgeprägten Hyperpolarisationen und damit vermehrter *burst*-Aktivität führte, entwickeln Absence-Epilepsien (Ludwig et al., 2003). Die Frage, warum eine vollständige Ablation von HCN1 keine Epilepsie auslöst, obwohl cortikale Übererregbarkeit auf zellulärer und Netzwerkebene im Hippocampus nachgewiesen werden konnte (Huang et al., 2009), wurde kürzlich in einer eleganten Studie beantwortet, die eine durch HCN1 *knockout* induzierte Hochregulation von $\alpha 5$ GABA Rezeptor Untereinheiten und damit eine Erhöhung der GABAergen tonischen Inhibition zeigten (Chen et al., 2010). Eine weitere Evidenz für einen funktionellen Zusammenhang zwischen HCN Abberationen und Epilepsien stellen pharmakologische Interventionen dar (siehe Kapitel 3.2.). Kürzlich ist noch ein weiterer Aspekt, die Steigerung des interneuronalen hippocampalen I_h und somit die Zunahme der basalen Inhibition durch die antiepileptisch wirksame Substanz Lamotrigin beschrieben worden (Peng et al., 2010).

Die mögliche Rückwirkung der HCN Entwicklung auf die neuronale Entwicklung wird durch die in der Einleitung (Kapitel 1.3.) angesprochenen multiplen Funktionen dieser Kanäle bedingt. Einige I_h Funktionen sind besonders entwicklungsrelevant. So beeinflusst I_h die Entstehung und Stabilisierung neuronaler Netzwerke während der Entwicklung, da er an der Aufrechterhaltung einer Homöostase von Erregung und Hemmung innerhalb neuronaler Netzwerke maßgeblich beteiligt ist (Zhu, 2000; Vasilyev and Barish, 2002). Im Ergebnis kontrolliert der I_h , der schon früh während der Entwicklung exprimiert wird, spontane oszillatorische Aktivität in entstehenden neuronalen Netzwerken. Ein Beispiel dafür sind cerebelläre Korbzellen (GABA), die im Kleinhirn einen inhibitorischen Effekt ausüben (Lujan et al., 2005). Der I_h vermittelt die elektrotonische Trennung der neuronalen Kompartimente, was die hauptsächliche Veränderung in isokortikalen *layer 5* Pyramidenzellen während der Entwicklung darstellt (Zhu, 2000). Die Zunahme der Gleichgewichtskonstante spontaner exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (EPSPs), hervorgerufen durch direkt depolarisierende präsynaptische Terminale (Beaumont and Zucker, 2000; Mellor et al., 2002), beeinflusst zusätzlich die neuronale Gesamterregbarkeit. Weiterhin trägt I_h zur Abnahme des Eingangswiderstandes, hauptsächlich im Dendriten aber auch im Soma, bei (Zhu, 2000) und reguliert dadurch die Responsivität für kleine synaptische Ereignisse (Gasparini and DiFrancesco, 1997). Besonders der durch HCN1 getragene I_h vermittelt Funktionen, die eine Frequenzregulation tonisch inhibitorischer Eingangssignale ermöglichen könnten, wie in cerebellären Korbzellen (Saitow and Konishi, 2000) gezeigt. I_h garantiert die Stabilität der neuronalen Entladung, da er Aktionspotentiale durch Einfluss auf die Nachhyperpolarisation (AHP) kontrolliert. Außerdem verhindert I_h eine Hyperpolarisation der Membran über den Bereich hinaus, in dem Aktionspotentiale erzeugt werden können. Eine verlängerte Aktivierung von I_h ist mit verschiedenen rhythmischen Netzwerkaktivitäten assoziiert (Bal and McCormick, 1996; Strata et al., 1997).

Unsere speziellen Untersuchungen weisen auf eine Beteiligung von I_h und I_h exprimierenden Progenitorzellen für die striatale Entwicklung hin. Neben den synaptischen Einflüssen wird spontanes

tonisches Feuern in neostriatalen cholinergen Interneuronen durch intrinsische Membraneigenschaften generiert, die kein dauerhaftes Ruhemembranpotential zulassen (Bennett et al., 2000). Die Kombination von depolarisierender Aktivität eines persistierenden unterschwelligen I_{Na+} und des I_h bringen cholinerge Neurone an die Feuerschwelle. Auf dem Level eines einzelnen adulten cholinergen Neurons bewirkt I_h also eine relative Depolarisation, welche das Neuron nahe an die Feuerschwelle bringt und so die Antwort auf cortikale Inputs erleichtert. Die Verkürzung der Nachhyperpolarisation durch I_h steuert und reguliert das spontane Feuerverhalten der striatalen cholinergen Neurone zusätzlich (Bennett et al., 2000). Weiterhin limitiert I_h die Ausdehnung von hyperpolarisierenden und depolarisierenden Antworten (Robinson and Siegelbaum, 2003). Im adulten Neostriatum exprimieren die großen cholinergen Interneurone I_h (Kawaguchi, 1993). Die Zellen der I_h -exprimierenden Subgruppe der primären E14-Neurone und der proliferierenden ST14A-Zellen entsprechen elektrophysiologisch einem frühen Stadium dieser cholinergen Interneurone des adulten Striatum. Cholinerge Neurone stellen nur einen kleinen Anteil (~3-4%) der gesamten striatalen Neuronenpopulation bei adulten Ratten (Kawaguchi, 1993). Wir fanden ca. 20 % I_h -exprimierende Zellen früher Entwicklungsstadien (E14), also Zellen mit Eigenschaften cholinergischer Interneurone. Unter Berücksichtigung der etablierten Eigenschaften des I_h , besonders des stark cAMP-sensitiven HCN2, liegt es nahe, dass die Regulation der Entwicklung des I_h , wengleich dieser nur in einer Subgruppe von Neuronen vorhanden war, eine ausschlaggebende Rolle in der Feinabstimmung neuronaler Erregbarkeit spielt. I_h könnte so dazu beitragen, die Proliferation und das Überleben von transplantierten Zellen zu ermöglichen. I_h -exprimierende Zellen bergen möglicherweise das Potential, die Restrukturierung des Striatum entscheidend zu beeinflussen, da sie, die ersten Zellen im primordiales Striatum stellen und bedeutsam bei der Kompartimentierung zu sein scheinen (van Vulpes and van der, 1998). Dies bezieht sich wahrscheinlich nicht nur auf jene Zellen, für die die Entwicklung zu Interneuronen determiniert ist. Interneurone und der I_h selbst haben wahrscheinlich entscheidende funktionelle Relevanz bei der Kontrolle der neuronalen Erregbarkeit und starken Einfluß auf eine koordinierte neuronale Aktivität während der Reifung des funktionellen striatalen Netzwerkes nach Transplantation und Differenzierung *in vivo*. Unsere Beobachtungen zeigen ca. 20% der neuronalen Zellen, die vorbestimmte cholinerge Interneurone sein könnten, was notwendig für die regelrechte Striatogenese sein könnte. Deren erhebliche Funktion würde auch erklären, weshalb die früh postmitotischen cholinergen Interneurone die ersten sind, die das primordiales Striatum durch Generierung der patch-Kompartimente ausbilden (van Vulpes and van der Kooy, 1998).

