

**Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,  
plastische und ästhetische Operationen  
der Universität Würzburg  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Rudolf Hagen**

**In-vitro-Analyse der Maturation und Interaktion neuronaler Stammzellen des  
Nucleus Cochlearis der Ratte**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Christine Irma Annikki Völker  
aus Würzburg**

**Würzburg, Dezember 2021**





**Referent:** Prof. Dr. med. Kristen Rak  
**Korreferentin:** Prof. Dr. med. Anna-Leena Sirén  
**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:**

27. März 2023

**Die Promovendin ist Zahnärztin.**



meiner Familie gewidmet



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Einführung</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Charakter und Eigenschaften neuronaler Stammzellen .....	1
1.1.2	Anfänge und Entwicklung der Erforschung neuronaler Stammzellen .....	2
1.1.3	Neuronale Stammzellen des Innenohrs.....	4
1.1.4	Zellmaturation .....	5
<b>1.2</b>	<b>Das auditorische System und der Nucleus Cochlearis</b> .....	<b>8</b>
1.2.1	Anatomische und physiologische Grundlagen des auditorischen Systems	8
1.2.2	Der Nucleus Cochlearis – erste zentrale Schaltstelle der Hörbahn .....	11
<b>1.3</b>	<b>Das Neuron</b> .....	<b>12</b>
1.3.1	Der Aufbau eines Neurons .....	12
1.3.2	Das Perikaryon .....	13
1.3.3	Die Dendriten.....	13
1.3.4	Das Axon und der Axonhügel.....	14
1.3.5	Die Synapsen – Arten und Funktionsweise .....	14
1.3.6	Klassifikation von Neuronen .....	15
1.3.7	Morphologische Einteilung von Neuronen .....	16
1.3.8	Funktionelle Einteilung von Neuronen .....	17
1.3.9	Myelinisierung von Neuronen.....	17
1.3.10	Spannungsgesteuerte Ionenkanäle in Neuronen .....	19
1.3.11	Aktionspotentiale – Entstehung und Weiterleitung .....	20
1.3.12	Signalverarbeitung intra- und interzellulär .....	23
1.3.13	Neuronale Spontanaktivität .....	24
<b>1.4</b>	<b>Das Lebendzellanalyseverfahren des Calcium-Imaging an neuronalen Zellen</b> .....	<b>25</b>
1.4.1	Entwicklung der Calcium-Imaging-Technik.....	25
1.4.2	Ca <sup>2+</sup> -Indikatoren .....	27
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Calcium-Imaging-Setup</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2</b>	<b>Sonstige technische Geräte</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3</b>	<b>Labormaterialien</b> .....	<b>32</b>

<b>2.4</b>	<b>Präparationsinstrumentarium</b> .....	<b>33</b>
<b>2.5</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>33</b>
2.5.1	Chemikalien für die Zellkultur .....	33
2.5.2	Chemikalien für die Immunzytologie .....	34
2.5.3	Chemikalien für das Calcium-Imaging .....	34
<b>2.6</b>	<b>Fluorophore</b> .....	<b>35</b>
<b>2.7</b>	<b>Wachstumsfaktoren</b> .....	<b>35</b>
<b>2.8</b>	<b>Enzyme</b> .....	<b>35</b>
<b>2.9</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>36</b>
2.9.1	Erstantikörper .....	36
2.9.2	Zweitantikörper .....	37
<b>2.10</b>	<b>Selbsthergestellte Lösungen, Puffer und Medien</b> .....	<b>37</b>
2.10.1	Produkte für die Kulturen neuronaler Stammzellen .....	37
2.10.2	Produkte für die Immunzytochemie und Zellkultur.....	38
2.10.3	Produkte für die Beschichtung von Glas-Deckgläsern für Immunzytologie, Zellkultur und Calcium-Imaging .....	39
<b>2.11</b>	<b>Tierstämme</b> .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Präparation von Nuclei Cochleares der Ratte</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Gewebedissoziation</b> .....	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau</b> .....	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Die Suspensionszellkultur</b> .....	<b>41</b>
3.4.1	Suspensionszellkultur von NSCs des Nucleus Cochlearis der Ratte.....	41
3.4.2	Konditionierung von Suspensionszellkulturen .....	42
3.4.3	pH-Wert-Veränderungen des Zellmediums .....	42
3.4.4	Erhöhte Zelldichte in Suspensionszellkulturen .....	42
<b>3.5</b>	<b>Beschichtung von Glas-Deckgläsern (DG)</b> .....	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Zellversuche</b> .....	<b>43</b>
3.6.1	Ausplattierung von Einzelzellen aus Suspensionszellkulturen .....	43
3.6.2	Ausplattierung primärer Neurone .....	43
3.6.3	Ermittlung der optimalen Zelldichte .....	44
3.6.4	Ausplattierung von Neurosphären.....	44
<b>3.7</b>	<b>Calcium-Imaging-Verfahren</b> .....	<b>45</b>
3.7.1	Konstruktion spezieller DG für das Calcium-Imaging .....	45

3.7.2	Vorbereitung der Zellen zur Analyse mit Calcium-Imaging .....	46
3.7.3	Messung am Calcium-Imaging-Setup.....	47
<b>3.8</b>	<b>Analyse der Zelldifferenzierung mit Calcium-Imaging.....</b>	<b>50</b>
3.8.1	Vermessung von Ca <sup>2+</sup> -Strömen bei Einzelzellen.....	50
3.8.2	Analyse der Spontanoszillationen im Verlauf der Zelldifferenzierung.....	50
3.8.3	Detektion spannungsabhängiger Ca <sup>2+</sup> -Kanäle .....	50
3.8.4	Untersuchung der intrazellulären Spontanaktivität .....	51
3.8.5	Detektion des Axons unter den Neuriten .....	51
<b>3.9</b>	<b>Immunfluoreszenzanalyse.....</b>	<b>52</b>
3.9.1	Zellfixierung .....	52
3.9.2	Detektion von Ca <sup>2+</sup> -Kanälen.....	53
<b>3.10</b>	<b>Datenanalyse und Auswertung des Calcium-Imaging.....</b>	<b>53</b>
3.10.1	Verarbeitung der Rohdaten .....	53
3.10.2	Quantifizierung und statistische Analyse .....	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung eines Calcium-Imaging-Protokolls für primäre Neurone und NSCs des N.C. ....</b>	<b>58</b>
4.1.1	Immunzytologische Zellkontrolle .....	58
4.1.2	Immunzytologische Unterscheidung von Neuronen im undifferenzierten und differenzierten Zustand .....	59
4.1.3	Ermittlung der optimalen Dichte von Einzelzellen.....	61
4.1.4	Aufzeichnung spontaner Oszillationen im zeitlichen Verlauf.....	63
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung von primären Neuronen und NSCs des N.C. mit dem Calcium-Imaging-Verfahren.....</b>	<b>65</b>
4.2.1	Quantifizierung von Spontanoszillationen im zeitlichen Verlauf.....	65
4.2.2	Ermittlung des Axons unter den Neuriten anhand der Spontanaktivität ...	66
4.2.3	Unterschiede der Spontanaktivität zwischen Soma, Axon und Dendriten	70
4.2.4	Spontanoszillationen im neuronalen Netzwerk.....	78
<b>4.3</b>	<b>Analyse von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in primären Neuronen und NSCs des N.C. .</b>	<b>80</b>
4.3.1	Immunzytologischer Nachweis von Ca <sup>2+</sup> -Kanälen.....	80
4.3.2	Detektion unterschiedlicher Ca <sup>2+</sup> -Kanaltypen .....	81
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>87</b>

<b>5.1</b>	<b>Kultur und Analysemodell von primären Neuronen und NSCs des N.C. ...</b>	<b>87</b>
	.....	
5.1.1	Zellkultursetup .....	87
5.1.2	Immunzytologischer Nachweis von Neuronen und NSCs .....	88
<b>5.2</b>	<b>Etablierung eines Calcium-Imaging-Systems für die Analyse von primären Neuronen und NSCs des N.C.....</b>	<b>89</b>
5.2.1	Auswahl des geeigneten Fluorophors.....	89
5.2.2	Einflüsse auf die Adhäsion der Zellen.....	90
5.2.3	Überlegungen zum Zeitpunkt der Zelldifferenzierung.....	91
5.2.4	Entwicklung einer speziellen Messkammer .....	91
5.2.5	Sonstige Umgebungsparameter der Zellen .....	92
5.2.6	Ausarbeitung einer geeigneten Fluorophor-Beladungszeit .....	92
5.2.7	Dauer der Messungen und Zeitpunkte der Peaks .....	93
5.2.8	Calcium-Imaging-Auswertung durch ROI Analyse .....	94
5.2.9	Alternative Bestimmungsmethode der Ca <sup>2+</sup> -Aktivität.....	96
<b>5.3</b>	<b>Analyse von primären Neuronen und NSCs des N.C. mittels Calcium-Imaging.....</b>	<b>96</b>
5.3.1	Untersuchung der Spontanaktivität in Form von Ca <sup>2+</sup> -Strömen in Zusammenhang mit der Maturation.....	96
5.3.2	Evaluation der Spontanaktivität in verschiedenen zellulären Kompartimenten .....	100
5.3.3	Evaluation der Spontanaktivität nach neuronaler Netzbildung .....	102
5.3.4	Untersuchung und Nachweis von Ca <sup>2+</sup> -Kanälen .....	105
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>Appendix</b>		
<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	
<b>IV</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>V</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen</b>	

## 1 Einleitung

### 1.1 Einführung

“In adult centres the nerve paths are something fixed, ended, immutable. Everything may die, nothing may be regenerated.“ (Cajal 1913)

Dieses Dogma – in adulten Zentren, seien die Nervenbahnen etwas Festgesetztes, Endendes, Unveränderbares; alles könne sterben, nichts könne regeneriert werden – das der spanische Mediziner Santiago Ramón y Cajal (1852 – 1934) mitbegründet hat, prägte die Hirnforschung bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts. Erst 1906 bestätigte Cajal in seiner Nobelpreisrede den Neuroanatomen Wilhelm His (1831 – 1904) in dessen Theorie, dass Neurone sowohl im embryonalen als auch im adulten Organismus aus ihren Vorläuferzellen, den Neuroblasten, entstehen und durch sie regeneriert werden können (Cajal 1906; Jones 1999). Cajal postulierte drei grundlegende Eigenschaften für das Phänomen der adulten Neurogenese: Neurone entstehen aus Neuroblasten, sie sind in der Lage, sich selbst durch Mitose zu regenerieren, und sie können sich untereinander funktionell vernetzen. Cajal beschrieb, dass embryonale Zellentwicklung und adulte Zellerneuerung den gleichen Grundzügen folgen (Cajal 1906).

#### 1.1.1 Charakter und Eigenschaften neuronaler Stammzellen

Heute werden allgemein als Stammzellen undifferenzierte Zellen in Organismen bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen, sich mitotisch zu teilen. Grundlegend werden beim Säugetier embryonale und adulte Stammzellen unterschieden. Adulte Stammzellen liegen, im Gegensatz zu den während der Entwicklung bedeutenden embryonalen Stammzellen, im ausgereiften Organismus von Säugetieren vor und dienen als Quelle zur Zellerneuerung von Geweben. Diese Zellen besitzen über die Entwicklungsphase hinaus weiterhin die Fähigkeit, sich selbst zu teilen und in alle spezialisierten Zellen des Endoderms, Mesoderms und Ektoderms eines Organismus terminal zu differenzieren. Stammzellen von Säugetieren können auf der Grundlage ihrer Teilungs- und Differenzierungsfähigkeit zu bestimmten Zelltypen in toti, pluri-, multi- und oligopotenten Stammzellen unterteilt werden. Neben Stammzellen des Knochenmarks,

## 1 - Einleitung

Fettgewebes und Blutes konnten in den vergangenen Jahren ebenfalls im Bereich des zentralen Nervensystems (ZNS) von Säugetieren sogenannte neuronale Stammzellen (NSC - neural stem cells) identifiziert und isoliert werden.

Neuronale Stammzellen sind sowohl fähig, sich selbst zu erneuern, als auch zu allen Zellen der neuroektodermalen Linie - Neuronen, Astrozyten und Gliazellen - zu differenzieren (Reynolds and Weiss 1992; Gage et al. 1995; Doetsch et al. 1997; Sohr 2006). Sie besitzen spezifische Eigenschaften, durch welche sie eindeutig zu charakterisieren sind. Ihre drei kardinalen Eigenschaften bestehen darin, dass sie (a) neuronales Gewebe generieren können oder sich davon ableiten, (b) das Potential zur Selbsterneuerung besitzen und (c) durch asymmetrische Zellteilung zu anderen Zelltypen differenzieren können. Die aus Stammzellen hervorgehenden Vorläuferzellen (Progenitorzellen) können wiederum eine eigene Stammzellfunktion einnehmen oder zu mindestens zwei unterschiedlichen Zelllinien differenzieren. Ihr Potential zur Selbsterneuerung ist jedoch begrenzt. Des Weiteren kommen im ZNS auch Progenitorzellen vor, die linienspezifisch sind, sich also nur in eine Zelllinie weiterentwickeln können (Weiss et al. 1996; McKay 1997).

### 1.1.2 Anfänge und Entwicklung der Erforschung neuronaler Stammzellen

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts hatten Ramón y Cajal und Wilhelm His noch die Vorstellung, das Gehirn könne postnatal keine neuen Nervenzellen regenerieren (Cajal 1913). Nachdem jedoch Zweifel an der fehlenden Regenerationsfähigkeit des adulten Gehirns aufgekommen waren, nutzte der Neurobiologe Joseph Altman neue technische Methoden zur Darstellung sich teilender Zellen. Hiermit sollte die Unterscheidung zwischen alten, embryonalen und neu entstandenen - im adulten Organismus hinzugekommenen - Neuronen ermöglicht werden (Altman 1962a): Indem er mit radioaktiv markiertem  $H^3$ -Thymidin sich teilende Zellen darstellte, konnte Altman zeigen, dass im Gyrus dentatus des Hippocampus junger Ratten (Altman and GD 1965) und im Bulbus olfactorius (Altman 1969) neue neuronale Zellen gebildet werden. Nach Altmans Technik konnte jedoch noch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass im Versuch Neurone und nicht Gliazellen markiert wurden, weshalb einige Jahre später Kaplan und Hinds eine Methode zur Bestätigung der Ergebnisse von Altman entwickelten: Sie konnten durch Kombination der Methode der Thymidinmarkierung mit einer elektronenmikroskopischen Darstellung des Phänotyps der Zellen Altmans Erkenntnisse

von 1962 verifizieren (Hinds 1968a; Hinds 1968b; Kaplan and Hinds 1977). Trotz dieser Nachweise blieb lange die Vorstellung erhalten, dass im Bereich des adulten zentralen Nervensystems kein Stammzellpotential vorhanden sei, da die bisherige Forschung nur morphologisch die neu entstandenen Zellen aufzeigen konnte, nicht jedoch durch spezifische neuronale Marker (Altman 1962b). Erst in den 80er Jahren wurden adulte Kanarienvögel hinsichtlich des Auftretens neuer Neurone und des gleichzeitigen Erlernens neuer Lieder mithilfe des  $H^3$ -Thymidin-Mitosenachweises in den höheren Stimmzentren untersucht und es konnte eine Korrelation nachgewiesen werden (Goldman and Nottebohm 1983). Von diesem Zeitpunkt an wurde vermehrt Forschung im Bereich der Neurogenese betrieben und in der folgenden Zeit in verschiedenen Arealen des zentralen Nervensystems adulte Neurogenese nachgewiesen, wie beispielsweise im Gyrus dentatus adulter Ratten (Gage et al. 1995). Ende des 20. Jahrhunderts wurde ein Mitosenachweisverfahren mithilfe des synthetisch hergestellten Thymidinanalogons BrdU (5-Bromo-3'-Desoxyuridin) etabliert, welches - ähnlich wie  $H^3$ -Thymidin - in der S-Phase der Mitose in die DNA der Zellen integriert wird (Eriksson et al. 1998). Dieser BrdU-Marker ist, im Gegensatz zum bisher verwendeten radioaktiv markierten  $H^3$ -Thymidin, durch die Immunfluoreszenztechnik in Geweben und Zellen nachweisbar (Kuhn et al. 1996; Palmer et al. 1997). Mit dieser Methode konnten nun erstmals Neurone durch spezifische Proteine auch immunhistologisch dargestellt und nachgewiesen, sowie Vorläuferzellen und daraus neu gebildete Neurone qualitativ und quantitativ untersucht werden. Das Dogma, dass im adulten Gehirn des Säugetiers Neurone und Gliazellen nicht nachgebildet werden könnten, wurde somit allmählich aus der Forschung verbannt. Innerhalb weniger Jahre war bewiesen, dass im adulten Gehirn des Säugetiers zwei Regionen mit dem Potential der Neurogenese bestehen: die subgranuläre Zone (SGZ) im Gyrus dentatus des Hippocampus und die subventrikuläre Zone (SVZ) in den Wänden der lateralen Ventrikel (Eriksson et al. 1998; Gould et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass *in-vivo* Zellen der SVZ Neurone und Vorläuferzellen generieren, die in den Bulbus olfactorius wandern und dort zu Interneuronen differenzieren (Luskin 1993). Auch wurden *in-vitro* Studien zur Neurogenese durchgeführt, bei denen Zellen aus der SVZ isoliert und anschließend mit den Wachstumsfaktoren EGF (epidermal growth factor) (Morshead et al. 1994) und bFGF (basic fibroblast growth factor) (Gritti et al. 1995) behandelt wurden. Es wurde gezeigt, dass die Zellen multipotent waren, also die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besaßen und somit Stammzellpotential aufwiesen (Doetsch et al. 1997). Bei diesen Zellen der SVZ konnten Charakteristika von Astrozyten nachgewiesen werden: Sie exprimierten das

## 1 - Einleitung

„glial fibrillary acidic protein“ (GFAP), wiesen ein helles Zytoplasma und „gap junctions“ zur Erregungsweiterleitung auf (Altman 1969). Außerdem wurde gezeigt, dass Zellen aus Neurosphären in Neurone, Gliazellen und Oligodendrozyten differenzieren können, sofern sie aus einer pluripotenten Vorläuferzelle hervorgegangen sind (Reynolds and Weiss 1992; Doetsch et al. 1997). Zellen, welche in der Lage sind, Neurone zu generieren, wurden als primäre Vorläuferzellen der adulten Neurogenese beschrieben (Doetsch et al. 1997).

Anstelle der Vorstellung eines starr organisierten Nervensystems entstand das Bild neuronaler Plastizität, wonach sich das Gehirn von Säugetieren an Sinneseindrücke und verschiedene Lebenssituationen anzupassen, sowie Schädigungen durch Reparaturmechanismen zu beheben vermag (Morris 1999). Da heute die Neurogenese detaillierter untersucht und zahlreiche Modulatoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren und Hormone, genauer bekannt sind, könnte künftig Nervengewebe gezielt beeinflusst und regeneriert werden, was für therapeutische Ansätze einen großen Nutzen erbringen würde (Li et al. 2003). Hierzu müssen jedoch die komplexen Regulationsmechanismen noch weiter untersucht werden.

### 1.1.3 Neuronale Stammzellen des Innenohrs

Die Forschung am Innenohr des adulten Säugetiers zeigt in diesem ebenfalls ein Stammzellpotential auf. Es war möglich, neuronale Stammzellen der Cochlea zu isolieren und *in-vitro* zu kultivieren, sodass sie in reife Neurone und Gliazellen differenzieren konnten (Zhai et al. 2005). Durch spezifische Marker gelang es, die Differenzierung an Haarzellen zu demonstrieren (Zhai et al. 2005). In verschiedenen Untersuchungen konnten Stammzellen des Spiralganglions isoliert werden (Rask-Andersen et al. 2005; Senn 2007; Oshima 2007; Di Santo 2013). Aus allen drei Bereichen des Innenohres früh-postnataler Ratten war es möglich, Progenitorzellen zu isolieren: aus dem Spiralganglion, dem Utriculus und dem Corti-Organ (Di Santo 2013). Die dissoziierten Zellen der drei Gewebeareale wurden in frei flottierenden Zellkulturen kultiviert (Di Santo 2013). Ebenso wurden Utriculi, Sacculi, Corti-Organ, Spiralganglien und Striae vasculares aus den Gleichgewichtsorganen von Mäusen isoliert und die dissoziierten Zellen in frei flottierenden Zellkulturen kultiviert (Li et al. 2003; Oshima 2007). Unter der Zugabe von EGF, FGF-2 und IGF-1 zeigten die Einzelzellen ein hohes Proliferationspotential sowie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und entwickelten nach

wenigen Tagen Neurosphären aus klonierten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass nach Entzug der wachstumsfördernden Substanzen die Einzelzellen aus allen untersuchten Gewebearealen teilweise in Zellen maturierten, welche morphologisch und in ihren funktionellen Charakteristika Haarsinneszellen ähnelten. Aus diesen Erkenntnissen wurde geschlossen, dass die *in-vitro* generierten, haarzellähnlichen Zellen potentiell das geschädigte Gleichgewichts- bzw. Hörorgan regenerieren könnten (Li et al. 2003; Oshima 2007). 2005 gelang es erstmals, neuronale Stammzellen in den Spiralganglien humaner und vom Meerschweinchen abstammender Präparate nachzuweisen (Rask-Andersen et al. 2005). Die hierbei entnommenen Zellen konnten ebenfalls in frei flottierenden Zellkulturen unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert und zu Neurosphären propagiert werden. Aus den Neurosphären klonalen Ursprungs maturierten Einzelzellen und differenzierten in Gliazellen oder Neurone, die anschließend über mehrere Wochen *in-vitro* kultiviert werden konnten (Rask-Andersen et al. 2005). Haarsinneszellen wurden aus den Cochleae von Ratten isoliert und eine Methode zur Kultivierung dieser entwickelt. Aus den Zellen wurden Monolayer-Kulturen des neonatalen Gewebeareals angelegt, welches später das Corti-Organ ausbildet. Es gelang, in diesen Kulturen die Einzelzellen zu kultivieren (Zhai et al. 2005). Die Progenitorzellen dieser Kulturen zeigten das Potential zur Proliferation und zur Entwicklung von Neurosphären. Gemeinsam kultiviert mit mesenchymalen Zellen wiesen sie die Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen auf, welche die Haarzellmarker Myosin VIIa und Myosin VI exprimierten. Zudem fand auch eine Differenzierung einzelner Zellen in Stützzellen statt, die durch den Marker p27 immunzytochemisch nachweisbar waren (Zhai et al. 2005). Zhai et al. konnten also zeigen, dass die isolierten Progenitorzellen aus Haarsinneszellen die Fähigkeit besaßen, *in-vitro* nach Kultivierung erneut in Neuroepithel zu differenzieren. Zudem wurden als Marker für neuronale Progenitorzellen Nestin (Lendahl et al. 1990) und Musashi-1 (Kaneko et al. 2000) in neonatalen Maus-Spiralganglien (Oshima et al. 2007) sowie in Neurosphären von Maus-Spiralganglien (Rask-Andersen et al. 2005; Oshima 2007; Oshima et al. 2007) nachgewiesen.

### 1.1.4 Zellmaturation

Die Reifung und das Auswachsen primärer Neurone wurden bereits 1988 am Modell primärer hippocampaler Neurone *in-vitro* beschrieben. Es hieß, dass die Reifung der

## 1 - Einleitung

neuronalen Zellen einem stereotypen Ablauf von Ereignissen der Entwicklung folgt (Dotti 1988). Dieses Modell der Zellmaturation ist vergleichbar mit der neuronalen Entwicklung *in-vivo* (Craig 1994). Die Maturation einer Zelle wurde in fünf Entwicklungsstufen dargestellt: die Formation von Lamellipodien (1), die Verlängerung der kleinen Fortsätze (2), die Formation und das Wachstum eines Axons (3), das Wachstum von Dendriten (4) sowie die Maturation von Axon und Dendriten (5) (Dotti 1988). Kurze Zeit nach Anwachsen der Zellen auf dem Trägermaterial wurde die Entwicklung der Lamellipodien in der direkten Zellperipherie beschrieben, welche kleinen Erhebungen in der äußeren Zellmembran ähneln und sowohl bei neuronalen als auch bei nicht-neuronalen Zellen beobachtet werden konnten (Harris 1973). Die spätere Bedeutung der Lamellipodien für die Zellen *in-vivo* ist unklar, sie könnten allerdings *in-vitro* für das Anheften an künstlichen, zweidimensionalen Oberflächen und für die Formation von Neuriten verantwortlich sein (Dotti 1988). Diese Lamellipodien, welche zunächst die gesamte Zelle engmaschig umgeben, separieren sich im Verlauf zu freibeweglichen Strukturen, die sich in bestimmten Intervallen um die Zelle herum anordnen (Collins 1978; Wessells and Nuttall 1978). In diesen Bereichen bilden sich später Neuriten, sodass die Lamellipodien-Strukturen offensichtlich deren Wachstumskegel darstellen (Dotti 1988). Innerhalb weniger Stunden verlängern sich die Lamellipodien-Strukturen deutlich und bilden kleine netzartige Muster, was die zweite Entwicklungsstufe nach Dotti et al. darstellt. Solche Entwicklungsmuster wurden auch in anderen Untersuchungen bei Zellen des Hippocampus sowie des Gyrus cinguli und bei weiteren Regionen des ZNS beschrieben (Shoukimas and Hinds 1978; Nowakowski and Rakic 1979; Moody and Heaton 1981; Bicknell and Beal 1984). Zur dritten Entwicklungsstufe wurde erklärt, dass einige Stunden nach Auswachsen der Lamellipodien eine einzelne Struktur beginnt, im Vergleich zu allen anderen Strukturen, verstärkt und schneller zu wachsen. Diese ließ sich eindeutig als das Axon identifizieren (Dotti 1988). Von diesem Zeitpunkt an erhält die Zelle eine Polarität (Bartlett and Banker 1984; Dotti 1988). Erst nach vier Tagen der Zellkultivierung bzw. zwei bis drei Tage nach Auswachsen des Axons wurde das Einsetzen eines verstärkten Wachstums der Dendriten beobachtet, was als vierte Entwicklungsstufe bezeichnet wurde. Einen derartigen Ablauf von Axon- und Dendritenwachstum beschrieben ebenfalls Nowakowski und Rakic 1979 an hippocampalen Zellen (Nowakowski and Rakic 1979). Zwischen dem vierten und siebten Tag der Zellkultivierung beginnt mit der fünften Entwicklungsstufe die Maturation (Dotti 1988). Es entwickeln sich dendritische Dornfortsätze und reife Synapsen lassen sich nachweisen (Grabrucker et al. 2009). Während der Zellreifung sind dann in Axon

und Dendriten neuronenspezifische Markerproteine aufzufinden: MAP2, das bevorzugt in den Dendriten auftritt, und Tau, das vorwiegend im Axon vorliegt (Dotti et al. 1987; Dotti 1988), außerdem auch Nestin, das in NSC und Progenitorzellen zu finden ist (Reynolds and Weiss 1992; Morshead et al. 1994; Suzuki et al. 2010). Diese sind zum Zeitpunkt der Polarisierung der Zelle noch unspezifisch in Axon und Dendriten verteilt, sodass deren späteres spezifisches Auftreten ein Charakteristikum für die Phase der Maturation darstellt (Caceres et al. 1984; Dotti et al. 1987). Die von Dotti et al. 1988 gewonnenen Erkenntnisse zeigen das Potential einer Zelle, von einem unpolaren Neuroblasten bis hin zu einem vollständig polarisierten Neuron zu reifen.

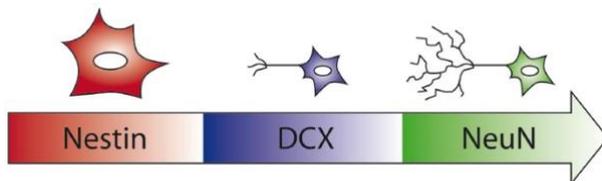


Abbildung 1: Schematische Darstellung neuronaler Reifungsstadien anhand immunzytologischer Markerproteine

(modifiziert nach Couillard-Despres S et al., Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. Eur J Neurosci. 2005 Jan;21(1):1-14. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x. PMID: 15654838;

gezeichnet von © Christine Völker).

**DXC (Doublecortin), blau** – neuronales Markerprotein von Vorläuferzellen im Differenzierungsverlauf;

**Nestin, rot** – Markerprotein neuronaler, undifferenzierter Vorläuferzellen;

**NeuN (Neuronal Nuclei), grün** – Markerprotein differenzierter Neurone.

Die Abbildung zeigt schematisch den Fortschritt der Reifungsstadien von der undifferenzierten Vorläuferzelle bzw. neuronalen Stammzelle (immunzytologisch markierbar durch das Markerprotein Nestin; **rot**) weiter über die Vorläuferzelle (markierbar durch Doublecortin; **blau**) bis hin zum differenzierten Neuron (markierbar durch NeuN, **grün**).

## 1 - Einleitung

### 1.2 Das auditorische System und der Nucleus Cochlearis

#### 1.2.1 Anatomische und physiologische Grundlagen des auditorischen Systems

Anatomisch besteht das Hörorgan aus einem peripheren und einem zentralen Anteil, wobei der periphere Bereich aus dem äußeren Ohr, dem Mittelohr und dem Innenohr sowie der Pars cochlearis des N. vestibulocochlearis gebildet wird, der zentrale Teil hingegen aus der Hör- und Gleichgewichtsbahn. Der anatomische Übergang des peripheren in den zentralen Bereich wird durch den Eintrittspunkt des N. cochlearis in den Hirnstamm gebildet. Innerhalb der zentralen Hörbahn werden ein aufsteigender und ein absteigender Anteil unterschieden. Die aufsteigende Hörbahn dient dazu, akustische Signale an das Gehirn weiter zu leiten, zu verarbeiten und an das Bewusstsein zu schicken. Dieser Teil der Hörbahn besteht aus fünf Neuronen: Ganglion spirale in der Cochlea mit zentralen Fortsätzen in Form der Pars cochlearis des N. vestibulocochlearis, Nuclei cochleares anterior und posterior, Nuclei centrales colliculi inferioris, Corpus geniculatum mediale und Gyri temporales transversus (Heschl-Querwindungen, primäres Hörfeld). Die absteigende Hörbahn wird durch Fasern gebildet, welche von der Hörrinde über den oberen Olivenkomplex zu äußeren und inneren Haarzellen verlaufen. Hier wird die Empfindlichkeit der Haarsinneszellen für Schallimpulse gesteuert.

Der Vorgang des Hörens beginnt mit der Schallaufnahme über das äußere Ohr und der Schallweiterleitung über den Gehörgang zum Trommelfell. Von dort findet eine Übertragung von Schwingungen über die Gehörknöchelchenkette des Mittelohrs auf das ovale Fenster der Cochlea statt. Die Gehörknöchelchen Hammer, Amboss und Steigbügel tragen durch ihre Hebelwirkung zu einer Schalldruckverstärkung bei der Übertragung der Schallenergie auf die mit Perilymphflüssigkeit gefüllte Cochlea am ovalen Fenster bei. Aufgrund der unterschiedlichen Schallwellenwiderstände (Impedanzen) der Medien Luft und Wasser an der Grenzfläche würden ansonsten 98% der auftreffenden Schallwellen reflektiert und so für den Hörvorgang verloren gehen. Daher findet mit Hilfe der Gehörknöchelchen eine Impedanzanpassung statt. Es entstehen Druckdifferenzen in der Perilymphflüssigkeit, die zu einer mechanoelektrischen Signalumwandlung der komplexen Schallwellen durch das Corti-Organ der Cochlea in elektrische neuronale Aktivität führen.

Das erste Neuron der Hörbahn wird durch das Ganglion spirale in der Cochlea gebildet. Die Axone dieser Ganglienzellen stellen den größten Teil des Hörnervs (N. cochlearis oder acusticus, N. VIII) dar. Sie verlaufen durch den inneren Gehörgang (Meatus

acusticus internus) und führen von dort zum Kleinhirnbrückenwinkel der Medulla oblongata (Kandel et al. 2012). Die Neuriten der Ganglienzellen des Ganglion spirale sind mit den inneren und äußeren Haarsinneszellen des Corti-Organ verbunden. Alle Fasern des Hörnervs treten in den Hirnstamm ein und bilden im Nucleus cochlearis (N.C.) das zweite Neuron der Hörbahn. Vor dem Eintritt in den N.C. teilt sich der Hörnerv in zwei Faserbündel, von denen eines den Nucleus cochlearis dorsalis und eines den Nucleus cochlearis ventralis innerviert. Der dorsale Anteil der Hörbahn führt nun vom Boden der Rautengrube nach kontralateral zu den Colliculi inferiores. Der ventrale Anteil verläuft über den Lemniscus lateralis der Gegenseite zu den kontralateralen Colliculi inferiores. Ein weiterer Faseranteil läuft zum oberen Olivenkern (Nucleus olivaris superior). Dieser Olivenkomplex stellt das erste Kerngebiet der Hörbahn dar, das von beiden Ohren Afferenzen erhält und sie miteinander vergleichen kann, wodurch er das wichtigste Kerngebiet für das Richtungshören bildet. Der laterale Anteil dieses Komplexes kann die Schallquelle durch Intensitätsdifferenzen orten, der mediale Abschnitt nutzt die Laufzeitdifferenz zur Ortung. Die Masse der Fasern, welche die Nuclei cochleares beider Seiten miteinander verbinden, wird als Corpus trapezoideum bezeichnet.

Umschaltstation aller auditorischer Fasern sind die Colliculi inferiores, die das dritte Neuron der Hörbahn bilden. Das vierte Neuron der Hörbahn liegt im nachgeschalteten Corpus geniculatum mediale. Die Hörbahn endet mit den sogenannten Heschl'schen Querwindungen (Gyri temporales transversi), welche das fünfte Neuron darstellen, in der Brodmann Area 41.

## 1 - Einleitung

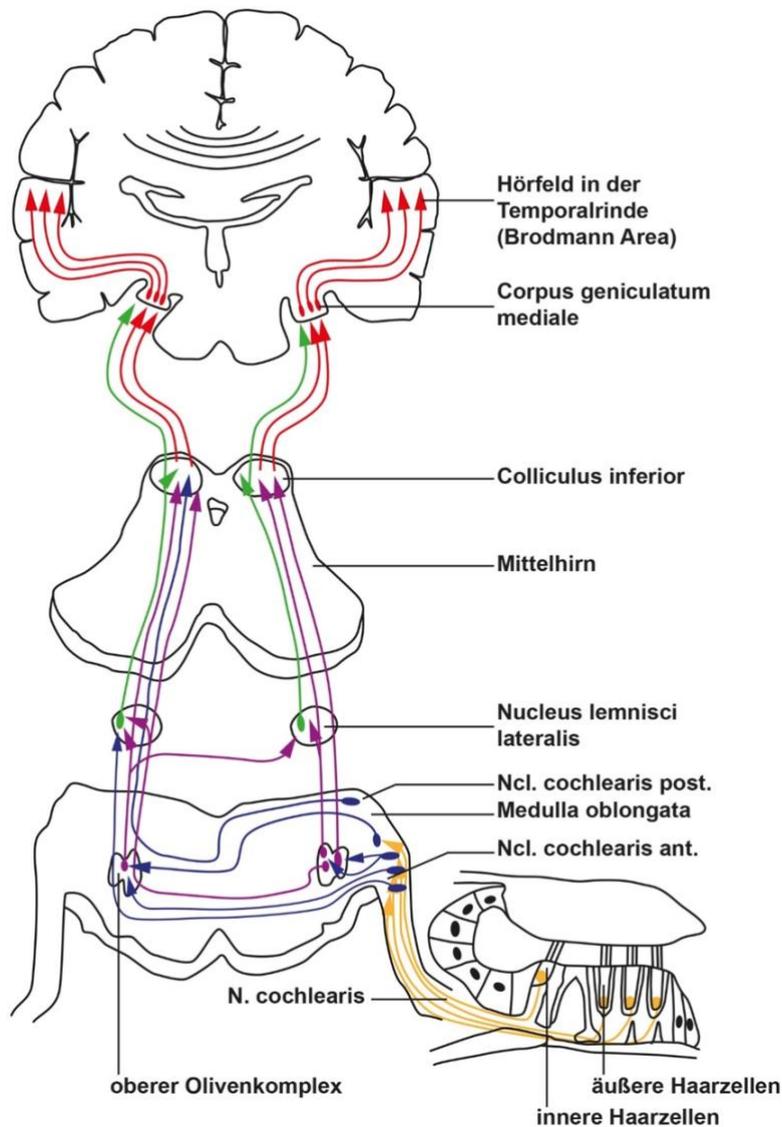


Abbildung 2: Schematische Darstellung der zentralen, afferenten Hörbahn

(modifiziert nach „The Ciba Collection of Medical Illustrations, Farbatlanten der Medizin, Band 5, Nervensystem I“, Frank H. Netter, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1987; gezeichnet von © Christine Völker).

ant. – anterior

N. – Nervus

Ncl. – Nucleus

post. – posterior

Die Abbildung stellt schematisch die zentrale, afferente Hörbahn dar. Anatomischer Beginn ist der Eintritt des VIII. Hirnnerven (N. vestibulocochlearis) in den Hirnstamm, der sich in den **Nervus (N.) cochlearis** und N. vestibularis aufteilt. Die in ihm verlaufenden afferenten Nervenfasern enden beidseits jeweils in den

**Nuclei (Ncl.) cochleares posteriores (post.) et anteriores (ant.).** Die Hörbahn verläuft weiter zu den Kernen des **oberen Olivenkomplexes**. Von dort geht der Verlauf – bereits unter Kreuzung der Nervenbahnen von der Gegenseite – weiter über die **Ncl. lemnisci laterales** zur Vierhügelplatte des Mittelhirns mit den **Colliculi inferiores**. Endpunkt nach Querung des **Corpus geniculatum mediale** im Bereich des Metathalamus ist das **primäre Hörfeld in der Temporalrinde** des Großhirns, die sogenannte **Brodman-Area (Area 41)**. Die neuronalen Signale kreuzen im Verlauf der Hörbahn größtenteils zur Gegenseite und bilden zahlreiche Verbindungen der Kerngebiete untereinander.

### 1.2.2 Der Nucleus Cochlearis – erste zentrale Schaltstelle der Hörbahn

Bereits 1909 beschrieb Ramón y Cajal, dass alle Fasern des Hörnerven im N.C. münden, wo sie sich in unterschiedliche, auf- und absteigende Faserbündel auftrennen (Ramón y Cajal 1909).

Vom Ganglion spirale in der Cochlea verlaufen frequenzspezifische Fasern zum N.C. Dieser stellt die erste zentrale Umschaltstation der Hörbahn dar. Sowohl histologisch als auch funktionell lassen sich drei Kompartimente des N.C. beschreiben: der anteroventrale (AVNC), posteroventrale (PVNC) und der dorsale N.C. (DNC). Die aufsteigenden Fasern münden vorwiegend im AVNC, absteigende Efferenzen werden im PVNC und DNC umgeschaltet. Der gesamte N.C. ist tonotopisch geordnet aufgebaut. Im N.C. unterscheidet man unterschiedliche Zellarten, die auch elektrophysiologisch klassifizierbar sind. Der AVNC besteht vorwiegend aus multipolaren Stellatum-Zellen. Diese kodieren die eintreffenden auditorischen Signale entsprechend ihrer Frequenz. Zudem sind hier auch Bushy-Zellen zu finden, die das akustische eingetroffene Signal zeitlich vermessen und so den Schall horizontal lokalisieren können (Campagnola and Manis 2014). Der PVNC weist sogenannte Oktopus-Zellen auf, welche auf bestimmte Frequenzen hin postsynaptische Signale erzeugen und so die zeitliche Ortung dieser Frequenzen unterstützen. Den DNC bilden zum größten Teil fusiforme Pyramidalzellen. Sie reagieren durch exzitatorische und inhibitorische Signale auf spezielle Schallereignisse und verstärken dadurch die vertikale Schalllokalisierung (Lieberman 1993).