Während der gesamten neuronalen Entwicklung dient I_h zur Aufrechterhaltung homöostatischer Plastizität. So werden mittlere Niveaus neuronaler Aktivität gehalten, da die synaptische Stärke in der korrekten Erregungsleitungsrichtung dynamisch eingestellt werden kann (Turrigiano and Nelson, 2004). Der I_h ermöglicht die Feinabstimmung der neuronalen Erregbarkeit durch *second messenger*, da er aufgrund seiner cAMP-Sensitivität eine elektrobiochemische Schnittstelle darstellt (Robinson and Siegelbaum, 2003). Dadurch wird der heterogene Einfluss verschiedener über metabotrope Rezeptoren wirkenden Neurotransmitter vermittelt (Agmon and Wells, 2003). Neben permissiven Einflüssen auf neuronale Erregbarkeit beeinflusst der I_h vermutlich direkt die neuronale Entwicklung durch Kontrolle der Depolarisation postsynaptischer Neurone und damit des intrazellulären Kalziumgehalts. Auf diese Weise entsteht eine Verbindung zwischen molekularen Ereignissen wie

Transkription oder posttranslationaler Modifikation und Ionenkanalvermittelter funktioneller Aktivität (Spitzer, 2006). Eine Störung der Entwicklung des zellulären Phänotyps I_h hat schwere und lang anhaltende Konsequenzen, weil HCN-Kanäle in dem jeweiligen zellulären Kontext eine einzigartige physiologische Rolle übernehmen, die durch andere ionale Leitfähigkeiten kaum kompensiert werden kann (aber siehe Chen et al., 2010). Dies wurde unter anderem in Rattenmodellen für epileptische Anfälle während der Entwicklung (Chen et al., 2001b) und Absence-Epilepsie (Schridde et al., 2006) demonstriert.

6. Zusammenfassung

Die Arbeiten untersuchen mit elektrophysiologischen und molekularbiologischen Methoden den intrinsischen, wenig selektiven, hyperpolarisationsaktivierten, und durch cyclisches Nukleotid gesteuerten Kationenstrom I_h in Expressionssystemen und Neuronen des Zentralen Nervensystems. Besondere Beachtung finden seine Eigenschaften, seinen Einfluss auf neuronale Funktionen und seine Modulation.

Neben der Charakterisierung basaler biophysikalischer Eigenschaften von HCN1 Kanälen der Ratte ergaben sich im Expressionssystem (HEK293) und in neocortikalen Neuronen Hinweise auf eine bisher unbekannte cytoplasmatische inhibitorische Regulation ebendieser Kanäle.

Der bedeutende Beitrag von HCN Kanälen zur Regulation der Erregbarkeit in verschiedenen Neuronengruppen spiegelt sich in der Rolle von I_h für die normale und pathologische Funktionalität auf zellulärer und Netzwerkebene wieder. Die hier vorgestellten Resultate bekräftigen und erweitern Befunde anderer Arbeitsgruppen. Die Reduktion von I_h beeinflusst z. B. kritisch die integrativen Eigenschaften von cortikalen Pyramidenzellen. Eine weitere wesentliche funktionelle Konsequenz der Reduktion von I_h ist die Verschiebung der Resonanzfrequenzen neuronaler Membranen.

HCN Kanäle stellen einen wichtigen Angriffspunkt für Interferon (IFN)- β , das sowohl bei entzündlichen Prozessen freigesetzt als auch therapeutisch angewandt wird, dar. IFN- β steigert nach direkter Einwirkung die neuronale Erregbarkeit im Cortex der Ratte durch direkt neuronale und rezeptorvermittelte Reduktion und Verlangsamung von I_h . Die Summe der funktionellen Konsequenzen der I_h Minderung könnte an den IFN- β induzierten Veränderungen des EEG beteiligt sein.

HCN Kanäle haben antiepileptische und antiepileptogene Funktionen. Der Verlust von HCN1 Leitfähigkeit in neocortikalen Pyramidenzellen ist mit Absence-Epilepsie assoziiert. Genetisch determinierte Epilepsien sind sensitiv gegenüber frühen milden Interventionen. So führen maternale Deprivation und neonatales *handling* zu dauerhaften Veränderungen der HCN1 Expression und der Anfallshäufigkeit.

Sowohl die Möglichkeit der frühen Intervention als auch die Befunde zu I_h / HCN Veränderungen in einem engen perinatalen Zeitfenster im Neocortex, sowie embryonal im Striatum, verweisen auf die Bedeutung von I_h / HCN für die Entwicklung des Gehirns.

7. Literaturverzeichnis

- Agmon A, Wells JE (2003) The role of the hyperpolarization-activated cationic current I_h in the timing of interictal bursts in the neonatal hippocampus. *J Neurosci* 23: 3658-3668.
- Albowitz B, Kuhn U, Kohling R, Lucke A, Straub H, Speckmann EJ, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek H, Opiel F (1998) Spatio-temporal distribution of epileptiform activity in slices from human neocortex: recordings with voltage-sensitive dyes. *Epilepsy Res* 32: 224-232.
- Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A, DiFrancesco D (2001) Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J Gen Physiol* 117: 519-532.
- Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M, DiFrancesco D (2003) Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 549: 347-359.
- Asano M, Hayashi M, Yoshida E, Kawade Y, Iwakura Y (1990) Induction of interferon-alpha by interferon-beta, but not of interferon-beta by interferon-alpha, in the mouse. *Virology* 176: 30-38.
- Bajorat R, Brauer AU, Wasner U, Rolfs A, Strauss U (2005) Functional significance of HCN2/3-mediated I_h in striatal cells at early developmental stages. *Journal of Neuroscience Research* 82: 206-213.
- Bal T, McCormick DA (1996) What stops synchronized thalamocortical oscillations? *Neuron* 17: 297-308.
- Bal T, McCormick DA (1997) Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current I_h . *J Neurophysiol* 77: 3145-3156.
- Barbuti A, Baruscotti M, Altomare C, Moroni A, DiFrancesco D (1999) Action of internal pronase on the f-channel kinetics in the rabbit SA node. *J Physiol* 520 Pt 3: 737-744.
- Barbuti A, Gravante B, Riolfo M, Milanese R, Terragni B, DiFrancesco D (2004) Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circulation Research* 94: 1325-1331.
- Barresi V, Belluardo N, Sipione S, Mudo G, Cattaneo E, Condorelli DF (2003) Transplantation of prodrug-converting neural progenitor cells for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther* 10: 396-402.
- Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D (2005) Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacology & Therapeutics* 107: 59-79.
- Bayer SA (1983) 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res* 50: 329-340.
- Beaumont V, Zucker RS (2000) Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I_h channels. *Nat Neurosci* 3: 133-141.
- Bender RA, Brewster A, Santoro B, Ludwig A, Hofmann F, Biel M, Baram TZ (2001) Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1-4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus. *Neuroscience* 106: 689-698.
- Bender RA, Kirschstein T, Kretz O, Brewster AL, Richichi C, Ruschenschmidt C, Shigemoto R, Beck H, Frotscher M, Baram TZ (2007) Localization of HCN1 channels to presynaptic compartments: novel plasticity that may contribute to hippocampal maturation. *J Neurosci* 27: 4697-4706.
- Bennett BD, Callaway JC, Wilson CJ (2000) Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20: 8493-8503.