## 1 - Einleitung

### 1.3 Das Neuron

Ein Neuron ist eine Zelle, die sich durch die Möglichkeit der Erregungsbildung und -weiterleitung als Folge einer Stimulation auszeichnet. Diese Erregungsausbreitung unter Neuronen erfolgt durch eine Depolarisation des Zellmembranpotentials. Die Erregung kann dann über Synapsen, mit Hilfe von Neurotransmittern als Überträgerstoffe oder über elektrische Verbindungen auf ein Erfolgsorgan oder nachgeschaltete Neurone übertragen werden.

#### 1.3.1 Der Aufbau eines Neurons

Ein Neuron wird in den Zelleib - Soma oder Perikaryon - und zwei Arten von Fortsätzen unterteilt - das Axon mit Axonhügel und die Dendriten. Dendriten nehmen Erregungen auf, die als postsynaptische Potentiale messbar sind. Das Axon hingegen leitet Erregungen in Form von Aktionspotentialen weiter. Nach Summation exzitatorischer und inhibitorischer Erregungen innerhalb des Perikaryons werden diese Aktionspotentiale im Axonhügel, dem Anfangssegment des Axons, generiert.

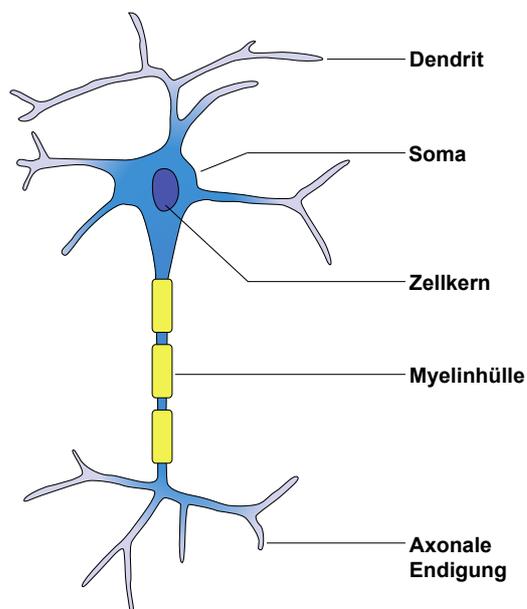


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Neurons mit seinen Zellbestandteilen

(modifiziert nach Duale Reihe Anatomie, Aumüller G et al., Hrsg. 3., aktualisierte Auflage, Stuttgart: Thieme; 2014; gezeichnet von © Christine Völker)

Die Abbildung stellt schematisch den Aufbau eines Neurons dar. Gezeigt sind der Zellkörper (**Soma**) mit **Zellkern**, die **Dendriten**, das **Axon** mit **Myelinhülle** und die **axonalen Endigungen**.

### 1.3.2 Das Perikaryon

Das Perikaryon stellt den Zellkörper (Soma) eines Neurons dar. In ihm finden wichtige Stoffwechselfvorgänge wie die Neurotransmitterproduktion statt. Das Soma zeichnet sich durch den zentral gelegenen, kugeligen Zellkern aus, der aufgrund einer hohen Stoffwechselrate sehr groß ist und einen deutlichen Nucleolus enthält. Zudem liegen im Soma stark entwickelte Organellen. Zu ihnen gehören die sogenannten Nissl-Schollen, die eine Ansammlung von rauem endoplasmatischem Retikulum und freien Ribosomen bezeichnen und die für die Proteinsynthese des Neurons zuständig sind. Wichtig für die Energieversorgung der Zelle sind die zahlreich vorkommenden Mitochondrien. Außerdem liegt im Soma der Golgi-Apparat, aus dem Granula und Vesikel hervorgehen. Die Komponenten des Zytoskeletts sind stark entwickelt. Hierzu gehören beispielsweise die Mikrotubuli.

### 1.3.3 Die Dendriten

Die Dendriten bilden erregbare Strukturen für die Signalaufnahme eines Neurons. Sie können sich komplex verzweigen und in unterschiedlicher Anzahl innerhalb eines Neurons vorkommen. So können weit ausladende Dendritenbäume entstehen, die sich im Verlauf des Lebens einer Nervenzelle ständig verändern können. Sie sind imstande, an ihrer Oberfläche zahlreiche Synapsen auszubilden. Dendriten enthalten, genau wie das Axon, parallel verlaufende Mikrotubuli, jedoch haben sie hier nicht alle die gleiche elektrische Ausrichtung. Ihr Plus-Pol kann also sowohl zum Perikaryon zeigen als auch in Richtung der Synapsen. An ihrer Oberfläche bilden Dendriten besondere Ausstülpungen, die als Dornen (Spines) bezeichnet werden. Sie dienen der Oberflächenvergrößerung und der Regulation der Reizbarkeit über die Anzahl dort vorhandener Synapsen.

## 1 - Einleitung

### 1.3.4 Das Axon und der Axonhügel

Ein Neuron besitzt typischerweise nur ein Axon, das der raschen elektrischen Weiterleitung in Form der Aktionspotentiale dient. Das Axon ist durch ein dichtes Zytoskelett charakterisiert. Es besteht aus Mikrotubuli und Neurofilamenten. Diese sind parallel zur Längsachse des Axons angeordnet und alle elektrisch gleichartig ausgerichtet. Entlang dieser Mikrotubuli findet der schnelle axonale Transport statt. Die Neurofilamente bilden das stabile, strukturelle Gerüst des Axons. Axone können Kollateralen bilden und sich an ihren Enden in zahlreiche, kleine Äste aufzweigen. Durch die terminalen Aufzweigungen entsteht das sogenannte Telodendron, durch welches das Neuron über Synapsen Kontakt zu vielen anderen Neuronen und Rezeptoren erhalten kann. Am Telodendron befinden sich in den einzelnen Ästen sogenannte Endkolben. Diese speichern Neurotransmitter in Vesikeln, die bei Bedarf in den synaptischen Spalt entlassen werden können.

Das Axon entspringt am Zellkörper in Form des Axonhügels - auch Ursprungskegel genannt - und setzt sich als dünneres Segment fort. Nach dem Axonhügel beginnt die Myelinscheide, die das gesamte restliche Axon umgibt. Sowohl an Axonen als auch an Dendriten bilden sich beim Auswachsen sogenannte Wachstumskegel. Sie können auf Reize aus der Umgebung reagieren, indem sie beispielsweise anziehende oder abstoßende Signale erzeugen, welche dazu führen, dass die Wachstumsrichtung des Neurons beeinflusst wird.

### 1.3.5 Die Synapsen – Arten und Funktionsweise

Synapsen stellen spezielle Kontaktstellen dar, die dazu dienen, Erregungen von einem Neuron auf ein anderes zu übertragen, was als Neurotransmission bezeichnet wird (Syed 2009). Es werden chemische und elektrische Synapsen unterschieden.

Elektrische Synapsen werden durch Porenproteine gebildet. Dabei sind jeweils sechs Connexinmoleküle zu einem Connexon mit einem Porenkanal zusammengelagert, welcher zwei Neurone miteinander verbindet und die sogenannte Gap Junction darstellt. So können Änderungen des Membranpotentials einer Zelle rasch und direkt auf die angeknüpfte Zelle übertragen werden. Die Gap Junctions erzeugen also eine elektrische Kopplung der Neurone untereinander.

Chemische Synapsen sind bei Menschen in wesentlich größerer Anzahl vertreten als elektrische. Sie werden von drei Komponenten gebildet: einer präsynaptischen Membran, einem synaptischen Spalt und einer postsynaptischen Membran (Palay 1956). Die präsynaptische Membran des Axons kann eine synaptische Verbindung mit einem Dendriten, einem anderen Axon oder einem Perikaryon eingehen (Del Cerro and Snider 1972). Das Prinzip der chemischen Synapse besteht in der Umwandlung elektrischer Erregungen in chemische Informationen. Dabei lösen Aktionspotentiale (AP), die im Axon gebildet werden, eine Abgabe von Neurotransmittern aus den Vesikeln der Endkolben in den synaptischen Spalt aus. Durch ein AP kommt es in der präsynaptischen Zelle zur Öffnung spannungsgesteuerter Calcium-Kanäle ( $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle), wodurch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht wird. Mit Hilfe  $\text{Ca}^{2+}$ -bindender Proteine, wie beispielsweise Synaptotagmin, kommt es zu einer Verschmelzung der Transmittervesikel mit der präsynaptischen Membran, sodass Neurotransmitter aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt entlassen werden. Diese Transmittermoleküle können anschließend an ionotrope Rezeptoren in der postsynaptischen Membran binden, was in dieser Membran wiederum eine Änderung der Durchlässigkeit für bestimmte Ionen bewirken kann. Dadurch wird das chemische Signal wieder in ein elektrisches umgewandelt. Binden die Neurotransmitter an metabotrope Rezeptoren in der postsynaptischen Membran, so wird eine Second-Messenger-Kaskade ausgelöst und das Signal zunächst auf chemischem Wege weitergeleitet. Je nach Art des Neurotransmitters entsteht in der postsynaptischen Zelle entweder ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) oder ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP). Ein EPSP begünstigt, ein IPSP behindert die Bildung eines Aktionspotentials in der postsynaptischen Zelle.

Gray unterschied bereits 1959 zwei Arten von chemischen Synapsen: Gray-Typ-I- und Gray-Typ-II-Synapsen. Diese beiden Arten differieren leicht in ihrer Morphologie. Typ-I-Synapsen sind i. d. R. inhibitorisch, Typ-II-Synapsen exzitatorisch (Gray 1959).

### 1.3.6 Klassifikation von Neuronen

Neurone lassen sich auf anatomischer (Davis and Sterling 1979; Boycott and Wässle 1991; Masland 2004), molekularer (Baraban 2004; Nelson et al. 2006; Kodama et al. 2012) und elektrophysiologischer (Markram et al. 2004) Ebene einteilen. Die

## 1 - Einleitung

anatomische Einteilung erfolgt nach ihrer Morphologie, also nach dem Verzweigungstyp und der Anzahl der Neuriten, die sich vom Soma aus verzweigen.

### 1.3.7 Morphologische Einteilung von Neuronen

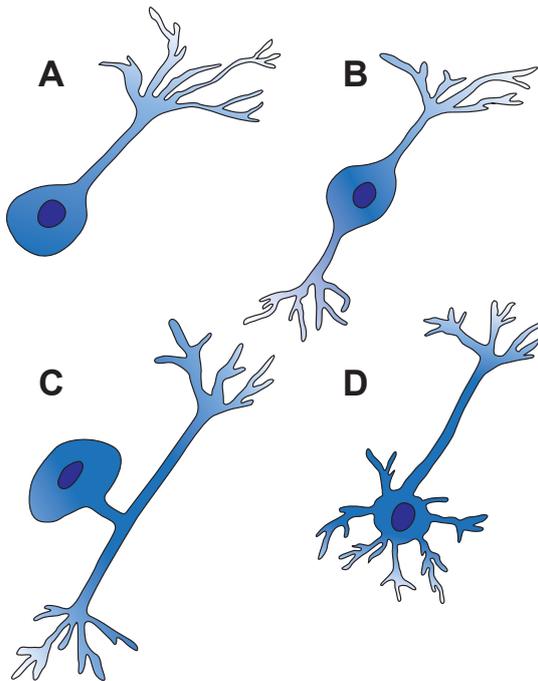


Abbildung 4: Schematische Gegenüberstellung morphologisch unterschiedlicher Arten von Neuronen

(modifiziert nach Pseudounipolar\_bipolar\_neurons.svg:Juoj8, nachbearbeitet von Jonathan Haas; veröffentlicht unter der Lizenz „Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported“; gezeichnet von © Christine Völker)

Die Abbildung zeigt die unterschiedliche Morphologie von Neuronen mit folgenden Arten:

- A:** unipolares Neuron mit Soma und nur einem Neurit in Form des Axons;
- B:** bipolares Neuron mit zwei entgegengesetzt wachsenden Neuriten und einem dazwischen gelegenen Soma;
- C:** pseudounipolares Neuron mit zwei verschmolzenen Neuriten und einem mittig ausgelagerten Soma;
- D:** multipolares Neuron mit mehr als zwei Neuriten und einem zwischen ihnen gelegenen Soma.

Neurone mit einem einzigen Neuriten werden als unipolar bezeichnet. Sie besitzen also keine Dendriten, sondern nur das Axon.

Pseudounipolare Neurone besitzen ebenfalls nur einen Fortsatz. Dieser hat sich durch Verschmelzen von ursprünglich zwei Fortsätzen in der Nähe des Perikaryons gebildet. Beide Fortsatzanteile sind myelinisiert.

Bei bipolaren Nervenzellen liegen ein Axon und ein vom gegenüberliegenden Zellpol abgehender Dendrit vor.

Sind an einem Neuron drei oder mehr Neuriten vorhanden, wird es als multipolar bezeichnet. Dies ist die häufigste Form von Neuronen im zentralen Nervensystem (Peters 2007). Die Dendriten multipolarer Neurone sind unterschiedlich stark verzweigt und werden unterteilt in Golgi-Typ-I- und Golgi-Typ-II-Neurone. Typ I weist ein bis zwei dicke Dendriten und ein langes Axon auf, wohingegen Typ II zahlreiche, verzweigte Dendriten und ein kurzes Axon besitzt (Jones 1999).

### 1.3.8 Funktionelle Einteilung von Neuronen

Die funktionelle Einteilung von Neuronen erfolgt nach der Richtung der Signalausbreitung bei der Weiterleitung von Erregungen im ZNS. Efferente (motorische) Neurone leiten eine Erregung vom ZNS in die Peripherie, wohingegen afferente (sensible) Neurone eine Signalausbreitung von der Peripherie aus an das ZNS gewährleisten. Zwischen efferenten und afferenten Neuronen sind die sogenannten Interneurone (Assoziationszellen) zwischengeschaltet.

### 1.3.9 Myelinisierung von Neuronen

Geren beschrieb 1954, dass im PNS Lamellen spiralig aus Schwann-Zell-Windungen organisiert sind (Betty Ben Geren 1954). Bestätigt wurde diese Annahme 1957 (Robertson 1957). Es wurde erklärt, dass im PNS kontinuierlich eine Lage Zytoplasma die spiraligen Windungen umgibt. Im ZNS hingegen bildet die Myelinscheide die äußerste Hülle bis auf einen Bereich, in dem das Zytoplasma eine Zunge bildet.

Diese spiraligen Myelinschichten werden im ZNS durch Oligodendrozyten, im peripheren Nervensystem (PNS) durch Schwann-Zellen gebildet. In ihrer Feinstruktur unterscheiden sich zwar Oligodendrozyten und Schwann-Zellen, aber ihre Funktion ist prinzipiell sehr ähnlich. Sie bilden lipidreiche Membranschichten, welche die Axone

## 1 - Einleitung

durch mehrfaches, spiralisches Umhüllen elektrisch isolieren. Die Myelin-Hüllen sind um die Axone des Gehirns gewickelt, wobei ein Oligodendrozyt gleichzeitig Abschnitte mehrerer Axone, Schwann-Zellen hingegen immer nur jeweils einen Abschnitt eines Axons umhüllen können. Diese als Myelinscheide bezeichnete Umhüllung liegt in regelmäßigen Abständen unterbrochen vor. An diesen Stellen, sogenannten Ranvier-Schnürringen, liegt die Axonmembran frei und ist nicht elektrisch isoliert. Hier sind zahlreiche Natriumionenkanäle vorhanden, mit deren Hilfe Aktionspotentiale an den Ranvier-Schnürringen generiert werden. Die Weiterleitung dieser Aktionspotentiale erfolgt saltatorisch (Huxley and Stämpfli 1949).

Myelinisierte Nervenfasern sind daher essentiell für eine schnelle Ausbreitung von Aktionspotentialen. Hierbei interagieren die Axone und die Schwann-Zellen bzw. die Oligodendrozyten. Durch die Myelinisierung ist eine schnellere und zuverlässigere Signalausbreitung möglich als bei nicht-myelinisierten Nervenfasern (Rushton 1951).

Nicht-myelinisierte Nervenfasern sind nur von einer einzigen, locker um das Axon angeordneten Schwann-Zelle umhüllt und besitzen keine Ranvier-Schnürringe. Dadurch können sie nur eine langsame Erregungsleitung aufbauen (Waxman and Bennett 1972).

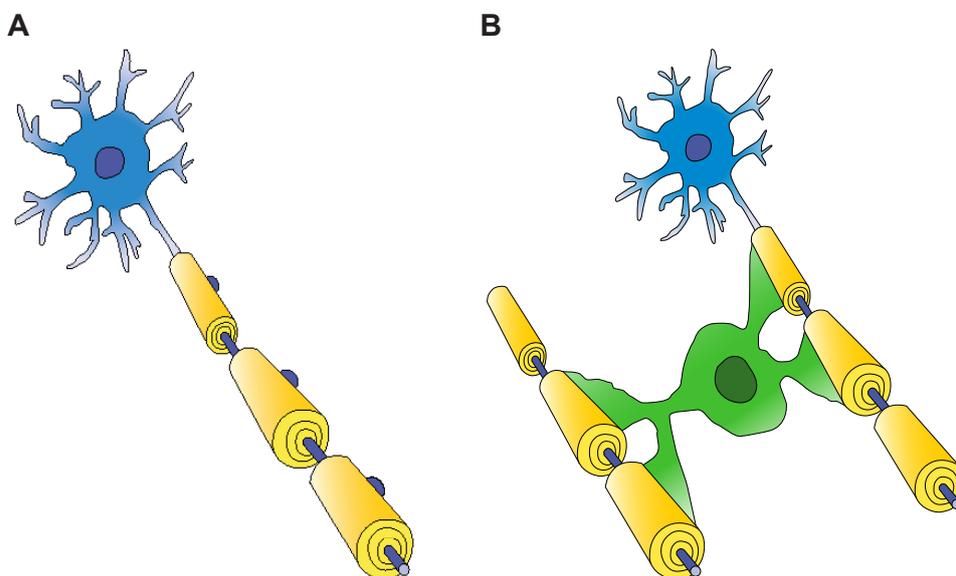


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines von einer Myelinscheide umhüllten Axons

(modifiziert nach <https://de.dreamstime.com/stockfoto-schwann-zellen-und-oligodendrocytes-image47565249>; gezeichnet von © Christine Völker)

Die Abbildung stellt schematisch den Aufbau einer Schwann-Zelle (**A**) gegenüber dem eines Oligodendrozyten (**B**) dar. In **Blau** ist der Bereich des Zellkörpers mit seinen Endigungen gezeigt, in **gelb** die Hüllen, die um das Axon gebildet werden und in **grün** der Bereich des Zellkerns eines Oligodendrozyten.

**A: Schwann-Zellen**, wie sie als Hüll- und Stützzellen von Neuronen im **PNS** vorkommen, umhüllen jeweils einzeln mit eigenständigem Zellkern das neuronale Axon, wodurch sie es elektrisch isolieren. Pro Axon können mehrere Schwann-Zellen gleichzeitig eine Hülle bilden.

**B:** Ein **Oligodendrozyt** hingegen, wie er im **ZNS** vorkommt, kann alleine mehrere Hüllen um ein Axon bilden und zudem gleichzeitig verschiedene Neurone umhüllen. Er enthält einen einzigen Zellkern.

### 1.3.10 Spannungsgesteuerte Ionenkanäle in Neuronen

Die molekularen Grundlagen von Ionenkanälen blieben bis zu den 1980er Jahren unerforscht. Anhand der Transportmechanismen durch Membranen wurden 1978 zwei Klassen definiert: Transporter und Poren, wobei Poren als eine Art Tunnel dargestellt wurden, die nur von entsprechend kleinen Molekülen passiert werden können (Hille 1978). Ionenkanäle stellen spezielle Membranproteine dar, welche in der Zellmembran selektive Poren zur Passage von Ionen von intra- nach extrazellulär oder umgekehrt durch die Lipiddoppelschicht bilden (Hille 1978). Ionenkanäle können weiter klassifiziert werden in spannungsgesteuerte und ligandengesteuerte Kanäle. Hiernach ist die Funktionsweise eines Ionenkanals entweder von der Membranspannung oder von einem chemischen Liganden, der sich an den Ionenkanal anlagert, abhängig (Hille 1978). Nowak zeigte 1984, dass Neurone Informationen über elektrische Signale übertragen, die durch spannungsgesteuerte Ionenkanäle erzeugt werden (Nowak et al. 1984).

Bis zu den 1980er Jahren basierte die Forschung an Ionenkanälen vorwiegend auf der Messung ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften, u. a. durch Experimente mit der sogenannten Patch-Clamp-Technik. Hierbei wurden vor allem die Charakteristika der Spannungsunterschiede ermittelt, die bei der Kanalöffnung zu messen waren (Neher and Sakmann 1976; Hille 1978).

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle enthalten in ihrer genetisch verankerten Aminosäuresequenz geladene Aminosäuren, die sich durch Änderungen des sie umgebenden elektrischen Feldes über die Zellmembran verschieben können. Dies führt zu einer Konformationsänderung des gesamten Membranproteins, was wiederum ein

## 1 - Einleitung

Öffnen oder Schließen der Pore erzeugt (Hille 1978; Tombola et al. 2006). Die Kanäle sind aus verschiedenen Untereinheiten (UE) zusammengesetzt: aus den porenbildenden  $\alpha$ -UE und den intrazellulär gelegenen  $\beta$ -UE (Catterall 1995). In der Regel sind bei spannungsgesteuerten Ionenkanälen vier  $\alpha$ -UE zu einer wassergefüllten Pore zusammengelagert, durch die Ionen geleitet werden können. Meist ist an diese noch eine regulatorische  $\beta$ -UE angelagert, welche die Inhibition, Exzitation und Sensitivität gegenüber Regulatorstoffen steuert (Hille 1978). Die zusammengelagerten  $\alpha$ -UE enthalten einen Spannungssensor, mit dessen Hilfe elektrische Signale detektiert und erzeugt werden können, um Erregungen weiterzuleiten sowie neue Aktionspotentiale hervorzurufen (Sansom 2000).

Die ersten Ansätze zum detaillierten Verständnis der Ionenkanäle auf molekularer Ebene lieferten Stühmer et al. durch Mutationsstudien an Kanalproteinen, die sie in Oozyten des Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) überexprimierten und gezielt vermessen konnten (Stühmer et al. 1989). Ab Mitte der 90er Jahre gab es durch die vermehrte Forschung an Proteinstrukturen rasche Fortschritte in der strukturellen Charakterisierung der Ionenkanäle. Es konnte gezeigt werden, dass die selektive Permeabilität der Zellmembran vor allem durch die darin enthaltenen Ionenkanalproteine in Kombination mit der aktiven  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase bestimmt wird (Lingrel et al. 1994).

### 1.3.11 Aktionspotentiale – Entstehung und Weiterleitung

Das Axon von Neuronen des ZNS enthält eine spezielle Region - den Axonhügel bzw. das Initialsegment des Axons. Im Bereich dieses Areals liegt keine Myelinisierung vor und die Dichte der Ionenkanäle ist hier besonders hoch. Seit den 50er Jahren wurde erforscht, welches Areal eines Neurons für die Generierung von APs verantwortlich ist, wobei sich der distale Abschnitt des Axonhügels bzw. das Anfangssegment des Axons als zuständiges Gebiet herausstellte (Fuortes 1957; Fatt 1957; Coombs et al. 1957; Eccles 1964).

Wie unter 1.3.1 bereits beschrieben, erhält ein postsynaptisches Neuron über seine Dendriten einen Input von Informationen über die Synapsen anderer Zellen, wobei das jeweils eingehende Signal exzitatorisch oder inhibitorisch sein kann (Hodgkin and Huxley 1952; Zilles and Tillmann 2010). Das Signal breitet sich von den Dendriten bis zum Soma hin aus, wo alle eingehenden Signale überlagert werden, aus denen sich

dann summatorisch ein Gesamtpotential ergibt (Hodgkin and Huxley 1952). Liegt das resultierende Potential über einem bestimmten Schwellenwert, so wird im Axonhügel ein AP erzeugt. Dabei ändert sich das Zellpotential rasch vom negativen Ruhepotential (ca. - 60 mV) zu einem positiven Potential von etwa + 20 mV. Das AP breitet sich über das Axon aus und kann so Signale an andere Zellen abgeben. Die Generierung und Weiterleitung von APs erfolgt durch selektive spannungsabhängige Ionenkanäle (Hodgkin and Huxley 1952; Huxley 1964). Die erste direkte Messung von Membranströmen wurde 1952 von Hodgkin und Huxley an Axonen von Tintenfischen durchgeführt und anschließend der Mechanismus beschrieben (Hodgkin and Huxley 1952; Huxley 1964). Dabei zeigte sich, dass durch eine Anhebung der Membranspannung eine Erhöhung der Leitfähigkeit der Zellmembran für Natrium-Ionen ( $\text{Na}^+$ ) bewirkt wird. Es kommt zum verstärkten  $\text{Na}^+$ -Einstrom nach intrazellulär und die Membranspannung steigt folglich noch weiter an. Liegt dieser Potentialanstieg über einem bestimmten Schwellenwert, so wird ein AP ausgelöst (Hodgkin and Huxley 1952). Hodgkin und Huxley zeigten, dass sich zudem auch die Membranleitfähigkeit für Kalium-Ionen ( $\text{K}^+$ ) erhöht und so gleichzeitig zum  $\text{Na}^+$ -Einstrom auch ein verstärkter  $\text{K}^+$ -Ausstrom nach extrazellulär stattfindet, der wiederum zur Repolarisation der Zellmembran führt. So kommt es zu einem charakteristischen Verlauf eines AP (Hodgkin and Huxley 1952; Hodgkin and Huxley 1990). Wird eine Zelle kontinuierlich stimuliert, führt dies zu schnell hintereinander gereihten APs, was als Burst bezeichnet wird. Die Oszillationsfrequenz verhält sich dabei proportional zur Stärke der Erregung (Hodgkin and Huxley 1952).

## 1 - Einleitung

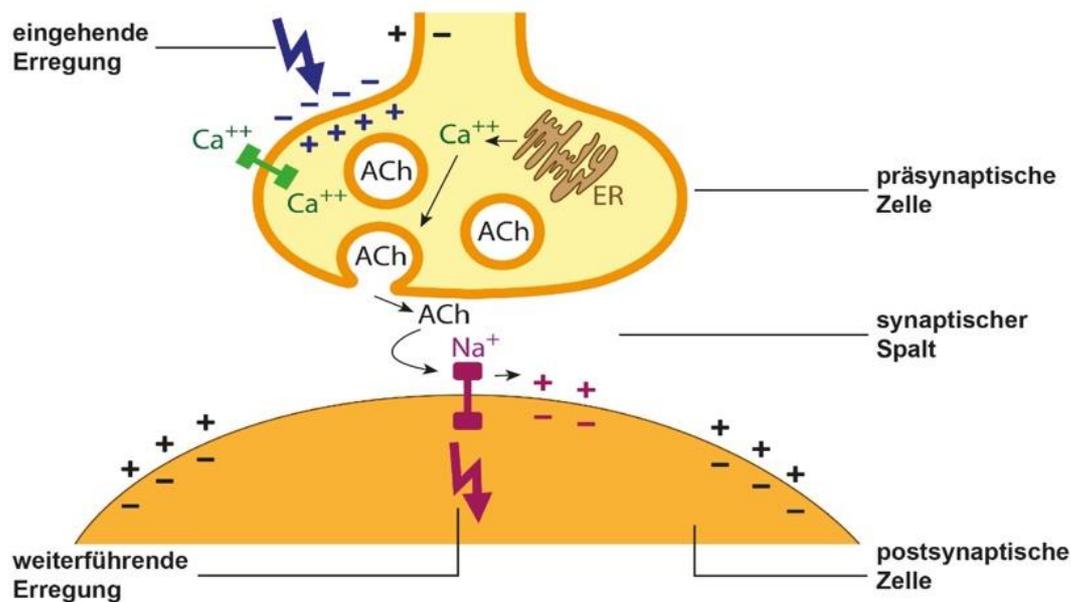


Abbildung 6: Schematische Aufzeichnung einer synaptischen Endigung mit der Generierung eines Aktionspotentials

(modifiziert nach Thieme, Endspurt Vorklinik, Physiologie Skript 3, S.9; Aufbau einer chemischen Synapse; <https://www.thieme.de/viamedici/vorklinik-faecher-physiologie-1509/a/aufbau-synapse-25350.htm>; gezeichnet von © Christine Völker).

ACh – Acetylcholin

$Ca^{++}$  – Calcium-Ion(en)

ER – Endoplasmatisches Retikulum

$Na^+$  – Natrium-Ion(en)

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau und die Funktionsweise einer chemischen Synapse mit präsynaptischer Zelle, synaptischem Spalt und postsynaptischer Zelle.

Dargestellt ist die **präsynaptische Zelle** mit Zellmembran, die im nicht erregten Zustand nach extrazellulär eine positive, nach intrazellulär eine negative Spannung aufweist. Trifft an der präsynaptischen Membran eine **Erregung** ein, kommt es zu einer Membranpotential-Umkehr. Infolgedessen öffnen sich spannungsgesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanäle, wodurch die Änderung des Membranpotentials weiter verstärkt wird.  $Ca^{2+}$ -Ionen strömen nun in die präsynaptische Zelle ein, v.a. aus dem intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher **endoplasmatisches Retikulum (ER)**. Dort docken sie an intrazelluläre Vesikel, die Neurotransmitter (hier ACh – Acetylcholin) enthalten. Folglich verschmelzen die Vesikel mit der präsynaptischen Membran und die Neurotransmitter werden in den **synaptischen Spalt** entlassen. Sie können nun an ligandengesteuerte  $Na^+$ -Rezeptoren in der postsynaptischen Membran binden, wodurch die Membran durchlässig für  $Na^+$ -Ionen wird.  $Na^+$ -Ionen strömen in die **postsynaptische Zelle** ein und das Membranpotential der postsynaptischen Zelle verändert sich. Die ursprünglich elektrische Erregung wird also an der synaptischen Endigung in ein

chemisches Signal umgewandelt, das in der postsynaptischen Zelle schließlich wieder als elektrische Erregung weitergeleitet wird.

### 1.3.12 Signalverarbeitung intra- und interzellulär

Sowohl  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ - als auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind über spezifische, selektive Kanäle an der Generierung von APs beteiligt (Eccles 1964). Entsprechend ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften führen Ionenkanäle zum Ein- oder Ausstrom bestimmter Ionen, sodass Veränderungen des Membranpotentials hervorgerufen werden, wodurch es zu einer Depolarisation oder Hyperpolarisation kommt (Hodgkin and Huxley 1952). Im Folgenden seien die wichtigsten Ionenkanäle in diesem Zusammenhang dargestellt:

$\text{Na}^+$ -Kanäle erzeugen durch Öffnung einen  $\text{Na}^+$ -Einstrom, wodurch es zu einer Depolarisation der Zelle kommt. Sie liefern den größten Anteil des nach intrazellulär gerichteten Ionenflusses, der für die schnelle Depolarisierungsphase während eines AP verantwortlich ist. Es zeigte sich, dass in dem Zellareal, in dem ein AP erzeugt werden kann, eine stark erhöhte Dichte an  $\text{Na}^+$ -Kanälen vorhanden ist. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei diesem Areal um den Axonhügel (Hodgkin and Huxley 1952). Schon durch geringe Konzentrationen des Nervengifts Tetrodotoxin (TTX) kann der  $\text{Na}^+$ -Strom des gesamten Neurons zum Erliegen kommen und folglich kein AP mehr ausgelöst werden (Yang et al. 1991).

$\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle tragen durch Ionen-Einstrom zur Erregbarkeit der Zelle bei. Es werden anhand unterschiedlicher Durchlässigkeiten und Aktivierungs-Schwellenwerte verschiedene Typen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen unterschieden (Callewaert et al. 1996; Kole and Stuart 2012).

$\text{K}^+$ -Kanäle erzeugen einen Auswärtsstrom und gehören zu den Hauptregulatoren der Erregbarkeit von Neuronen. Sie sind an der Einstellung eines Schwellenwertes in Bezug auf das Auslösen eines AP beteiligt und tragen zur Repolarisation nach einem erzeugten AP und zur Aufrechterhaltung des Ruhepotentials eines Neurons bei (Elfvig 1961).

Insgesamt zeigt sich eine große Vielfalt in der Expression von Ionenkanälen am Ort der AP-Entstehung. Durch eine elektrische Isolation des Somas und der Dendriten kann die Verarbeitung elektrischer Inputs am Entstehungsort eines AP unabhängig von diesen Zellbereichen erfolgen (Palay et al. 1968). Die jeweils neuronenspezifische Vielfalt der an diesem Entstehungsort vorhandenen Ionenkanäle ermöglicht unterschiedlichen Neuronen die Verarbeitung synaptischer Inputs auf verschiedene Weise, wodurch

## 1 - Einleitung

folglich unterschiedliche Ausgangssignale weitergeleitet werden können (Palay et al. 1968).

Es konnte gezeigt werden, dass die Ionenkanäle im AP-bildenden Areal zusätzlich auch durch Neurotransmitter moduliert werden können, die an der Konvertierung hochfrequenter Bursts in tonische Oszillationen beteiligt sind (Bender et al. 2010; Bender et al. 2012).

### 1.3.13 Neuronale Spontanaktivität

Neurone weisen eine elektrische Erregbarkeit, sogenannte Spontanaktivität auf. Sie kann durch Umwelteinflüsse herauf- oder herabreguliert werden. Diese Spontanaktivität spielt insbesondere im visuellen, auditorischen und motorischen System eine große Rolle in der Entwicklung (Kirkby et al. 2013). Abhängig von ihrer Amplitude und Frequenz beeinflusst sie die Formation neuronaler Verschaltung, die embryonale Neurogenese und corticale neuronale Prozesse (Thivierge 2009). Auch die interzelluläre Strukturierung neuronaler Netzwerke wird durch spontane Zellaktivität gesteuert (Ben-Ari and Spitzer 2010). Im Verlauf der Entwicklung treten bestimmte, wiederkehrende Muster spontaner Aktivität auf, die über große neuronale Netzwerke verbreitet oder lokal synchron auftreten können (Kilb et al. 2011; Kirkby et al. 2013). Neuronale Spontanaktivität beeinflusst so zahlreiche Entwicklungsmechanismen wie die Neurogenese, die Apoptose, neuronale Migration, Differenzierung und Netzwerkformation (Weissman et al. 2004; Kilb et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität in der frühen Entwicklung vorwiegend von Gap Junctions und spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen abhängig ist, während in der späten Entwicklung Neurotransmitter und Synapsen starken Einfluss zeigen (Bando et al. 2015). Spontane neuronale Aktivität ist an intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale gebunden, welche die Zellmaturation durch Steuerung des Wachstums und der Verzweigung von Neuriten und Axonen beeinflussen (Yamamoto and Bendito 2012). Es konnte gezeigt werden, dass so die Maturation neuronaler Stammzellen zu ausgereiften Neuronen maßgeblich durch die Zellaktivität und die damit verbundenen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale vorangetrieben wird (Deisseroth et al. 2004).

## 1.4 Das Lebendzellanalyseverfahren des Calcium-Imaging an neuronalen Zellen

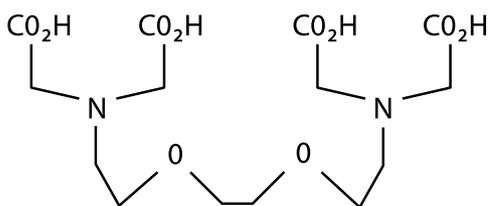
### 1.4.1 Entwicklung der Calcium-Imaging-Technik

Zu den ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren, die in den 60er Jahren erstmals zur Darstellung dynamischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale genutzt wurden, zählten  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Fotoproteine wie Aequorin (Shimomura et al. 1962; Ashley and Ridgway 1968). Wenig später wurde zudem der synthetische  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Arsenazo III entwickelt, der sein Absorptionsspektrum als eine Funktion des gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$  verändert (Brown et al. 1975). Aequorin und Arsenazo III ermöglichten einen wichtigen Einblick in die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Regulation neuronaler Prozesse (Hallett and Carbone 1972; Stinnakre and Tauc 1973; Llinás and Nicholson 1975). Die Anwendung dieser beiden  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren war jedoch noch schwierig, vor allem durch das problematische Einschleusen des Indikators in die Zelle. 1980 wurden vor diesem Hintergrund bahnbrechend neue, sensitivere und vielfältigere  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren entwickelt (Tsien 1980). Diese waren das Ergebnis einer Hybridisierung hoch  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiver Chelatoren wie EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure) oder BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure) mit einem fluoreszierenden Chromophor. Zur ersten Generation fluoreszierender  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren zählte u. a. Fura-2 (Grynkiewicz et al. 1985). In Abbildung 7 sind die unterschiedlichen Strukturformeln der hier beschriebenen Fluorophore dargestellt. Fura-2 zeigte sich als besonders effektiv, da es quantitative Messungen durch Einbezug des Signalverhältnisses über alternierende Exzitationswellenlängen erlaubte (Grynkiewicz et al. 1985). In den folgenden Jahren wurden zahlreiche  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren entwickelt, die unterschiedliche Exzitationsspektren und Affinitäten für  $\text{Ca}^{2+}$  aufwiesen. Hierzu zählten u. a. Oregon Green BAPTA-1 und Fluo-4 als neue Fluorophor-Familien (Paredes et al. 2008). Sie erwiesen sich als besonders effektiv durch ihre einfache Anwendung sowie Einschleusung in die Zellen und durch die Erzeugung eines starken Signal-Rausch-Verhältnisses (Grienberger and Konnerth 2012). Ein weiterer großer Durchbruch wurde erneut von der Arbeitsgruppe um Tsien et al. 1997 erreicht: Sie führten Protein-basierte, genetisch codierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren (GECI) ein (Miyawaki et al. 1997). Diese erfuhren in den folgenden Jahren enorme Fortschritte (Rochefort et al. 2008; Looger and Griesbeck 2012).

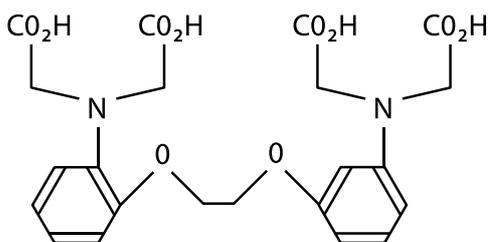
## 1 - Einleitung

Neben der Entwicklung der fluoreszierenden Indikatoren ergaben sich auch Neuerungen in der Messtechnik. Es kam zur Anwendung der Live-Darstellung per Video-Aufnahmen über CCD Kameras (Connor 1986; Smith and Augustine 1988; Lasser-Ross et al. 1991; Swandulla et al. 1991) und der konfokalen Mikroskopie für das Calcium-Imaging (Eilers et al. 1995). Die Effektivität der Fluoreszenz-Indikatoren zusammen mit den neu entwickelten Techniken erlaubte Echtzeit-Fluoreszenz-Beobachtungen biologischer Prozesse bis in Einzelzellen (Grienberger and Konnerth 2012). Große Fortschritte brachte in den 90er Jahren die Zwei-Photonen-Mikroskopie (Denk et al. 1990) und ihre Verwendung für das Calcium-Imaging im neuronalen System (Yuste and Denk 1995). Die Zwei-Photonen-Imaging-Technik revolutionierte das Calcium-Imaging und wird heute weltweit erfolgreich eingesetzt (Helmchen and Denk 2005; Svoboda and Yasuda 2006).

### EGTA



### BAPTA



### FURA-2

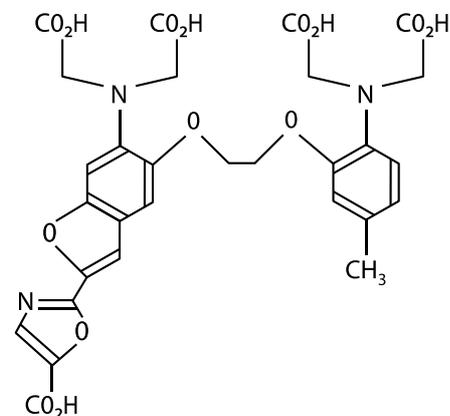


Abbildung 7: Chemische Strukturformeln der Fluorophore **EGTA**, **BAPTA** und **Fura-2**.