- Berger T, Larkum ME, Luscher HR (2001) High I(h) channel density in the distal apical dendrite of layer V pyramidal cells increases bidirectional attenuation of EPSPs. *J Neurophysiol* 85: 855-868.
- Beyer S, Mix E, Hoffrogge R, Lünser K, Völker U, Rolfs A (2007) Neuroproteomics in stem cell differentiation. *PROTEOMICS - CLINICAL APPLICATIONS* 1: 1513-1523.
- Beyer S, Raether G, Stadler K, Hoffrogge R, Scharf C, Rolfs A, Mix E, Strauss U (2009) Interferon-beta modulates protein synthesis in the central nervous system. *J Neuroimmunol*.
- Bezanilla F (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels *Physiol Rev* 80: 555-592.
- Bhide PG (1996) Cell cycle kinetics in the embryonic mouse corpus striatum. *J Comp Neurol* 374: 506-522.
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X (2009) Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 89: 847-885.
- Bosch M, Pineda JR, Sunol C, Petriz J, Cattaneo E, Alberch J, Canals JM (2004) Induction of GABAergic phenotype in a neural stem cell line for transplantation in an excitotoxic model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 190: 42-58.
- Brelidze TI, Carlson AE, Zagotta WN (2009) Absence of direct cyclic nucleotide modulation of mEAG1 and hERG1 channels revealed with fluorescence and electrophysiological methods. *J Biol Chem* 284: 27989-27997.
- Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ (2002) Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *J Neurosci* 22: 4591-4599.
- Brewster AL, Bernard JA, Gall CM, Baram TZ (2005) Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. *Neurobiol Dis* 19: 200-207.
- Brierley MM, Fish EN (2002) Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *J Interferon Cytokine Res* 22: 835-845.
- Brown BS, Yu SP (2000) Modulation and genetic identification of the M channel. *Prog Biophys Mol Biol* 73: 135-166.
- Brumberg JC, Nowak LG, McCormick DA (2000) Ionic mechanisms underlying repetitive high-frequency burst firing in supragranular cortical neurons. *J Neurosci* 20: 4829-4843.
- Budde T, Caputi L, Kanyshkova T, Staak R, Abrahamczik C, Munsch T, Pape HC (2005) Impaired regulation of thalamic pacemaker channels through an imbalance of subunit expression in absence epilepsy. *J Neurosci* 25: 9871-9882.
- Cattaneo E, Conti L (1998) Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. *J Neurosci Res* 53: 223-234.
- Cattaneo E, Magrassi L, Butti G, Santi L, Giavazzi A, Pezzotta S (1994) A short term analysis of the behaviour of conditionally immortalized neuronal progenitors and primary neuroepithelial cells implanted into the fetal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 83: 197-208.
- Catterall WA, Dib-Hajj S, Meisler MH, Pietrobon D (2008) Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases *J Neurosci* 28: 11768-11777.
- Chang F, Cohen IS, DiFrancesco D, Rosen MR, Tromba C (1991) Effects of Protein-Kinase Inhibitors on Canine Purkinje-Fiber Pacemaker Depolarization and the Pacemaker Current-If. *Journal of Physiology-London* 440: 367-384.
- Chen J, Mitcheson JS, Tristani-Firouzi M, Lin M, Sanguinetti MC (2001a) The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11277-11282.
- Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ, Soltesz I (2001b) Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat Med* 7: 331-337.
- Chen K, Baram TZ, Soltesz I (1999) Febrile seizures in the developing brain result in persistent modification of neuronal excitability in limbic circuits. *Nat Med* 5: 888-894.
- Chen S, Wang J, Siegelbaum SA (2001c) Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 117: 491-504.
- Chen X, Shu S, Bayliss DA (2009a) HCN1 channel subunits are a molecular substrate for hypnotic actions of ketamine. *J Neurosci* 29: 600-609.