BAPTA – 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure

CO<sub>2</sub>H – Carboxylgruppe

EGTA – Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure

FURA-2 – Fura-2-acetoxymethylester

N – Stickstoff

O – Sauerstoff

Die Abbildung zeigt die chemischen Strukturformeln der Fluorophore EGTA, BAPTA und Fura-2; gezeichnet von © Christine Völker. Dargestellt sind die unpolaren Formen der Indikatoren EGTA, BAPTA und Fura-2. Durch Freisetzung des Wasserstoff-Ions ( $H^+$ ) können sich negativ geladene Carboxylgruppen bilden und dort  $Ca^{2+}$ -Ionen anlagern, sodass ein Chelator-Komplex entsteht.

### 1.4.2 $Ca^{2+}$ -Indikatoren

$Ca^{2+}$ -Indikatoren zeigen Veränderungen der Konzentration von zytosolisch freiem  $Ca^{2+}$  auf. Freies  $Ca^{2+}$  steht im Gleichgewicht mit den  $Ca^{2+}$ -Ionen, die an körpereigene  $Ca^{2+}$ -Puffer wie Parvalbumin gebunden sind (Baimbridge 1992). In Calcium-Imaging-Experimenten dienen die  $Ca^{2+}$ -Indikatoren als exogene  $Ca^{2+}$ -Puffer und erhöhen so die Gesamtzahl zellulärer  $Ca^{2+}$ -Puffer-Moleküle (Helmchen et al. 1996). Das Ziel eines Experiments bestimmt daher, ob eine geringe oder hohe Indikator-Konzentration verwendet werden sollte. Ist die Konzentration entsprechend hoch, liegen vorwiegend exogene  $Ca^{2+}$ -Puffer-Moleküle vor und ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom kann sofort detektiert werden. Bei geringer Konzentration exogener  $Ca^{2+}$ -Puffer-Moleküle ist es möglich, eine generelle Veränderung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu erkennen (Neher and Augustine 1992). Diese Analyse-Methode wurde als „Single-compartment model“ (Ein-Kammer-Modell) beschrieben. Dabei werden endogene,  $Ca^{2+}$ -bindende Proteine und exogene  $Ca^{2+}$ -Puffer in Form des Indikators einbezogen (Regehr and Tank 1994; Helmchen et al. 1996; Helmchen et al. 1997). Hiermit kann die Ruhe-  $Ca^{2+}$ -Dynamik analysiert werden, beispielsweise um die  $Ca^{2+}$ -Dynamik in Dendriten zu beschreiben (Regehr and Tank 1994). Das Modell beruht auf vier grundlegenden Annahmen: 1. Es findet ein unmittelbarer  $Ca^{2+}$ -Einstrom statt. 2. Der  $Ca^{2+}$ -Ausstrom folgt einem linearen Mechanismus und ist nicht sättigbar. 3. Der Anteil gebundener  $Ca^{2+}$ -Ionen ist konstant. 4.  $Ca^{2+}$ -Ionen liegen in einem chemischen und Diffusions-Gleichgewicht vor (Helmchen et al. 1997).

Die verschiedenen  $Ca^{2+}$ -Indikatoren unterscheiden sich in ihrer Affinität zu  $Ca^{2+}$ -Ionen (Mank and Griesbeck 2008; Paredes et al. 2008). Diese wird in der sogenannten Dissoziationskonstante  $K_d$  dargestellt, welche die Wahrscheinlichkeit beschreibt, mit der sich ein Komplex aus Indikator und  $Ca^{2+}$ -Ion wieder voneinander trennt. Diese Konstante entspricht der  $Ca^{2+}$ -Konzentration, bei der die Hälfte aller Indikator-Moleküle an  $Ca^{2+}$  gebunden vorliegt. Es gibt daher niedrig-affine (z. B. Fluo-5N) und hoch-affine  $Ca^{2+}$ -Indikatoren (z. B. Oregon Green BAPTA-1). Der  $K_d$ -Wert ist abhängig von vielen Parametern wie pH-Wert, Temperatur und Vorliegen von Magnesium-Ionen (Oliver et al.

## 1 - Einleitung

2000). Folglich gibt es auch Unterschiede zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-Bedingungen. Es ist also wichtig, für ein entsprechendes Experiment den geeigneten Indikator in der passenden Konzentration anzuwenden, um die Ergebnisse richtig interpretieren zu können. Beispielsweise zeigt ein niedrig-affiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator durch seine Fluoreszenz-Signale schneller eine Veränderung in der Konzentration zytosolisch freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf (Helmchen et al. 1997). Die Auswahl des entsprechenden Indikators sollte sich also nach dem wissenschaftlichen Ziel und den verwendeten Zellen richten.  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren niedriger Affinität werden durch die benötigte Sensitivität begrenzt, was sich insbesondere unter *in-vivo*-Bedingungen oder in sehr kleinen Strukturen wie den dendritischen Spines bemerkbar macht. In solchen Fällen bleiben hoch-affine  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren die Indikatoren der Wahl (Grienberger and Konnerth 2012).

Abbildung 7 zeigt u.a. die Struktur von Fura-2 als repräsentatives Beispiel für fluoreszierende chemische Indikatoren (Grynkiewicz et al. 1985). Fura-2 stellt eine Kombination aus  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator und -Fluorophor dar. Angeregt wird der Indikator durch ultraviolettes Licht mit Wellenlängen von 340 nm sowie 380 nm und sein Emissionspeak liegt zwischen einer Wellenlänge von 505-520 nm (Tsien 1989). Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kommt es zu intramolekularen Konformationsänderungen der Indikatormoleküle, was zur Veränderung der emittierenden Fluoreszenz führt. Fura-2 bietet durch das Charakteristikum der Zwei-Photonen-Absorption den Vorteil, dass es mit zwei verschiedenen Absorptions-Wellenlängen genutzt werden kann. So kann eine quantitative Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb eines bestimmten Neurons erfolgen - unabhängig von der (unbekannten) intrazellulären Indikator-Konzentration. Die Emissionsrate bei 510 nm verhält sich direkt proportional zur intrazellulären Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und es kommt durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung zu einer Verschiebung der Anregungs- und Fluoreszenzwellenlänge. So kann - unabhängig von der absoluten Fluoreszenzintensität - durch die Differenz der Fluoreszenzintensitäten nach Anregung mit 340 nm und mit 380 nm die freie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestimmt werden (Tsien 1989). Im Gegensatz zu Fura-2 nimmt bei anderen Indikatoren wie Oregon Green BAPTA-1 und Fluo-4 die Fluoreszenz mit dem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg einfach zu (Grienberger and Konnerth 2012). Einen großen Vorteil bieten die chemischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren damit, dass sie auch in membranpermeablen Formen existieren (Helmchen and Waters 2002). Zudem sind diese Indikatoren mit verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinitäten und Farbspektren erhältlich, sodass sie parallel verwendet werden können (Grienberger and Konnerth 2012).

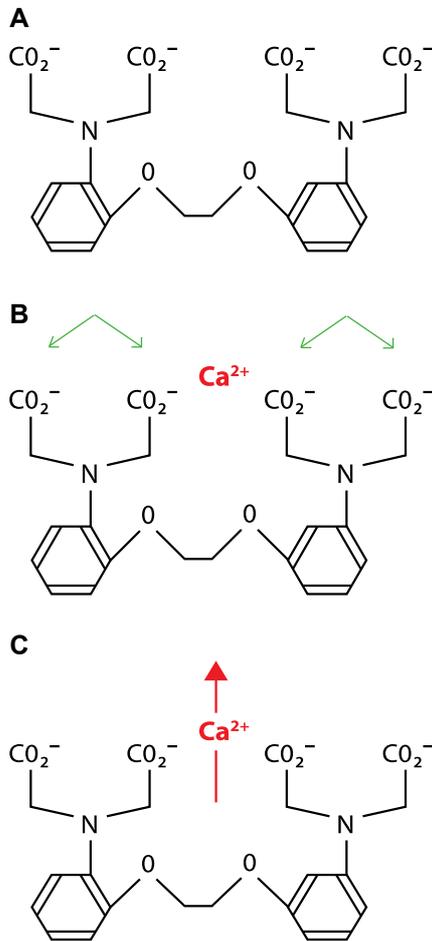


Abbildung 8: Darstellung des Binde- und Lösevorgangs von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei dem Fluorophor Oregon-Green-BAPTA-1 (OG).

BAPTA – 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure

$\text{Ca}^{2+}$  – Calcium-Ion(en)

$\text{CO}_2^-$  – Carboxylat-Anion

N – Stickstoff

O – Sauerstoff

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des Fluorophors Oregon-Green-BATPA-1 im Verlauf des Bindens und Lösens von Calcium-Ionen; gezeichnet von © Christine Völker.

**A:** OG mit negativ geladenen Carboxylgruppen ( $\text{CO}_2^-$ ); ungebundener Zustand.

**B:** Die negativ geladenen Carboxylgruppen lagern  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) an (im Bereich der grünen Pfeile), sodass ein Chelator-Komplex entsteht.

**C:** Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können aus dem Chelator wieder entbunden werden (roter Pfeil); das OG liegt anschließend wieder im negativ geladenen Ausgangszustand vor und kann erneut einen Komplex mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eingehen.

### 1.5 Zielsetzung

Wie in vergangenen Studien gezeigt werden konnte, sind im auditorischen System in unterschiedlichen Arealen neuronale Stammzellen vorhanden. Das Stammzellpotential des N.C., einer zentralen Schaltstelle der Hörbahn, konnte bereits am Tiermodell der Ratte (Rak et al. 2011) und der Maus (Volkenstein et al. 2013) nachgewiesen werden. Ebenso wurde eine exogene Stimulationsmöglichkeit sowie Beeinflussbarkeit neuronaler Stammzellen des N.C. gezeigt, beispielsweise durch Wachstumsfaktoren wie EGF und FGF-2 (Rak et al. 2014).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Prozesse der Zelldifferenzierung von neuronalen Stammzellen des N.C. am Tiermodell der Ratte *in-vitro* weiter zu evaluieren. Hierzu wurden die Entwicklung und das Verhalten der Zellen in neuronalen Netzwerken, deren intra- und interzelluläre Verarbeitung von Reizen sowie die Reaktion auf exogene Faktoren analysiert. Es sollte eine Charakterisierung der Zellentwicklung der NSC des N. C. vom Beginn der Zellreifung bis zum Höhepunkt der Zelldifferenzierung erfolgen; dieser Zeitraum wurde im Folgenden als (Zell-)Differenzierung bezeichnet. Demgegenüber sollte entsprechend die Entwicklung der Primärneuronen untersucht und dargestellt werden, was ebenfalls unter den Begriff der (Zell-)Differenzierung gefasst wurde. In den Grafiken und Bildern wurde der Zeitraum dieser Differenzierungszeit mit „DIF – Tag(e) der Differenzierung“ beschrieben.

Die Untersuchungen sollten zunächst an primären neuronalen Zellen etabliert und durchgeführt werden. Hierzu sollte die Grundaktivität der Zellen im Calcium-Live-Cell-Imaging vermessen und eine mögliche Interaktion der Zellen im neuronalen Netzwerk untersucht werden. Daraufaufgehend sollten die Untersuchungen auch mit neuronalen Stammzellen durchgeführt und verglichen werden.

Diese Erkenntnisse sollen das Verständnis der Funktion und Entwicklung des auditorischen Systems erweitern und Wege für neue Therapiemöglichkeiten bezüglich einer potentiellen Regenerationsfähigkeit des N.C. bahnen.

## 2 Materialien

### 2.1 Calcium-Imaging-Setup

Tabelle 1: Auflistung der technischen Bestandteile des Calcium-Imaging-Setups.

Zusammengefasst sind alle wichtigen technischen Geräte, aus denen das für die Calcium-Imaging-Messungen eingesetzte Setup besteht.

v – Version

W – Watt

x – x-fache Vergrößerung

Bezeichnung	Artikel(nummer)	Bezugsquelle
<b>Inverses Fluoreszenzmikroskop (Durchlicht + Auflicht)</b>	Axiovert S100 TV	Zeiss
<b>Öl-Immersionsobjektiv 40x</b>	----	Zeiss
<b>Lichtquelle</b>	Polychrome II	Till Photonics
<b>Mini-Laborpumpe</b>	Laboport	Roth
<b>Perfusionskammer (temperaturgeregelt)</b>	RC-22C	Warner Instruments
<b>Mikroskopleuchte (mit Reflektor)</b>	Hal	Zeiss
<b>Schlauchpumpe (mikroprozessorgesteuert)</b>	Reglo Digital	Ismatec
<b>Filter Set (Bandpass)</b>	F46-002	AHF Analysentechnik
<b>TILLvISION v3.3</b>	Software	Till Photonics
<b>Temperature Controller</b>	ATC30	aiks
<b>Temperature Controller</b>	----	Olympus
<b>Heizmatte</b>	15W	AccuLux

### 2.2 Sonstige technische Geräte

Tabelle 2: Auflistung sonstiger technischer Geräte.

Dargestellt ist eine Übersicht über die technischen Geräte, die für die unterschiedliche Messungen und Experimente eingesetzt wurden.

W – Watt

Bezeichnung	Artikel(nummer)	Bezugsquelle
<b>Absaugpumpe</b>	AP86	KNF
<b>Automatikpipette</b>	Multipette plus	Eppendorf
<b>Einkanal-Pipetten</b>	Pipette Research	Eppendorf

## 2 - Materialien

<b>Fluoreszenz Lichtquelle</b>	EL6000	Leica
<b>Inverses Fluoreszenzmikroskop</b>	DMI 4000B	Leica
<b>Inverses Durchlichtmikroskop</b>	CK2	Olympus
<b>Neubauer Zählkammer improved</b>	ZK06	Hartenstein
<b>Operationsmikroskop</b>	OPMI 1	Zeiss
<b>Pipettierhelfer</b>	accu-jet pro	Brand
<b>Reagenzglasschüttler</b>	Lab Dancer Vario	IKA Yellowline
<b>Thermomixer</b>	Thermomixer comfort	Eppendorf
<b>Vertical Laminar Flow Cabinet</b>	Biogard Hood B4000-2	The Baker Company, Inc.
<b>Wasserbad, 1000W</b>	3042	Köttermann Labortechnik
<b>Zentrifuge</b>	Centrifuge 5810	Eppendorf
<b>Zentrifuge</b>	Mikroliter Zentrifuge 1029 GKO Q	Hettich

### 2.3 Labormaterialien

Tabelle 3: Auflistung der Labormaterialien.

Dargestellt ist eine Übersicht über Kleinlabormaterialien, die für die unterschiedlichen Versuche eingesetzt wurden.

cm – Zentimeter

ml – Milliliter

µl – Mikroliter

mm – Millimeter

No. – Numero (Nummer)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikel(nummer)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Combitips plus 2,5 ml Multipipetten</b>	0030 069.242 Combitips Plus 5 ml	Eppendorf Eppendorf
<b>Multiwellplatte 12 well</b>	BD Falcon 12-well Multiwell Plate, 353043	BD Falcon
<b>Multiwellplatte 6 well</b>	BD Falcon 12-well Multiwell Plate, 351146	BD Falcon
<b>Petrischalen 35 mm</b>	CELLSTAR cell culture dishes, 627160	Greiner bio-one
<b>Petrischalen 35 mm (4-wells)</b>	CELLSTAR cell culture dishes, P7112	Greiner bio-one
<b>Petrischalen 35 mm, Live Cell Imaging</b>	µ-Dish 35mm, high	ibidi
<b>Petrischalen 35 mm, Live Cell Imaging</b>	µ-Dish 35mm, high Grid-500	ibidi
<b>Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 10 µl</b>	Pipette tip neutral	Sarstedt

<b>Serological Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml</b>	CELLSTAR serological pipette	Greiner bio-one
<b>Standard Reaktionsgefäß</b>	Micro tube 1,5 ml	Sarstedt
<b>Zellkulturflaschen</b>	Filter-Top Zellkultur-Flasche, 50 ml, 25 cm <sup>2</sup>	CELLSTAR
<b>Glasdeckgläschen 10 mm</b>	No. 1	Fisher Scientific
<b>Glasdeckgläschen 22 mm</b>	503870	H. Saur

## 2.4 Präparationsinstrumentarium

Tabelle 4: Übersicht über das Präparationsinstrumentarium.

Aufgelistet ist das für die Tierpräparationen eingesetzte Instrumentarium.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikel(nummer)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Mikrochirurgische Pinzette</b>	T5036	Dumont
<b>Mikrochirurgische Federschere</b>	SN03	Hartenstein
<b>Mikroskopierschere gebogen</b>	SN02	Hartenstein
<b>Chirurgische Schere (Cooper)</b>	537-171029 (gebogen)	Aesculap

## 2.5 Chemikalien

### 2.5.1 Chemikalien für die Zellkultur

Tabelle 5: Auflistung der Chemikalien für die Zellkultur.

Die Übersicht zeigt die Chemikalien, die für das Anlegen der Zellkulturen eingesetzt wurden.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikel(nummer)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>B27 Supplement without vitamin A</b>	12587-010	Invitrogen
<b>GlutaMAX I Supplement</b>	35050-061	Invitrogen
<b>Neurobasal Medium</b>	21103	Invitrogen
<b>Penicillin-Streptomycin, liquid</b>	15140	GIBCO

## 2 - Materialien

### 2.5.2 Chemikalien für die Immunzytologie

Tabelle 6: Auflistung der Chemikalien für die Immunzytologie.

Die Übersicht zeigt die Chemikalien, die für immunzytologische Analysen eingesetzt wurden.

BSA – bovines Serum-Albumin

Ca – Calcium

DPBS – Dulbecco's phosphate-buffered saline (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)

Mg – Magnesium

PBS – Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

PFA – Paraformaldehyd

Bezeichnung	Artikel(nummer)	Bezugsquelle
<b>all trans-RETINOIC ACID</b>	R 2625	Sigma Aldrich
<b>Bovines Serum Albumin (BSA)</b>	A9418	Sigma
<b>Ethanol absolut</b>	8098	J.T. Baker
<b>Laminin, mouse</b>	354232	BD Biosciences
<b>Mowiol 40-88</b>	324590	Sigma Aldrich
<b>Paraformaldehyd (PFA) reinst</b>	1040051000	MERCK
<b>Phosphate-Buffered Saline (PBS)</b>	DPBS with Ca & Mg, H15-001	PAA Laboratories

### 2.5.3 Chemikalien für das Calcium-Imaging

Tabelle 7: Auflistung der Chemikalien für das Calcium-Imaging.

Aufgelistet sind die Chemikalien, die für Calcium-Imaging-Messungen eingesetzt wurden.

Ca – Calcium

CaCl<sub>2</sub> – Calciumchlorid

Mg – Magnesium

MgCl<sub>2</sub> – Magnesiumchlorid

SNX - ω-Theraphotoxin-Hg1a

Bezeichnung	Artikel(nummer)	Bezugsquelle
<b>Aqua ad iniectabilia</b>	PZN 35211	Berlin-Chemie
<b>Dimethylsulfoxid</b>	67-68-5	Roth
<b>HBSS (+ CaCl<sub>2</sub>, + MgCl<sub>2</sub>)</b>	14025050	Gibco
<b>HBSS (ohne Ca, Mg; mit Phenolrot)</b>	14180046	PAA
<b>Pluronic F-127</b>	CAS 9003-11-6	Sigma Aldrich
<b>Kurtoxin</b>	MBS405695-1	Biotrend
<b>ω-Conotoxin MVIIC</b>	BP0080	Biotrend
<b>SNX 482</b>	BP0376	Biotrend

<b>Nifedipin</b>	BG0268	Biotrend
<b>Elbesil BM Silikonfett</b>	400100	ELBE

## 2.6 Fluorophore

Tabelle 8: Auflistung der Fluorophore.

Aufgelistet sind die als Calcium-Indikatoren eingesetzten bzw. beschriebenen calciumsensitiven Fluorophore.

AM – Acetoxymethyl

BAPTA – 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure

Ca<sup>2+</sup> – Calcium-Ionen

<b>Fluorophor</b>	<b>Indikatortyp</b>	<b>Artikel (Nr.)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Fura-2-AM</b>	Ca <sup>2+</sup> -Indikator	F1221	Invitrogen
<b>Fluo-4-FF</b>	Ca <sup>2+</sup> -Indikator	F23981	Invitrogen
<b>Oregon Green 488 BAPTA-1, AM</b>	Ca <sup>2+</sup> -Indikator	O6807	molecular probes

## 2.7 Wachstumsfaktoren

Tabelle 9: Liste eingesetzter Wachstumsfaktoren.

Aufgelistet sind die in den Experimenten eingesetzten Wachstumsfaktoren.

EGF – Epidermal growth factor

FGF-2/FGFb – Fibroblast growth factor

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikel (Nr.)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Recombinant Murine Epidermal Growth Factor (EGF)</b>	315-09	PeptoTech
<b>Recombinant Murine Fibroblast Growth Factor basic (FGF-2/FGFb)</b>	450-33	PeptoTech

## 2.8 Enzyme

Tabelle 10: Liste verwendeter Enzyme.

Auflistung der in den Experimenten eingesetzten Enzyme.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikel(nummer)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
--------------------	------------------------	---------------------

## 2 - Materialien

<b>Accutase</b>	L11-007	PAA Laboratories
-----------------	---------	------------------

### 2.9 Antikörper

#### 2.9.1 Erstantikörper

Tabelle 11: Liste verwendeter Erst-Antikörper.

Auflistung der in den Experimenten eingesetzten Erst-Antikörper.

DAPI – 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid

GFAP – Glial fibrillary acidic protein

MBP – Myelin basic protein

NeuN – Neuronal Nuclei

<b>Antigen</b>	<b>Konz.</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Host</b>	<b>Artikel (Nr.)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Anti-Calcium Channel (<math>\alpha_1</math> Subunit), Pan</b>	1:400	polyklonal	rabbit	C1103	Sigma Aldrich
<b>DAPI</b>	1:1000	----	----	D9542	Sigma Aldrich
<b>GFAP</b>	1:100	monoklonal	mouse	MAB360	Millipore
<b>MATH-1,</b>	1:500	polyklonal	rabbit	sc-98520	Santa Cruz
<b>Atoh-1</b>					
<b>M156</b>					
<b>Myelin Basic Protein (MBP)</b>	1:100	polyklonal	rabbit	M38221	Sigma Aldrich
<b>Nestin</b>	1:500	monoklonal	mouse	MAB353	Millipore
<b>NeuN</b>	1:500	monoklonal	mouse	MAB377	Millipore
<b>SOX2</b>	1:500	polyklonal	rabbit	ab97959	Abcam
<b>Tubulin beta</b>	1:50	polyklonal	rabbit	sc-9104	Santa Cruz
<b>Tubulin beta</b>	1:500	monoklonal	mouse	T 5168	Sigma Aldrich
<b>Tubulin beta III (TU-20)</b>	1:500	monoklonal	mouse	ab7751	Abcam
<b>Tubulin beta III</b>	1:500	polyklonal	rabbit	ab18207	Abcam
<b>Tubulin beta III (TUJ1)</b>	1:500	monoklonal	mouse	MMS-435P	Covance

## 2.9.2 Zweitantikörper

Tabelle 12: Liste eingesetzter Zweit-Antikörper.

Auflistung der in den Experimenten eingesetzten Zweitantikörper.

IgG – Immunglobulin G

Antigen	Konz.	Klonalität	Host	Artikel (Nr.)	Bezugsquelle
<b>Alexa Fluor 488 IgG</b>	1:500	anti-mouse	goat	A-11001	Invitrogen
<b>Alexa Fluor 488 IgG</b>	1:500	anti-rabbit	goat	A-11008	Invitrogen
<b>Alexa Fluor 555 IgG</b>	1:500	anti-mouse	goat	A-21422	Invitrogen
<b>Alexa Fluor 555 IgG</b>	1:500	anti-rabbit	goat	A-21428	Invitrogen

## 2.10 Selbsthergestellte Lösungen, Puffer und Medien

### 2.10.1 Produkte für die Kulturen neuronaler Stammzellen

Tabelle 13: Liste selbsthergestellter Medien für die Kulturen neuronaler Stammzellen.

Auflistung der Zusammensetzung der für die Stammzellkulturen selbsthergestellten Medien.

DIF-Medium – Differenzierungsmedium

EGF – Epidermal growth factor

FGF-2 – Fibroblast growth factor

NSC-Medium – Stammzellmedium für neuronale Stammzellen

ng – Nanogramm

ml – Milliliter

µM – Mikromolar

Medium	Zusätze
<b>Stammzellmedium (NSC-Medium)</b>	Neurobasal Medium 1% Penicillin/Streptomycin 1% GlutaMAX 2 % B-27 Serum-Free Supplement Minus Vitamin A 10 ng/ml EGF 10 ng/ml FGF-2

## 2 - Materialien

<b>Differenzierungsmedium (DIF-Medium)</b>	Neurobasal Medium 1% Penicillin/Streptomycin 1% GlutaMAX 2 % B-27 Serum-Free Supplement 1 µM Retinsäure
--	---

### 2.10.2 Produkte für die Immunzytochemie und Zellkultur

Tabelle 14: Liste selbsthergestellter Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie und Zellkultur.

Auflistung der Zusammensetzung selbsthergestellter Puffer und Lösungen, die in den Experimenten für die Immunzytochemie und Zellkultur eingesetzt wurden.

Aq. dem. – Aqua demineralisata (demineralisiertes Wasser)

g – Gramm

HCl – Chlorwasserstoff

M – Molar

ml – Milliliter

NaCl – Natriumchlorid

NaPP – Natriumphosphat-Puffer

PBS – Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

PFA – Paraformaldehyd

TBST – Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)

<b>Puffer oder Lösung</b>	<b>Zusätze</b>
<b>Mowiol Eindecklösung</b>	10 g Mowiol 40-88 40 ml PBS 20 ml wasserfreies Glycerin
<b>PBS 0,05 M</b>	83,33 ml 0,3 M NaPP ad 500 ml Aq. dem. 4,5 g NaCl = 0,9 % pH 7,2 – 7,4
<b>PBS 0,05 M mit 1 % Triton X100</b>	83,33 ml 0,3 M NaPP ad 500 ml Aq. dem. 5 ml Triton X 100 = 1 % 4,5 g NaCl pH 7,2 – 7,4
<b>Paraformaldehyd (PFA) 4%</b>	0,1 M NaPP 4% Paraformaldehyd reinst pH 7,4
<b>TBST</b>	1,21 g Tris-Base (MG 121,14) 4,0 g NaCl 350 ml Aq. dem. (steril)

pH → 7,6 mit ca. 0,5 ml HCl (rauchend) ad 500 ml Aq. dem. (steril) + 0,5 ml Tween 20
--

### 2.10.3 Produkte für die Beschichtung von Glas-Deckgläsern für Immunzytologie, Zellkultur und Calcium-Imaging

Tabelle 15: Liste verwendeter Produkte zur Beschichtung von Glas-Deckgläsern für Immunzytologie, Zellkultur und Calcium-Imaging.

Auslistung der für die Beschichtung von Glas-Deckgläsern eingesetzten Produkte. Diese wurden für die Immunzytologie, Zellkultur und das Calcium-Imaging eingesetzt.

M – Molar

PBS – Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

Lösung	Zusätze
<b>Laminin-111</b>	PBS 0,05 M Laminin-111 (1:100)
<b>Poly-D-Lysin</b>	PBS 0,05 M Poly-D-Lysin (1:100)

### 2.11 Tierstämme

Tabelle 16: Liste eingesetzter Tierstämme.

Auflistung der in den Experimenten zur Zellgewinnung eingesetzten Tierstämme

Gattung	Nomenklatur	Bezugsquelle
<b>CD IGS Ratte</b>	CrI:CD(SD)	Charles River
<b>Sprague Dawley Ratte</b>	RJHan:SD	Janvier Labs

### 3 Methoden

#### 3.1 Präparation von Nuclei Cochleares der Ratte

Sechs Tage postnatal wurden Sprague-Dawley-Ratten (Charles River/Janvier) dekapitiert. Die Haut des Schädels und das darunterliegende Weichgewebe wurden mit mikrochirurgischer Schere gespalten und lateralisiert. Die Eröffnung und Teilung des Schädels erfolgten entlang der bindegewebigen Suturen. Beginnend am Fonticulus posterior wurde entlang der Sutura sagittalis nach ventral geschnitten, danach über die Suturae coronales und lambdoideae beidseits nach lateral. Nun konnte das Os parietale nach links- und rechts-lateral aufgeklappt werden. Von posterior wurde ein Entlastungsschnitt durch das Foramen magnum gesetzt. Nach Eröffnung der dorsalen Schädelanteile (Neurocranium) wurden unter Anheben des Frontalhirns die Hirnnerven mit einer mikrochirurgischen Federschere am Eintritt in die jeweiligen knöchernen Foramina durchtrennt und das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel herausgehoben und in eine Petri-Schale mit 2.5 ml gekühltem (4°C) D-PBS transferiert. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Operationsmikroskop.

Entlang der Lamina quadrigemina wurde das Großhirn mit dem Skalpell abgetrennt. Es erfolgte die stumpfe Durchtrennung des Kleinhirns zwischen den Hemisphären und die Befreiung des Hirnstamms von Meningen und größeren Blutgefäßen. Nach Aufklappung der Hemisphären nach rostral wurde der Truncus cerebri sichtbar und die Nuclei cochleares zeigten sich mit ihrer typischen trapezoiden Form. Mit mikrochirurgischer Pinzette wurde der N.C. beidseits stumpf präpariert und reseziert sowie in kleine Stücke geteilt.

#### 3.2 Gewebedissoziation

Das präparierte Gewebe wurde in 4°C Accutase in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, anschließend in einem Thermomixer bei 37°C für insgesamt 30 min inkubiert. Alle 10 min wurde die Lösung mit einer Eppendorf-Pipette trituriert. So wurden die Präparate vollständig dissoziiert. Danach wurde die Lösung in den Reaktionsgefäßen bei 100 U/min zentrifugiert. Die Accutase wurde dann abgesaugt und das Zellpellet in Stammzellmedium resuspendiert.

### 3.3 Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau

Zur Ermittlung der Anzahl an Einzelzellen in einer bestimmten Menge Zellmedium wurden diesem 10 µl entnommen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 10 µl Trypanblau vermengt. Von dieser Suspension wurden wiederum 10 µl entnommen und in den Kapillarspalt einer verbesserten Neubauer-Zählkammer gefüllt. Mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop wurde die Zellzahl ausgewertet. Mithilfe eines 20x-Phasenkontrast-Objektiv konnten die Zellen morphologisch eindeutig identifiziert werden. Es konnten so Zellen, die das Trypanblau aufgenommen hatten, von solchen abgegrenzt werden, die ungefärbt blieben. Die Substanz kann von vitalen Zellen mit intakter Zellmembran nicht aufgenommen werden, wohingegen abgestorbene, perforierte Zellen den Farbstoff aufnehmen und so dunkelblau angefärbt werden. Die verbesserte Neubauer Zählkammer besteht aus vier Gruppenquadraten. In jedem Gruppenquadrat wurden die vitalen Zellen gezählt, wobei Zellen, die auf der oberen und linken Außenlinie lagen, mitgezählt wurden, Zellen auf der unteren und rechten Außenlinie hingegen nicht gezählt wurden. Aus der Anzahl der in den Gruppenquadraten gezählten vitalen Zellen wurde ein Durchschnittswert berechnet. Anschließend wurde nach der folgenden Formel die Anzahl x der Zellen berechnet, welche sich in der anfänglichen Menge Zellmedium befinden:

Die Anzahl x der Zellen in einer Suspension ergibt sich nach dem folgenden Quotienten:

$$\text{Zellzahl x pro } \mu\text{l Volumen} = \frac{\text{ausgezählte Zellzahl (gesamt)}}{4 * \text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} * \text{Kammertiefe (mm)} * \text{Verdünnung}}$$

### 3.4 Die Suspensionszellkultur

#### 3.4.1 Suspensionszellkultur von NSCs des Nucleus Cochlearis der Ratte

Die präparierten und bereits adhäsionsverdauten Einzelzellen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen in 5 ml NSC-Medium gegeben. Nun wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Alle 7 Tage erfolgte eine Zugabe von 2 ml neuem NSC-Medium. Nach 2-4 Wochen bildeten sich aus den Einzelzellen in den

### 3 - Methoden

Kulturflaschen Konglomerate aus vitalen Zellen, deren Durchmesser sich im Verlauf der Zeit kontinuierlich vergrößerte. Diese entwickelten sich dann zu frei flottierende Neurosphären, welche für die weiteren Versuche eingesetzt werden konnten.

#### 3.4.2 Konditionierung von Suspensionszellkulturen

Kulturen, die länger als vier Wochen bestehen sollten (Langzeitkulturen), wurden konditioniert, d. h. nach Erreichen der maximalen Füllmenge der Kulturflaschen von 10 ml wurden diese aufrecht gestellt, sodass die Zellkonglomerate auf den Flaschenboden absinken konnten. Mithilfe einer Pasteurpipette wurden dann 5 ml Medium ohne Zellen abgesaugt und es wurde wiederum 5 ml frisches, auf 37 °C erwärmtes Stammzellmedium hinzu pipettiert. Dieses Vorgehen wurde alle 7 Tage wiederholt.

#### 3.4.3 pH-Wert-Veränderungen des Zellmediums

Das für die Suspensionskulturen verwendete Stammzellmedium enthielt Phenolrot als Indikator für den vorhandenen pH-Wert des Mediums. Ein Umschlag des Zellmediums auf eine gelbe Farbe zeigte ein sauer werden, also Absinken des pH-Werts. In diesem Fall war ein erhöhter Anteil anfallender Stoffwechselprodukte der Zellen im Medium vorhanden, welcher aufzeigte, dass die Geschwindigkeit der Zellvermehrung das Pufferpotential des Mediums überstieg. Zeigte sich dann bei mikroskopischer Kontrolle bei 10-facher Vergrößerung eine leicht erhöhte Zelldichte, musste ein Mediumwechsel stattfinden.

#### 3.4.4 Erhöhte Zelldichte in Suspensionszellkulturen

Bei mikroskopischer Analyse einer deutlich erhöhten Zelldichte in einer Langzeitkultur musste diese ausgedünnt werden. Dabei wurde die Hälfte der Zellkultur mithilfe einer Pasteurpipette entnommen und durch frisches, erwärmtes Stammzellmedium ersetzt.

### 3.5 Beschichtung von Glas-Deckgläsern (DG)

DG mit einem Durchmesser von 10 mm wurden zu 100 Stück in Glas-Petrischalen auf Löschpapier gelegt. Die DG wurden so für 30 min unter UV-A Licht sterilisiert und waren dann einsatzbereit für den Versuch. Hierfür wurden sie in 4-well Petrischalen gesetzt und dort mit je 75 µl Poly-D-Lysin (1:100) in D-PBS-Lösung für 24 h bei 5 °C beschichtet. Vor dem Versuch erfolgte eine Spülung der DG mit reinem D-PBS und eine weitere Beschichtung mit je 75 µl Laminin-1 (1:100) in D-PBS-Lösung. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37 °C im Brutschrank wurde die Lösung von den DG abgesaugt und es erfolgte eine Benetzung mit der entsprechenden Zellsuspension.

### 3.6 Zellversuche

#### 3.6.1 Ausplattierung von Einzelzellen aus Suspensionszellkulturen

Zur Gewinnung von Einzelzellen aus Langzeitkulturen wurden aus der entsprechenden Zellkultur 1,5 ml mit einer 5 ml Accujet-Pipette entnommen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Zellmedium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und zum Zellpellet wurden 200 µl Accutase hinzugefügt. Die Zelldissoziation erfolgte durch Inkubation bei 37 °C im Thermomixer für insgesamt 30 min. Alle 10 min wurde die Zellsuspension zusätzlich mit einer 200 µl-Pipette trituriert.

Anschließend wurden die Zellen in Stammzellmedium resuspendiert. Nach Auszählung der Zellen erfolgte die Ausplattierung auf DG. Die Dichte der Ausplattierungen ist bei den jeweiligen Versuchen gesondert vermerkt. Sofern nichts angegeben ist, wurde die ermittelte optimale Dichte gewählt (optimale Dichte: ca. 8000 Zellen/ 1 cm<sup>2</sup>, siehe 3.6.3). Die Dauer der Kultivierung sowie Art und Zugabetag der unterschiedlichen Medien werden bei den Ergebnissen jeweils gesondert angegeben.

#### 3.6.2 Ausplattierung primärer Neurone

Zur Ausplattierung von Einzelzellen in Form primärer Neurone wurde das frisch präparierte Gewebe des Nucleus Cochlearis 6 Tage alter Ratten mit jeweils 200 µl

## 3 - Methoden

Accutase für 30 min bei 37 °C im Thermomixer dissoziiert. Es erfolgte nach Zellzählung die Ausplattierung in der bei den jeweiligen Ergebnissen gesondert verzeichneten Zellzahl auf DG, Für Calcium-Imaging-Versuche wurden die Zellen, wie unter 3.7.1 beschrieben, auf die besonders konstruierten DG mit 22 mm Durchmesser ausplattiert.

### 3.6.3 Ermittlung der optimalen Zelldichte

Um herauszufinden, wie viele Zellen auf ein DG von 1 cm<sup>2</sup> Oberfläche auszuplattieren sind, um im Verlauf der Zelldifferenzierung ein solches Wachstum zu erreichen, dass die Zellen im Calcium-Imaging gut detektiert und sowohl getrennt voneinander als auch im Netzwerk analysiert werden können, wurden zunächst neuronale Stammzellen in unterschiedlichen Dichten ausplattiert und unter dem inversen Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Mikroskop Leica DMI 4000B kontrolliert. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen mit PFA und eine immunzytologische Färbung. Hierfür wurden Einzelzellen, wie unter 3.6.1/3.6.2 beschrieben, ausplattiert und nach 0, 1, 2 und 5 Tagen Wachstum fixiert. Pro DG wurden 1000, 2500, 5000 oder 10000 Zellen ausplattiert.

### 3.6.4 Ausplattierung von Neurosphären

Zur Ausplattierung von Neurosphären auf DG wurden aus der entsprechenden Zellkulturflasche die makroskopisch sichtbaren Neurosphären mit einer 5 ml Accujet-Pipette entnommen. Die Sphären wurden dann auf beschichtete DG gegeben und das umgebende Zellmedium wurde durch frisches, erwärmtes Stammzellmedium ersetzt. Anschließend wurden die Sphären bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Inkubationszeit wurde entsprechend der jeweiligen Fragestellung gewählt.

### 3.7 Calcium-Imaging-Verfahren

#### 3.7.1 Konstruktion spezieller DG für das Calcium-Imaging

Für Calcium-Imaging-Versuche wurde eine laboreigene Konstruktion mit 22 mm DG entwickelt: Das Ende einer 1 ml Pipettenspitze wurde mit einem scharfen Messer abgetrennt und der Rand dieses Endes wurde einseitig dünn mit Silikonfett benetzt. Mithilfe des Fetts wurde dieses Ende mittig auf einem 22 mm DG befestigt. Dieses aufgebrachte Pipettenspitzen-Ende diente als vergrößerte Reserve-Kammer für Zellmedium mit einem Fassungsvermögen von ca. 300  $\mu$ l. Die für den entsprechenden Versuch benötigte Anzahl dieser Konstruktionen wurde hergestellt und auf einem Laborfilm in einer Glas-Petrischale nebeneinandergesetzt. Die konstruierten DG wurden so für 30 min unter UV-A-Licht sterilisiert und anschließend nach gleicher Vorgehensweise wie die kleinen DG (siehe unter 3.5) beschichtet, allerdings mit jeweils 100  $\mu$ l Poly-D-Lysin und Laminin-1 pro DG, das innerhalb des aufgesetzten Pipettenendes aufgebracht wurde. Die für das Calcium-Imaging konstruierten DG wurden in 6-well-Petrischalen gesetzt. In die Räume zwischen den sechs Wells der Petrischalen wurde steriles destilliertes Wasser gefüllt, das einem Verdunsten der Flüssigkeiten auf den DG entgegenwirken sollte.

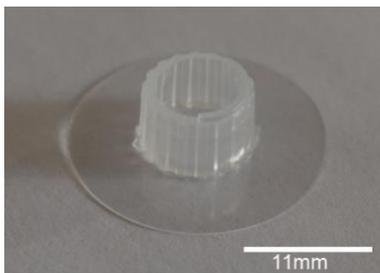


Abbildung 9: Konstruktion eines DG mit vergrößerter Medium-Vorratskammer (konstruiert und fotografiert von © Christine Völker).

Die Abbildung zeigt eine selbst konstruierte Medium-Vorratskammer inklusive Glas-Deckglas zum Ausplattieren von Zellen. Das Ende einer 1ml-Pipettenspitze ist als Vorratskammer mit Silikonfett auf dem DG fixiert und abgedichtet, sodass Medium in das Pipetten-Ende eingefüllt werden kann. Dieses fasst ca. 250  $\mu$ l Flüssigkeit.

### 3 - Methoden

#### 3.7.2 Vorbereitung der Zellen zur Analyse mit Calcium-Imaging

Zur Untersuchung von NSCs oder primären Neuronen wurde ein Protokoll zur Beladung der Zellen mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluorophoren Fura-2-AM, Fluo-4-FF und Oregon-Green BAPTA-1 erstellt. Nach diesem Protokoll wurde zunächst eine Suspension des entsprechenden Fluorophors in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aus 0,5 ml HBSS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ), 0,5  $\mu\text{l}$  der Fluorophor-Lösung und 0,5  $\mu\text{l}$  Pluronic-F-127-Lösung angesetzt. Das zu untersuchende, mit Zellen beladene DG wurde mikroskopisch unter einem 40x-Objektiv auf morphologisch erkennbare, intakt erscheinende Neurone untersucht. Von dem zu untersuchenden DG wurde das Zellmedium mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und durch 250  $\mu\text{l}$  der angesetzten, auf 37 °C erwärmten Fluorophor-Lösung ersetzt. Die Zellen wurden für 15 min bei 37 °C im dunklen Brutschrank inkubiert.

Währenddessen wurde die Flusskammer vorbereitet, d. h. diese wurde mit 80 % Ethanol desinfiziert und der Dichtungsring sowie der Boden der Kammer wurden mit einer dünnen Schicht Silikonfett überzogen. Nach der Inkubationszeit wurde die Fluorophor-Lösung vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt - ohne die Zellen am Boden des DGs zu beschädigen - und durch 250  $\mu\text{l}$  frische, auf 37 °C erwärmte, farblose HBSS-Lösung (mit  $\text{Ca}^{2+}$ ) ersetzt. Das DG wurde nun in die Flusskammer eingesetzt und mit dem Dichtungsring fixiert. Das Pipettenspitzen-Ende, das auf dem DG befestigt war, wurde vorsichtig entfernt. Durch mehrmaliges Austauschen der frischen HBSS-Lösung wurden die Zellen gründlich gespült. Es erfolgte eine Zugabe von weiteren 250  $\mu\text{l}$  der farblosen HBSS-Lösung (mit  $\text{Ca}^{2+}$ ).

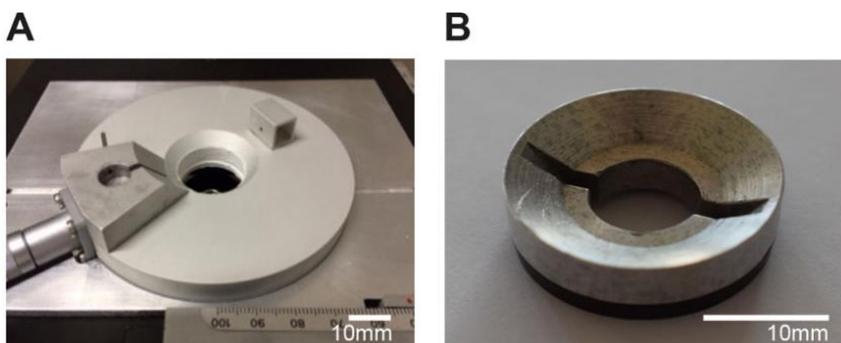


Abbildung 10: Flusskammer und Einsatz für das DG (fotografiert von © Christine Völker).

Die Abbildung zeigt unter A eine Flusskammer, die beheizbar ist. Zudem können Zu- und Abfluss optional angeschlossen werden. Mittig befindet sich eine Aussparung für den Einsatz (B) mit dem DG, auf welchem

Zellen ausplattiert werden können. Das DG ist auf B unterhalb der Metallkonstruktion mit dem schwarzen Ring fixiert und abgedichtet. Mittig auf B befinden sich die ausplattierten und mit Medium benetzbaren Zellen, sodass diese unter dem Mikroskop betrachtet / vermessen werden können. Die Flusskammer (A) kann mit dem sichtbaren Metalltisch im Mikroskop ausgerichtet werden.

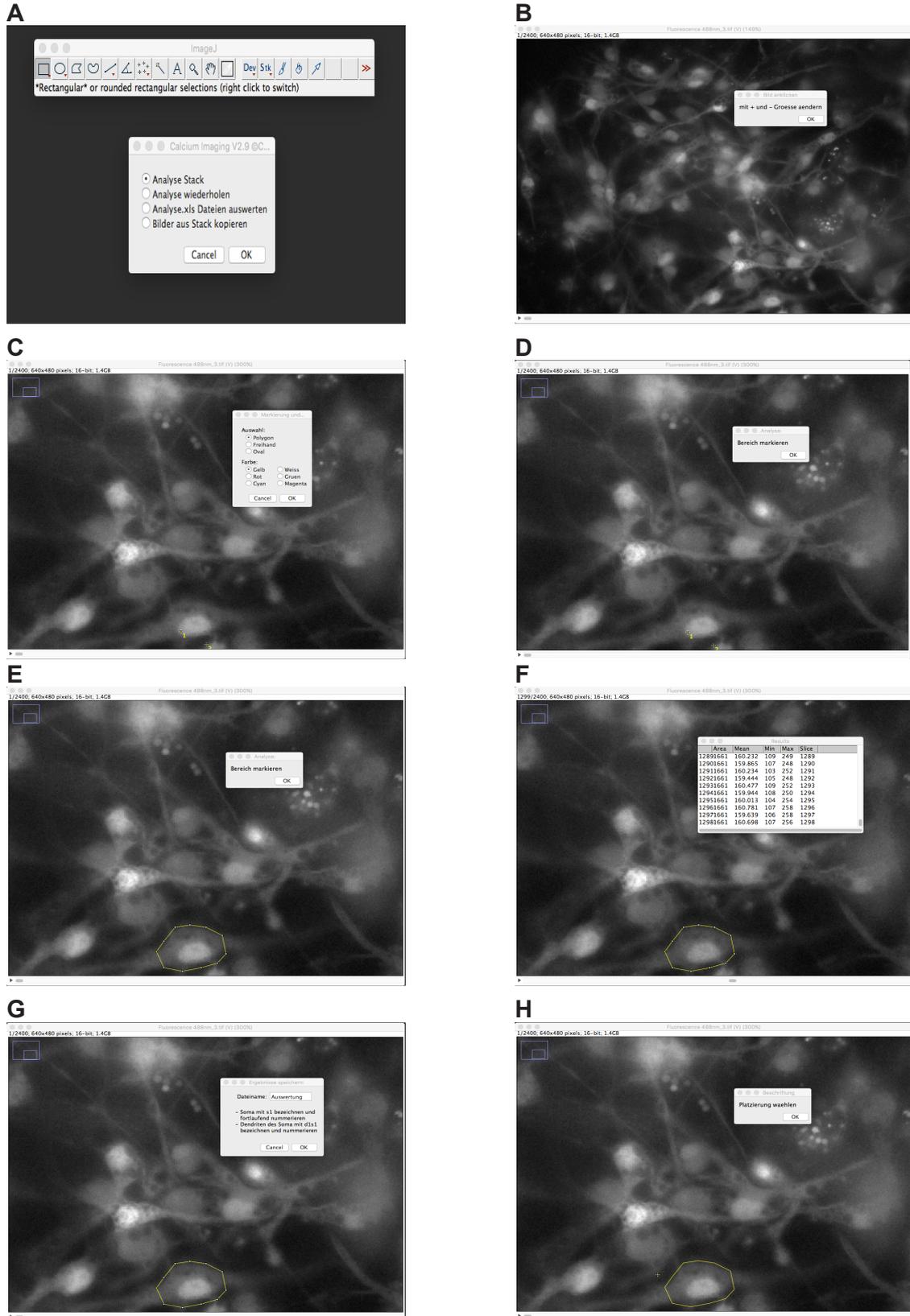
**A:** Beheizbare Flusskammer mit Zu- und Abflussoption;

**B:** Einsatz für die Flusskammer mit Dichtungsring (schwarz) zur Fixierung des DG.

### 3.7.3 Messung am Calcium-Imaging-Setup

Zur Messung mit dem Calcium-Imaging-Setup über die TILLvISION Software wurde ein Messprotokoll im TILL Protocol Editor erstellt, das für alle Calcium-Imaging-Messungen angewendet wurde (siehe Abbildung 11) (Smetters et al. 1999). In diesem Protokoll wurde ein 1x1 Binning festgelegt mit einem Bildfeld von 640 x 480 Pixel. Es wurde eine Wiederholungsrate von 2400 Zyklen mit ca. 118 ms Messzeit pro Zyklus eingestellt (wobei die zeitliche Dauer in jeder Messung angepasst werden musste und daher gering variiert). So wurden mit einer CCD-Kamera je Messung 2400 Bilder innerhalb von ca. 300 s mit einer durchschnittlichen Bildwiederholfrequenz von 8 Hz aufgenommen. Die Wellenlänge des Monochromators wurde auf 488 nm festgesetzt und eine Belichtungszeit von 50 ms wurde eingestellt. Dieses Messprotokoll konnte für jede Calcium-Imaging-Messung in den entsprechenden Arbeitsplatz (Workspace) geladen werden, sodass die Messung automatisch nach dem Protokoll ablief, sobald es aktiviert war. Das Calcium-Imaging wurde mit einem 40x Ölimmersionsobjektiv (Zeiss) durchgeführt.

### 3 - Methoden



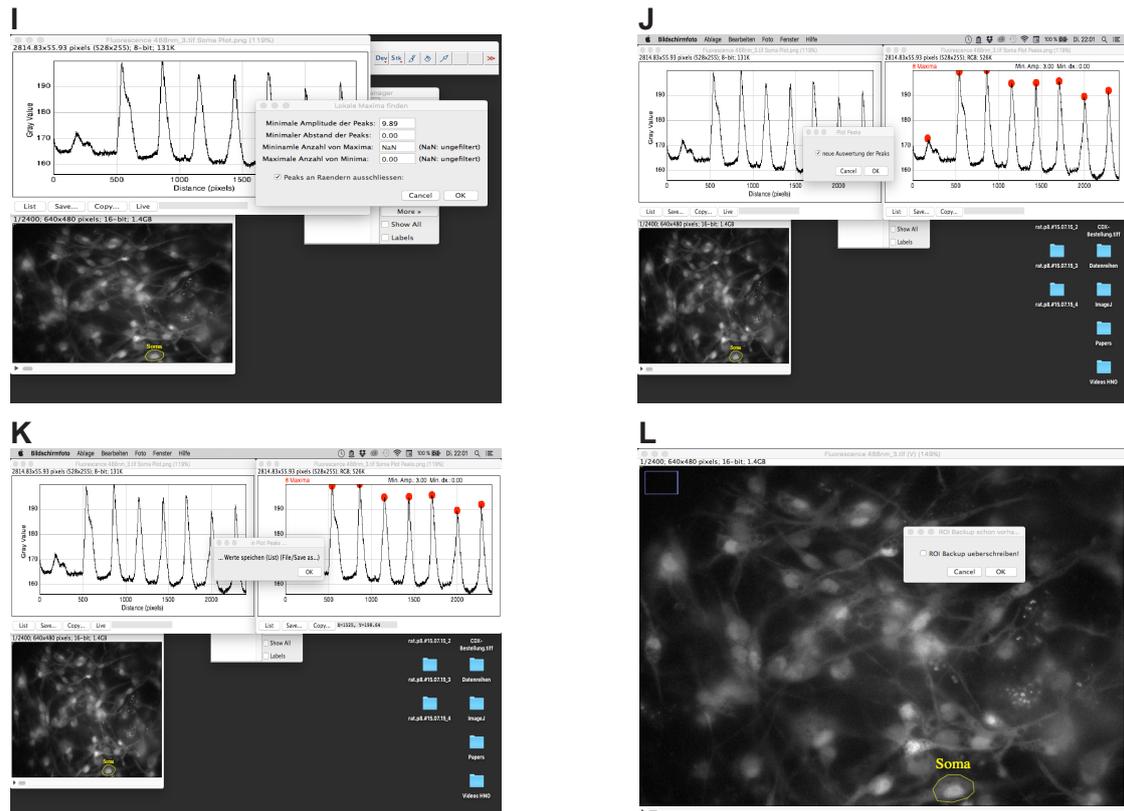


Abbildung 11: Protokoll der Calcium-Imaging-Auswertung (dokumentiert und erstellt von © Christine Völker). Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht der Protokoll-Abfolge der Calcium-Imaging-Messungen.

- A:** Auswahl des Bildstapels (Analyse stack).
- B:** Option der Vergrößerung/Verkleinerung eines Bildausschnitts.
- C:** Auswahl der Form zur Umrandung des zu vermessenden Bildausschnitts (Region of Interest/ROI) – Polygon, Freihand oder oval – sowie der Farbe des ROI-Rahmens.
- D:** ROI-Markierung.
- E:** ROI-Auswertung.
- F:** Auflistung der Grauwerte der ROI im Verlauf der Calcium-Imaging-Messung.
- G:** Festlegung eines Dateinamens.
- H:** Platzierung des Dateinamens im Bildschirmfoto.
- I:** Festlegung der Parameter „minimale Amplitude der Peaks“ und „minimaler Abstand der Peaks“.
- J:** Darstellung aller Peaks mit roten Punkten in der Grafik der Grauwerte. Option zur erneuten Auswertung durch Veränderung der Parameter.
- K:** Speicherung der Auswertung.
- L:** Sicherung eines Backups mit allen entsprechend ausgewerteten ROI.

ROI – Region of interest

### 3.8 Analyse der Zelldifferenzierung mit Calcium-Imaging

#### 3.8.1 Vermessung von $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen bei Einzelzellen

Für die Messung wurde aus den entsprechenden Zellkulturen jeweils 1 ml Zellsuspension mit Hilfe einer Accujet-Pipette entnommen bzw. das Gewebe des frisch präparierten N.C. aufgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden dann mit Hilfe von je 500  $\mu\text{l}$  Accutase bei 37 °C für 15 min dissoziiert und in Zellmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf die für das Calcium-Imaging-Verfahren entsprechend konstruierten und beschichteten DG ausplattiert. Nach 36-48 h erfolgte eine Calcium-Imaging-Messung der spontanen Oszillationen für den Differenzierungstag 0 (DIF 0). Bei den übrigen DG wurden den Zellen durch einen Mediumwechsel die Wachstumsfaktoren entzogen und durch den Differenzierungsfaktor all-trans-Retinsäure 10  $\mu\text{M}$  ersetzt. Alle zwei Tage fand ein Austausch durch frisches Zellmedium statt. Am Differenzierungstag 4 (DIF 4) erfolgte eine zweite Calcium-Imaging-Messung.

#### 3.8.2 Analyse der Spontanoszillationen im Verlauf der Zelldifferenzierung

An den Tagen 4, 8, 12 und 16 nach Initiation der Zelldifferenzierung (DIF 4, 8, 12 und 16) wurde jeweils eine Calcium-Imaging-Messung durchgeführt. Die vermessenen Zellen wurden mit PFA (3.9.1) fixiert und anschließend durch Immunfluoreszenzfärbungen analysiert.

#### 3.8.3 Detektion spannungsabhängiger $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle

Zur Untersuchung der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle von primären Neuronen und NSCs dienten die spezifischen Inhibitoren  $\omega$ -Conotoxin MVIIC (CTX), Nifedipin (Nif), SNX-482 (SNX) und Kurtoxin (Kur). Zunächst wurden 1 mM Stock-Lösungen aus den Inhibitoren CTX, Nif und SNX sowie eine 50  $\mu\text{M}$  Lösung aus Kurtoxin angesetzt, welche bei -20 °C aufbewahrt werden konnten. Nifedipin wurde in DMSO gelöst, die übrigen Inhibitorstoffe in destilliertem Wasser. Die entsprechenden Zellen wurden am Differenzierungstag DIF 4 (wie unter 3.8.1 beschrieben) auf den konstruierten DG für

das Calcium-Imaging vorbereitet. Je Zellart und Tier wurde im Folgenden jeweils ein DG mit einem der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Inhibitoren und eines mit auf 37 °C erwärmtem HBSS (mit  $\text{Ca}^{2+}$ ) als Kontrolle vermessen, sodass für jedes Tier schließlich eine Messung mit allen Inhibitorstoffen und eine Kontrollmessung vorlagen. Die Inhibitoren wurden in Stoffmengenkonzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  Nifedipin, 2,6  $\mu\text{M}$  CTX, 0,2  $\mu\text{M}$  SNX-482 und 0,5  $\mu\text{M}$  Kurtoxin eingesetzt.

Demnach wurden zu der mit 500  $\mu\text{l}$  HBSS gefüllten Flusskammer je 2,5  $\mu\text{l}$  der Nif-Stock-Lösung, 1,3  $\mu\text{l}$  CTX-Stock-Lösung, 5  $\mu\text{l}$  Kur-Stock-Lösung oder 0,1  $\mu\text{l}$  SNX-Stock-Lösung hinzugegeben. Nachdem die jeweilige Calcium-Imaging-Messung gestartet war, wurde zum Zeitpunkt des Bildes 1000 oder 1700 der entsprechende Inhibitor bzw. 2  $\mu\text{l}$  HBSS bei der Kontrollmessung vorsichtig hinzu pipettiert und die Messung fertig gestellt. Nach jeder Messung mit Inhibitor wurde im Anschluss eine weitere Messung der gleichen Zellen ohne Substanz-Zugabe durchgeführt. Im Anschluss wurden die Messungen ausgewertet (wie unter 3.10 beschrieben).

#### 3.8.4 Untersuchung der intrazellulären Spontanaktivität

Es wurden Calcium-Imaging-Messungen am Tag DIF 0 und DIF 4 der Zelldifferenzierung von primären Neuronen und NSCs des N.C. durchgeführt. Bei der Auswertung der Spontanoszillationen wurden jeweils die Areale Soma und Neuriten einander gegenübergestellt.

#### 3.8.5 Detektion des Axons unter den Neuriten

Spontanoszillationen am Differenzierungstag DIF 4 wurden mit dem Calcium-Imaging vermessen. Die Oszillationskurven der Neuriten wurden mit denen der jeweiligen Somata verglichen. Dabei wurden die Zeitpunkte der Signale in den Zellarealen Soma und Neuriten einander gegenübergestellt. Der prozentuale Anteil der Oszillationen, welche im jeweiligen Neuriten und dem Soma zum selben Zeitpunkt auftraten, wurde im Verhältnis zu allen im Soma vorkommenden Peaks ausgewertet.

### 3.9 Immunfluoreszenzanalyse

#### 3.9.1 Zellfixierung

Zur Fixierung von Einzelzellen oder Neurosphären für immunzytologische Untersuchungen wurde eine 4 %ige Lösung von PFA und 0,1 M NaPP auf 37 °C erwärmt und zunächst im Verhältnis 1:3 zum Zellkulturmedium des entsprechenden Präparats hinzu pipettiert. Nach 2 min wurde die Lösung abgesaugt und anschließend vollständig durch PFA-Lösung für weitere 30 min ersetzt. Nach Absaugen des PFA wurde das Präparat dreimal für jeweils 5 min mit TBST-Pufferlösung gespült. Die fixierten Präparate konnten nun entweder sofort immunzytologisch gefärbt oder, vollständig bedeckt mit TBST-Lösung, bei 4 °C gelagert und anschließend jederzeit weiter untersucht werden.

Zur immunzytologischen Untersuchung neuronaler Zellen erfolgte eine zusätzliche Fixierung des Präparats mit gekühltem Aceton (- 20 °C) für 5 min, anschließend zwei Spülungen mit TBST-Lösung und eine Inkubation in BSA (bovines Serumalbumin) 10 %ig für 30 min. Für die immunzytologische Analyse wurde eine 1 %ige BSA-Lösung in TBST hergestellt, zu welcher die gewünschten Erstantikörper hinzugefügt wurden. Von dieser Erstantikörper-Lösung wurden je 20 µl auf ein Deckplättchen mit den entsprechenden Zellen gegeben und es folgte die Inkubation für 24 h bei 5 °C im Dunkeln (in einer mit Alufolie umwickelten Petrischale). Danach wurde die Erstantikörper-Lösung abgesaugt und das Präparat dreimal mit TBST mit jeweils 5 min Einwirkdauer gespült. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Zweitantikörperlösung. Diese wurde aus einer 1 %igen BSA-Lösung in TBST durch Zugabe von DAPI (1:1000), goat anti-rabbit- und goat-anti-mouse-Antikörpern (jeweils gekoppelt an Alexa A488 oder A555) hergestellt. Detaillierte Angaben zu den Erstantikörpern sind bei den jeweiligen Versuchen aufgeführt. Von der Zweitantikörperlösung wurden jeweils 20 µl auf das DG aufgetragen und für 1 h inkubiert. Das Präparat wurde anschließend dreimal mit TBST-Lösung gespült (je 5 min Einwirkdauer) und dann mit auf 60 °C erwärmter Mowiol-Lösung auf Glasobjektträgern eingedeckt.

### 3.9.2 Detektion von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen

Zum Nachweis von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in den neuronalen Zellen wurden Einzelzellen – primäre Neurone und NSCs – immunzytologisch untersucht. Sie wurden für vier Tage differenziert und mit PFA fixiert. Anschließend erfolgte eine immunzytologische Färbung aller Zellen mit dem Markerprotein anti-Ca<sup>2+</sup>-Channel-( $\alpha_1$  Subunit)-Pan.

## 3.10 Datenanalyse und Auswertung des Calcium-Imaging

### 3.10.1 Verarbeitung der Rohdaten

Für die Calcium-Imaging-Messungen kam das inverse Mikroskop Zeiss Axiovert S100 TV zum Einsatz. Während der Versuche wurden über die TILLvisION-Software Bilder mit einer hochsensitiven CCD-Kamera aufgenommen. Zur weiteren Analyse der Aufnahmen wurde die Software ImageJ 1.49h (NIH USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2006) verwendet. Ein speziell für die Live-Imaging-Aufnahmen geschriebenes Auswertungsprotokoll in Form einer txt-Datei diente zur Datenauswertung. In ihr wurden alle Befehle zur Datenanalyse in bestimmter Abfolge festgelegt. Jeder mithilfe der TILLvisION-Software für einen Arbeitsplatz (Workspace) erstellte Bildstapel wurde jeweils in das ImageJ-Programm importiert. Um die Änderungen der Fluoreszenzintensität einer bestimmten Zelle im Verlauf des Calcium-Imaging zu untersuchen, wurde eine Region-of-Interest-Analyse durchgeführt (Rehberg et al. 2008). Die Region of Interest (ROI) bestand je nach Fragestellung aus dem Soma oder einem Neurit bzw. einem Ausschnitt dieser Areale der entsprechenden Zelle (Abbildung 12). Über die erstellte txt-Datei wurden anschließend die Änderungen der Grauwerte in den ROI im zeitlichen Verlauf der Bilderfolge in Zahlenwerte umgewandelt. Hierbei erfolgte die Grauwertbestimmung immer in Relation zum Grauwert des Hintergrundes. Über die txt-Datei wurde aus den analysierten Grauwert-Abfolgen eine grafische Darstellung der Zahlenwerte in Form eines Liniendiagramms konstruiert. Die Grauwerte wurden in Abhängigkeit von der Zeit bzw. der Bilderreihenfolge aufgetragen. Im nächsten Schritt war über das Protokoll der txt-Datei eine Markierung und Quantifizierung aller Maxima der Kurve unter Angabe eines individuellen Schwellenwertes sowie eines zugelassenen Signal-Intervalls durch rote Punkte (Plots) möglich. Es konnten nacheinander alle im Bild

### 3 - Methoden

befindlichen Zellen bzw. ihre Somata und Neuriten mit nummerierten und farblich unterschiedlichen ROI markiert werden. Durch automatisiertes Erstellen einer Backup-Datei konnte jederzeit auf die ROI und dementsprechend auf die Kurven mit ihren berechneten Maxima zugegriffen und eine erneute Analyse einzelner Zellbereiche durchgeführt werden. Unabhängig von der Auswertung mithilfe der erstellten txt-Datei wurde zur Erstellung eines Kurzfilmes einer bestimmten Zelle ebenfalls die ImageJ-Software verwendet. Hierzu wurde der entsprechende Bilderstapel importiert, in eine 8-bit-Form umgewandelt und auf den gewünschten Bildausschnitt reduziert. Anschließend konnten alle Grauwerte in Fehlfarben umgewandelt und eine beliebige Anzeigefrequenz für die Bildabfolge ausgewählt werden. Für die Fehlfarben wurde blau analog zum Grauwert geringster Intensität gewählt, rot analog zur maximalen Intensität. Dazwischen wurden Abstufungen der Farbtöne gelb bis orange zugeordnet.

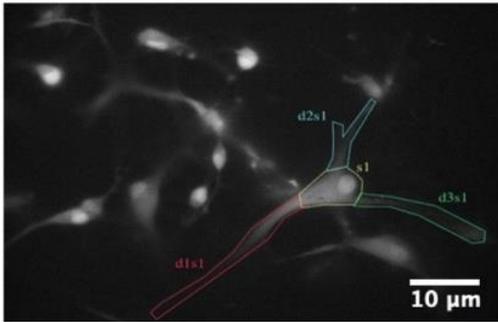
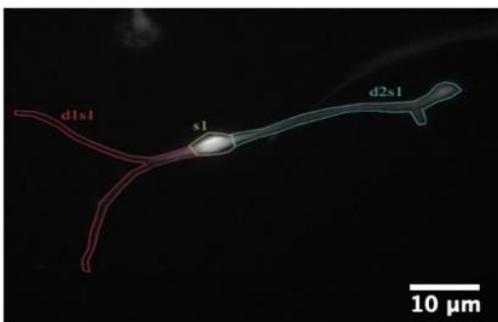
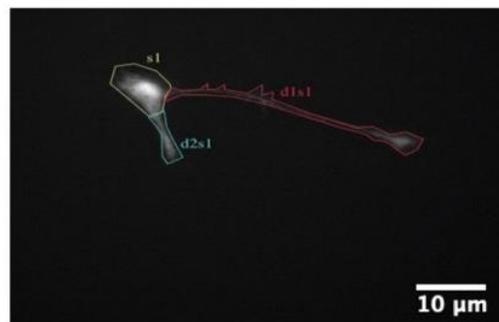
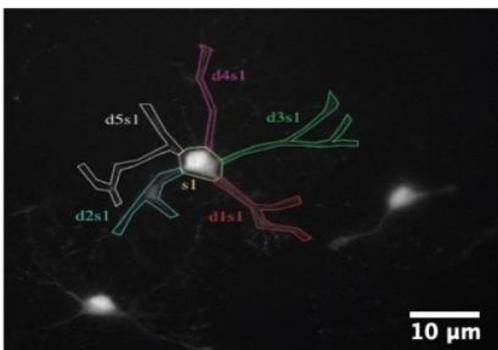
**A - DIF 0****B - DIF 4****C - DIF 8****D - DIF 12****E - DIF 16**

Abbildung 12: Exemplarische Kennzeichnung primärer Neurone bei der Auswertung der Calcium-Imaging-Messungen (Messungen und Bildkomposition von © Christine Völker).

Die Abbildung zeigt exemplarisch primäre Neurone mit der Markierung ihrer ROI für die Auswertung der Calcium-Imaging-Messungen im Verlauf der Zelldifferenzierung von DIF 0 bis DIF 16.

Markiert sind das Soma („s“ gelb) und die Neuriten („d“ in den Farben rot, grün, blau, magenta, weiß) als Regions of Interest (ROI). Abbildung **A** zeigt Zellen zu Beginn der Differenzierung (**DIF 0**) und die Abbildungen **B**, **C**, **D**, **E** stellen Zellen an den weiter fortgeschrittenen Differenzierungstagen 4, 8, 12, und 16 (**DIF 4, 8, 12, 16**) dar.

d – Dendrit (z. B. d1s1 – Dendrit 1, zugehörig zu Soma 1)

### 3 - Methoden

DIF – Differenzierungstag (Tag der Zelldifferenzierung)

ROI – Region of interest

s – Soma (z. B. s1 – Soma 1)

#### 3.10.2 Quantifizierung und statistische Analyse

Die statistische Auswertung der beim Calcium-Imaging aufgenommenen Grauwerte erfolgte eigenständig mit den Programmen Microsoft Excel für Mac (Version 14.3.9 bis Version 16.46) und GraphPad Prism Version 6.00c bis Version 9.0.0 für Mac (GraphPad Software, La Jolla, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Zur Untersuchung einer Normalverteilung wurde eine Spaltenanalyse mit dem D'Agostino-Pearson Omnibus-Test durchgeführt. Sofern eine Gauß'sche Normalverteilung vorlag, folgte ein ungepaarter t-Test. Für Gruppenanalysen wurde ein zweifacher ANOVA-Test durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant betrachtet. Normalverteilte Werte wurden in Linien- oder Säulendiagrammen aus den individuellen Werten dargestellt. Die Liniendiagramme zeigen alle Einzelwerte. Die Säulendiagramme zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichung der Mittelwerte. Bei einigen Daten des Calcium-Imaging wurde eine manuelle Auswertung vorgenommen. Hierzu wurden die Signal-Amplitude (Abbildung 13A), das Signal-Intervall (Abbildung 13B) und die Ruhefluoreszenz (Abbildung 13C) festgelegt, wonach entschieden wurde, welche Formation ein positives Ereignis darstellt. Alle Ereignisse, die sich anders darstellten, wurden als negativ erachtet.

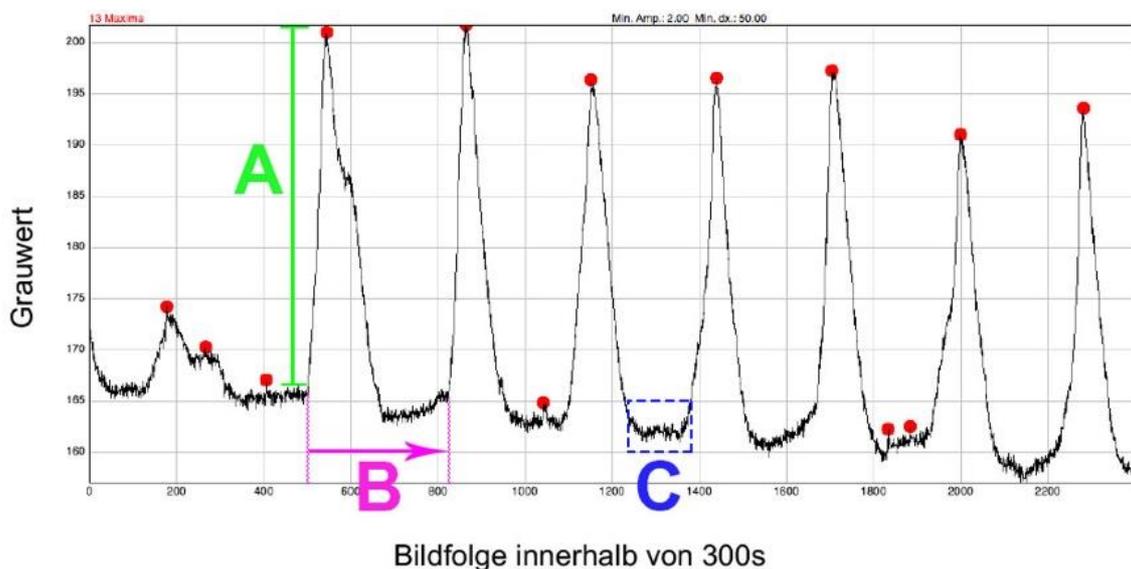


Abbildung 13: Exemplarische Grafik sehr eindeutiger Spontanoszillationen eines primären Neurons (Messung und Grafik von © Christine Völker).

Die Abbildung zeigt exemplarisch die Spontanoszillationen eines primären Neurons. Aufgezeichnet ist der Grauwert (die Fluoreszenz) eines Neurons am Differenzierungstag 4 (DIF 4) im Verlauf einer Calcium-Imaging-Messung von Spontanoszillationen in einem Messzeitraum von 300 Sekunden mit einer Gesamtbildanzahl von 2400 Bildern.  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks sind durch rote Punkte markiert. Insgesamt zeigt das vermessene Soma 13 Maxima ( $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks). Eingezeichnet sind die Bereiche, die für den angewandten Analyse-Algorithmus eine Rolle spielen.

**A:** Signal-Amplitude;

**B:** Signal-Intervall;

**C:** Ruhefluoreszenz.

s – Sekunden

## 4 - Ergebnisse

### 4 Ergebnisse

#### 4.1 Etablierung eines Calcium-Imaging-Protokolls für primäre Neurone und NSCs des N.C.

##### 4.1.1 Immunzytologische Zellkontrolle

Einzelzellen wurden immunzytologisch mithilfe spezifischer Markerproteine untersucht. Primär präparierte Neurone wurden nach Ausplattierung und Fixierung mit dem neuronalen Marker  $\beta$ -III-Tubulin identifiziert (Abbildung 14A). In allen untersuchten Zellen ließ sich das Markerprotein nachweisen. Ebenso wurden Einzelzellen der NSCs mit dem für noch nicht vollständig differenzierte neuronale Stammzellen kennzeichnenden Typ VI Intermediärfilament Nestin markiert (Abbildung 14B). Es konnten in allen untersuchten NSC-Kulturen zum Zeitpunkt der Fixierung unvollständig differenzierte Neurone Nestin(+) markiert werden. Diese Zellen wiesen einen typischen großen Zellkern sowie ein großes, abgeflachtes Soma mit unterschiedlicher Anzahl an Zellfortsätzen auf. In den NSC-Kulturen hatten sich die Zellen zu Konglomeraten (Neurosphären) entwickelt.

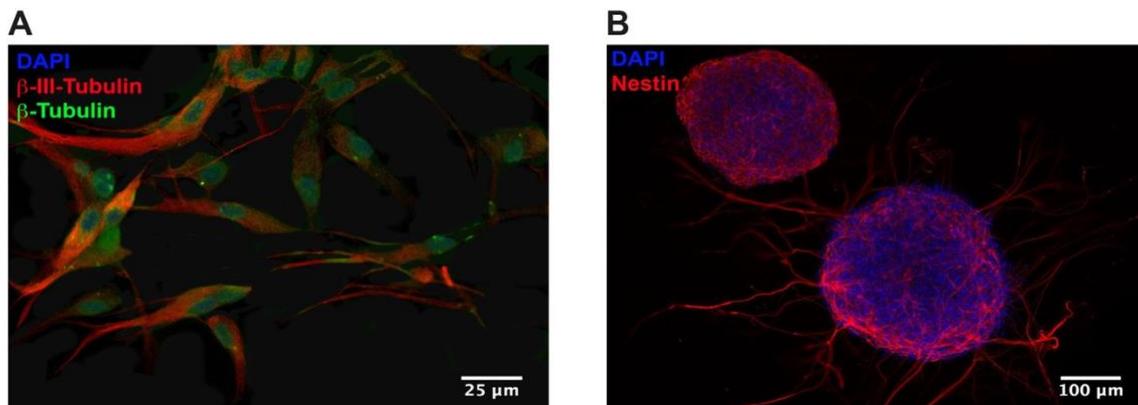


Abbildung 14: Immunzytologische Identifikation von primären Neuronen und NSC-Neurosphären des N.C. (Mikroskopische Fotografie und Bildkomposition von © Christine Völker).

Die Abbildung zeigt immunzytologisch markierte primäre Neuronen (A) und NSC-Neurosphären (B) des N.C. Zellkerne sind durch DAPI (blau) markiert;

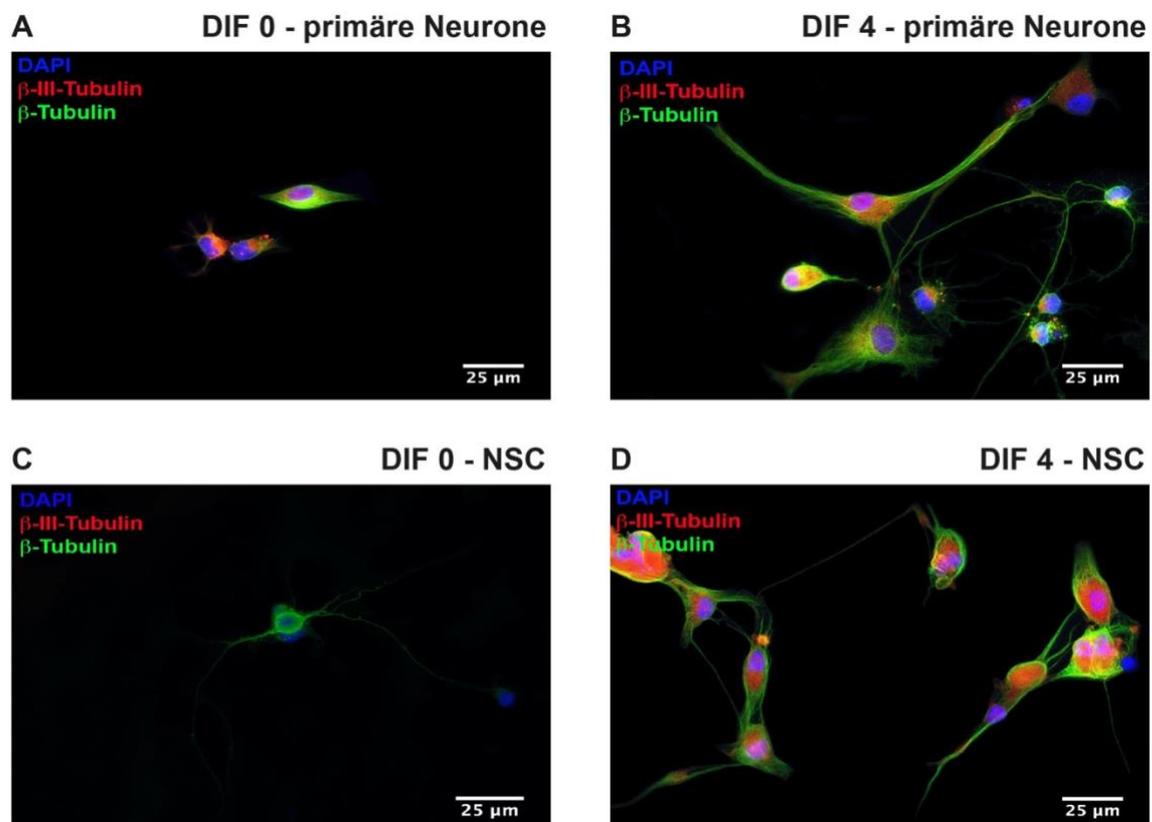
**A:** Primäre, differenzierte Neurone konnten durch den Marker  $\beta$ -III-Tubulin (rot) identifiziert werden;  $\beta$ -Tubulin (grün) kennzeichnet das Zytoskelett.