- Chen X, Shu S, Kennedy DP, Willcox SC, Bayliss DA (2009b) Subunit-specific effects of isoflurane on neuronal Ih in HCN1 knockout mice. *J Neurophysiol* 101: 129-140.
- Chen X, Shu S, Schwartz LC, Sun C, Kapur J, Bayliss DA (2010) Homeostatic regulation of synaptic excitability: tonic GABA(A) receptor currents replace I(h) in cortical pyramidal neurons of HCN1 knock-out mice. *J Neurosci* 30: 2611-2622.
- Chen X, Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C, III, Bayliss DA (2005) HCN subunit-specific and cAMP-modulated effects of anesthetics on neuronal pacemaker currents. *J Neurosci* 25: 5803-5814.
- Ching GY, Liem RK (1999) Analysis of the roles of the head domains of type IV rat neuronal intermediate filament proteins in filament assembly using domain-swapped chimeric proteins. *J Cell Sci* 112 (Pt 13): 2233-2240.
- Coyle PK, Hartung HP (2002) Use of interferon beta in multiple sclerosis: rationale for early treatment and evidence for dose- and frequency-dependent effects on clinical response. *Mult Scler* 8: 2-9.
- D'Arcangelo G, Grassi F, Ragozzino D, Santoni A, Tancredi V, Eusebi F (1991) Interferon inhibits synaptic potentiation in rat hippocampus. *Brain Res* 564: 245-248.
- Dafny N, Prieto-Gomez B, Dong WQ, Reyes-Vazquez C (1996) Interferon modulates neuronal activity recorded from the hypothalamus, thalamus, hippocampus, amygdala and the somatosensory cortex. *Brain Res* 734: 269-274.
- David M (2002) Signal transduction by type I interferons. *Biotechniques Suppl*: 58-65.
- Davie JT, Kole MH, Letzkus JJ, Rancz EA, Spruston N, Stuart GJ, Hausser M (2006) Dendritic patch-clamp recording. *Nat Protoc* 1: 1235-1247.
- Day M, Carr DB, Ulrich S, Ilijic E, Tkatch T, Surmeier DJ (2005) Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and K_{leak} channels. *J Neurosci* 25: 8776-8787.
- de Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16: 6146-6156.
- Decher N, Chen J, Sanguinetti MC (2004) Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels: molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers. *J Biol Chem* 279: 13859-13865.
- Delhaye S, Paul S, Blakqori G, Minet M, Weber F, Staeheli P, Michiels T (2006) Neurons produce type I interferon during viral encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7835-7840.
- Demontis GC, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L, DiFrancesco D (2002) Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *Journal of Physiology-London* 542: 89-97.
- Dickson CT, Magistretti J, Shalinsky MH, Fransen E, Hasselmo ME, Alonso A (2000) Properties and role of I-h in the pacing of subthreshold oscillations in entorhinal cortex layer II neurons. *Journal of Neurophysiology* 83: 2562-2579.
- DiFrancesco D (1981) A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol* 314: 377-393.
- DiFrancesco D (1999) Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by cAMP and voltage in rabbit SA node. *J Physiol* 515 (Pt 2): 367-376.
- DiFrancesco D, Ferroni A (1983) Delayed activation of the cardiac pacemaker current and its dependence on conditioning pre-hyperpolarizations. *Pflugers Arch* 396: 265-267.
- DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C (1986) Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 377: 61-88.
- DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145-147.
- DiPasquale E, Keegan KD, Noebels JL (1997) Increased excitability and inward rectification in layer V cortical pyramidal neurons in the epileptic mutant mouse stargazer. *Journal of Neurophysiology* 77: 621-631.
- Doan TN, Stephans K, Ramirez AN, Glazebrook PA, Andresen MC, Kunze DL (2004) Differential distribution and function of hyperpolarization-activated channels in sensory neurons and mechanosensitive fibers. *Journal of Neuroscience* 24: 3335-3343.
- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.

- Ehrlich ME, Conti L, Toselli M, Taglietti L, Fiorillo E, Taglietti V, Ivkovic S, Guinea B, Tranberg A, Sipione S, Rigamonti D, Cattaneo E (2001) ST14A cells have properties of a medium-size spiny neuron. *Exp Neurol* 167: 215-226.
- Ferrer T, Rupp J, Piper DR, Tristani-Firouzi M (2006) The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K⁺ channel. *J Biol Chem* 281: 12858-12864.
- Frederiksen K, McKay RD (1988) Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci* 8: 1144-1151.
- Freed WJ (1993) Neural transplantation: a special issue. *Exp Neurol* 122: 1-4.
- Freed WJ (2004) A perspective on transplantation therapy and stem cells for Parkinson's disease. *Cell Transplant* 13: 319-327.
- Frere SG, Kuisle M, Luthi A (2004) Regulation of recombinant and native hyperpolarization-activated cation channels. *Mol Neurobiol* 30: 279-305.
- Gage FH, Ray J, Fisher LJ (1995) Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 18: 159-192.
- Garden DL, Dodson PD, O'Donnell C, White MD, Nolan MF (2008) Tuning of synaptic integration in the medial entorhinal cortex to the organization of grid cell firing fields. *Neuron* 60: 875-889.
- Gasparini S, DiFrancesco D (1997) Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Arch* 435: 99-106.
- George MS, Abbott LF, Siegelbaum SA (2009) HCN hyperpolarization-activated cation channels inhibit EPSPs by interactions with M-type K(+) channels. *Nat Neurosci* 12: 577-584.
- Gill CH, Randall A, Bates SA, Hill K, Owen D, Larkman PM, Cairns W, Yusuf SP, Murdock PR, Strijbos PJLM, Powell AJ, Benham CD, Davies CH (2004) Characterization of the human HCN1 channel and its inhibition by capsazepine. *British Journal of Pharmacology* 143: 411-421.
- Giocomo LM, Hasselmo ME (2008) Time constants of h current in layer II stellate cells differ along the dorsal to ventral axis of medial entorhinal cortex. *J Neurosci* 28: 9414-9425.
- Giorgetti A, Carloni P, Mistrik P, Torre V (2005) A homology model of the pore region of HCN channels. *Biophys J* 89: 932-944.
- Goldman MS, Golowasch J, Marder E, Abbott LF (2001) Global structure, robustness, and modulation of neuronal models. *J Neurosci* 21: 5229-5238.
- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 81: 2341-2364.
- Gravante B, Barbuti A, Milanese R, Zappi I, Viscomi C, DiFrancesco D (2004) Interaction of the pacemaker channel HCN1 with filamin A. *J Biol Chem* 279: 43847-43853.
- Gray CM, McCormick DA (1996) Chattering cells: superficial pyramidal neurons contributing to the generation of synchronous oscillations in the visual cortex. *Science* 274: 109-113.
- Gronholm M, Teesalu T, Tyynela J, Piltti K, Bohling T, Wartiovaara K, Vaheri A, Carpen O (2005) Characterization of the NF2 protein merlin and the ERM protein ezrin in human, rat, and mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 28: 683-693.
- Gundelfinger ED, Kessels MM, Qualmann B (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 127-139.
- Hadjilambrea G, Mix E, Rolf A, Muller J, Strauss U (2005) Neuromodulation by a cytokine: interferon-beta differentially augments neocortical neuronal activity and excitability. *J Neurophysiol* 93: 843-852.
- Hagell P, Cenci MA (2005) Dyskinesias and dopamine cell replacement in Parkinson's disease: a clinical perspective. *Brain Res Bull* 68: 4-15.
- Hamasaki T, Goto S, Nishikawa S, Ushio Y (2001) A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons. *J Neurosci* 21: 4272-4280.
- Hamasaki T, Goto S, Nishikawa S, Ushio Y (2003) Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum. *Brain Res Brain Res Rev* 41: 1-12.