**B:** NSCs wurden durch Nestin (rot) markiert. Dargestellt sind Neurosphären der NSCs aus 8 Wochen alten Kulturen.

DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate

#### 4.1.2 Immunzytologische Unterscheidung von Neuronen im undifferenzierten und differenzierten Zustand

Zur Gegenüberstellung des undifferenzierten und differenzierten Zustands der Zellentwicklung primärer Neurone und NSCs des N.C. wurden Zellen zu den Zeitpunkten DIF 0 und DIF 4 im Verlauf der Differenzierung durch Retinsäure nach erfolgtem Calcium-Imaging immunzytologisch untersucht. Als neuronales Markerprotein diente hierzu  $\beta$ -III-Tubulin. Dieses war bei primären Neuronen sowohl bei DIF 0 als auch zum Zeitpunkt DIF 4 nachzuweisen (Abbildung 15A, B). Bei NSCs war es nur in differenzierten Zellen (DIF 4) zu finden (Abbildung 15D).



## 4 - Ergebnisse

Abbildung 15: Immunzytologische Färbung von neuronalen Einzelzellen nach Calcium-Imaging (Mikroskopische Fotografie und Bildkomposition von © Christine Völker).

Die Abbildung zeigt immunzytologisch markierte neuronale Einzelzellen nach einer Calcium-Imaging-Messung: Färbung von primären neuronalen Einzelzellen des N.C. (**A, B**) und von Einzelzellen aus einer Kultur von NSCs des N.C. (**C, D**) im Vergleich zwischen Beginn der Differenzierung an Tag 0 (**DIF 0**) und am Differenzierungstag 4 (**DIF 4**) im Anschluss an Calcium-Imaging-Messungen. Zellkerne sind durch DAPI (blau) markiert. Differenzierte Neurone konnten durch den Marker  $\beta$ -III-Tubulin (rot) als spezifischen Mikrotubuli-Bestandteil identifiziert werden, während mit  $\beta$ -Tubulin (grün) allgemein das mikrotubuläre Zytoskelett gekennzeichnet wurde.

Zellkerne sind durch DAPI (blau) markiert;

DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate

DIF – Differenzierungstag (Tag der Zelldifferenzierung)

Zur Unterscheidung der Differenzierungsphasen von Netzwerken aus primären Neuronen wurden primär neuronale Einzelzellen in Stammzellmedium ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden diese mit PFA fixiert und immunzytologisch mit dem neuronalen Markerprotein  $\beta$ -III-Tubulin gefärbt. Weitere Zellen wurden über 4 Tage mit Retinsäure differenziert und ebenfalls fixiert und gefärbt (DIF 4). In beiden Fällen war  $\beta$ -III-Tubulin nachweisbar (Abbildung 16 A, B). Bei DIF 4 zeigten sich stärker vernetzte Zellausläufer, ebenfalls teilweise markiert durch  $\beta$ -III-Tubulin.

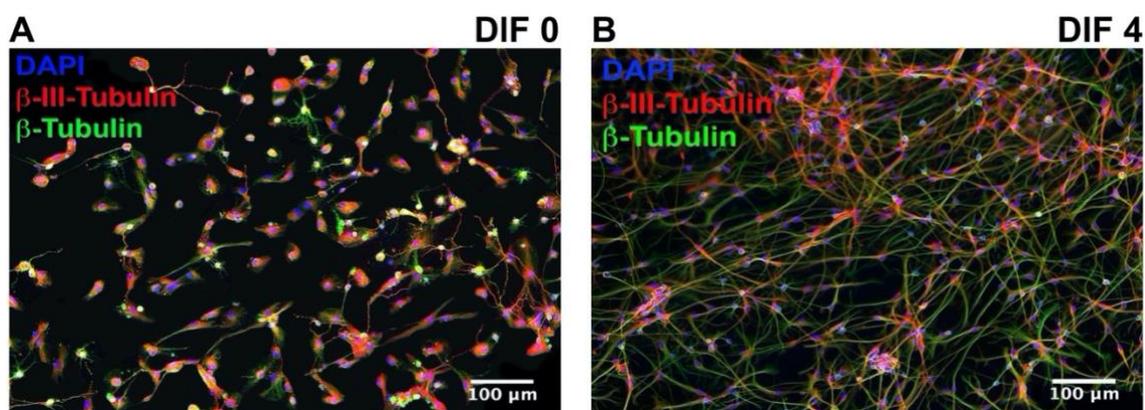


Abbildung 16: Immunzytologische Färbung eines neuronalen Netzwerks aus primären Neuronen des N.C. 6 Tage alter Ratten (Mikroskopische Fotografie und Bildkomposition von © Christine Völker).

Die Abbildung zeigt immunzytologisch markierte neuronale Netzwerke primärer Neurone bei DIF 0 und DIF 4. Dargestellt ist die Markierung der Zellen durch  $\beta$ -III-Tubulin (rot) zu Beginn der Differenzierung (**DIF 0; A**) und bei fortgeschrittener Differenzierung (**DIF 4; B**).

Zellkerne sind durch DAPI (blau) markiert.  $\beta$ -III-Tubulin (rot) war im Zytoplasma innerhalb der Neurone bei DIF 0 in geringen Mengen, bei DIF 4 stark ausgeprägt nachzuweisen. Zudem waren bei DIF 4 die Zellausläufer ebenfalls durch  $\beta$ -III-Tubulin markiert. Das Zytoskelett wurde durch den Intermediärfilamentbestandteil  $\beta$ -Tubulin (grün) dargestellt.

Zellkerne sind durch DAPI (blau) markiert;

DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate

DIF – Differenzierungstag (Tag der Zelldifferenzierung)

### 4.1.3 Ermittlung der optimalen Dichte von Einzelzellen

Es wurde geprüft, wie sich unterschiedliche Anzahlen ausplattierter Einzelzellen von NSCs auf den DG während der frühen Phase der Zelldifferenzierung verhielten. Hierzu wurden Zelldichten von 2500, 5000 und 10000 Zellen pro Quadratzentimeter in einem Differenzierungszeitraum von 5 Tagen immunzytologisch untersucht (Abbildung 17). Es zeigte sich, dass die Einzelzellen bei einer Zelldichte von 5000 und 10000 ausplattierten Zellen im Verlauf der Zelldifferenzierung eine sichtbar stärker ausgeprägte Vernetzung entwickelten als mit nur 2500 ausplattierten Zellen. Bei einer Dichte von 10000 Zellen wurden zudem mehr  $\beta$ -III-Tubulin(+) Zellausläufer sichtbar. Bei 10000 Zellen überlagerten sich die differenzierten Einzelzellen zum Zeitpunkt DIF 5 teilweise sichtbar (Abbildung 17L).

Für alle folgenden Versuche zur Vermessung von Einzelzellen mit dem Calcium-Imaging wurde folglich eine Zellzahl von ca. 8000 Einzelzellen/cm<sup>2</sup> gewählt – also ein Bereich zwischen 5000 und 10000 Zellen/cm<sup>2</sup>.

## 4 - Ergebnisse

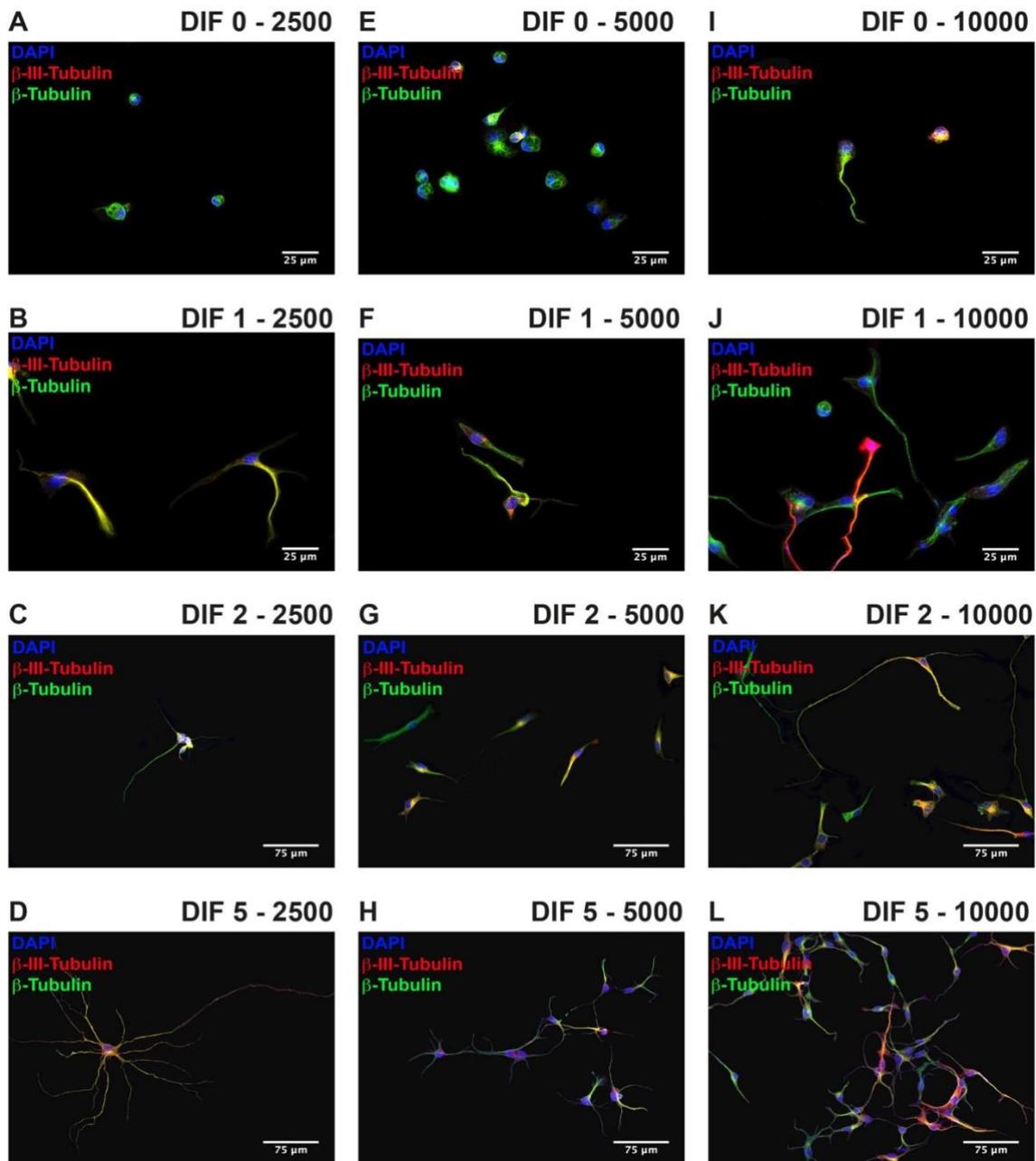


Abbildung 17: Immunzytologische Analyse unterschiedlicher Anzahlen ausplattierter Einzelzellen von NSCs des N.C. (Mikroskopische Fotografie und Bildkomposition von © Christine Völker).

Die Abbildung zeigt eine immunzytologische Analyse unterschiedlich dicht ausplattierter NSC-Einzelzellen. Dargestellt sind 2500, 5000 und 10000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattierter Einzelzellen zu den Differenzierungszeitpunkten 0, 1, 2, und 5 (DIF 0, 1, 2, 5).

**A-D** zeigen 2500 Zellen/cm<sup>2</sup> über den Differenzierungszeitraum von insgesamt 5 Tagen, **E-H** zeigen 5000 Zellen/cm<sup>2</sup>, **I-L** zeigen 10000 Zellen/cm<sup>2</sup>.

Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Ab DIF 1 konnten β-III-Tubulin(+) Zellen (rot) identifiziert werden. Mit β-Tubulin (grün) ist das Zytoskelett markiert. Bei DIF 2 und DIF 5 entwickelten sich bei 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> sichtbar mehr Zellen als bei 2500 Zellen/cm<sup>2</sup>. DG mit 10000 Zellen/cm<sup>2</sup> wichen insbesondere bei DIF 5 stark

von beiden anderen Zellreihen ab – hier entwickelten sich deutlich mehr Zellausläufer, die sich teilweise stark überlagerten.

Zellkerne sind durch DAPI (blau) markiert;

DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate

DIF – Differenzierungstag (Tag der Zelldifferenzierung)

#### 4.1.4 Aufzeichnung spontaner Oszillationen im zeitlichen Verlauf

Für die Untersuchung, ob neuronale Zellen des N.C. spontane Erregungen aufweisen würden, wurde das Calcium-Imaging-Verfahren angewendet. Hierfür sollte ein Fluorophor in Form eines AM-Esters zum Einsatz kommen. Mit den Fluorophoren Fluo-4-FF und Fura-2 konnten keine Oszillationen aufgezeichnet werden. Mit dem Fluorophor Oregon-Green-BAPTA-1 ließen sich bei primären Neuronen und bei NSCs Spontanoszillationen darstellen. Eine solche Spontanaktivität konnte durch Umwandlung der im Calcium-Imaging aufgenommenen Schwarz-Weiß-Bilder in Fehlfarben gut sichtbar dargestellt werden (Abbildung 18).

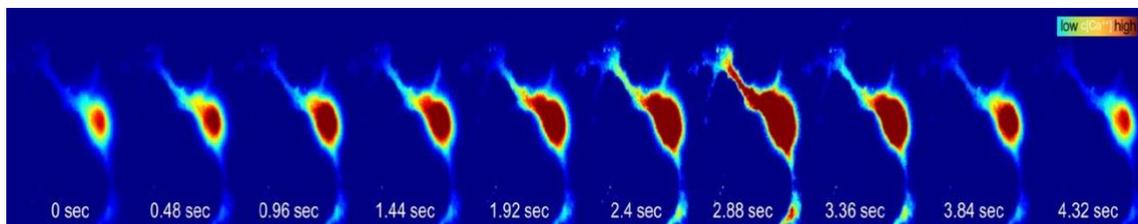


Abbildung 18: Bildliche Darstellung einer Spontanerregung im Calcium-Imaging (Mikroskopische Fotografie und Bildkomposition von © Christine Völker).

Aufgezeichnet ist ein spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak in einem primären Neuron des N.C. über einen Zeitraum von 4,32 s. Dargestellt sind die Entstehung (ab 0,48 s), der Höhepunkt (2,88 s) und das Abklingen (ab 3,36 s) der Erregung. Die Fluoreszenzintensitäten wurden in Graustufen aufgezeichnet und in Fehlfarben umgewandelt. Blau kennzeichnet die geringste Fluoreszenzintensität, während rot für die höchste Intensität steht. Die Erregung breitete sich zunächst über das Soma aus (0,48 s – 0,96 s) und lief dann in die Zellausläufer weiter (0,96 s – 3,84 s).

sec – Sekunden

## 4 - Ergebnisse

Spontane Oszillationen waren bei primären Neuronen zum Zeitpunkt DIF 4 gegenüber DIF 0 in signifikant erhöhter Anzahl aufzufinden ( $p < 0,0001$ ; Abbildung 19A). Während die durchschnittliche Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks innerhalb von 5 Minuten bei DIF 0  $8,33 \pm 0,52$   $N=48$  betrug, lag sie zum Zeitpunkt DIF 4 bei durchschnittlich  $17,03 \pm 0,73$   $N=69$ , wobei N für die Anzahl vermessener Zellen steht. Bei NSCs ergab sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg spontaner Erregungen der Zellen zwischen DIF 0 und DIF 4 ( $p < 0,0001$ ; Abbildung 19B). Bei DIF 0 wiesen hier die Zellen in 5 Minuten eine durchschnittliche Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks von  $2,72 \pm 0,22$   $N=273$  auf, wohingegen am Tag DIF 4  $16,44 \pm 0,46$   $N=143$  Peaks auftraten.

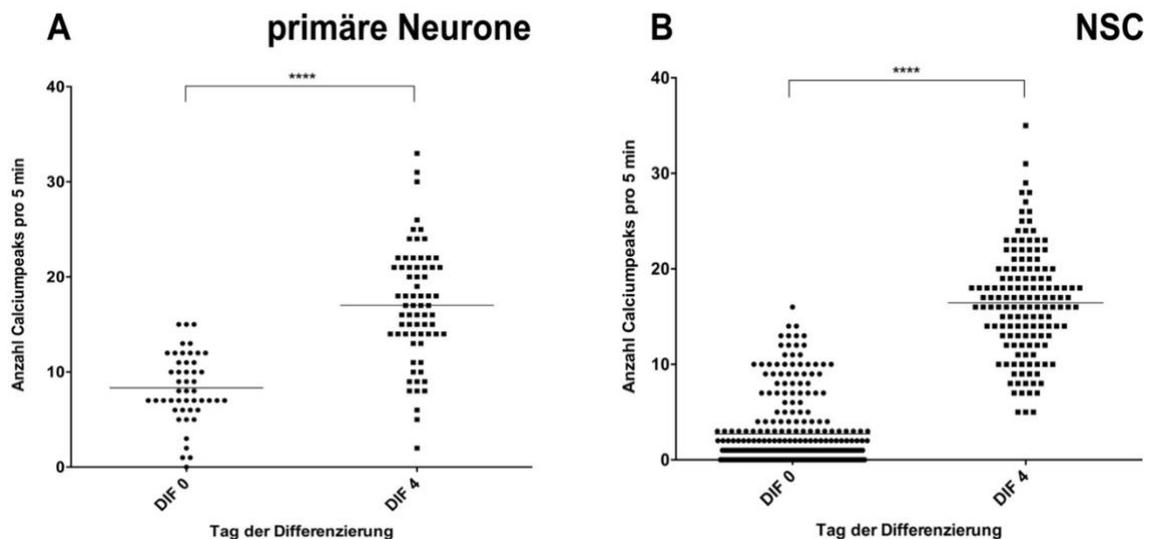


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Anzahl spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks bei DIF 0 und DIF 4 (Messungen und Grafik von © Christine Völker).

Vermessen wurden primär kultivierte Neurone (A) und NSCs des N.C. (B). Aufgezeichnet ist die Anzahl spontaner Oszillationen (Calciumpeaks) am jeweiligen Tag der Differenzierung innerhalb eines Messzeitraums von 5 min. Bei DIF 0 lagen die primären Neurone in einem frühen Differenzierungszustand, NSCs in einem nahezu undifferenzierten Zustand vor. Hier zeigte sich in beiden Fällen nur geringe Spontanaktivität. Bei DIF 4 war die Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks im Vergleich zu DIF 0 jeweils signifikant angestiegen ( $p < 0,0001$ ).

Mit Sternchen ist das Signifikanzniveau gekennzeichnet: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

DIF – Differenzierungstag / Tag der Zelldifferenzierung

min – Minuten

NSC – neural stem cells (neuronal Stammzellen)

## 4.2 Charakterisierung von primären Neuronen und NSCs des N.C. mit dem Calcium-Imaging-Verfahren

### 4.2.1 Quantifizierung von Spontanzillationen im zeitlichen Verlauf

Um zu bestimmen, zu welchem Zeitpunkt der Zelldifferenzierung primär präparierte Neurone des N.C. die höchste Anzahl spontan ausgelöster Erregungen aufweisen, wurde die Anzahl spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks in einem zeitlichen Verlauf von 16 Tagen der Zelldifferenzierung quantifiziert (Abbildung 20). Es wurden hierzu 8000 Einzelzellen des N.C. pro DG (entsprechend  $1 \text{ cm}^2$  Fläche) ausplattiert. Ausgewertet wurden die Spontanerregungen der Somata.

Vom frühen Differenzierungszeitpunkt DIF 0 bis zum Tag 16 der Zelldifferenzierung (DIF 16) wurden alle 4 Tage Zellen mit dem Calcium-Imaging-Verfahren vermessen. Primäre Neurone (Abbildung 20A) zeigten einen signifikanten Anstieg spontaner Erregungen zwischen DIF 0 mit einer durchschnittlichen Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks in 5 Minuten von  $9,17 \pm 0,63$   $N=30$  und dem Zeitpunkt DIF 4 mit einer durchschnittlichen Anzahl von  $18,89 \pm 0,71$  Peaks  $N=70$  ( $p < 0,0001$ ), wobei  $N$  für die Anzahl vermessener Zellen steht. Anschließend zeigte sich eine Tendenz des Sinkens der Anzahl spontaner Erregungen bis zu DIF 8 mit  $14,17$  Peaks  $\pm 0,66$   $N=60$  über DIF 12 auf  $12,59$  Erregungen  $\pm 1,18$   $N=17$  bis zu DIF 16 mit durchschnittlich nur noch  $3,75 \pm 1,15$   $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks  $N=8$ . Zwischen DIF 4 gegenüber DIF 0 ( $p < 0,0001$ ), DIF 8 gegenüber DIF 4 ( $p < 0,0001$ ) und DIF 16 gegenüber DIF 12 ( $p = 0,0001$ ) ergaben sich signifikante Unterschiede. Die Gruppe DIF 12 zu DIF 8 ( $p = 0,2601$ ) erwies sich als nicht signifikant.

Darauf folgend wurden NSCs aus Suspensionszellkulturen des N.C. untersucht. Ebenso wie die primären Neurone wurden die Zellen nach Ausplattierung über 16 Tage mit Retinsäure differenziert und im zeitlichen Verlauf alle 4 Tage Vermessungen der spontan auftretenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks mit dem Calcium-Imaging durchgeführt (Abbildung 20B). Es zeigte sich bei den NSCs des N.C., ebenso wie bei den primären Neuronen, eine deutliche Veränderung der Anzahl spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks zwischen DIF 0 und den späteren Differenzierungsstadien. Am Tag DIF 0 ließen sich  $1,55$   $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks pro 5 Minuten  $\pm 0,12$   $N=20$  messen. Zu DIF 4 hingegen war die Peakzahl auf  $25,35 \pm 0,81$   $N=20$  angestiegen. Anschließend sank die Peakzahl bei DIF 8 massiv ab auf  $10,35 \pm 0,98$   $N=20$ . Bis zu DIF 12 sank sie geringgradig weiter bis auf  $7,35$  Peaks/5 Minuten  $\pm 1,01$   $N=20$ . Am Differenzierungstag DIF 16 traten fast keine Peaks mehr auf ( $0,55 \pm 0,15$

## 4 - Ergebnisse

N=20). Bei DIF 4 gegenüber DIF 0 ( $p < 0,0001$ ), DIF 8 gegenüber DIF 4 ( $p < 0,0001$ ) und DIF 16 gegenüber DIF 12 ( $p < 0,0001$ ) ergaben sich hochsignifikante Unterschiede. Die Gruppe DIF 12 zu DIF 8 ( $p = 0,0389$ ) erwies sich als gering signifikant.

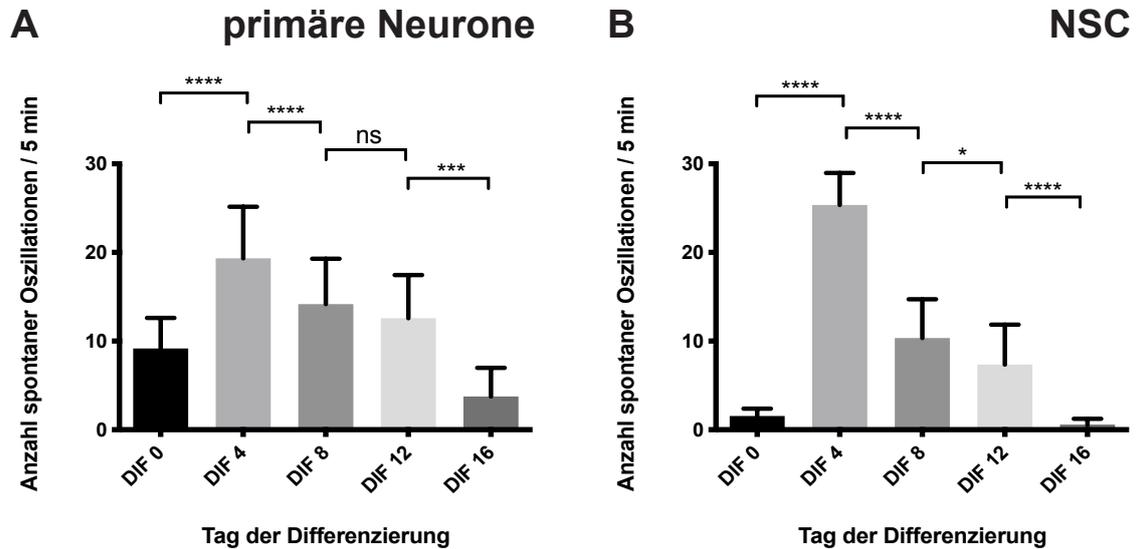


Abbildung 20: Quantifizierung spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks im Verlauf der Zelldifferenzierung innerhalb von 16 Tagen (Messungen und Grafik von © Christine Völker).

Abgebildet sind die Spontanoszillationen an den Differenzierungstagen 0, 4, 8, 16 (**DIF 0, 4, 8, 12 und 16**) bei primären Neuronen (**A**) und bei NSCs (**B**). Am Tag 0 lagen die Zellen in einem sehr frühen Stadium der Zelldifferenzierung vor. Bei DIF 4 war die Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks sowohl bei den primären Neuronen als auch bei den NSCs signifikant angestiegen im Vergleich zu DIF 0. Nach DIF 4 sank die Anzahl spontaner Erregungen jeweils signifikant zur vorherigen Gruppe bis zu einem Wert nahe dem bei DIF 0 (außer DIF 12 zu DIF 8 bei den primären Neuronen – hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied).

Sternchen geben das Signifikanzniveau an: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p = 0,0001$ , \*  $p = 0,0389$ , ns (nicht signifikant):  $p = 0,2601$ .

DIF – Differenzierungstag / Tag der Zelldifferenzierung

min – Minuten

NSC – neural stem cells (neuronal Stammzellen)

### 4.2.2 Ermittlung des Axons unter den Neuriten anhand der Spontanaktivität

Morphologisch sind Axon und Dendriten einer neuronalen Zelle nicht immer einfach voneinander zu unterscheiden. Zur Identifizierung des Axons wurde das Muster

spontaner Oszillationen im Soma und in den Neuriten von primären Neuronen und NSCs des N.C. zum Zeitpunkt DIF 4 untersucht und das Erregungsmuster des Somas jeweils mit dem der einzelnen Neuriten einer Zelle verglichen. Es zeigte sich, dass jeweils in einem von mehreren Neuriten eines primären Neurons bzw. einer NSC eine stärkere Übereinstimmung der Spontanoszillationen mit denen des Somas vorhanden war (exemplarisch Abbildung 21).

## 4 - Ergebnisse

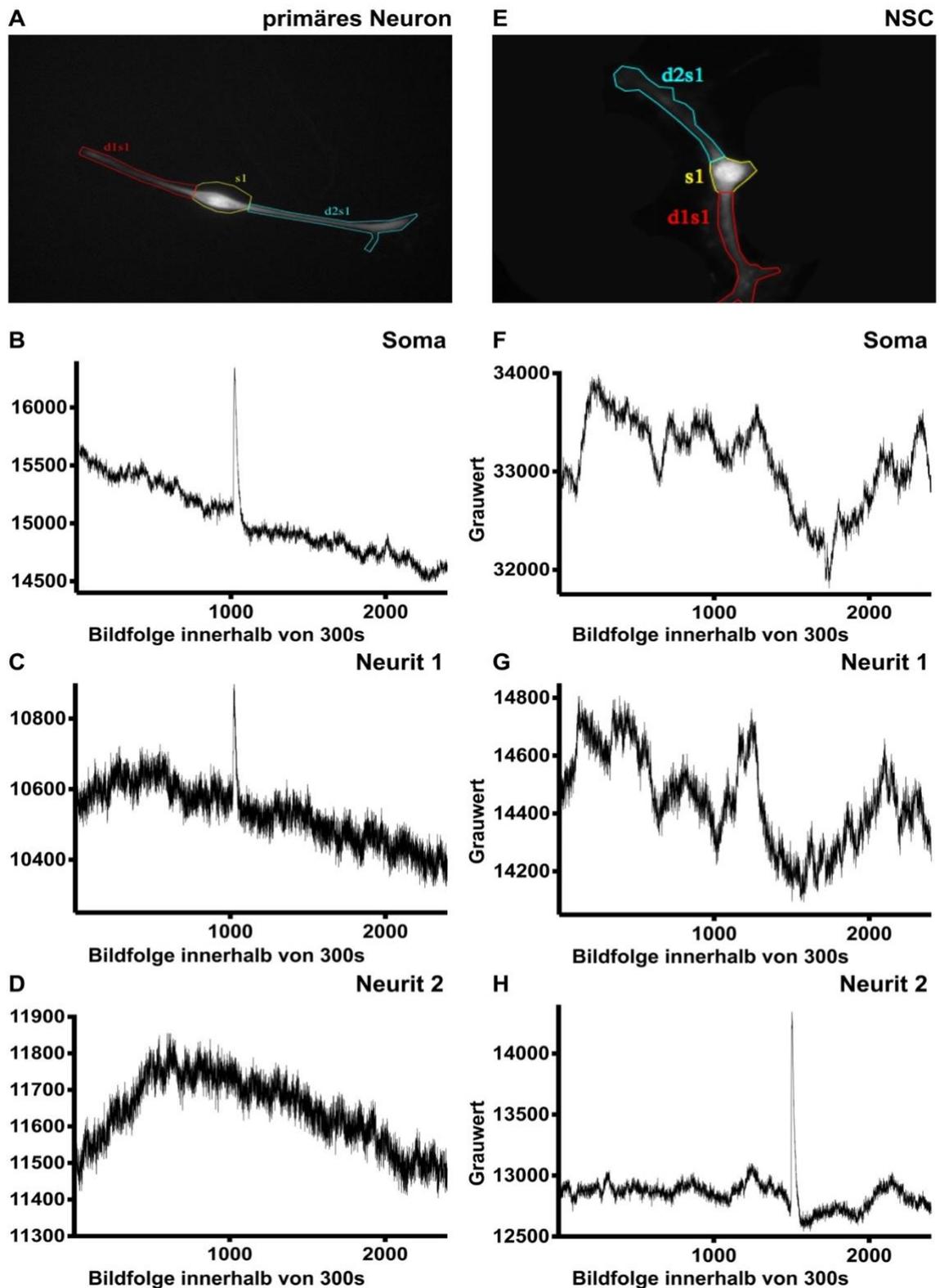


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung von Spontanzillationen neuronaler Zellen, vermessen mit dem Calcium-Imaging-Verfahren (Messungen und Grafik von © Christine Völker).

Unter **A-D** ist ein **primäres Neuron** mit seinen Spontanoszillationen dargestellt, unter **E-H** eine **NSC** des N.C. Farbig markiert sind die Zellareale **Soma (gelb, s1)**, **Neurit 1 (rot, d1s1)** und **Neurit 2 (türkis, d2s1)**. Unter den Bildern (**A, E**) der Zellen sind grafische Darstellungen der Spontanoszillationen des entsprechenden Zellareals in Form der Veränderung der Grauwerte innerhalb von 300s aufgeführt. Die Grafiken **B und F** zeigen die spontanen Erregungen des jeweiligen Somas, die Grafiken **C und G** stellen die Spontanerregungen des Neuriten 1 dar. Hier zeigt sich ein ähnlicher grafischer Verlauf wie bei den Erregungen des entsprechenden Somas. Die Grafen **D und H** spiegeln die spontanen Oszillationen des jeweiligen Neuriten 2 wider. Diese weisen eine geringere Ähnlichkeit zu den Spontanerregungen des entsprechenden Somas (B, F) auf als die Neuriten 1 (C, G).

s1 – Soma 1

d – Dendrit (z. B. d1s1 – Dendrit 1, zugehörig zu Soma 1)

s – Sekunden

In primären Neuronen (Abbildung 22A) waren bei DIF 4 in einer Messzeit von 300 s in einem Neuriten durchschnittlich 26,89 %  $\pm$  4,1% der gemessenen Peaks mit denen des entsprechenden Somas deckungsgleich (N=9), während in anderen Neuriten nur 11,56 %  $\pm$  2,4 % der Spontanoszillationen (N=9) gleichzeitig zu denen im Soma gemessen werden konnten. Die beiden Neuriten unterschieden sich nach dem ungepaarten t-Test in ihrem prozentualen Anteil an den mit dem Soma übereinstimmenden  $Ca^{2+}$ -Peaks signifikant ( $p = 0,0053$ ).

In NSCs (Abbildung 22B) waren in einem Neuriten 31,09 %  $\pm$  5 % der gemessenen Peaks gleichzeitig mit denen im Soma zu verzeichnen (N=11), während in anderen Neuriten nur 12 %  $\pm$  2,1 % der Spontanoszillationen (N=11) mit denen des entsprechenden Somas übereinstimmten. Die beiden Neuriten unterschieden sich auch hier im prozentualen Anteil an den im Soma gleichzeitig zu verzeichnenden Spontanoszillationen signifikant ( $p = 0,0021$ ). Der Neurit, der die höchste Übereinstimmung mit dem Soma zeigte, wurde im Folgenden als Axon gewertet.

## 4 - Ergebnisse

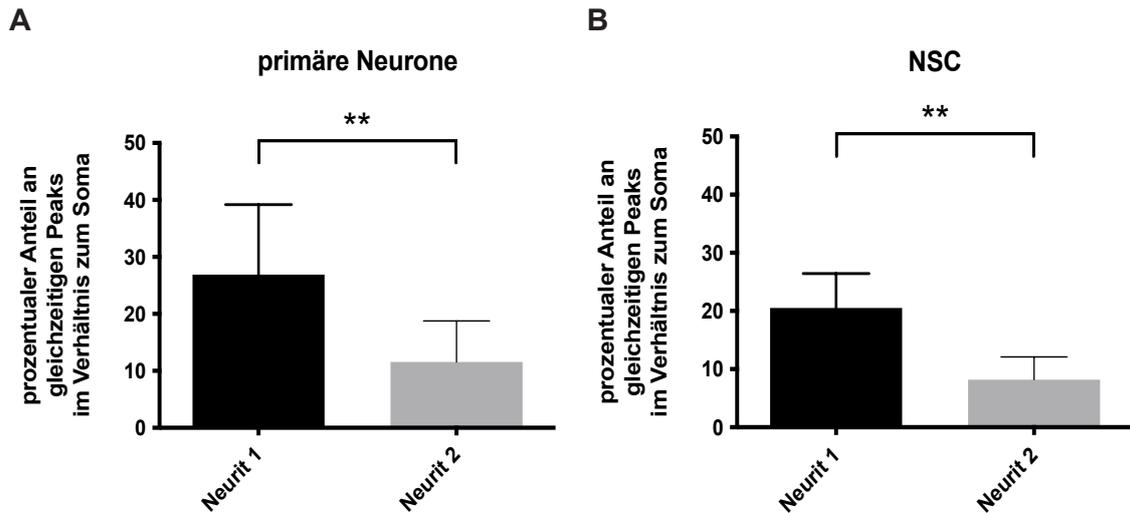


Abbildung 22: Prozentualer Anteil an  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks, die im jeweiligen Neuriten und dem entsprechenden Soma gleichzeitig auftraten (Messungen und Grafik von © Christine Völker).

Dargestellt ist der jeweilige Anteil an Spontanoszillationen bei DIF 4 innerhalb von 300s Messzeit in Neurit 1 und 2 eines primären Neurons (A) sowie einer NSC (B), der mit den im entsprechenden Soma auftretenden Peaks zeitlich übereinstimmt.

Sowohl bei primären Neuronen als auch bei NSCs zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem berechneten Anteil der beiden Neuriten einer neuronalen Zelle.

Sternchen geben das Signifikanzniveau an: \*\*  $p < 0,01$

### 4.2.3 Unterschiede der Spontanaktivität zwischen Soma, Axon und Dendriten

Spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks wurden in den verschiedenen Bestandteilen der Zellen am Tag 0 und 4 der Zelldifferenzierung (DIF 0 und DIF 4) in einem Zeitraum von 5 Minuten mit dem Calcium-Imaging-Verfahren quantifiziert.  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks wurden im Soma, den Dendriten und dem Axon vermessen und einander gegenübergestellt (Abbildung 23).

Bei primären Neuronen zeigte sich bei DIF 0 (Abbildung 23A) eine Anzahl spontaner Erregungen im Soma von  $8,64 \pm 0,48$   $N=101$ , wobei N für die Anzahl vermessener Zellen steht. Im Axon dagegen betrug die Zahl der Spontanaktivitäten nur  $4,14 \pm 1,43$   $N=7$ , in den Dendriten lag sie bei  $3,75 \pm 0,88$   $N=8$ . Das Soma zeigte demnach im ungepaarten t-Test signifikant mehr Erregungen auf als das Axon ( $p = 0,0173$ ) und die Dendriten ( $p = 0,0058$ ). Zwischen Axon und Dendriten bestand kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,7869$ ). Bei DIF 4 (Abbildung 23B) konnten im Soma  $11,77$  Spontanaktivitäten  $\pm 0,38$   $N=271$  gemessen werden. Das Axon zeigte demgegenüber eine Anzahl von  $14,54$  Erregungen  $\pm 1,24$   $N=48$  auf und in den Dendriten konnten  $13,07$  Peaks  $\pm 0,91$   $N=84$

gemessen werden. Das Axon zeigte demnach eine signifikante höhere Anzahl an Spontanoszillationen gegenüber dem Soma auf ( $p = 0,0081$ ). Zwischen Dendriten und Soma sowie zwischen Dendriten und Axon war kein signifikanter Unterschied messbar ( $p > 0,05$ ).

Bei NSCs zeigten sich zum Zeitpunkt DIF 0 (Abbildung 23C) im Soma 2,58 Spontanerregungen  $\pm 0,25$  N=77. Im Axon konnten hier nur 0,43 Peaks  $\pm 0,12$  N=46 gemessen werden und in den Dendriten traten  $0,57 \pm 0,19$   $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks N=23 auf. Das Soma zeigte demnach im ungepaarten t-Test hochsignifikant mehr Erregungen als das Axon und die Dendriten ( $p < 0,0001$ ). Axon und Dendriten unterschieden sich nicht signifikant ( $p = 0,5522$ ). Bei DIF 4 (Abbildung 23D) waren im Soma 22,23 Spontanerregungen  $\pm 0,72$  N=144 zu messen. Im Axon konnten 28,89 Oszillationen  $\pm 1,40$  N=19 gemessen werden und in den Dendriten 26 Peaks  $\pm 1,08$  N=40. Die Erregungszahl war sowohl im Axon gegenüber dem Soma ( $p = 0,0013$ ) als auch in den Dendriten gegenüber dem Soma ( $p = 0,0113$ ) signifikant erhöht. Zwischen Axon und Dendriten bestand keine signifikante Differenz ( $p = 0,1211$ ).