- Heron SE, Scheffer IE, Berkovic SF, Dibbens LM, Mulley JC (2007) Channelopathies in idiopathic epilepsy. *Neurotherapeutics* 4: 295-304.
- Hu H, Vervaeke K, Storm JF (2002) Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 545: 783-805.
- Hu S, Sheng WS, Ehrlich LC, Peterson PK, Chao CC (2000) Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation* 7: 153-159.
- Hua LL, Kim MO, Brosnan CF, Lee SC (2002) Modulation of astrocyte inducible nitric oxide synthase and cytokine expression by interferon beta is associated with induction and inhibition of interferon gamma-activated sequence binding activity. *J Neurochem* 83: 1120-1128.
- Huang Z, Walker MC, Shah MM (2009) Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis. *J Neurosci* 29: 10979-10988.
- Hutcheon B, Yarom Y (2000) Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends in Neurosciences* 23: 216-222.
- Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H (1999) Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 274: 12835-12839.
- Jackson HA, Marshall CR, Accili EA (2007) Evolution and structural diversification of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel genes. *Physiol Genomics* 29: 231-245.
- Jat PS, Sharp PA (1989) Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large-T-antigen gene are growth restricted at the nonpermissive temperature. *Mol Cell Biol* 9: 1672-1681.
- Jensen MS, Yaari Y (1997) Role of intrinsic burst firing, potassium accumulation, and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy. *J Neurophysiol* 77: 1224-1233.
- Jones RS (1994) Synaptic and intrinsic properties of neurons of origin of the perforant path in layer II of the rat entorhinal cortex in vitro. *Hippocampus* 4: 335-353.
- Jung S, Jones TD, Lugo JN, Jr., Sheerin AH, Miller JW, D'Ambrosio R, Anderson AE, Poolos NP (2007) Progressive dendritic HCN channelopathy during epileptogenesis in the rat pilocarpine model of epilepsy. *J Neurosci* 27: 13012-13021.
- Katafuchi T, Take S, Hori T (1995) Roles of cytokines in the neural-immune interactions: modulation of NMDA responses by IFN-alpha. *Neurobiology (Bp)* 3: 319-327.
- Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13: 4908-4923.
- Khawaled R, Bruening-Wright A, Adelman JP, Maylie J (1999) Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium channels. *Pflugers Arch* 438: 314-321.
- Kim HG, Fox K, Connors BW (1995) Properties of Excitatory Synaptic Events in Neurons of Primary Somatosensory Cortex of Neonatal Rats. *Cerebral Cortex* 5: 148-157.
- Kimura K, Kitano J, Nakajima Y, Nakanishi S (2004) Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated HCN2 cation channel forms a protein assembly with multiple neuronal scaffold proteins in distinct modes of protein-protein interaction. *Genes Cells* 9: 631-640.
- Kitamura K, Takayama M, Hamajima N, Nakanishi M, Sasaki M, Endo Y, Takemoto T, Kimura H, Iwaki M, Nonaka M (1999) Characterization of the human dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene. *DNA Res* 6: 291-297.
- Klink R, Alonso A (1993) Ionic mechanisms for the subthreshold oscillations and differential electroresponsiveness of medial entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 70: 144-157.
- Kole MH, Brauer AU, Stuart GJ (2007) Inherited cortical HCN1 channel loss amplifies dendritic calcium electrogenesis and burst firing in a rat absence epilepsy model. *J Physiol* 578: 507-525.
- Kole MHP, Hallermann S, Stuart GJ (2006) Single I-h channels in pyramidal neuron dendrites: Properties, distribution, and impact on action potential output. *Journal of Neuroscience* 26: 1677-1687.
- Komagiri Y, Kitamura N (2003) Effect of intracellular dialysis of ATP on the hyperpolarization-activated cation current in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 90: 2115-2122.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455: 894-902.

- Kusile M, Wanaverbecq N, Brewster AL, Frere SG, Pinault D, Baram TZ, Luthi A (2006) Functional stabilization of weakened thalamic pacemaker channel regulation in rat absence epilepsy. *J Physiol* 575: 83-100.
- Liberati AM, Biagini S, Perticoni G, Ricci S, D'Alessandro P, Senatore M, Cinieri S (1990) Electrophysiological and neuropsychological functions in patients treated with interferon-beta. *J Interferon Res* 10: 613-619.
- Linden DR, Sharkey KA, Mawe GM (2003) Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. *J Physiol* 547: 589-601.
- Lindvall O, Bjoerklund A (2004) Cell Therapy in Parkinson's Disease. *NeuroRx* 1: 382-393.
- Lindvall O, Kokaia Z (2006) Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 441: 1094-1096.
- Long SB, Campbell EB, MacKinnon R (2005) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309: 903-908.
- Lorincz A, Notomi T, Tamas G, Shigemoto R, Nusser Z (2002) Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci* 5: 1185-1193.
- Lu Z, Klem AM, Ramu Y (2002) Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J Gen Physiol* 120: 663-676.
- Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong XG, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, Hofmann F (2003) Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *Embo Journal* 22: 216-224.
- Ludwig A, Zong XG, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591.
- Ludwig A, Zong XG, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *Embo Journal* 18: 2323-2329.
- Lujan R, Albasanz JL, Shigemoto R, Juiz JM (2005) Preferential localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel subunit HCN1 in basket cell terminals of the rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 21: 2073-2082.
- Lundberg C, Field PM, Ajayi YO, Raisman G, Bjorklund A (1996) Conditionally immortalized neural progenitor cell lines integrate and differentiate after grafting to the adult rat striatum. A combined autoradiographic and electron microscopic study. *Brain Res* 737: 295-300.
- Lundberg C, Martinez-Serrano A, Cattaneo E, McKay RD, Bjorklund A (1997) Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp Neurol* 145: 342-360.
- Luthi A, McCormick DA (1998) H-current: Properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* 21: 9-12.
- Luthi A, McCormick DA (1999) Modulation of a pacemaker current through Ca²⁺-induced stimulation of cAMP production. *Nat Neurosci* 2: 634-641.
- Maccaferrri G, McBain CJ (1996) The hyperpolarization-activated current (I_h) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *J Physiol* 497 (Pt 1): 119-130.
- Madrazo I, Drucker-Colin R, Diaz V, Martinez-Mata J, Torres C, Becerril JJ (1987) Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med* 316: 831-834.
- Magee JC (1998) Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 18: 7613-7624.
- Magee JC (1999) Dendritic I_h normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons (vol 2, pg 508, 1999). *Nature Neuroscience* 2: U9.
- Marcelin B, Chauviere L, Becker A, Migliore M, Esclapez M, Bernard C (2009) h channel-dependent deficit of theta oscillation resonance and phase shift in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 33: 436-447.
- Marchand R, Lajoie L (1986) Histogenesis of the striopallidal system in the rat. Neurogenesis of its neurons. *Neuroscience* 17: 573-590.
- Marin O, Anderson SA, Rubenstein JL (2000) Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20: 6063-6076.