## 4 - Ergebnisse

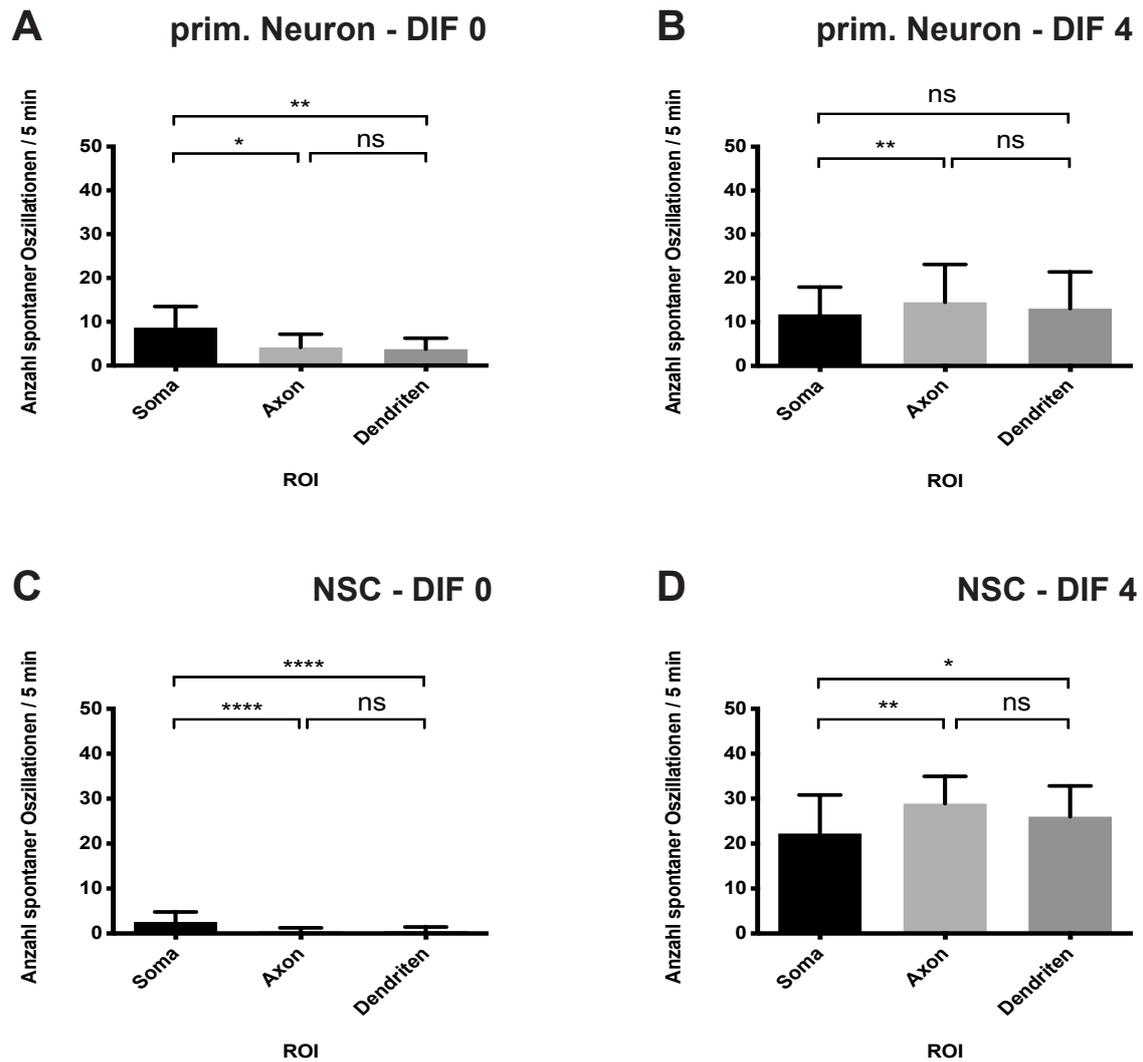


Abbildung 23: Gegenüberstellung der Spontanaktivität der Zellareale Soma, Axon und Dendriten bei DIF 0 und DIF 4 (Messungen und Grafik von © Christine Völker).

Untersucht wurde der Unterschied zwischen den Spontanoszillationen in Soma, Axon und Dendriten von primären Neuronen (A, B) gegenüber NSCs (C, D) zu den Zeitpunkten **DIF 0** und **DIF 4** der Zelldifferenzierung.

In primären Neuronen zeigte sich bei DIF 0 zwischen Axon und Soma ( $p = 0,0173$ ) sowie in Dendriten gegenüber dem Soma ( $p = 0,0058$ ) ein signifikanter Unterschied. Axon und Dendriten unterschieden sich hier nicht signifikant ( $p = 0,7869$ ). Bei DIF 4 lag eine signifikante Differenz zwischen Axon und Soma vor ( $p = 0,0081$ ). Soma und Dendriten ( $p = 0,1268$ ) sowie Axon und Dendriten ( $p = 0,3377$ ) zeigten keinen signifikanten Unterschied (ns).

In NSCs lag bei DIF 0 zwischen den Spontanoszillationen des Axons sowie der Dendriten gegenüber den Erregungen des Somas ein hochsignifikanter Unterschied vor ( $p < 0,0001$ ). Axon und Dendriten unterschieden sich nicht signifikant (ns:  $p = 0,5522$ ). Bei DIF 4 differierten das Axon gegenüber dem Soma ( $p = 0,0013$ ) und die Dendriten gegenüber dem Soma ( $p = 0,0113$ ) signifikant. Axon und Dendriten zeigten keinen signifikanten Unterschied (ns:  $p = 0,1211$ ).

Sternchen geben das Signifikanzniveau an: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,02$ , ns (nicht signifikant):  $p > 0,05$ .

DIF – Differenzierungstag / Tag der Zelldifferenzierung

min – Minuten

ns – nicht signifikant

NSC – neural stem cells (neuronal Stammzellen)

prim. – primär

ROI – Region of interest („Interessensregion“ – Areal, das vermessen / dargestellt wurde)

Des Weiteren erfolgte eine direkte Gegenüberstellung zwischen früherem und späterem Stadium der Zelldifferenzierung in den Zellarealen Soma, Axon und Dendriten bei primären Neuronen und NSCs (Abbildung 24).

Bei den primären Neuronen zeigte sich im Soma (Abbildung 24A) zum Zeitpunkt DIF 4 mit einer Anzahl spontaner Erregungen von  $11,77 \pm 0,38$   $N=271$  gegenüber DIF 0 mit einer Peak-Anzahl von  $8,64 \pm 0,48$   $N=101$  eine hochsignifikante Zunahme der Spontanoszillationen im Verlauf der Differenzierung ( $p < 0,0001$ ). Im Axon (Abbildung 24B) waren bei DIF 4 mit  $14,54$  Peaks  $\pm 1,24$   $N=48$  signifikant mehr Erregungen zu messen als bei DIF 0 mit  $4,14$  Peaks  $\pm 1,14$   $N=7$  ( $p = 0,0027$ ). In den Dendriten (Abbildung 24C) zeigte sich ebenfalls eine signifikante Zunahme spontaner Oszillationen von DIF 0 mit  $3,75$  Peaks  $\pm 0,88$   $N=8$  zu DIF 4 mit  $13,07$  Peaks  $\pm 0,91$   $N=84$  ( $p = 0,0024$ ).

Bei den NSCs zeigte sich im Soma (Abbildung 24D) zum Zeitpunkt DIF 4 mit einer Anzahl an Spontanerregungen von  $22,23 \pm 0,72$   $N=144$  eine hochsignifikant höhere Spontanaktivität als im undifferenzierten Zustand mit  $2,58 \pm 0,25$   $N=77$  Peaks ( $p < 0,0001$ ). Das Axon (Abbildung 24E) wies mit  $28,89$  Peaks  $\pm 1,39$   $N=19$  bei DIF 4 hochsignifikant mehr Erregungen auf als bei DIF 0 mit  $0,43 \pm 0,12$   $N=46$  Peaks ( $p < 0,0001$ ). Die Dendriten (Abbildung 24F) zeigten mit  $26$  Peaks  $\pm 1,08$   $N=40$  bei DIF 4 ebenfalls hochsignifikant mehr Spontanerregungen als bei DIF 0 mit  $0,57$  Peaks  $\pm 0,19$   $N=23$  ( $p < 0,0001$ ).

## 4 - Ergebnisse

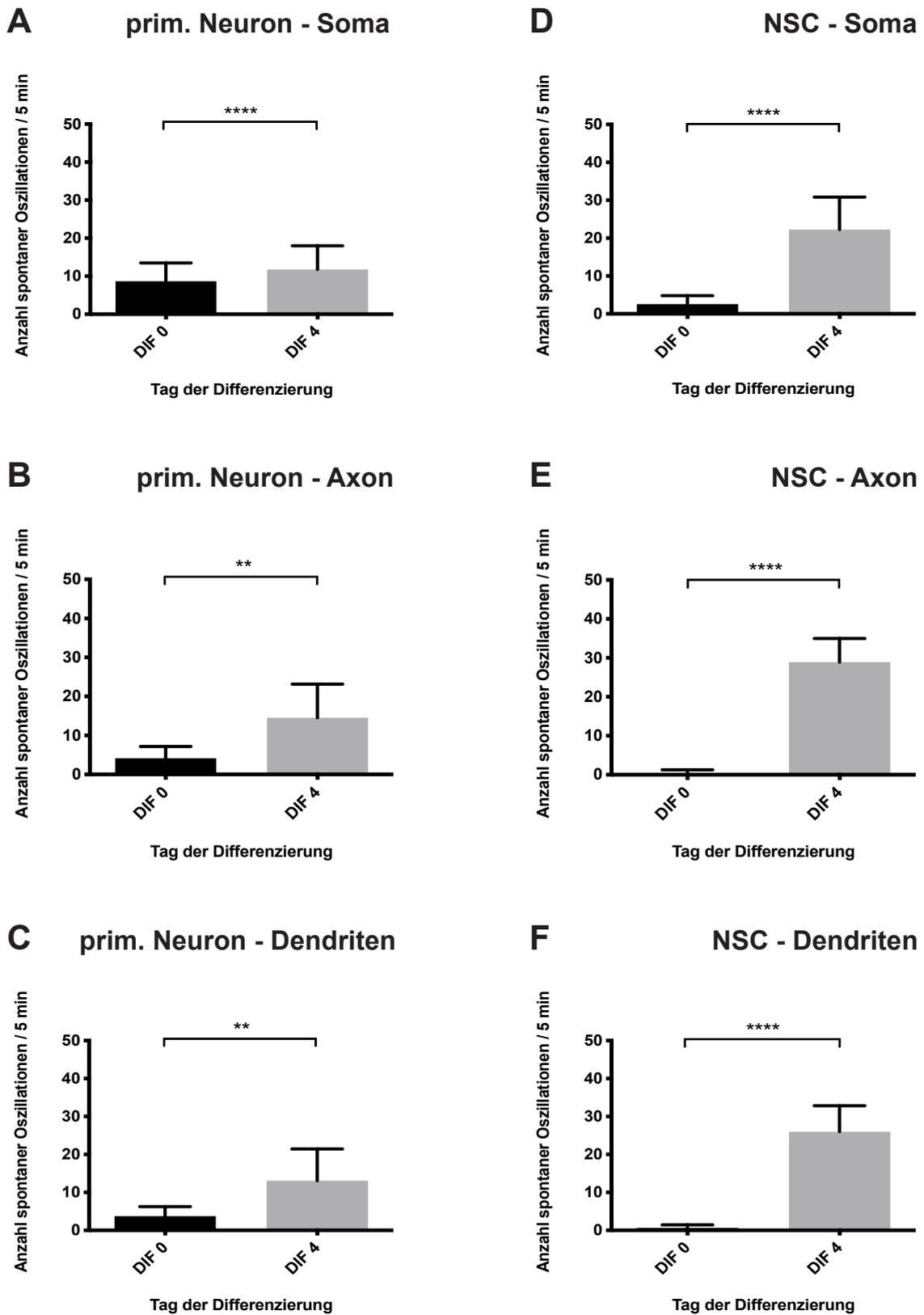


Abbildung 24: Quantifizierung spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks in Soma, Axon und Dendriten bei DIF 0 und DIF 4 (Messungen und Grafik von © Christine Völker).

Dargestellt ist in primären Neuronen und NSCs die Anzahl spontaner Oszillationen innerhalb von 5 Minuten in Abhängigkeit vom Tag der Zelldifferenzierung. Die Oszillationen der primären Neurone (**A**, **B**, **C**) sind in Somata (**A**), Axon (**B**) und Dendriten (**C**) gegenüber denen der NSCs (**D**, **E**, **F**) in Somata (**D**), Axon (**E**) und Dendriten (**F**) aufgezeichnet. Es konnte in allen Zellarealen ein signifikanter Unterschied der Anzahl spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks zwischen DIF 0 und DIF 4 nachgewiesen werden.

Sternchen geben das Signifikanzniveau an: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ .

DIF – Differenzierungstag / Tag der Zelldifferenzierung

min – Minuten

ns – nicht signifikant

NSC – Neural stem cells (neuronale Stammzellen)

prim. – primär

Morphologisch trat ein Areal innerhalb der Neuriten einer Zelle durch seine kegelförmige oder kolbenartige Form hervor (Abbildung 25). Dieses Areal stellte den Wachstumskegel eines Neuriten dar.

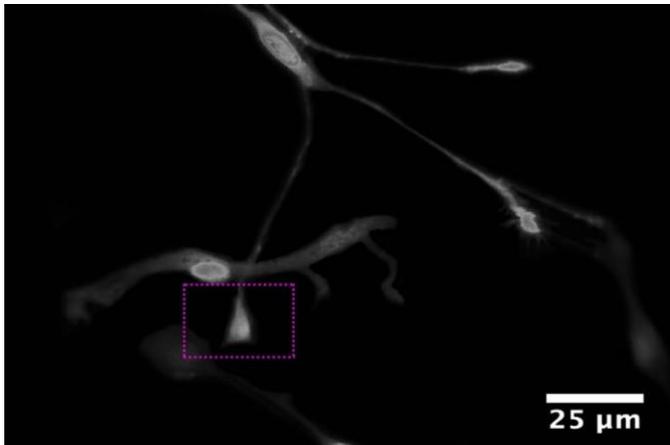


Abbildung 25: Exemplarische Darstellung eines Wachstumskegels

(Mikroskopische Fotografie und Bildkomposition von © Christine Völker).

Abgebildet sind primäre Neurone des N.C. bei DIF 4. Lilafarben eingerahmt ist ein typisch kegelförmig geformter Wachstumskegel an der Endigung eines Neuriten.

#### 4 - Ergebnisse

Gegenüber den entsprechenden Somata konnte in diesem Areal eine deutlich höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität gemessen werden. Exemplarisch ist dieses Phänomen anhand zweier NSCs des N.C. in Abbildung 26 dargestellt. Die Areale mit erhöhter Aktivität wurden als Wachstumskegel bezeichnet.

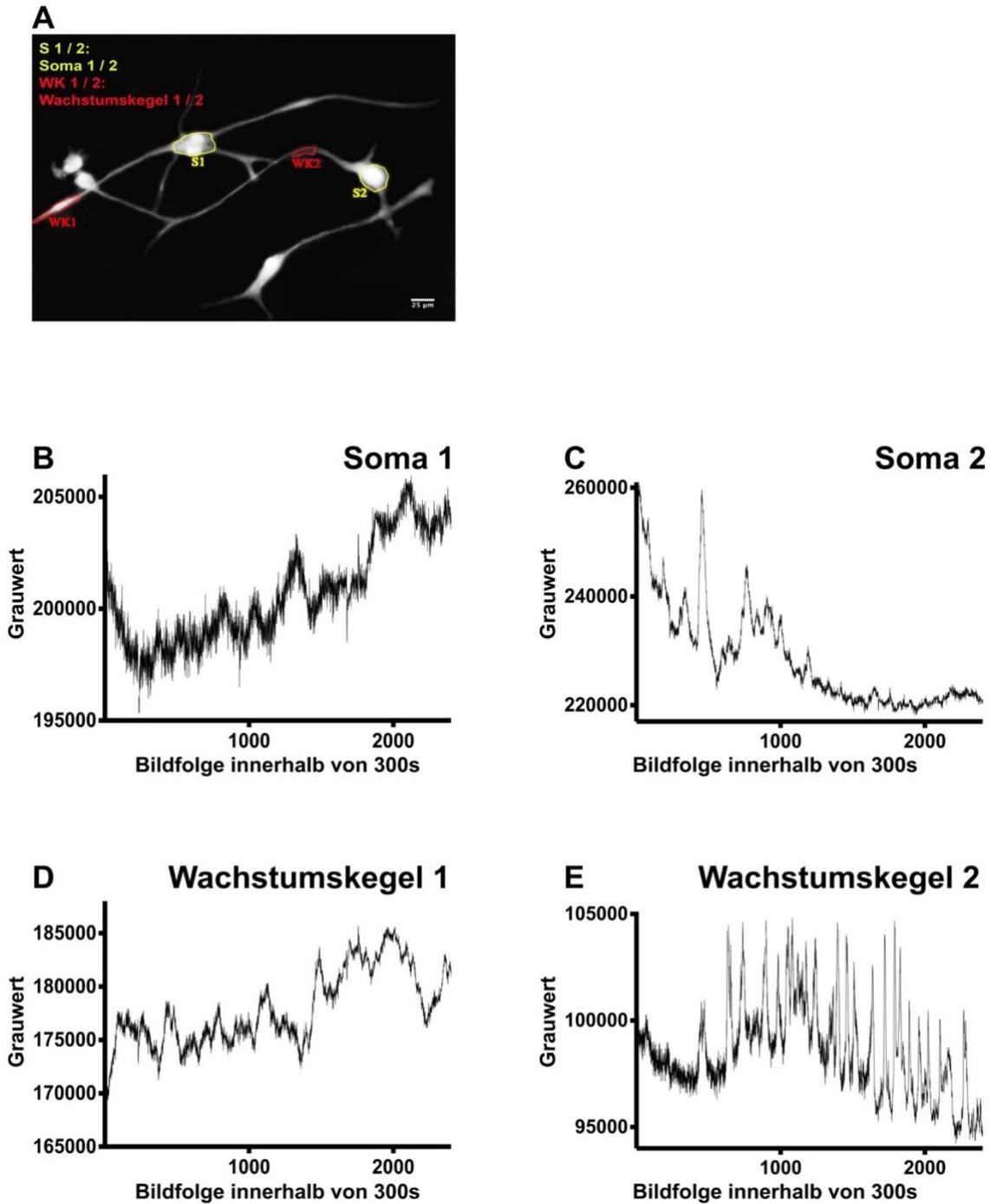


Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität in Wachstumskegeln von NSCs gegenüber der Aktivität im zugehörigen Soma.

(Abbildung modifiziert nach Voelker J., Voelker C., Engert J., Goemann N., Hagen R., Rak K. (2021), Spontaneous calcium oscillations through differentiation: A calcium imaging analysis of rat cochlear nucleus neural stem cells; Figure 3; Cells, 202, 10(10), 2802; <http://doi.org/10.3390/cells10102802>. Bildkomposition von Christine Völker).

Gegenübergestellt sind Spontanaktivitäten im Wachstumskegel und dem entsprechenden Soma bei einer NSC des N. C. zum Zeitpunkt DIF 4.

**A:** NSCs mit markiertem Soma (**gelb, S1 / S2**) und markiertem Wachstumskegel (**rot, WK1 / WK2**) als ROI für das Calcium-Imaging.

**B-E:** Spontanoszillationen der Somata und zugehöriger Wachstumskegel. Abgebildet ist jeweils der Grauwert in Abhängigkeit von der entsprechenden Bildfolge innerhalb von 300s.

s – Sekunden (in den Grafiken)

s1/2 – Soma 1/2

WK 1/2 – Wachstumskegel 1/2

Bei primären Neuronen (Abbildung 27A) waren in den Wachstumskegeln mit  $20,3 \pm 1,1$  N=23 Spontanoszillationen nach einem ungepaarten t-Test hochsignifikant mehr Peaks zu messen als in den Somata mit  $13 \pm 0,6$  N=24 Spontanerregungen ( $p < 0,0001$ ). N steht für die Anzahl vermessener ROIs.

Bei NSCs (Abbildung 27B) zeigte sich in den Wachstumskegeln mit  $24,6 \pm 1,1$  N=10 spontanen  $Ca^{2+}$ -Aktivitäten eine hochsignifikant höhere Anzahl an Peaks als in den Somata mit  $15,2 \pm 1,2$  N=10 Aktivitäten ( $p < 0,0001$ ).

## 4 - Ergebnisse

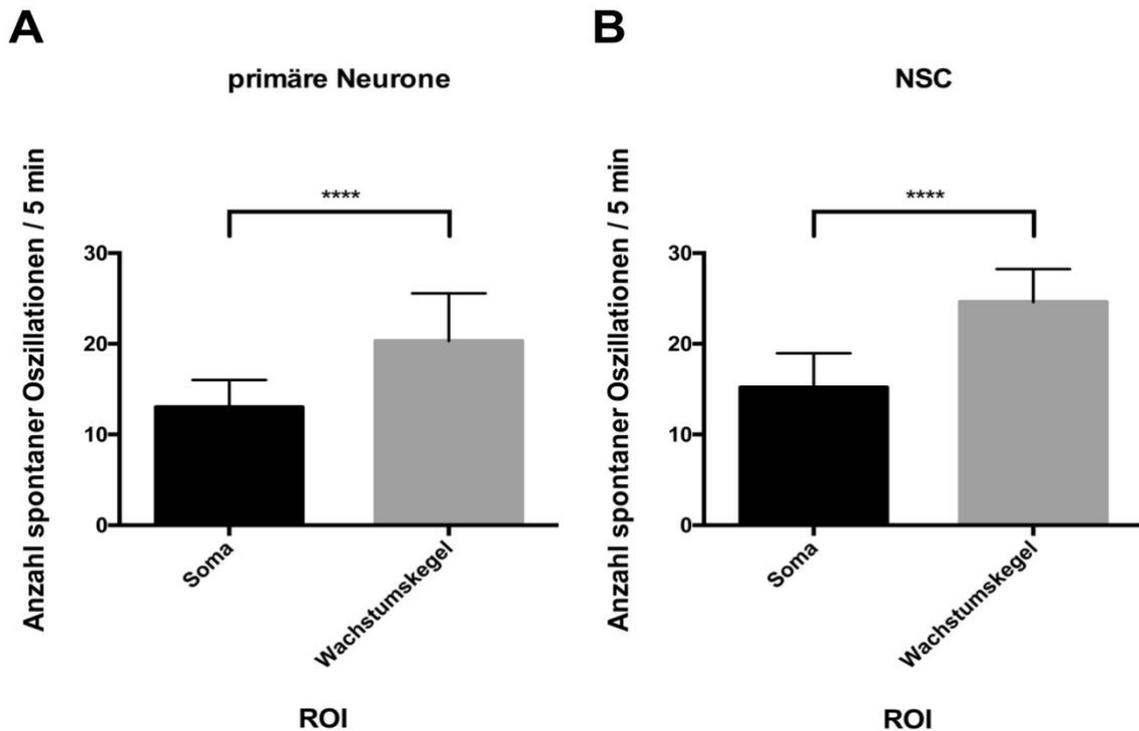


Abbildung 27: Gegenüberstellung der Anzahl von Spontanaktivitäten in Wachstumskegeln und Somata (Messungen und Grafik von © Christine Völker).

Abgebildet ist die Anzahl spontaner Aktivitäten innerhalb von 5 Minuten in Abhängigkeit vom ROI (Soma oder Wachstumskegel) bei primären Neuronen (**A**) und bei NSCs (**B**) zum Zeitpunkt DIF 4. Bei A und B zeigte sich in den Wachstumskegeln ein hochsignifikant höheres Auftreten spontaner  $Ca^{2+}$ -Peaks als in den Somata ( $p < 0,0001$ ).

Sternchen geben das Signifikanzniveau an: \*\*\*\*  $p < 0,05$ .

min – Minuten

ROI – region of interest („Interessensregion“ – Areal, das vermessen / dargestellt wurde)

### 4.2.4 Spontanoszillationen im neuronalen Netzwerk

Zur Ermittlung des zeitlichen und örtlichen Zusammenhangs spontaner Erregungen der Zellen in einem neuronalen Netzwerk erfolgte die Ausplattierung in einer höheren Dichte primärer Neurone (10000 Zellen je DG). Die Calcium-Imaging-Analyse erfolgte nach 4 Tagen Differenzierungszeit. Im Verlauf der Zelldifferenzierung zeigten die Zellen die Fähigkeit, ein eng verzweigtes Netzwerk auszubilden (Abbildung 28 A). Sowohl globale

Aktivitäten (Abbildung 28) als auch lokale Aktivitäten (Abbildung 29) konnten in den Zellnetzwerken nachgewiesen werden. Hierbei wurden globale Aktivitäten als zu gleichem Zeitpunkt auftretende Erregungen in unterschiedlichen Zellen des neuronalen Netzwerkes mit sehr ähnlichem bzw. gleichem Muster definiert (exemplarisch Abbildung 28 B,C,D). Bei lokaler Aktivität hingegen handelte es sich um Erregungen, welche ausschließlich in einzelnen Arealen bzw. Zellen auftraten und sich in ihrem Muster unterschieden (exemplarisch Abbildung 29).

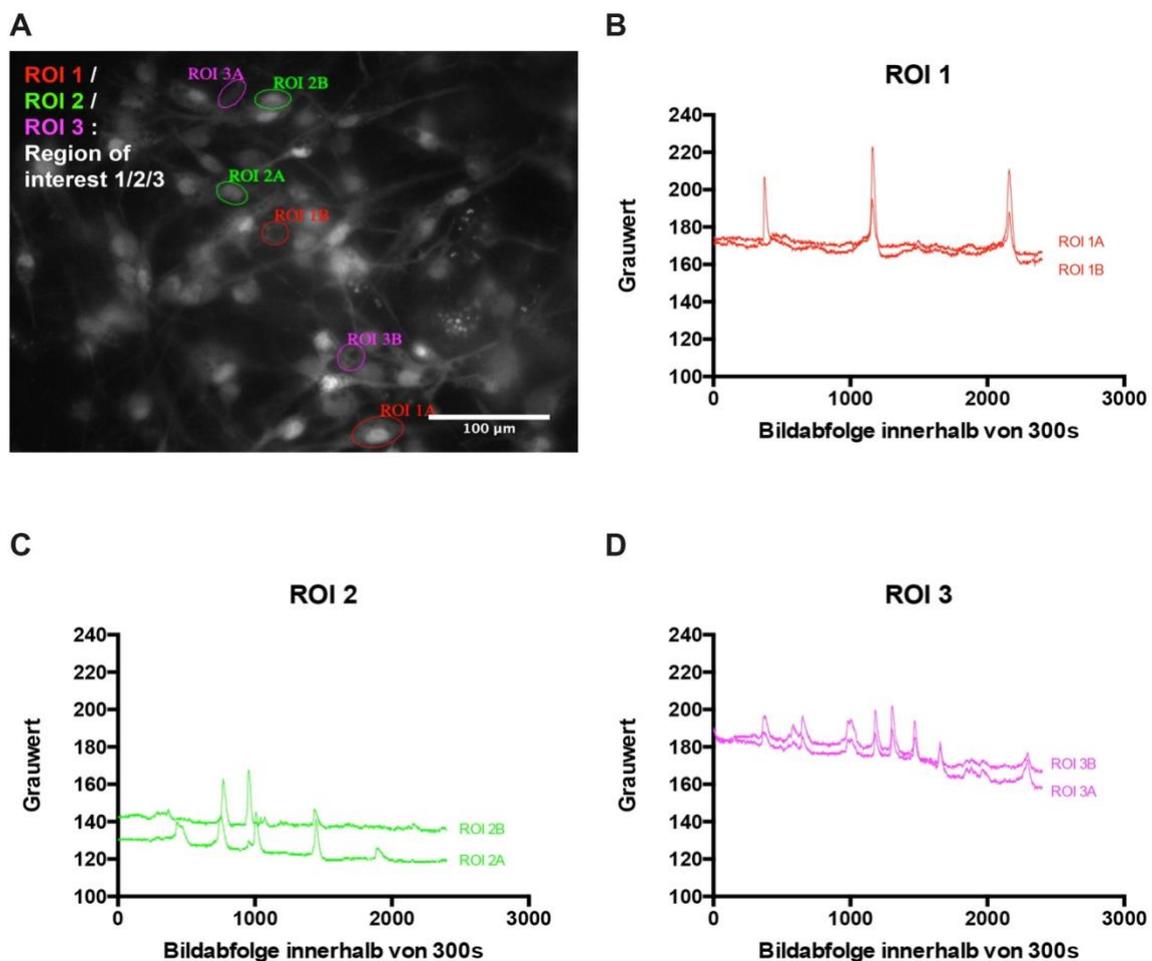


Abbildung 28: Exemplarische Darstellung globaler neuronaler Aktivität (Mikroskopische Fotografie, Messungen und Bildkomposition von © Christine Völker).

Dargestellt ist ein Netzwerk primärer Neurone des N.C. bei DIF 4 mit farbig markierten ROIs (**A**).

**B-D** zeigen die Spontanzillationen der in **A** markierten ROIs im Calcium-Imaging innerhalb von 300s, wobei die einzelnen ROIs jeweils eine globale Erregung zeigen. Jede Grafik enthält zwei Kurven mit ROI A und B – diese stellen die zusammengehörigen globalen Erregungen dar.

## 4 - Ergebnisse

ROI – Region of interest („Interessensregion“ – Areal, das vermessen / dargestellt wurde)

s – Sekunden

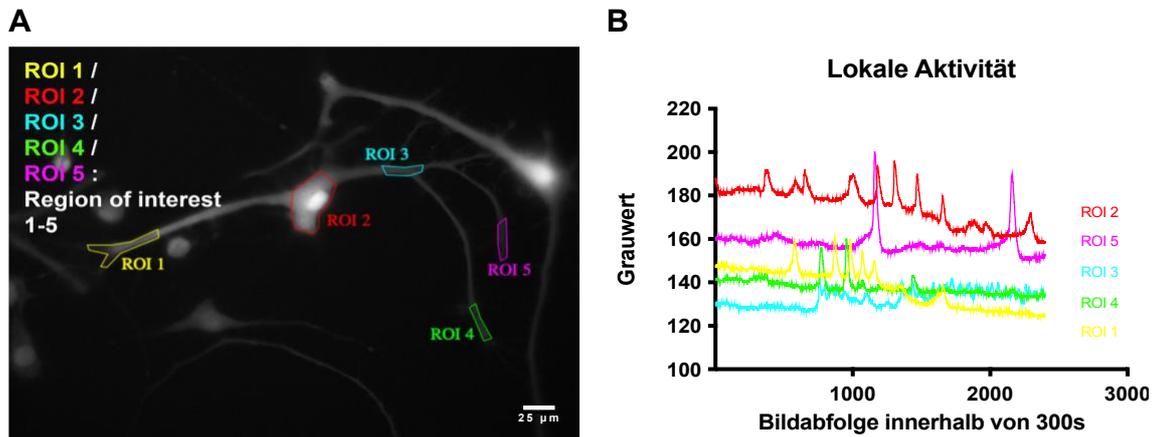


Abbildung 29: Exemplarische Darstellung lokaler neuronaler Aktivität (Mikroskopische Fotografie, Messungen und Bildkomposition von © Christine Völker).

Abgebildet sind primäre Neurone des N.C. bei DIF 4 mit farblich markierten ROIs 1-5 (A).

B zeigt die Spontanzillationen der entsprechenden ROIs im Calcium-Imaging innerhalb von 300s, wobei jede ROI eine lokale Aktivität darstellt.

ROI – Region of interest („Interessensregion“ – Areal, das vermessen / dargestellt wurde)

s – Sekunden

### 4.3 Analyse von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in primären Neuronen und NSCs des N.C.

#### 4.3.1 Immunzytologischer Nachweis von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen

Bei der immunzytologischen Analyse spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle mit dem Markerprotein anti- Ca<sup>2+</sup>-Channel-( $\alpha_1$ -Subunit)-Pan zeigte sich, dass in allen untersuchten primären Neuronen (Abbildung 30A) sowie NSCs (Abbildung 30B) spannungsgesteuerte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vorhanden waren. Deutlich markiert werden konnten

sie vor allem im Bereich des Somas, aber auch teilweise in den Zellausläufern (Abbildung 30).

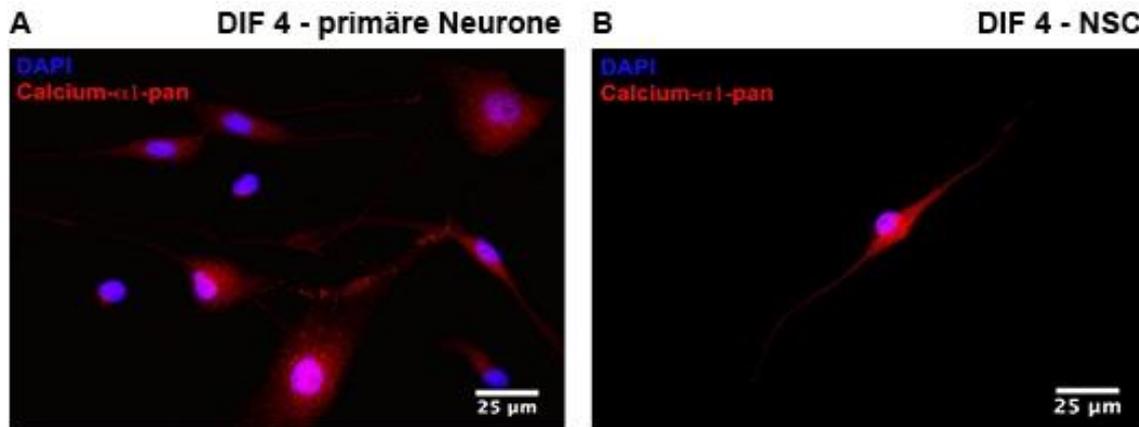


Abbildung 30: Immunzytologische Färbung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Mikroskopische Fotografie und Bildkomposition von © Christine Völker).

Die Abbildung zeigt immunzytologisch markierte spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle neuronaler Zellen. Dargestellt sind primäre Neurone (A) und NSCs (B) zum Zeitpunkt DIF 4.

Zellkerne sind durch DAPI (blau) markiert. Die spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle wurden durch das Protein anti- Ca<sup>2+</sup>-Channel-(α<sub>1</sub>-Subunit)-Pan (rot) markiert. Ca<sup>2+</sup>-Kanäle konnten in allen neuronalen Zellen bei DIF 4 gekennzeichnet werden.

DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate

DIF – Differenzierungstag / Tag der Zelldifferenzierung

NSC – neural stem cells (neuronal Stammzellen)

#### 4.3.2 Detektion unterschiedlicher Ca<sup>2+</sup>-Kanaltypen

Um zu untersuchen, welche unterschiedlichen Arten spannungsgesteuerter Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in primären Neuronen und NSCs des N.C. vorhanden sind, wurden während der Calcium-Imaging-Messungen spezifische Inhibitoren zugesetzt.

Zur Inhibition von L-Typ- Ca<sup>2+</sup>-Kanälen wurde Nifedipin (Nif) 5 µM verwendet. P-, Q- und N-Typ- Ca<sup>2+</sup>-Kanäle wurden durch ω-Conotoxin (CTX) 2,6 µM blockiert. Zur Analyse der R-Typ- Ca<sup>2+</sup>-Kanäle wurde der Inhibitor SNX-482 (SNX) 0,2 µM eingesetzt. Zur Blockade von T-Typ- Ca<sup>2+</sup>-Kanälen kam Kurtoxin (Kur) 0,5 µM zum Einsatz.

## 4 - Ergebnisse

In den Abbildungen 31 (primäre Neurone) und 32 (NSC) sind exemplarisch die Grafiken der Spontanzillationen nach Calcium-Imaging-Messung für einzelne Zellen unter Einsatz der Inhibitoren dargestellt (Abbildung 31, Abbildung 32).

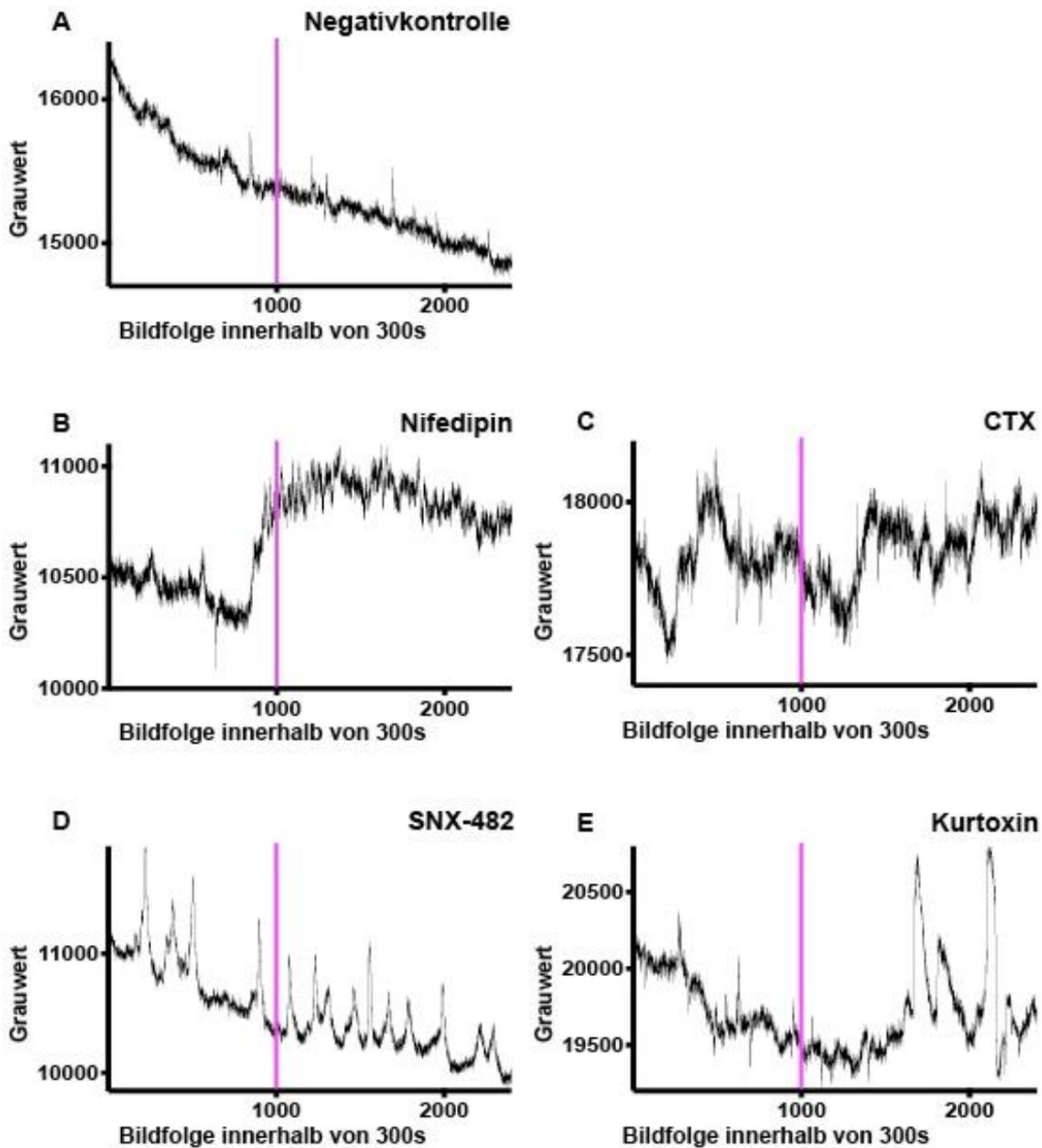


Abbildung 31: Exemplarische graphische Darstellung der Einflussnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalinhibitoren auf Spontanerregungen primärer Neurone (Messungen und Grafik von © Christine Völker).

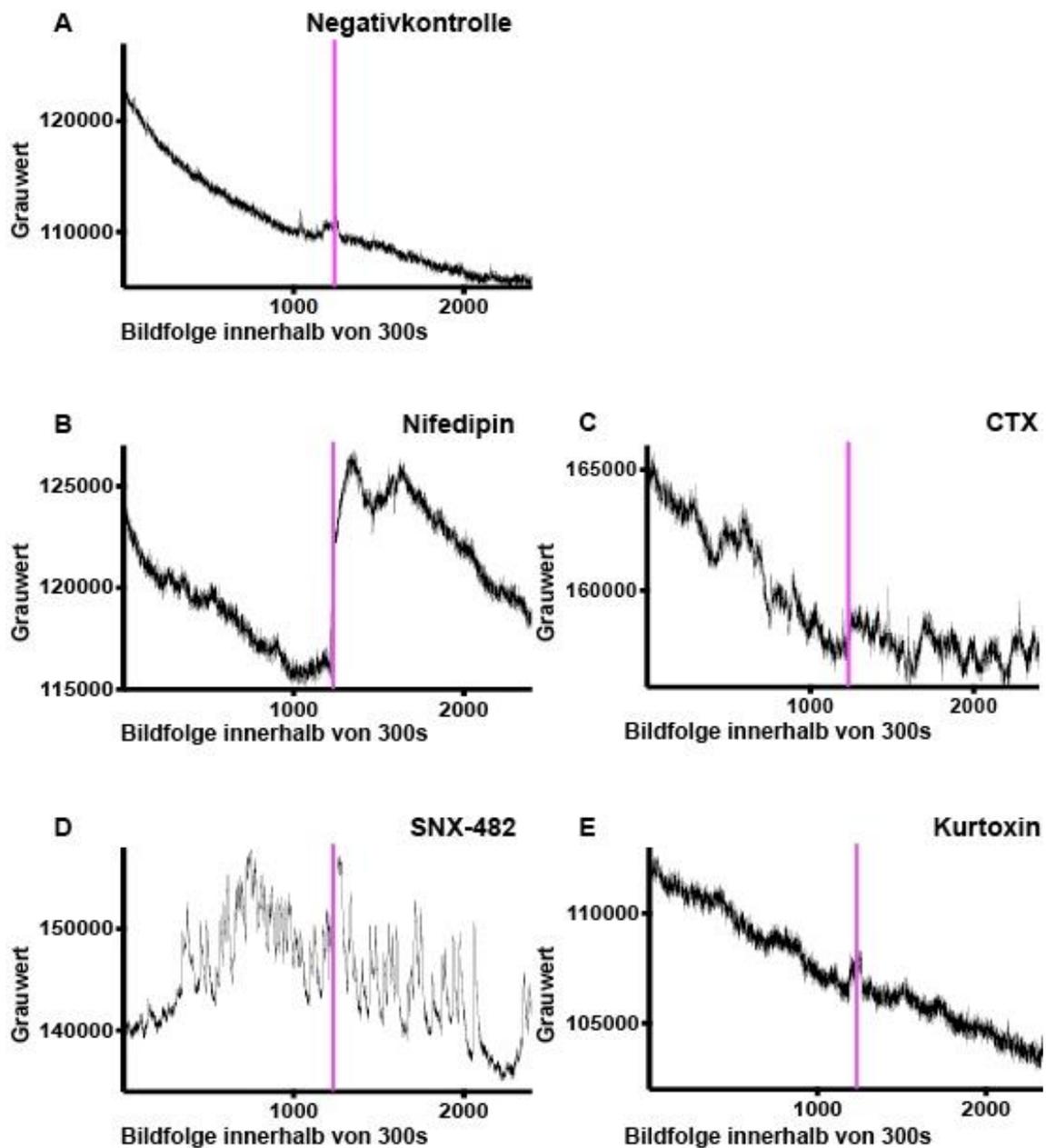
Abgebildet sind Spontanzillationen zum Zeitpunkt DIF 4. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte bei Bild 1000, markiert durch einen lilafarbenen Balken. Gezeigt ist der Grauwert zum jeweiligen Bildzeitpunkt innerhalb der Calcium-Imaging-Messung von 300s. Eine Negativkontrolle mit Zugabe von HBSS(+ $\text{Ca}^{2+}$ )-Lösung (A)

ist der Inhibitorzugabe gegenübergestellt. Als Inhibitoren wurden Nifedipin/Nif (**B**),  $\omega$ -Conotoxin/CTX (**C**), SNX-482 (**D**) und Kurtoxin/Kur (**E**) eingesetzt.

CTX -  $\omega$ -Conotoxin

s – Sekunden

SNX -  $\omega$ -Theraphotoxin-Hg1a,  $\omega$ -TRTX-Hg1a



## 4 - Ergebnisse

Abbildung 32: Exemplarische graphische Darstellung der Einflussnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalinhibitoren auf Spontanerregungen von NSCs.

(Abbildung modifiziert nach Voelker J., Voelker C., Engert J., Goemann N., Hagen R., Rak K. (2021), Spontaneous calcium oscillations through differentiation: A calcium imaging analysis of rat cochlear nucleus neural stem cells; Figure 4; Cells, 202, 10(10), 2802; <http://doi.org/10.3390/cells10102802>. Bildkomposition von Christine Völker).

Abgebildet sind Spontanoszillationen zum Zeitpunkt DIF 4. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte bei Bild 1200, markiert durch einen lilafarbenen Balken. Gezeigt ist der Grauwert zum jeweiligen Bildzeitpunkt innerhalb der Calcium-Imaging-Messung von 300s. Eine Negativkontrolle mit Zugabe von HBSS-Lösung (**A**) ist der Inhibitorzugabe gegenübergestellt. Als Inhibitoren wurden Nifedipin/Nif (**B**),  $\omega$ -Conotoxin/CTX (**C**), SNX-482 (**D**) und Kurtoxin/Kur (**E**) eingesetzt.

CTX -  $\omega$ -Conotoxin

s – Sekunden

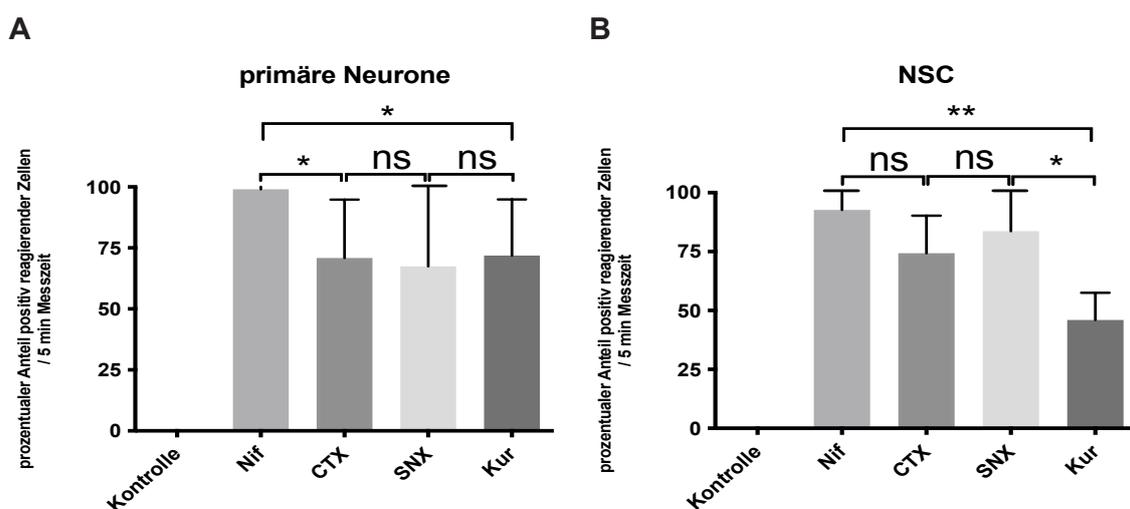
SNX -  $\omega$ -Theraphotoxin-Hg1a,  $\omega$ -TRTX-Hg1a

Es erfolgte eine statistische Auswertung von Veränderungen der Spontanaktivität innerhalb einer Messzeit von 5 min durch den jeweiligen Inhibitor (Abbildung 33). Dargestellt wurde das prozentuale Verhältnis von Zellen, die eine Änderung der Spontanaktivität nach Inhibitorzugabe aufwiesen, zu denjenigen, die keine Veränderung zeigten. Ausgewertet wurden hier sowohl die Somata als auch die Neuriten der Zellen. Die Statistiken über die einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Inhibitoren wurden einander gegenübergestellt.

Bei primären Neuronen folgte nach Zugabe von Nif ein deutlicher Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks (Abbildung 31B). Der Anteil an  $\beta$ -III-Tubulin Zellen, bei denen dies eintrat, betrug  $99\% \pm 1\%$  (N=44). Nach Einsatz von CTX wurde eine etwas geringere Verstärkung der spontanen Oszillationen sichtbar (Abbildung 31C). Der Anteil an Zellen betrug  $70,8\% \pm 9,8\%$ , (N=49). Nach Zugabe der Hemmstoffe SNX und Kur hingegen stieg die Zahl der Peaks deutlich an. Bei SNX (Abbildung 31D) betrug der Anteil positiv reagierender Zellen  $67,4\% \pm 15,5\%$  (N=38). Kur (Abbildung 31E) wies  $71,8\% \pm 9,4\%$  positive Reaktionen auf, (N=63). Die Negativkontrolle unter HBSS-Zugabe (Abbildung 31A) zeigte keine Veränderung des Peak-Verlaufs. In der statistischen Gegenüberstellung (Abbildung 33A) zeigte sich mit dem ungepaarten t-Test ein gering signifikanter

Unterschied zwischen der Wirkung von Nif und CTX ( $p = 0,0169$ ) sowie zwischen der Wirkung von Nif und Kur ( $p = 0,0165$ ). Die Auswirkung der übrigen Inhibitoren unterschied sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Zur Untersuchung von NSCs wurden die Inhibitoren in den gleichen Konzentrationen eingesetzt wie bei den primären Neuronen. Nach Zugabe des L-Typ-  $Ca^{2+}$ -Kanal-Inhibitors Nif zeigte sich auch hier eine deutliche Veränderung des spontanen Oszillationsmusters (Abbildung 32B). Der Anteil der reagierenden Zellen betrug  $92,7\% \pm 7,3\%$  ( $N=14$ ). Auf die Zugabe von CTX zeigte sich eine ähnliche Zunahme der Oszillationen wie bei primären Neuronen (Abbildung 32C). Hier war ein Anteil von  $74,3\% \pm 9,2\%$  mit positiver Reaktion auf den Inhibitor zu messen ( $N=40$ ). Unter dem Einsatz von SNX trat eine etwas stärkere Zunahme der  $Ca^{2+}$ -Peaks auf als bei primären Neuronen (Abbildung 32D). Hier zeigte sich ein positiv reagierender Anteil von  $83,7\% \pm 10,9\%$  ( $N=35$ ). Die Untersuchung der T-Typ-  $Ca^{2+}$ -Kanäle mit Kur (Abbildung 32E) ergab, dass die Zellen bezüglich ihrer Anzahl an Oszillationen nur ungefähr in der Hälfte der Fälle beeinflussbar waren. Ein Anteil von  $46\% \pm 6,7\%$  ( $N=26$ ) positiv reagierender Zellen konnte ausgewertet werden. In der statistischen Analyse (Abbildung 33B) zeigte sich mit dem ungepaarten t-Test ein gering signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung von Nif und Kur ( $p = 0,0092$ ) sowie ein gering signifikanter Unterschied zwischen SNX und Kur ( $p = 0,0420$ ). Der Unterschied zwischen den Anteilen positiver Reaktionen auf die übrigen Inhibitoren war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).



## 4 - Ergebnisse

Abbildung 33: Statistische Darstellung der Regulierbarkeit unterschiedlicher Ca<sup>2+</sup>-Kanaltypen über spezifische Ca<sup>2+</sup>-Kanalinhibitoren (Messungen und Grafik von © Christine Völker).

Analysiert wurden primäre Neurone (**A**) und NSCs (**B**). Aufgezeigt ist der prozentuale Anteil von Zellen bezogen auf das entsprechende Tier, der nach Zugabe des jeweiligen Inhibitors während des Calcium-Imagings innerhalb von 5 min eine Veränderung des Aktivitätsmusters aufzeigte. Bei den verwendeten Inhibitoren handelt es sich um Nifedipin (Nif),  $\omega$ -Conotoxin (CTX), SNX-482 (SNX) und Kurtoxin (Kur). Gegenübergestellt ist eine Kontrollmessung mit HBSS. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei primären Neuronen zwischen Nif und CTX sowie zwischen Nif und Kur ( $p < 0,05$ ). Bei NSCs war der Unterschied zwischen Nif und Kur sowie zwischen SNX und Kur ( $p < 0,05$ ) signifikant. Die übrigen Gruppen zeigten bei beiden Zellarten im Vergleich untereinander keine Signifikanz (nicht signifikant/ns:  $p > 0,05$ ).

Sternchen geben das Signifikanzniveau an: \*  $p < 0,05$ ; ns:  $p > 0,05$ .

CTX -  $\omega$ -Conotoxin

Kur – Kurtoxin

min – Minuten

Nif – Nifedipin

ns – nicht signifikant

NSC – neural stem cells (neuronal Stammzellen)

SNX -  $\omega$ -Theraphotoxin-Hg1a,  $\omega$ -TRTX-Hg1a

## 5 Diskussion

In den durchgeführten Zellkulturexperimenten und Messungen konnte eine Korrelation zwischen Maturation sowie Interaktion und Spontanaktivität primärer Neurone und neuronaler Stammzellen des Nucleus Cochlearis der Ratte nachgewiesen werden. Für die Analysen wurden zum einen ein Live-Cell-Imaging in Form eines Calcium-Imaging-Verfahrens mit einem speziell entwickelten Messprotokoll sowie zum anderen immunhistologische Nachweismethoden angewendet. Anhand des Calcium-Imagings konnte die Abhängigkeit des Verhaltens neuronaler Zellen von ihrem  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt im Verlauf der Zelldifferenzierung dargestellt werden.

### 5.1 Kultur und Analysemodell von primären Neuronen und NSCs des N.C.

#### 5.1.1 Zellkultursetup

Für die Experimente wurden primäre Neurone sowie NSCs des N.C. 6 Tage alter Ratten eingesetzt. Langzeitkulturen zur Gewinnung der NSCs wurden in frei flottierender Zellkultur in serumfreiem Basalmedium angesetzt, das als Serumersatz B27-Supplement ohne Retinsäure (RA - Retinoic Acid) enthielt. RA wurde entzogen, da es *in-vitro* zur Zelldifferenzierung führt, indem es einen neuronalen Differenzierungsreiz auslöst (Maden 2007). RA ist ein Vitamin-A-Derivat, das zu der Familie der Retinoide zählt. RA dringt in den Zellkern ein und beeinflusst die Zelle durch Bindung an zwei Arten ligandengesteuerter Transkriptionsfaktoren - die RA-Rezeptoren und die Retinoid-X-Rezeptoren. Im embryonalen ZNS beeinflusst RA die Entwicklung entscheidend (Maden 2002). RA führt zur Reifung von Stamm-/Progenitorzellen in Neurone und Gliazellen mit entsprechenden morphologischen Veränderungen, indem es den Zellzyklus der NSCs beendet und die Zelldifferenzierung induziert (Ray and Gage 2005).

Weitere wichtige Bestandteile der Langzeitkulturen waren die Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2. Sie gelten als essentiell für den Prozess der Selbsterneuerung von NSCs (Palmer et al. 1995; Palmer et al. 1999). Für die Differenzierung der Zellen wurden dem Medium als Serumersatz B27 mit RA zugesetzt und die Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 entzogen (Jori et al. 2003).

## 5 - Diskussion

Zur Ausplattierung von Einzelzellen wurden die DG mit Laminin-1 und PDL beschichtet. PDL ermöglicht eine starke Zelladhäsion an Oberflächen. Diese wird durch Interaktion der anionischen Zellaußenseite mit dem kationischen Ende der an die Glasoberfläche adsorbierten Polylysine erzeugt (Mazia 1975). Laminin ist ein extrazelluläres Matrixprotein und funktioniert als eine Art Mediator zwischen Kollagenen und Heparansulfat in der Basalmembran der adhätierenden Zellen (Sakashita and Ruoslahti 1980; Timpl et al. 1983; Sakashita et al. 2001). Laminin beeinflusst zudem durch eine Integrin-Aktivierung die Differenzierung von NSCs (Harper et al. 2010). In Vorexperimenten war gezeigt worden, dass eine reine Beschichtung der DG mit Laminin-1 nicht genügte, um alle ausplattierten Zellen bis über das Calcium-Imaging hinaus an den DG adhätieren zu lassen. In Versuchen ohne PDL-Beschichtung waren nach entsprechender Wachstums- bzw. Differenzierungszeit und Beladung mit der Fluorophor-Lösung auf den DG keine Zellen mehr aufzufinden.

### 5.1.2 Immunzytologischer Nachweis von Neuronen und NSCs

Zur Typisierung wurden die entsprechenden Zellen immunzytologisch mit spezifischen Markerproteinen untersucht (4.1.1). Primäre neuronale Zellen ließen sich mit  $\beta$ -III-Tubulin, der neuronalen Isoform von  $\beta$ -Tubulin, markieren, das für die Bildung von Mikrotubuli essentiell ist (Abbildung 14A). NSCs reagierten positiv auf den Progenitorzellmarker Nestin (Abbildung 14B). Dies deutete darauf hin, dass es sich bei den NSCs um noch nicht differenzierte Zellen handelte, sondern um neuronale Stamm- und Progenitorzellen (Lendahl et al. 1990). Die Literatur beschreibt dies als eine Art Zwischenstadium vor der Zelldifferenzierung, dem eine Expression von  $\beta$ -III-Tubulin folgt (Lendahl et al. 1990). Auch in ependymalen Zellen des Hirnstamms adulter Ratten war vor der Maturation eine Expression von Nestin nachgewiesen worden (Fagerlund et al. 2011). Im N.C. konnte der Stammzellmarker Nestin 2011 in der adulten Ratte identifiziert werden (Rak et al. 2011; Zheng et al. 2011). Eine Expression von  $\beta$ -III-Tubulin wurde in Makroneuronen des Kleinhirns während der Maturation nachgewiesen (Ferreira and Caceres 1992).

## 5.2 Etablierung eines Calcium-Imaging-Systems für die Analyse von primären Neuronen und NSCs des N.C.

Sowohl an primär präparierten Neuronen als auch an NSCs des N.C. wurden Aktivitätsmessungen im differenzierten und undifferenzierten Zustand durchgeführt, um Erkenntnisse hinsichtlich der Aktivität und Reifung der Zellen während der neuronalen Differenzierung zu gewinnen. Hierfür wurde ein experimentelles Protokoll entwickelt. Es wurden die spontanen Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration intrazellulär mit dem Calcium-Imaging-Verfahren *in vitro* untersucht (4.1.4) (Helmchen et al. 1997; Helmchen and Waters 2002).

### 5.2.1 Auswahl des geeigneten Fluorophors

Für das Calcium-Imaging wurden membranpermeable Fluorophore – sogenannte AM-Ester – eingesetzt, welche durch einfache Diffusion in die Zellen aufgenommen werden können (Grienberger and Konnerth 2012). Es gibt dabei unterschiedliche Fluorophore, die verschiedene Erkenntnisse liefern. Wird beispielsweise Fura-2 eingesetzt, ist eine Bestimmung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration möglich (Roe et al. 1990), was zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Verhältnisse einer Zelle eingesetzt werden kann (Neher 1995).

Für die rein qualitative Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kamen die in der Literatur am häufigsten bei Untersuchungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme zum Einsatz gebrachten Fluorophore Fluo-4 und Oregon Green BAPTA-1 (OG) in Frage (Grienberger and Konnerth 2012), die ein maximal hohes Signal-Rausch-Verhältnis und damit eine optimale Identifikation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks ermöglichen (Paredes et al. 2008). Dies ist entscheidend, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks einer Zelle möglichst deutlich herauszufiltern. Ausschlaggebende Unterschiede zwischen den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen stellen die jeweilige Affinität und die Bindungsgeschwindigkeit zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dar. Sie werden in Form der Dissoziationskonstante  $K_d$  ausgedrückt (Paredes et al. 2008). Diese korreliert mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, bei der die Hälfte der Indikator-Moleküle an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gebunden vorliegt (Paredes et al. 2008). Dementsprechend reagieren verschiedene Fluorophore mit unterschiedlicher Sensitivität und Geschwindigkeit auf Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Im Vergleich zeigt Fura-2 einen sehr niedrigen

## 5 - Diskussion

$K_d$ -Wert, also eine hohe Affinität zu  $Ca^{2+}$ , Fluo-4 hingegen eine große Dissoziationskonstante, d. h. eine niedrige Affinität zu  $Ca^{2+}$ , und OG weist einen zwischen diesen beiden Fluorophoren liegenden  $K_d$ -Wert auf. Mit Fura-2 und Fluo-4 konnten bei den NSCs des N.C. keine Spontanzillationen aufgezeichnet werden (4.1.4). Mit OG war eine Aufzeichnung der  $Ca^{2+}$ -Peaks möglich – hier lagen also eine passende Affinität und Bindungsgeschwindigkeit zum zytosolisch freien  $Ca^{2+}$  vor.

### 5.2.2 Einflüsse auf die Adhäsion der Zellen

In Voruntersuchungen wurden die Zellen nach einem Zeitraum von 24 Stunden nach Ausplattierung mit dem Fluorophor beladen. Es zeigte sich, dass dieser Zeitraum für die entsprechend nötige Adhäsion der Zellen auf den DG nicht genügte. Die Zellen wurden in diesem Fall beim Auswaschen des Fluorophors aus der extrazellulären Lösung vollständig von den DG gespült. Für eine adäquate Zelladhäsion auf der Glasoberfläche der DG im Verlauf der Calcium-Imaging-Versuche erwies sich ein Anwachszeitraum von 36-48 Stunden als notwendig. Eine Ursache für das leichte Lösen der Zellen von den DG könnte der Inhaltsstoff Pluronic F-127 in der Fluorophor-Lösung sein. Es handelt sich hierbei um ein schaumdämpfendes nichtionisches Tensid, welches durch seine amphiphilen Eigenschaften zur Dispergierung der Fluorophor-Lösung benötigt wird. Dessen Einsatz wurde bereits 1989 in der Literatur beschrieben (Maruyama et al. 1989). Zwar kann dadurch eine gleichmäßige Verteilung der übrigen Inhaltsstoffe zustande kommen (Dispersion), jedoch könnte durch den Wascheffekt des Tensids die anhaltende Haftung der Zellen an der Glasoberfläche erschwert sein. Zudem gilt das Tensid als zytotoxisch, wodurch der Literatur zufolge Zellwachstum sowie Zellreifung und damit auch eine Haftung durch Neuriten-artige Ausläufer an Oberflächen eingeschränkt sein könnten (Ikegaya et al. 2005).

Eine Zytotoxizität des Tensids Pluronic F-127 wurde anhand primärer corticaler Neurone bereits ab einer Pluronic-Konzentration von 0,01% im Zellmedium beschrieben: Innerhalb von 24 Stunden konnte eine Zellnekrose ausgelöst werden, sofern Pluronic ungebunden im Zellmedium vorlag (Bardi et al. 2009). In der für die N.C.-Zellen verwendeten Loading-Lösung betrug die Pluronic-Konzentration 0,1% für den Beladungszeitraum. Anschließend wurde die Konzentration durch einen Waschvorgang stark gesenkt (3.7.2).

### 5.2.3 Überlegungen zum Zeitpunkt der Zelldifferenzierung

Für die Voruntersuchungen zur Entwicklung eines Versuchsprotokolls wurden unterschiedliche Stadien der Zelldifferenzierung gewählt (4.1.4, Abbildung 17): angefangen bei Tag 0 der Zelldifferenzierung nach 36-48 h (DIF 0) bis hin zu Tag 5 (DIF 5). Abweichend zur üblichen Literatur wurde nicht die Beschriftung „DIV“ für „days in vitro“, also für den vollständigen Zeitraum der Zellkultivierung verwendet (Nwabuisi-Heath et al. 2012), sondern „DIF“ für „Tag(e) der Differenzierung“, um den Zeitraum hervorzuheben, in dem die im Calcium-Imaging messbare Zellentwicklung stattfand. DIF 0 definierte sich durch den Wechsel des Mediums: von Medium ohne RA mit EGF und FGF-2 zu Medium mit RA und ohne EGF und FGF-2. In der Literatur wird die vorangeschrittene Maturation neuronaler Zellen auf die Differenzierungstage DIF 3 – DIF 5 datiert (D'Ascenzo et al. 2006). Sowohl neuronale Progenitorzellen als auch Primärneurone des N.C. zeigten bei DIF 0 einen nahezu undifferenzierten Zustand mit geringer Spontanzillationsrate (4.1.4, Abbildung 19). DIF 4 hingegen konnte anhand stark angestiegener Peakzahlen der fortgeschrittenen Zellreife zugeordnet werden. Abweichend zu bisherigen Publikationen, in welchen nur neuronale Stamm-/Progenitorzellen (D'Ascenzo et al. 2006) oder primäre Neurone (Vogelstein et al. 2009) untersucht worden waren, wurde zusätzlich ein Vergleich vorgenommen.

### 5.2.4 Entwicklung einer speziellen Messkammer

Als Schwierigkeit stellte sich in den Versuchen eine ausgeprägte Sensibilität der Zellen auf Veränderungen der Umgebung heraus. Sobald die Umgebungstemperatur nur gering sank oder der CO<sub>2</sub>-Gehalt variierte, kam es schnell zur Reduktion der Anzahl aktiv messbarer Zellen oder sogar zur Apoptose bzw. Nekrose aller ausplattierten Zellen. Dies stellte einerseits eine Hürde im Zeitraum zwischen dem Ausplattieren der Einzelzellen und dem Start der Messung dar und zeigte sich andererseits als Problematik im Verlauf einer Calcium-Imaging-Messung. Daher wurde eine Konstruktion von Vorratskammern für die Pufferlösung auf den DG entwickelt (Abbildung 9). Hiermit konnte den Zellen pro 1cm<sup>2</sup> Fläche die dreifache Menge an Medium auf einem DG zur Verfügung gestellt werden im Vergleich dazu, wenn das Medium nur auf die Glasoberfläche aufgebracht wurde. Andernfalls wurde bereits innerhalb der ersten 12-24 Stunden ein Großteil der ausplattierten Einzelzellen avital, weshalb diese nicht vermessen und ausgewertet

## 5 - Diskussion

werden konnten. Dies war anhand der morphologischen Struktur der Zellen erkennbar sowie durch ein reines Signal-Rauschen im Calcium-Imaging. Morphologisch wiesen apoptotische/nekrotische Neurone einen fragmentierten bzw. irregulären Zellkern auf, wie es schon an geschädigten hippocampalen Neuronen der Ratte dargestellt wurde (Pang et al. 2003).

### 5.2.5 Sonstige Umgebungsparameter der Zellen

Zur Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme wurde als Pufferlösung HBSS mit  $\text{Ca}^{2+}$  in die Flusskammer hinzugefügt. Dabei dienen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen optimal der Signaltransduktion, wenn die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration niedrig ist ( $\approx 10^{-7}$  M), während die extrazelluläre Konzentration hoch ist ( $\approx 10^{-3}$  M). Zudem wird der pH-Wert konstant gehalten. Unter diesen Bedingungen können  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrations-Schwankungen bereits durch einen geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg im Zytoplasma generiert und detektiert werden (Uhlén et al. 2015).

Die Zellen waren während einer Messung auch sensibel gegenüber Veränderungen der Temperatur. Daher wurden die Flusskammer, die Pufferlösung und auch das Objektiv auf 37 °C erwärmt. Hierzu dienten eine in die Flusskammer integrierte Heizung sowie eine Heizmatte, die um das Objektiv herum montiert wurde.

### 5.2.6 Ausarbeitung einer geeigneten Fluorophor-Beladungszeit

Es musste ein passender Zeitraum für die Beladung der Zellen mit dem Fluorophor (sogenanntes Loading) gefunden werden. Während dieses Beladungszeitraums wurden die Fluorophor-Moleküle mit ihrer membranpermeablen Ester-Gruppe in die Zellen eingeschleust, wo anschließend die Estergruppe abgetrennt wurde, sodass das Fluorophor-Molekül zur Bindung freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen intrazellulär vorlag (D'Ascenzo et al. 2006).

Die zeitlichen Angaben zur Beladungszeit variieren in anderen Publikationen zwischen 15 und 30 Minuten (Barreto-Chang and Dolmetsch 2009; Yuste et al. 2011; Lock et al. 2015). Bei den neuronalen Zellen des N.C. zeigten sich innerhalb dieses Zeitraums

erhebliche Differenzen in der Anzahl überlebender Zellen, wobei nach 15 Minuten Beladungszeit ähnliche Mengen des Fluorophors mikroskopisch sichtbar waren wie nach 30 Minuten. Als Faustregel beschreibt die Literatur, dass die Beladungszeit mit 10 Minuten plus Alter der Tiere (Anzahl der Lebensstage) in Minuten gewählt werden sollte (Yuste et al. 2011). Eine Zeit von 15 Minuten Loading erwies sich somit im vorliegenden Fall als die beste Option, da die größte Anzahl an Zellen bis zu diesem Zeitpunkt überlebt hatte. Dies könnte damit zu begründen sein, dass sich einerseits die Umgebungsparameter nach einem kürzeren Zeitraum noch eher am Optimum für das Überleben der Zellen befanden und andererseits damit, dass die zytotoxische Fluorophor-Lösung eine geringere Einwirkzeit auf die Zellen hatte.

### 5.2.7 Dauer der Messungen und Zeitpunkte der Peaks

Für das Calcium-Imaging wurde ein Messzeitraum von 5 Minuten gewählt. In der Literatur schwanken die Messzeiten zwischen 10 und 600 Sekunden: Spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivitäten an hippocampalen Neuronen der Maus wurden über 300 Sekunden untersucht (Patel et al. 2015), während für Purkinjezellen der Ratte ein Zeitraum von 60-600 Sekunden gewählt wurde (Liljelund et al. 2000) und bei olfaktorischen Neuronen des Hummers über 10-100 Sekunden die Spontanaktivitäten aufgenommen wurden (Park et al. 2013). Ein Zeitraum von 300 Sekunden bzw. 5 Minuten erschien daher für das Calcium-Imaging der N.C.-Zellen als sinnvoll.

In der Literatur wurde an Motoneuronen beschrieben, dass die spontanen Oszillationen einer Zelle nicht zu vorhersehbaren Zeitpunkten und nicht in pauschaler Anzahl vorzufinden sind (Subramanian et al. 2012). Vielmehr zeigt eine Zelle unregelmäßig abwechselnd Ruhephasen und aktive Phasen auf, wobei nur in den aktiven Anteilen  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks aufzuzeichnen sind (Subramanian et al. 2012). Folglich müsste innerhalb von 5 Minuten Messzeit eine valide Aussage über die Aktivität einer N.C.-Zelle getroffen werden können, da sowohl aktive als auch Ruhephasen erkennbar waren. In aktiven Phasen treten in irregulären Intervallen  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks auf, während in Ruhephasen eine Repolarisation der Zelle stattfindet und keine Peaks messbar sind (Subramanian et al. 2012).

## 5 - Diskussion

Bei einer Verlängerung der Messzeit kam es durchschnittlich nach ca. 50-60 Minuten zur Veränderung des morphologischen Erscheinungsbilds der Zellen und zum Einbruch jeglicher Zellaktivität.

### 5.2.8 Calcium-Imaging-Auswertung durch ROI Analyse

Anders als in der Literatur häufig dargestellt (Garaschuk et al. 2000; Morita et al. 2004), wurden zu analysierende Zellareale zur Auswertung der Calcium-Imaging-Messungen sehr detailliert manuell als ROI markiert, um möglichst viele Hintergrundstörungen bei der Messung zu extrahieren und, um alle entsprechenden Areale der Zelle sehr präzise in die Auswertung mit aufzunehmen. Das Problem der Hintergrund-Fluoreszenz wurde schon mehrfach beschrieben (Molitor and Manis 2003; Maruyama et al. 2014). Um die Messwerte dennoch so präzise wie möglich aufnehmen bzw. auswerten zu können, wurde daher in der Literatur meist keine absolute Analyse vorgenommen. Stattdessen erfolgte beispielsweise eine Extraktion des Hintergrund-Fluoreszenzwertes über die Differenzbildung aus der Fluoreszenzänderung durch einen Stimulus und der Ruhefluoreszenz:  $\Delta F/F = (F_{\text{Stimulus}} - F_{\text{Ruhe}}) / (F_{\text{Ruhe}} - F_{\text{Hintergrund}})$  (Molitor and Manis 2003). Es wurde also als sinnvoll erachtet, mithilfe des Calcium-Imagings keine absoluten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, sondern Konzentrationsverhältnisse zu bestimmen (Molitor and Manis 2003). Zudem wurden in anderen Auswertungen die Fluoreszenz-Kurven normalisiert oder Skalierungsfaktoren eingeführt, um unterschiedlich räumlich verteilte Zellen vergleichen zu können (Molitor and Manis 2003).

Die Auswahl der ROI erfolgte nach jeweiliger Fragestellung. Die Definition, bei welchen Signalen es sich um  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks handelte und was hingegen zum Grundrauschen zählte, folgte nach manueller Festlegung eines Schwellenwertes. In der Literatur wurden diverse Algorithmen beschrieben, um die Bestimmung der Anzahl an  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks zu standardisieren und zu beschleunigen, wobei vollständig automatisierte Signal-Detektion jedoch als generelle Schwierigkeit dargestellt wurde (Patel et al. 2015). Als problematische Punkte wurden allgemein die stark variable Anzahl an Peaks eines jeden zu vermessenden Neurons, die unterschiedliche Dauer sowie variable Amplituden der Signale, ein Auftreten der Peaks in irregulären Intervallen und das Verdecken von Signalen durch Störsignale dargestellt, was sich auch in vorliegenden Untersuchungen bestätigte (Picht et al. 2007; Patel et al. 2015; Prada et al. 2018).

Es wurden drei verschiedene Systematiken automatisierter Signaldetektion untersucht (Patel et al. 2015). Zunächst wurde eine auf Durchschnittswerten basierende Detektion beschrieben. Dabei lag der Schwachpunkt darin, dass Signale mit stark differierender Amplitude nicht detektiert werden konnten. Eine weitere Option bestand laut Patel in einer auf Wellenlängen basierenden Analyse. Hierbei wurden Frequenzen in ihrer zeitlichen Abfolge untersucht und nach anschließend festgelegtem, wiederkehrendem Intervall Signale entsprechend detektiert. Problematisch wurde hierbei allerdings beschrieben, dass bei variierenden Frequenzen zusätzliche Peaks nicht erkannt oder Hintergrundereignisse fälschlicherweise hinzugezählt werden könnten. Eine weitere Analysemethode nutzte eine Art Vorlage, die auf einer Datenbank bekannter Signalformen basierte. Dabei wurden Koeffizienten zur Minimierung falsch-positiver und zur Maximierung richtig-positiver Signale individuell angepasst (Patel et al. 2015). Bei der letzten Methode konnten falsch identifizierte Ereignisse nachträglich manuell gelöscht sowie nicht erkannte Signale hinzugefügt werden (Schultz et al. 2009).

Bei der Analyse der Spontanoszillationen neuronaler Zellen des N.C. nach Calcium-Imaging hätte eine einfache, ausschließlich automatisierte Detektion zu ungenauen Ergebnissen geführt, da sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse in ihrer Amplitude stark unterschieden und einige Peaks nahe an den Werten des Grundrauschens lagen (Abbildung 31 und Abbildung 32), sodass sie leicht hätten herausgerechnet werden können (Prada et al. 2018). Hinzu kam außerdem durch die Belichtung der Zellen im Verlauf der Messung bei den meisten Zellen ein Ausbleichen, sogenanntes Foto-Bleaching (beispielsweise Abbildung 31 A und D). Dies müsste bei einer Auswertung alleine über einen Algorithmus zunächst herausgefiltert werden. Eine solch komplexe Berechnung konnte hier durch manuelle Nach-Bestimmung der Peak-Ereignisse umgangen werden.

Lokale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität reguliert Funktionen wie den Einsatz der Neurotransmitter, das Neuriten-Wachstum, die Dynamik an den Wachstumskegeln, aktivitäts-abhängiges Axon-Wachstum und die Netzwerk-Verschaltung (Prada et al. 2018). Es schien daher äußerst wichtig, alle  $\text{Ca}^{2+}$ -Ereignisse zeitlich detailliert aufzunehmen, um diese sensiblen Zellfunktionen entsprechend genau charakterisieren und in die Analysen einbeziehen zu können. Die vorliegenden Untersuchungen wurden daher kombiniert manuell und mithilfe eines selbst erstellten Algorithmus ausgewertet. Grundlage der Signal-Detektion bildete ein Schwellenwert, der für jede Messung individuell anhand sichtbarer Peaks in der Grafik definiert wurde (Abbildung 11I). Anhand dieses Werts wurde mithilfe eines Algorithmus die Anzahl an Peaks der entsprechenden Messreihe bestimmt.

## 5 - Diskussion

Anschließend erfolgte eine visuelle Kontrolle durch Abgleich der Peak-Zeitpunkte mit entsprechendem Fluoreszenzintensitätsanstieg in der Bildabfolge. Hierbei wurde deutlich, dass innerhalb neuronaler Netzwerke einerseits Erregungen auftraten, die bis in die Randareale eines Netzwerks fortgesetzt wurden, andererseits aber auch Spontanoszillationen zustande kamen, die sich auf ein lokales Zellareal beschränkten (4.2.4, Abbildung 28 und Abbildung 29).

### 5.2.9 Alternative Bestimmungsmethode der $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität

In der Literatur wurde neben dem Calcium-Imaging eine weitere Methode zur Erfassung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität von Neuronen herangezogen, die teils zugleich als Kontrolle der Messergebnisse des Calcium-Imagings diente: die Patch-Clamp-Messung. Bei dieser Messmethode können die elektrischen Ströme und damit die Aktivitäten einzelner Zellen abgeleitet werden (Prada et al. 2018). Diese Kontrollmessung wurde in vorliegenden Untersuchungen nicht durchgeführt. Hier sollte das Hauptaugenmerk auf der Entwicklung eines optimal angepassten Calcium-Imaging-Protokolls zur Live-Untersuchung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivitäten von neuronalen Zellen des N.C. im Verlauf der Maturation liegen. Die Patch-Clamp-Messung an N.C.-Zellen wäre allerdings eine künftig denkbare Weiterführung der Untersuchung neuronaler Spontanaktivitäten des N.C.

## 5.3 Analyse von primären Neuronen und NSCs des N.C. mittels Calcium-Imaging

### 5.3.1 Untersuchung der Spontanaktivität in Form von $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen in Zusammenhang mit der Maturation

Spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen treten mit zahlreichen Funktionen während der Entwicklung des Nervensystems auf, wo sie grundlegende Prozesse beeinflussen: die Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen (Blankenship and Feller 2010; Rosenberg and Spitzer 2011; Yamamoto and Bendito 2012).  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind in Neuronen für viele Prozesse als Signalmolekül von Bedeutung. Zellen haben in ihrem Ruhezustand eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 100 nM, wobei diese bei aktivierten Zellen auf eine

bis zu 100-fache Konzentration ansteigt (Berridge et al. 2000). Spontanaktivität wurde beispielsweise in Netzwerken unreifer Neurone der Retina (Meister et al. 1991), im Hippocampus neonataler Ratten (Garaschuk et al. 1998), in embryonalen Zellen des Spinalkanals (Gonzalez-Islas and Wenner 2006), in auditorischen Nervenzellen (Tritsch et al. 2007) und in Purkinjezellen (Watt et al. 2009) identifiziert.

Ca<sup>2+</sup>-Aktivität ist im Verlauf früher neuronaler Zellentwicklung stark abhängig von Gap Junctions und spannungsgesteuerten Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (Voltage Gated Calcium Channels/VGCCs), während die spätere Entwicklung zudem von Neurotransmittern und Synapsen bestimmt wird (Uhlén et al. 2015). Im Verlauf der Maturation sind daher zum einen VGCCs und zum anderen sich entwickelnde interzelluläre Synapsen für das Verhalten neuronaler Zellen von Bedeutung.

Zur Charakterisierung der Maturation neuronaler N.C.-Zellen wurde daher im Rahmen des Calcium-Imagings die Ca<sup>2+</sup>-Aktivität sowohl innerhalb einzelner Zellen als auch in neuronalen Netzwerken untersucht (4.2), sodass einerseits die Zellaktivitäten intrazellulär lokalisiert sowie quantifiziert (4.2.1 bis 4.2.3) und andererseits die Kommunikation der Zellen untereinander analysiert werden konnten (4.2.4).

Es wurden drei Hauptgründe definiert, weshalb spontane oder zellautonome Erregungen noch unzureichend untersucht sind: 1. Ca<sup>2+</sup>-Ströme können an lokal stark begrenzten Arealen auftreten und ihre zeitlich-räumliche Komponente ist unvorhersehbar. 2. Proteine, die an der neuronalen Erregung beteiligt sind, zeigen eine hohe funktionelle Vielfalt, abhängig vom Ort des Reizes. 3. Neuronale Signale können sehr schnell und gering sein, sodass es schwierig ist, tatsächliche Ereignisse zwischen dem Grundrauschen zu erfassen (Prada et al. 2018). Diese Gedanken galt es in vorliegender Untersuchung mit aufzunehmen.