- Marin-Padilla M (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 21: 64-71.
- Marrion NV (1997) Control of M-current. *Annu Rev Physiol* 59: 483-504.
- Mccormick DA, Contreras D (2001) On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annu Rev Physiol* 63: 815-846.
- Mccormick DA, Pape HC (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol* 431: 291-318.
- McKay R (1992) Reconstituting animals from immortal precursors. *Curr Opin Neurobiol* 2: 582-585.
- Meeren HK, Pijn JP, van Luijtelaar EL, Coenen AM, Lopes da Silva FH (2002) Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci* 22: 1480-1495.
- Mellor J, Nicoll RA, Schmitz D (2002) Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic I-h channels. *Science* 295: 143-147.
- Mendez I, Dagher A, Hong M, Gaudet P, Weerasinghe S, McAlister V, King D, Desrosiers J, Darvesh S, Acorn T, Robertson H (2002) Simultaneous intrastriatal and intranigral fetal dopaminergic grafts in patients with Parkinson disease: a pilot study. Report of three cases. *J Neurosurg* 96: 589-596.
- Michels G, Er F, Khan I, Sudkamp M, Herzig S, Hoppe UC (2005) Single-channel properties support a potential contribution of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and If to cardiac arrhythmias. *Circulation* 111: 399-404.
- Milligan CJ, Edwards IJ, Deuchars J (2006) HCN1 ion channel immunoreactivity in spinal cord and medulla oblongata. *Brain Res* 1081: 79-91.
- Mistrik P, Pfeifer A, Biel M (2006) The enhancement of HCN channel instantaneous current facilitated by slow deactivation is regulated by intracellular chloride concentration. *Pflugers Arch* 452: 718-727.
- Mix E, Stefan K, Hoppner J, Klauer T, Zettl UK, Strauss U, Meyer-Rienecker HJ, Rolfs A (2003) Lymphocyte subpopulations, oxidative burst and apoptosis in peripheral blood cells of patients with multiple sclerosis-effect of interferon-beta. *Autoimmunity* 36: 291-305.
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001) Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 268: 1646-1652.
- Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A, DiFrancesco D (2001) Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I(f). *J Biol Chem* 276: 29233-29241.
- Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, Biel M (2003) Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 278: 43781-43786.
- Muller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E, Kaupp UB (2003) HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur J Neurosci* 17: 2084-2096.
- Muller M, Fontana A, Zbinden G, Gahwiler BH (1993) Effects of interferons and hydrogen peroxide on CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res* 619: 157-162.
- Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S, Berkovic SF (2003) Channelopathies as a genetic cause of epilepsy. *Curr Opin Neurol* 16: 171-176.
- Munsch T, Pape HC (1999a) Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH. *J Physiol* 519 Pt 2: 493-504.
- Munsch T, Pape HC (1999b) Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current in rat thalamic relay neurones by acetazolamide. *J Physiol* 519 Pt 2: 505-514.
- Njenga MK, Coenen MJ, DeCuir N, Yeh HY, Rodriguez M (2000) Short-term treatment with interferon-alpha/beta promotes remyelination, whereas long-term treatment aggravates demyelination in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 59: 661-670.
- Noam Y, Zha Q, Phan L, Wu RL, Chetkovich DM, Wadman WJ, Baram TZ (2010) Trafficking and surface expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 285: 14724-14736.
- Nolan MF, Dudman JT, Dodson PD, Santoro B (2007) HCN1 channels control resting and active integrative properties of stellate cells from layer II of the entorhinal cortex. *J Neurosci* 27: 12440-12451.

- Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, Buhl DL, Santoro B, Gibbs E, Vronskaya S, Buzsaki G, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2004) A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial inputs to distal dendrites memory and plasticity at of CA1 pyramidal neurons. *Cell* 119: 719-732.
- Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, Santoro B, Yin DQ, Thompson RF, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2003) The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* 115: 551-564.
- Noseworthy JH (2003) Management of multiple sclerosis: current trials and future options. *Curr Opin Neurol* 16: 289-297.
- Notomi T, Shigemoto R (2004) Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 471: 241-276.
- Okada K, Kuroda E, Yoshida Y, Yamashita U, Suzumura A, Tsuji S (2005) Effects of interferon-beta on the cytokine production of astrocytes. *J Neuroimmunol* 159: 48-54.
- Olanow CW, Kordower JH, Lang AE, Obeso JA (2009) Dopaminergic transplantation for Parkinson's disease: current status and future prospects. *Ann Neurol* 66: 591-596.
- Olsson M, Bjorklund A, Campbell K (1998) Early specification of striatal projection neurons and interneuronal subtypes in the lateral and medial ganglionic eminence. *Neuroscience* 84: 867-876.
- Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: The hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annual Review of Physiology* 58: 299-327.
- Pape HC, Mager R (1992) Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons. *Neuron* 9: 441-448.
- Pape HC, McCormick DA (1989) Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current. *Nature* 340: 715-718.
- Pellegrini S, John J, Shearer M, Kerr IM, Stark GR (1989) Use of a selectable marker regulated by alpha interferon to obtain mutations in the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 9: 4605-4612.
- Peng BW, Justice JA, Zhang K, He XH, Sanchez RM (2010) Increased basal synaptic inhibition of hippocampal area CA1 pyramidal neurons by an antiepileptic drug that enhances I(H). *Neuropsychopharmacology* 35: 464-472.
- Pfeffer LM (1997) Biologic activities of natural and synthetic type I interferons. *Semin Oncol* 24: S9.
- Pian P, Bucchi A, DeCostanzo A, Robinson RB, Siegelbaum SA (2007) Modulation of cyclic nucleotide-regulated HCN channels by PIP2 and receptors coupled to phospholipase C. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 455: 125-145.
- Planells-Cases R, Jentsch TJ (2009) Chloride channelopathies. *Biochim Biophys Acta* 1792: 173-189.
- Poolos NP (2004) The Yin and Yang of the H-Channel and Its Role in Epilepsy. *Epilepsy Curr* 4: 3-6.
- Poolos NP, Migliore M, Johnston D (2002) Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat Neurosci* 5: 767-774.
- Prinz M, Schmidt H, Mildner A, Knobloch KP, Hanisch UK, Raasch J, Merkler D, Detje C, Gutcher I, Mages J, Lang R, Martin R, Gold R, Becher B, Bruck W, Kalinke U (2008) Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 28: 675-686.
- Proenza C, Angoll D, Zahynacz KJ, Agranovich E, Accili EA (2002) Role of the cyclic nucleotide-binding domain (CNBD) in functional expression of HCN channels. *Biophysical Journal* 82: 278A.
- Prole DL, Yellen G (2006) Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4-S5 linker and Post-S6. *J Gen Physiol* 128: 273-282.
- Qiu DL, Chu CP, Shirasaka T, Tsukino H, Nakao H, Kato K, Kunitake T, Katoh T, Kannan H (2005) Corticotrophin-releasing factor augments the I(H) in rat hypothalamic paraventricular nucleus parvocellular neurons in vitro. *J Neurophysiol* 94: 226-234.
- Quinn CC, Chen E, Kinjo TG, Kelly G, Bell AW, Elliott RC, McPherson PS, Hockfield S (2003) TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone. *J Neurosci* 23: 2815-2823.
- Raes A, Wang Z, vandenBerg RJ, Goethals M, VandeVijver G, vanBogaert PP (1997) Effect of cAMP and ATP on the hyperpolarization-activated current in mouse dorsal root ganglion neurons. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 434: 543-550.

- Redies C, Lendahl U, McKay RD (1991) Differentiation and heterogeneity in T-antigen immortalized precursor cell lines from mouse cerebellum. *J Neurosci Res* 30: 601-615.
- Reid CA, Berkovic SF, Petrou S (2009) Mechanisms of human inherited epilepsies. *Prog Neurobiol* 87: 41-57.
- Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 65: 453-480.
- Robinson RB, Yu H, Chang F, Cohen IS (1997) Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current, *I_h*, in rat ventricle cells. *Pflugers Arch* 433: 533-535.
- Saitow F, Konishi S (2000) Excitability increase induced by beta-adrenergic receptor-mediated activation of hyperpolarization-activated cation channels in rat cerebellar basket cells. *Journal of Neurophysiology* 84: 2026-2034.
- Salin PA, Prince DA (1996) Electrophysiological mapping of GABAA receptor-mediated inhibition in adult rat somatosensory cortex. *J Neurophysiol* 75: 1589-1600.
- Sanabria ER, Su H, Yaari Y (2001) Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol* 532: 205-216.
- Santoro B, Baram TZ (2003) The multiple personalities of h-channels. *Trends Neurosci* 26: 550-554.
- Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA (2000) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* 20: 5264-5275.
- Santoro B, Grant SG, Bartsch D, Kandel ER (1997) Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14815-14820.
- Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998) Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93: 717-729.
- Santoro B, Piskrowski RA, Pian P, Hu L, Liu H, Siegelbaum SA (2009) TRIP8b splice variants form a family of auxiliary subunits that regulate gating and trafficking of HCN channels in the brain. *Neuron* 62: 802-813.
- Santoro B, Tibbs GR (1999) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 741-764.
- Santoro B, Wainger BJ, Siegelbaum SA (2004) Regulation of HCN channel surface expression by a novel C-terminal protein-protein interaction. *J Neurosci* 24: 10750-10762.
- Schridde U, Strauss U, Brauer AU, van Lujtelaar G (2006) Environmental manipulations early in development alter seizure activity, *I_h* and HCN1 protein expression later in life. *Eur J Neurosci* 23: 3346-3358.
- Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9391-9396.
- Shibata S, Ono K, Iijima T (1999) Inhibition by genistein of the hyperpolarization-activated cation current in porcine sino-atrial node cells. *British Journal of Pharmacology* 128: 1284-1290.
- Shin KS, Maertens C, Proenza C, Rothberg BS, Yellen G (2004) Inactivation in HCN channels results from reclosure of the activation gate: Desensitization to voltage. *Neuron* 41: 737-744.
- Shin KS, Rothberg BS, Yellen G (2001) Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J Gen Physiol* 117: 91-101.
- Shin M, Chetkovich DM (2007) Activity-dependent regulation of h channel distribution in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Biol Chem* 282: 33168-33180.
- Shuto H, Kataoka Y, Horikawa T, Fujihara N, Oishi R (1997) Repeated interferon-alpha administration inhibits dopaminergic neural activity in the mouse brain. *Brain Res* 747: 348-351.
- Sigworth FJ (1994) Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 27: 1-40.
- Simeone TA, Rho JM, Baram TZ (2005) Single channel properties of hyperpolarization-activated cation currents in acutely dissociated rat hippocampal neurones. *J Physiol* 568: 371-380.

- Spencer DD, Robbins RJ, Naftolin F, Marek KL, Vollmer T, Leranath C, Roth RH, Price LH, Gjedde A, Bunney BS. (1992) Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 327: 1541-1548.
- Spitzer NC (2006) Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444: 707-712.
- Spruston N, Johnston D (2008) Out of control in the dendrites. *Nat Neurosci* 11: 733-734.
- Stevens DR, Seifert R, Bufe B, Muller F, Kremmer E, Gauss R, Meyerhof W, Kaupp UB, Lindemann B (2001) Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 413: 631-635.
- Stieber J, Stockl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F (2005) Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem* 280: 34635-34643.
- Strata F, Atzori M, Molnar M, Ugolini G, Tempia F, Cherubini E (1997) A pacemaker current in dye-coupled hilar interneurons contributes to the generation of giant GABAergic potentials in developing hippocampus. *J Neurosci* 17: 1435-1446.
- Strauss U, Kole MH, Brauer AU, Pahnke J, Bajorat R, Rolfs A, Nitsch R, Deisz RA (2004) An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci* 19: 3048-3058.
- Stuart G, Spruston N (1998) Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J Neurosci* 18: 3501-3510.
- Surges R, Freiman TM, Feuerstein TJ (2003) Gabapentin increases the hyperpolarization-activated cation current Ih in rat CA1 pyramidal cells. *Epilepsia* 44: 150-156.
- Tanaka S, Wu N, Hsiao CF, Turman J, Jr., Chandler SH (2003) Development of inward rectification and control of membrane excitability in mesencephalic v neurons. *J Neurophysiol* 89: 1288-1298.
- Thoby-Brisson M, Cauli B, Champagnat J, Fortin G, Katz DM (2003) Expression of functional tyrosine kinase B receptors by rhythmically active respiratory neurons in the pre-Botzinger complex of neonatal mice. *Journal of Neuroscience* 23: 7685-7689.
- Trevillion L, Howells J, Bostock H, Burke D (2010) Properties of low-threshold motor axons in the human median nerve 1. *J Physiol* 588: 2503-2515.
- Tsanev R, Ivanov I (2002) Immune Interferon. Properties and clinical applications. In: *Immune interferon* pp 1-302. Boca Raton: CRC Press.
- Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 97-107.
- Ulens C, Siegelbaum SA (2003) Regulation of hyperpolarization-activated HCN channels by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry. *Neuron* 40: 959-970.
- Ulens C, Tytgat J (2001) Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem* 276: 6069-6072.
- Ulrich D (2002) Dendritic resonance in rat neocortical pyramidal cells. *J Neurophysiol* 87: 2753-2759.
- Ulrich D (2003) Differential arithmetic of shunting inhibition for voltage and spike rate in neocortical pyramidal cells. *European Journal of Neuroscience* 18: 2159-2165.
- Vaca L, Stieber J, Zong X, Ludwig A, Hofmann F, Biel M (2000) Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence. *FEBS Lett* 479: 35-40.
- Vaccari T, Moroni A, Rocchi M, Gorza L, Bianchi ME, Beltrame M, DiFrancesco D (1999) The human gene coding for HCN2, a pacemaker channel of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1446: 419-425.
- van der Meide PH, de Labie MC, Ruuls SR, Groenestein RJ, Botman CA, Olsson T, Dijkstra CD (1998) Discontinuation of treatment with IFN-beta leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. Rapid reversal of the antiproliferative activity of IFN-beta and excessive expansion of autoreactive T cells as disease promoting mechanisms. *J Neuroimmunol* 84: 14-23.
- van Der LS, Panzica F, de Curtis M (1999) Carbachol induces fast oscillations in the medial but not in the lateral entorhinal cortex of the isolated guinea pig brain. *J Neurophysiol* 82: 2441-2450.
- van Vulpen EH, van der Kooy KD (1998) Striatal cholinergic interneurons: birthdates predict compartmental localization. *Brain Res Dev Brain Res* 109: 51-58.

- van Welie I, van Hooft JA, Wadman WJ (2004) Homeostatic scaling of neuronal excitability by synaptic modulation of somatic hyperpolarization-activated Ih channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5123-5128.
- Vasilyev DV, Barish ME (2002) Postnatal development of the hyperpolarization-activated excitatory current I-h in mouse hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience* 22: 8992-9004.
- Vasilyev DV, Barish ME (2003) Regulation of an inactivating potassium current (I-A) by the extracellular matrix protein vitronectin in embryonic mouse hippocampal neurones. *Journal of Physiology-London* 547: 859-871.
- Velazquez L, Fellous M, Stark GR, Pellegrini S (1992) A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 70: 313-322.
- Velumian AA, Zhang L, Pennefather P, Carlen PL (1997) Reversible inhibition of IK, IAHP, Ih and ICa currents by internally applied gluconate in rat hippocampal pyramidal neurones. *Pflugers Arch* 433: 343-350.
- Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, DiFrancesco D (2001) C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *Journal of Biological Chemistry* 276: 29930-29934.
- Wahl-Schott C, Baumann L, Zong X, Biel M (2005) An arginine residue in the pore region is a key determinant of chloride dependence in cardiac pacemaker channels. *J Biol Chem* 280: 13694-13700.
- Wahl-Schott C, Biel M (2009) HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci* 66: 470-494.
- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411: 805-810.
- Wang J, Chen S, Nolan MF, Siegelbaum SA (2002) Activity-dependent regulation of HCN pacemaker channels by cyclic AMP: Signaling through dynamic allosteric coupling. *Neuron* 36: 451-461.
- Wang J, Chen S, Siegelbaum SA (2001) Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J Gen Physiol* 118: 237-250.
- Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, Shu Y, Simen A, Duque A, Vijayraghavan S, Brennan A, Dudley A, Nou E, Mazer JA, McCormick DA, Arnsten AF (2007) Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* 129: 397-410.
- Wellmer J, Su H, Beck H, Yaari Y (2002) Long-lasting modification of intrinsic discharge properties in subicular neurons following status epilepticus. *Eur J Neurosci* 16: 259-266.
- Wellner-Kienitz MC, Shams H, Scheid P (1998) Contribution of Ca²⁺-activated K⁺ channels to central chemosensitivity in cultivated neurons of fetal rat medulla. *J Neurophysiol* 79: 2885-2894.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A (2001) In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128: 3759-3771.
- Wickenden AD, Maher MP, Chaplan SR (2009) HCN pacemaker channels and pain: a drug discovery perspective. *Curr Pharm Des* 15: 2149-2168.
- Wigge P, McMahon HT (1998) The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci* 21: 339-344.
- Williams SR, Stuart GJ (2000) Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I(h) in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83: 3177-3182.
- Williams SR, Stuart GJ (2002) Dependence of EPSP efficacy on synapse location in neocortical pyramidal neurons. *Science* 295: 1907-1910.
- Wu JY, Cohen IS (1997) Tyrosine kinase inhibition reduces i(f) in rabbit sinoatrial node myocytes. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 434: 509-514.
- Yaari Y, Beck H (2002) "Epileptic neurons" in temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 12: 234-239.
- Yu H, Chang F, Cohen IS (1993) Pacemaker current exists in ventricular myocytes. *Circ Res* 72: 232-236.

- Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R (2001) MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res* 88: E84-E87.
- Yu X, Chen XW, Zhou P, Yao L, Liu T, Zhang B, Li Y, Zheng H, Zheng LH, Zhang CX, Bruce I, Ge JB, Wang SQ, Hu ZA, Yu HG, Zhou Z (2007) Calcium influx through If channels in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1147-C1155.
- Yu X, Duan KL, Shang CF, Yu HG, Zhou Z (2004) Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I(h) channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1051-1056.
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425: 200-205.
- Zha Q, Brewster AL, Richichi C, Bender RA, Baram TZ (2007) Activity-dependent heteromerization of the hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide gated (HCN) channels: role of N-linked glycosylation. *J Neurochem*.
- Zhang ZW (2004) Maturation of layer V pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: Intrinsic properties and synaptic function. *Journal of Neurophysiology* 91: 1171-1182.
- Zhou L, Siegelbaum SA (2007) Gating of HCN channels by cyclic nucleotides: residue contacts that underlie ligand binding, selectivity, and efficacy. *Structure* 15: 655-670.
- Zhu JJ (2000) Maturation of layer 5 neocortical pyramidal neurons: amplifying salient layer 1 and layer 4 inputs by Ca²⁺ action potentials in adult rat tuft dendrites. *J Physiol* 526 Pt 3: 571-587.
- Zolles G, Klocker N, Wenzel D, Weisser-Thomas J, Fleischmann BK, Roeper J, Fakler B (2006) Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron* 52: 1027-1036.
- Zong X, Eckert C, Yuan H, Wahl-Schott C, Abicht H, Fang L, Li R, Mistrik P, Gerstner A, Much B, Baumann L, Michalakis S, Zeng R, Chen Z, Biel M (2005) A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J Biol Chem* 280: 34224-34232.
- Zong XG, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M (2001) A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *Journal of Biological Chemistry* 276: 6313-6319.
- Zou LP, Ma DH, Wei L, van der Meide PH, Mix E, Zhu J (1999) IFN-beta suppresses experimental autoimmune neuritis in Lewis rats by inhibiting the migration of inflammatory cells into peripheral nervous tissue. *J Neurosci Res* 56: 123-130.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben werden.
- mir die Habilitationsordnung bekannt ist.

03.09.2010

Ulf Strauß