Für die neuronalen Zellen des N.C. bestand die Annahme, dass sich die Grundaktivität der Neurone im Verlauf der Zelldifferenzierung verändere, was sich in Form veränderter Ca<sup>2+</sup>-Ströme zeigen könnte. Somit wäre es möglich, verschiedenen Stadien der Zellmaturation spezifische Zellaktivitäten zuzuordnen und die Reifung der Zellen charakterisieren zu können. Anhalt hierfür gibt beispielsweise eine jüngere Untersuchung von NSCs der Großhirnrinde neonataler Mäuse, bei der sich im Verlauf einer 12-Tage-Periode der Zelldifferenzierung der Anteil an NSCs, die Ca<sup>2+</sup>-Signale exhibierten, relativ zur Membrandepolarisation signifikant erhöhte (D'Ascenzo et al.

## 5 - Diskussion

2006). Auch am erwachsenen Hippocampus wurde gezeigt, dass Neurogenese durch Membrandepolarisation gefördert wird, die in den Untersuchungen durch einen Anstieg der Aktivität in neuronalen Netzwerken imitiert wurde. Eine Generierung des Stimulus durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, welche wiederum durch Aktivierung von VGCCs und Glutamat-Rezeptoren zustande kamen, wurde vermutet (Deisseroth et al. 2004).

Zur Analyse der Spontanaktivität von primären Neuronen und NSCs des N.C. wurden die Oszillationen der Zellen unter Einfluss von RA zwischen frühem Stadium der Differenzierung und fortschreitender Maturation untersucht. Um den Zeitraum der Zellentwicklung der NSCs hervorzuheben, wurde bei der direkten Gegenüberstellung der Begriff der (Zell-)Differenzierung auch für die Primärneuronen verwendet, obwohl es sich hierbei eher um eine Zellreifung handelt, da die Zellen bereits in einem innerhalb der neuronalen Linie zu Neuronen differenzierten Zustand vorliegen (Sohur 2006).

Es zeigte sich eine Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität im Verlauf der Zelldifferenzierung bis zu einem Höhepunkt. Am Tag 0 der Zelldifferenzierung (DIF 0) waren bei primären Neuronen in 5 min durchschnittlich  $8,33 \pm 0,52$  spontane Oszillationen in den Zellen vorhanden. Diese stiegen auf eine Anzahl von  $17,03 \pm 0,73$   $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks zum Zeitpunkt DIF 4 an, womit ein Höhepunkt spontaner Zellaktivität erreicht war (Abbildung 20 A). Anschließend sank die Zahl spontaner Oszillationen über DIF 8 und DIF 12 bis zu DIF 16 auf durchschnittlich nur noch  $3,75 \pm 1,15$  Peaks in 5 Minuten. NSCs zeigten ein sehr ähnliches Verhalten: Hier ließen sich im undifferenzierten Zustand bei DIF 0 nur  $1,55 \pm 0,12$  Peaks messen. Die Aktivität stieg bis DIF 4 auf  $25,35 \pm 0,81$   $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks an, womit auch hier der Höhepunkt erreicht war. Danach sank die Zahl spontaner Oszillationen von DIF 8 mit  $10,35 \pm 0,98$  Peaks über DIF 12 bis zu DIF 16 auf nur noch  $0,55 \pm 0,15$  Peaks pro 5 Minuten.

Ein ähnliches Verhalten konnte 2015 anhand corticaler Neurone der Maus dargestellt werden: Die spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität der Neurone wurde zum Beginn der Migration mit dem ausgewachsenen Zustand verglichen (Bando et al. 2015). Diese Zellen zeigten  $1,3 \pm 0,2$  positive Ereignisse innerhalb von 10 Minuten Messzeit im unreifen Zustand. Bei ausgereiften Neuronen hingegen waren  $2,4 \pm 0,2$  Peaks in 10 Minuten zu verzeichnen. Somit wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl spontaner Erregungen zwischen unreifem und ausgereiftem Zustand gezeigt. Zudem wurde der prozentuale Anteil aktiver Zellen dargestellt: Nur 7,8% der vermessenen 295 Neurone waren im

unreifen Zustand aktiv, während 25,4% von 244 ausgereiften Neuronen Spontanerregungen zeigten. Auch hier war der Unterschied signifikant. Bando beschrieb, dass den Ergebnissen zufolge ein Anstieg der spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität ein wichtiges Kennzeichen für Zellmigration und Dendritenwachstum darstellt (Bando et al. 2015). Zudem zeigte diese Publikation, dass nicht nur  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme generell für die neuronale Entwicklung entscheidend sind, sondern auch dass ein ganz bestimmter Aktivitäts-Level für die jeweiligen Stadien der Reifung und der Zelllokalisierung *in vivo* von großer Bedeutung ist. Außerdem stellte Bando dar, dass ein signifikanter Anstieg der spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme im Verlauf der Zellentwicklung die Zellmigration stoppt und somit den entscheidenden Anstoß für die Dendritenformation gibt (Bando et al. 2015). Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse der Untersuchungen an den N.C.-Zellen: Sowohl die primären Neurone als auch die NSCs des N.C. zeigten einen Anstieg spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität im Verlauf der Maturation. Außerdem war nach einem Anstoß der Zellreifung eine zunehmende Ausprägung der Neuriten-artigen Ausläufer bis zu einem Maximum zu verzeichnen (Abbildung 17). Auch andere Publikationen zeigten derartige Parallelen zwischen spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivitäten und der Zellmaturation: Anhand von Patch-Clamp-Messungen war an corticalen Neuronen der Maus ein Anstieg spontaner Aktionspotentiale im Verlauf der Reifung des hippocampalen Cortex zwischen postnatalem Tag P0 und P10 zu verzeichnen (Bahrey and Moody 2003). Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Natrium-Kanal-Ströme und der Zunahme von Aktionspotentialen, der Aktivierung von VGCCs sowie dem Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms dargestellt (Luhmann et al. 2000; Bahrey and Moody 2003; Moore et al. 2008).

Im Vergleich zwischen primären Neuronen und NSCs war insgesamt eine höhere Grundaktivität bei den primären Neuronen zu Beginn und in der Spätphase der Differenzierung zu messen. Dieses Phänomen könnte damit zu erklären sein, dass primäre Neurone ein direktes Präparat aus dem Hirngewebe darstellen, während NSCs eine Selektierung über die Zeit der Kultivierung erfahren. Demnach würden sich primäre Neurone bereits in einem weiter fortgeschrittenen Stadium befinden als noch undifferenzierte NSCs. Zum Maximum der Spontanoszillationen bei DIF 4 zeigten die NSCs hingegen eine höhere Aktivität als die primären Neurone. Dies könnte damit zu erklären sein, dass NSCs zu diesem Zeitpunkt eine stärkere Verzweigung untereinander ausgebildet hatten. So könnte eine schnellere und stärkere Reizweiterleitung zwischen den Zellen stattfinden, was die höhere Grundaktivität erzeugen könnte.

## 5 - Diskussion

Nicht nur eine Veränderung der Anzahl an Spontanaktivitäten war im Verlauf der Zelldifferenzierung zu messen, sondern auch eine morphologische Veränderung an den neuronalen Zellen des N.C. war erkennbar (Abbildung 17). In der sehr frühen Phase der Zelldifferenzierung (DIF 0) zeigten NSCs überwiegend wenige bis keine Neuriten-artigen Ausläufer (Abbildung 17 A, E, I). Bereits 24h später (DIF 1) befanden sich die NSCs in einem bipolaren Zustand (Abbildung 17 B, F, J). Im weiteren Verlauf der Differenzierung nahm die Anzahl der Zellausläufer zu. Zu DIF 2 waren teilweise drei Ausläufer sichtbar (Abbildung 17 C,G,K) und zu DIF 5 befanden sich die differenzierten NSCs bereits im multipolaren Zustand (Abbildung 17 D,H,L). Bei primären Neuronen war eine ähnliche Umwandlung der Morphologie zu erkennen (Abbildung 15 A, B). In der Literatur wurden Differenzierungsstadien auch anhand der Zellmorphologie festgemacht. Arnhold beschrieb an aus embryonalen Maus-Stammzellen differenzierten Neuronen, dass sich die Zellen von einem unipolaren über einen bipolaren bis hin zu einem multipolaren Zustand veränderten (Arnhold et al. 2000a), was den Beobachtungen an den primären Neuronen und NSCs des N.C. entspricht.

### 5.3.2 Evaluation der Spontanaktivität in verschiedenen zellulären Kompartimenten

Zum besseren Verständnis der Entstehung einer Spontanerregung innerhalb einer einzelnen N.C.-Zelle und der Interaktion der Zellen untereinander erfolgte eine detailliertere intrazelluläre Analyse. Dies war insbesondere bei der Interaktion zwischen mehreren neuronalen Zellen des N.C. innerhalb eines Netzwerks von Bedeutung, da durch genauere Vorstellung des Zusammenhangs von Entstehungsareal und Richtung der Reizweiterleitung die Interaktion zwischen den Neuronen besser verstanden werden kann.

Die elektrische Reizweiterleitung verläuft intrazellulär meist in eine Richtung, was mit der anatomischen Struktur eines Neurons begründet werden kann: Somatodendritische Inputs verlaufen über die synaptischen Verbindungen vom Soma des einen zu den Dendriten eines anknüpfenden Neurons. Nach Weiterleitung der Signale von den Dendriten zum Soma findet dort eine Signalverarbeitung statt. Im Anschluss werden neue Signale im Initialsegment des Axons erzeugt und entlang des Axons bis zur Zielzelle weitergeleitet. Somit kommt eine eindeutige Richtung in der Weiterleitung der

Aktionspotentiale innerhalb eines Neurons zustande. Aber eine starke Spontanerregung wird nicht ausschließlich nach peripher weitergeleitet, sondern gelangt ebenfalls im Zellkörper in die Areale, welche vom letzten Reiz bereits erholt sind – es kommt zu einer Art Signal-Rückstoß (Eyzaguirre and Kuffler 1955). Dieses Phänomen könnte die gleichartigen Impulse erklären, die sich bei den N.C.-Zellen zwischen Soma und Axon darstellten (4.2.2, Abbildung 21). Elektrische Kopplung zwischen Axon und Soma ist ein bekanntes Phänomen (Stuart et al. 1997; Rasband 2010; Kole 2018). Darüber kann anhand der Erregungsmuster in den unterschiedlichen Neuriten gegenüber dem Soma eine Unterscheidung von Dendriten und Axon eines Neurons vorgenommen werden: Elektrisch gekoppelte Systeme in Form von Axon und Soma zeigen das gleiche Erregungsmuster. Bei genauem zeitlichem Vergleich der auftretenden  $Ca^{2+}$ -Peaks zeigte sich in den untersuchten Zellen, dass genau ein Neurit eines Neurons ein nahezu deckungsgleiches Erregungsmuster zu dem des entsprechenden Somas aufwies. Die Erregungen aller weiteren Neuriten traten zeitlich versetzt oder sogar mit vollständig anderem Muster auf (Abbildung 21). Es war ein signifikanter Unterschied zwischen dem prozentualen Anteil der im Neuriten 1 und 2 und im Soma zu gleichen Zeitpunkten auftretenden Spontanoszillationen zu verzeichnen (Abbildung 22). Bei dem Vergleich der Anzahl spontaner Erregungen zwischen Soma, Axon und Neuriten zeigte sich sowohl bei primären Neuronen als auch bei NSCs zu DIF 0 im Soma eine signifikant höhere Peakzahl als in den Neuriten, wohingegen zwischen Axon und Dendrit kein signifikanter Unterschied bestand (Abbildung 23 A und C). Bei DIF 4 war tendenziell in den Neuriten eine etwas höhere Anzahl an  $Ca^{2+}$ -Peaks zu messen als im Soma; zwischen Axon und Dendriten war jedoch auch hier kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (Abbildung 23 B und D). Somata zeigten also zu Beginn der Zelldifferenzierung v.a. bei primären Neuronen eine höhere Aktivität, die während der Maturation von der Aktivität in den Neuriten übertroffen wurde. Die Ursache für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass die Zellreifung von den Zellfortsätzen vorangetrieben und gesteuert wird (Lowery and Van Vactor 2009).

In der direkten Gegenüberstellung der Peakzahlen zwischen DIF 0 und DIF 4 in den drei Zellkompartimenten Soma, Axon und Dendriten wurde deutlich, dass in NSCs mit zunehmender Zellreifung eine deutlich höhere Diskrepanz in der Anzahl spontaner Erregungen im Vergleich zu DIF 0 entstand als bei primären Neuronen (Abbildung 24). Dies könnte damit zu erklären sein, dass sich primäre Neurone bereits in einem weiter

## 5 - Diskussion

fortgeschrittenen Stadium der Zelldifferenzierung befinden als NSCs (Lendahl and McKay 1990).

Auffällig war, dass ein Areal innerhalb einer Zelle besonders starke spontane Erregungen erzeugte (4.2.3). Dabei handelt es sich um den Wachstumskegel, wie in anderen Publikationen auch beschrieben (Henley and Poo 2004; Subramanian et al. 2012). Wachstumskegel bilden axonale Endigungen während des neuronalen Wachstums, welche zahlreiche spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle enthalten (Lowery and Van Vactor 2009). Sie dienen vor allem dazu, einerseits die Richtung des Zellwachstums vorzugeben und andererseits ankommende Reize in Signale für Zellwachstum bzw. -vernetzung zu übersetzen, wodurch Zellbeweglichkeit ermöglicht wird (Lowery and Van Vactor 2009). Ein großer Teil dieser Funktionen wird über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gesteuert (Kater et al. 1988). Daher könnte eine verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität an den Wachstumskegeln für die Maturation eines Neurons eine bedeutende Rolle spielen. Neurone im Wachstum zeigen eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität im Bereich der Wachstumskegel (Kater et al. 1988), was die Ergebnisse des Calcium-Imagings an primären Neuronen und NSCs des N.C. widerspiegelten (4.2.3, Abbildung 27).

Wachstumskegel können in ihrer Feinstruktur unterschiedliche Formen und Größen aufweisen: Typischerweise haben sie entweder Filopodien-artige oder Lamellipodien-artige Strukturen (Dent and Gertler 2003). Unter 40-facher Vergrößerung erschienen die Wachstumskegel der N.C.-Zellen als Dreiecksform oder als Verdickung des Axons (Abbildung 25 und Abbildung 26).

### 5.3.3 Evaluation der Spontanaktivität nach neuronaler Netzwerkbildung

Für die weitere Untersuchung der N.C.-Zellen galt es, die bereits analysierten Eigenschaften der Einzelzellen auf die Charakterisierung der Interaktion der Zellen in Netzwerken auszuweiten. In einem neuronalen Netzwerk können lokale und globale Zellaktivitäten unterschieden werden. Dabei wurden Aktivitäten als global beschrieben, wenn diese in mehreren Zellen eines Netzwerks synchron auftraten, wohingegen lokale Aktivitäten nur beschränkt auf ein Zellareal zu finden waren. Zum selben Zeitpunkt war bei lokaler Aktivität kein gleichartiges Erregungsmuster in den übrigen Arealen einer Zelle messbar (Subramanian et al. 2012). Diese beiden Arten von Aktivitäten konnten

bei den N.C.-Zellen ebenfalls nachgewiesen werden (4.2.4, Abbildung 28 und Abbildung 29).

Sie könnten Auskunft über die Funktionsweise bzw. Vernetzung der Zellen in einem Netzwerk geben. Das Auftreten globaler Aktivitäten *in vitro* sowohl bei primären Neuronen als auch bei NSCs des N.C. könnte ein Indiz für das Zusammenspiel der Zellen innerhalb eines Netzwerks sein, welches *in vivo* die Grundlage für die neuronale Plastizität darstellen könnte (Berlucchi and Buchtel 2009).

Wie auch als Einzelzellen zeigten sich maturierende N.C.-Zellen im Netzwerk morphologisch bi- oder multimorph und hatten schlanke Zellkörper mit Neuriten-artigen Ausläufern (Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17). Im Verlauf der Maturation vermehrten und verzweigten sich diese Zellausläufer, sodass ein komplex verzweigtes Netzwerk entstand und die Zellen untereinander Kontakt aufnehmen konnten. Zellen, die einzeln lagen, zeigten deutlich geringere Aktivitäten als miteinander vernetzte Zellen und gingen mit der Zeit zugrunde. Dieses Phänomen wurde von Patel et al. ebenfalls beschrieben (Patel et al. 2015). In Patels Untersuchung erfolgte eine Auswertung der Spontanaktivitäten über einen Differenzierungszeitraum von DIF 8 bis DIF 21. Bei einzeln liegenden Zellen waren nur wenige Spontanaktivitäten zu messen und Zellen, die sich bereits in einem kleinen Netzwerk befanden, zeigten unkoordinierte Aktivitäten. Je stärker die Zellen durch weitere Differenzierung untereinander verbunden waren, desto mehr synchron verlaufende Peakereignisse waren vorzufinden (Patel et al. 2015). Eine Erklärung dieses Phänomens war auch in anderen Publikationen zu finden (Nakayama et al. 2005; Voigt et al. 2005; Tetzlaff et al. 2010): Zellen bilden synaptische Verbindungen aus, die sich mit der Zeit vermehren. Es folgt die sogenannte Synapseneliminierung, wodurch nur ein bestimmtes Kontingent an Synapsen bestehen bleibt. Dies stellt die Grundlage der Neuroplastizität dar. So kann sich ein komplexes Netzwerk aus miteinander verknüpften Zellen aufbauen. Die Entwicklung dieser spontanen und synchronen Zellaktivität wurde in der Literatur davon abhängig gemacht, dass sich Oberflächenrezeptoren auf der Zellaußenseite ausbilden und vermehren, sich Ionenströme während der Maturation verändern und eine Balance zwischen Exzitation und Inhibition entsteht (Opitz et al. 2002; Misonou et al. 2004; McCabe et al. 2006; Klueva et al. 2008).

Spontane neuronale Aktivität stellt sich als eine Art Markenzeichen im Verlauf der Entwicklung des ZNS dar (Garaschuk et al. 2000). Die Voraussetzung für die Entstehung

## 5 - Diskussion

und Weiterleitung spontaner Oszillationen bildet eine Kommunikation unter den Zellen. Daran sind vor allem Gap Junctions und neuronale Synapsen mit intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern,  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und -Rezeptoren beteiligt (Garaschuk et al. 2000). Wie sich Reize innerhalb einer Zelle und zwischen mehreren Zellen in neuronalen Netzwerken fortsetzen, wurde bereits an zahlreichen Zellarten untersucht (Blum et al. 2010). Die Oszillationen unterscheiden sich demnach nicht nur in dem ihnen zugrunde liegenden Entstehungs-Mechanismus, sondern auch in ihrem spezifischen Muster (Garaschuk et al. 2000). Im unreifen Neocortex detektierte Garaschuk neuronale Aktivität in Form spontaner Oszillationen in Einzelzellen, Zellpaaren und Gruppen von 5 bis 50 Neuronen, was er als neuronale Domänen bezeichnete (Garaschuk et al. 2000). Ebenso zeigten sich bei der Untersuchung von primären Neuronen und NSCs des N.C. Muster spontaner Oszillationen und bestimmter Eigenschaften der Kommunikation unter den Zellen in neuronalen Netzwerken. Zum einen wurde deutlich, dass innerhalb eines neuronalen Netzwerks mehrere Zellen zur gleichen Zeit eine zellautonome Spontanaktivität, die sogenannte globale Aktivität, aufzeigen konnten (4.2.4, Abbildung 28).

Zum anderen wurde ein zeitlich-örtlicher Zusammenhang bei der Erregungsausbreitung in den Netzwerken deutlich, da die lokal auftretenden Oszillationen sichtbar über benachbarte Neurone weitergeleitet wurden. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme wurden mit dem Calcium-Imaging-Verfahren detektiert und aufgezeichnet. Hierbei könnte eine Übertragung von Spontanaktivitäten einzelner Zellen eines Netzwerks über Gap Junctions stattgefunden haben, da diese eine schnelle Reizweiterleitung sicherstellen. Auch in anderen Publikationen wurde beschrieben, dass in neuronalen Netzwerken unvorhersehbare zeitlich-räumliche Muster, ausgehend von Axonen und Dendriten, auftraten (Prada et al. 2018).

Insgesamt war es in der vorliegenden Untersuchung möglich, einen Zusammenhang zwischen spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität und Maturation von primären Neuronen und NSCs des N.C. darzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass intrazellulär eine Reizweiterleitung in eine Richtung stattfindet, welche sich in Form globaler und lokaler Erregungen interzellulär im Netzwerk abbildet. Diese Charakterisierung von Einzelzellen und Netzwerken des N.C. deutet auf ein entwicklungsabhängiges neurogenes Potential des N.C. hin.

### 5.3.4 Untersuchung und Nachweis von $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen

Grundlage für die Charakterisierung der Zellen anhand ihres  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts ist, dass Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivitäten aus einem Zusammenspiel von  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und Entladung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zustande kommen (Dolmetsch 1994; Bardo et al. 2006). Es gibt zahlreiche unterschiedliche Zellstrukturen mit Mechanismen, die dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch zwischen intra- und extrazellulärem Raum unterliegen: spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (VGCC – Voltage Gated Calcium Channels), ionotrope Glutamat-Rezeptoren, nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren und transiente Rezeptoren (Fucile 2004; Ramsey et al. 2006; Higley and Sabatini 2008; Grienberger and Konnerth 2012).  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden durch die Plasma-Membran-  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und den Natrium-  $\text{Ca}^{2+}$ -Tauscher aus dem Zytosol zurück nach extrazellulär geschleust. Die Freigabe von  $\text{Ca}^{2+}$  aus internen Speichern – v.a. dem endoplasmatischen Retikulum (ER) – wird über Inositoltrisphosphat- und Ryanodin-Rezeptoren gesteuert. Die hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher kann wiederum durch Rücktransport des  $\text{Ca}^{2+}$  durch die Sarko-/Endoplasmatische-Retikulum-  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) aufrechterhalten werden. Auch Mitochondrien tragen entscheidend zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bei: Sie stellen eine Art  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer dar, indem sie  $\text{Ca}^{2+}$  während des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs mithilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporters aufnehmen und anschließend langsam über den Natrium-  $\text{Ca}^{2+}$ -Tauscher ins Zytosol entlassen (Duchen 2004; Grienberger and Konnerth 2012).

Innerhalb der Gruppe der spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zeigt sich eine große Varietät. Gemäß dem Schwellenwert ihrer spannungsabhängigen Aktivierung werden sie in High- und Low-Voltage-activated-Kanäle (HVA und LVA) kategorisiert. HVA-Kanäle sind, abhängig von biophysikalischen, pharmakologischen und molekularen Eigenschaften, weiter zu unterteilen in L-, P/Q-, N-, R- und T-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Je nach Zelltyp und Zellkompartiment können verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle auftreten und ihr Vorkommen kann prozentual unterschiedlich verteilt sein. Die Untersuchung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen wird zur Aufzeichnung der Zellaktivität in Form von AP *in vivo* (Stosiek et al. 2003) und *in vitro* genutzt, wobei entscheidend ist, dass die VGCC den Haupt-Trigger für ein AP darstellen (Mao et al. 2008).

Es galt zunächst, die VGCC in primären Neuronen und NSCs des N.C. nachzuweisen. Dieser Nachweis erfolgte immunzytologisch mithilfe des Anti-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal- $\alpha_1$ -Pan-Antikörpers, welcher an die  $\alpha_1$ -Untereinheit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bindet (4.3.1). Dieser Antikörper wurde ebenfalls in anderen Publikationen eingesetzt, beispielsweise zum

## 5 - Diskussion

Nachweis von VGCC in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns der Maus (Dučić et al. 2012). Es ließen sich sowohl bei primären Neuronen als auch bei NSCs des N.C. im reifen Zustand (DIF 4) spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle nachweisen (Abbildung 30).

Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase spielt eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Zelldifferenzierung (Arnhold et al. 2000a). Hierbei stellen spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle einen der wichtigsten Wege für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in neuronale Zellen dar. Darüber werden zahlreiche Funktionen der Zellen gesteuert, wie z. B. die Motilität der Wachstumskegel und die Entwicklung der Neuriten. Für diese unterschiedlichen Aufgaben dienen die verschiedenen Subtypen der VGCC (Arnhold et al. 2000a). Diese Kanäle stellen durch ihre selektive Beeinflussung der Zellentwicklung sowie der Freisetzung von Neurotransmittern zum Auslösen chemischer Signale sehr wichtige pharmakologische Angriffspunkte zur spezifischen, chemotherapeutischen Behandlung bestimmter Erkrankungen dar (Arnhold et al. 2000b).

An embryonalen Stammzellen der Maus wurde eine Veränderung vorkommender VGCC im Verlauf der Maturation der Zellen dargestellt (Arnhold et al. 2000a). Außerdem konnte eine enge Korrelation zwischen der Zelldifferenzierung und der Dichte an  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen verzeichnet werden, wobei den  $\text{Ca}_v1$ -Kanälen (L-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen) ein großer Anteil an den aufgezeichneten  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen zuzuschreiben war (D'Ascenzo et al. 2006).

Arnhold beschrieb anhand embryonaler Stammzellen von Mäusen, dass im Verlauf der Zelldifferenzierung der prozentuale Anteil von L- und N-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen abnahm, während der Anteil von P/Q- und R-Typ-Kanälen zunahm. In jedem Stadium der Zelldifferenzierung konnte er allerdings alle Subtypen spannungsgesteuerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle nachweisen (Arnhold et al. 2000a).

$\alpha_1$ -Untereinheiten (UE) können wiederum in  $\alpha_1A$ -UE bis  $\alpha_1E$ -UE unterteilt werden. Eine Unterscheidung der unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle anhand der verschiedenen UE konnte bei den N.C.-Zellen im Verlauf der Maturation mit dem Anti- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal- $\alpha_1$ -Pan-Antikörper nicht vorgenommen werden, da dieser alle  $\alpha_1$ -UE der VGCC markiert. Nach der Beschreibung von Schneider und Wakamori liegen in P/Q-Typ-Kanälen die  $\alpha_1A$ -UE vor, in N-Typ-Kanälen die  $\alpha_1B$ -UE, in L-Typ-Kanälen die  $\alpha_1C/D$ -UE und N-Typ-Kanäle repräsentieren die  $\alpha_1E$ -UE (Schneider et al. 1994; Wakamori et al. 1994; Arnhold et al. 2000b; Zhang et al.) Daher wurde eine Differenzierung der verschiedenen UE und somit der unterschiedlichen VGCCs für die Zellen des N.C. darüber vorgenommen, dass mit

Hilfe verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Inhibitoren die VGCCs in der Live-Messung der Zellen bei DIF 4 blockiert und somit analysiert wurden.

Dazu wurden verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Inhibitoren eingesetzt, die jeweils spezifisch die unterschiedlichen Arten spannungsgesteuerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle inhibieren können (4.3.2). Sie wurden entweder zu Bild 1000 oder zu Bild 1200 von 2400 Bildern zur Messung hinzugegeben, um vor Inhibitorzugabe eine ausreichende Verifizierung für Peakereignisse zu haben und nach der Zugabe noch einen genügend langen Messzeitraum für die mögliche Wirkung sehen zu können. Fände eine Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms durch die Zellmembran statt, was sich anhand eines veränderten Musters der Spontanerregungen beim Calcium-Imaging zeigen würde, wäre dies eine positive Bestätigung, dass ein entsprechender  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vorhanden wäre. Andernfalls wäre der  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Zellen durch den zugesetzten Inhibitor nicht beeinflussbar. Die Ergebnisse sahen für primäre Neurone und NSCs sehr ähnlich aus. Nifedipin wurde als Blocker der L-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eingesetzt (Catterall et al. 2005). Hier zeigte sich eine deutliche Veränderung des ursprünglichen Oszillationsmusters der Zellen. Die Erregungskurve des Calcium-Imagings stieg nach Zugabe von Nifedipin in einem Großteil der Zellen steil an (Abbildung 31 B und Abbildung 32 B). Dieses Verhalten könnte einen schnellen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts durch Inhibition der L-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und anschließend auch fehlenden oder verzögerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom darstellen. Kurtoxin gilt als Inhibitor der T-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Catterall et al. 2005). Es bewirkte bei den N.C.-Zellen eine Erhöhung der Anzahl spontaner Oszillationen (Abbildung 31 E und Abbildung 32 E), ebenso wie SNX-482, das zur Regulierung der R-Typ-Kanäle dient (Abbildung 31 D und Abbildung 32 D) (Catterall et al. 2005). Dies könnte eine Vermehrung intrazellulär freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Beeinflussung der R- und T-Typ-Kanäle signalisieren. Beim Einsatz von  $\omega$ -Conotoxin, das auf die P/Q- und N-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle wirkt (Yu et al. 2010), traten nur geringe Veränderungen der Spontanerregungen auf (Abbildung 31 C und Abbildung 32 C). Anders als in der Literatur beschrieben und auch hier ursprünglich erwartet, sank die Fluoreszenzintensität, die sich proportional zur intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verhielt, bei Einsatz der Inhibitoren nicht auf ein Minimum ab, sondern stieg in unterschiedlichem Maß an (4.3.2). Ein solches Verhalten könnte grundsätzlich mit der Annahme korrelieren, dass durch entsprechende Wirkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker, die an der Zellmembran angreifen, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Austausch zwischen intra- und extrazellulär stagnieren würde. So war die Erwartung, dass die beim Calcium-Imaging entstehende Intensitätskurve zu einer Nulllinie würde, sobald ein Inhibitor an die Zellmembran gebunden hätte - sofern die

## 5 - Diskussion

entsprechend angreifbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vorhanden wären. Ein solches Verhalten erklärte Bando anhand corticaler Neurone der Maus: Hier zeigte sich eine minimale Verringerung der Frequenz an  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen durch den P/Q-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker, während sich eine signifikante Reduktion an Spontanerregungen durch die L- und N-Typ-Inhibitoren abbildete. Eine geringe Signal-Reduktion war auf den T-Typ-Blocker hin zu verzeichnen. Bando schloss daraus, dass VGCCs vom L-, N- und T-Typ bei der Generierung spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme im Verlauf der Migration corticaler Neurone involviert sind (Bando et al. 2015).

Bei den N.C.-Zellen zeigten sich unterschiedliche Reaktionen auf die Inhibitoren, die aber in keinem Fall zu einem vollständigen Erlöschen der Erregungen führten. Dennoch könnte dies die Hypothese bestärken, dass alle Arten spannungsgesteuerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in primären Neuronen und NSCs des N.C. in unterschiedlicher Anzahl vorhanden sind, da eine bestimmte und wiederkehrende Art der Aktivitätsveränderung in Abhängigkeit vom eingesetzten Inhibitor nachzuweisen war (Abbildung 33). Außerdem könnten unter Einsatz der Hemmstoffe weiterhin intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher entleert werden, sodass die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zunehmend ansteigen und so - anders als teils in der Literatur beschrieben - die Erregungen verstärkt und teilweise sogar überlagert werden könnten. Hiermit wäre eine derartige Musterveränderung der Kurve der Spontanerregungen zu erklären, wie sie hier aufzufinden war. Die Auswertung dieser Kurven wurde manuell durchgeführt, da nicht bei jedem Inhibitor ausschließlich eine Art der Veränderung der Anzahl spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Peaks zu beobachten war, sondern eine vollständige Variation der Erregungsmuster zustande kam (Abbildung 31 und Abbildung 32). Dies hätte eine Peak-Zählung über einen Algorithmus deutlich erschwert.

Insgesamt zeigte sich also, dass VGCCs in den primären Neuronen und NSCs des N.C. vorhanden waren und sich deren aktive Beteiligung an der Maturation der Zellen als wahrscheinlich erwies.

An hippocampalen Neuronen war in der Literatur mehrfach gezeigt worden, dass es zu einer zunehmenden Dichte von VGCCs im Verlauf der Maturation der Zellen kommt (Sher et al. 1991; Hilaire et al. 1996; Jones et al. 2014). Zudem wurde eine Veränderung des Auftretens der unterschiedlichen Subtypen von VGCCs während der Zellreifung dargestellt, wobei N-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vorwiegend der frühen hippocampalen Differenzierung zugeordnet wurden, während P/Q-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen eine Neurotransmittersteuerung in allen Stadien der Maturation zugeschrieben wurde (Verderio et al. 1995).

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Charakterisierung der NSCs des N.C. im Hinblick auf ihre Maturation und Interaktion in neuronalen Netzwerken sowie eine Analyse der Möglichkeiten nichtinvasiver Beeinflussung dieser Zellen.

Innerhalb der Ergebnisse dieser Dissertation konnte eine Abhängigkeit der neuronalen Reifung von der Zellaktivität in Form von  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen nachgewiesen werden. Hierfür zeigte sich ursächlich eine Variation in der qualitativen und quantitativen Verteilung von VGCCs und ihrer Spontanaktivität innerhalb der Zellareale im Verlauf der neuronalen Maturation. Interessanterweise zeigten NSCs ein ähnliches Verhalten wie primär kultivierte Neurone, einerseits in Bezug auf ihr Aktivitätsmuster während der Differenzierung, andererseits bezüglich ihrer Möglichkeit der Inhibierung, was auf eine ähnliche Expression von VGCCs hinweist. Die höchste neuronale Aktivität zeigte sich bei beiden Zellarten am Tag 4 der Zelldifferenzierung. Die neurogene Nische, die in der Literatur sowohl bei Ratten (Rak et al. 2011) als auch bei Mäusen (Volkenstein et al. 2013) im N.C. nachweisbar war, könnte somit zur Analyse pathologischer Prozesse sowie auch zu deren Behandlung in Betracht gezogen werden. Hierfür wäre die Entwicklung einer gesteuerten neuronalen Regeneration (GNR) denkbar. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zeigen verschiedene Ansätze auf, die in eine solche Therapie einzubeziehen wären. Es konnte gezeigt werden, dass sich die NSCs des N.C. durch Veränderung ihres  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts stark in ihrer Aktivität und folglich in ihrer Reifung und Vernetzung untereinander steuern lassen. Zudem gelang es, Eigenschaften neuronaler Netzwerke aus NSCs zu analysieren, die eine Kommunikation der Zellen untereinander charakterisieren. Eine Möglichkeit, eine GNR umzusetzen, wäre eine permanente Inkorporation bestimmter Stoffzusammensetzungen mit Hilfe eines biochemischen Implantats an geeigneter Position nahe des Hörnervenkerns. Andernfalls bestünde die Möglichkeit, medikamentöse Stoßtherapien durchzuführen. Außerdem könnte eine Kombination aus biochemischer Beschichtung und elektrophysiologischer Ionenstimulation bei Einsatz eines auditorischen Hirnstammimplantats genutzt werden. Dadurch wäre eine gezielte Beeinflussung der Neuromaturation und der neuronalen Vernetzung erreichbar. Möglicherweise könnte so künftig eine neuronale Degeneration therapiert oder ihr zumindest partiell entgegengewirkt werden. Fraglich ist hierbei zum einen die Langzeitwirkung, da nur eine bestimmte Menge biochemischer Stoffe eingebracht

## 6 - Zusammenfassung und Ausblick

werden könnte. Zum anderen müsste die Wirkung der biochemischen Substanzen auf die Zielneurone beschränkt bleiben, um keine negativen Nebenwirkungen auf umliegende Zellareale zu erzeugen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch medikamentöse Therapien zu manipulieren, um die Zelldifferenzierung von Progenitorzellen innerhalb der neuronalen Linie in Richtung Neuron zu beeinflussen. Die Progenitorzellen könnten *in vitro* erzeugt und später *in vivo* transplantiert werden (D'Ascenzo et al. 2006). Diese und ähnliche Aspekte gilt es, in Zukunft noch weiter zu analysieren.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Dissertation eine Charakterisierung des N. C. der Hörbahn in elektrophysiologischer und biochemischer Hinsicht erreicht werden. Die Ansätze dieser Arbeit könnten in Zukunft zu Therapieoptionen der Hörrehabilitation auf dieser Ebene beitragen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Altman J (1962a) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127–1128.
- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433–457. doi: 10.1002/cne.901370404
- Altman J (1962b) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127–1128. doi: 10.1126/science.135.3509.1127
- Altman J, GD Das (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335. doi: 10.1002/cne.901240303
- Arnhold S, Andressen C, Angelov D (2000a) Embryonic stem-cell derived neurones express a maturation dependent pattern of voltage-gated calcium channels and calcium-binding proteins. *International Journal of Developmental Neuroscience* 18:201–212. doi: 10.1016/S0736-5748(99)00089-1
- Arnhold S, Andressen C, Angelov D (2000b) Embryonic stem-cell derived neurones express a maturation dependent pattern of voltage-gated calcium channels and calcium-binding proteins. *Int J Dev Neurosci* 18:201–212.
- Ashley CC, Ridgway E (1968) Simultaneous recording of membrane potential, calcium transient and tension in single muscle fibers. *Nature* 219:1168–1169.
- Bahrey HLP, Moody WJ (2003) Early development of voltage-gated ion currents and firing properties in neurons of the mouse cerebral cortex. *J Neurophysiol* 89:1761–1773. doi: 10.1152/jn.00972.2002
- Baimbridge KG (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15:303–308. doi: 10.1016/0166-2236(92)90081-I
- Bando Y, Irie K, Shimomura T (2015) Control of spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients is critical for neuronal maturation in the developing neocortex. *Cerebral Cortex* 26:106–117. doi: 10.1093/cercor/bhu180
- Baraban SC (2004) Interneuron diversity series: Interneuronal neuropeptides – endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends Neurosci* 27:135–142. doi: 10.1016/j.tins.2004.01.008
- Bardi G, Tognini P, Ciofani G, et al (2009) Pluronic-coated carbon nanotubes do not induce degeneration of cortical neurons in vivo and in vitro. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 5:96–104. doi: 10.1016/j.nano.2008.06.008
- Bardo S, Cavazzini MG, Emptage N (2006) The role of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store in the plasticity of central neurons. *Trends in Pharmacological Sciences* 27:78–84. doi: 10.1016/j.tips.2005.12.008

## 7 - Literaturverzeichnis

- Barreto-Chang OL, Dolmetsch RE (2009) Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. *JoVE* e1067. doi: 10.3791/1067
- Bartlett WP, Banker GA (1984) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci* 4:1954–1965.
- Ben-Ari Y, Spitzer NC (2010) Phenotypic checkpoints regulate neuronal development. *Trends Neurosci* 33:485–492. doi: 10.1016/j.tins.2010.08.005
- Bender KJ, Ford CP, Trussell LO (2010) Dopaminergic modulation of axon initial segment calcium channels regulates action potential initiation. *Neuron* 68:500–511. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.026
- Bender KJ, Uebele VN, Renger JJ, Trussell LO (2012) Control of firing patterns through modulation of axon initial segment T-type calcium channels. *The Journal of Physiology* 590:109–118. doi: 10.1113/jphysiol.2011.218768
- Berlucchi G, Buchtel HA (2009) Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning. *Exp Brain Res* 192:307–319. doi: 10.1007/s00221-008-1611-6
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1:11–21. doi: 10.1038/35036035
- Betty Ben Geren FOS (1954) The structure of the schwann cell and its relation to the axon in certain invertebrate nerve fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 40:863–870. doi: 10.1073/pnas.40.9.863
- Bicknell HR, Beal JA (1984) Axonal and dendritic development of substantia gelatinosa neurons in the lumbosacral spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 226:508–522. doi: 10.1002/cne.902260406
- Blankenship AG, Feller MB (2010) Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 11:18–29. doi: 10.1038/nrn2759
- Blum R, Heinrich C, Sánchez R, et al (2010) Neuronal network formation from reprogrammed early postnatal rat cortical glial cells. *Cerebral Cortex* 21:413–424. doi: 10.1093/cercor/bhq107
- Boycott BB, Wässle H (1991) Morphological classification of bipolar cells of the primate retina. *Eur J Neurosci* 3:1069–1088. doi: 10.1111/j.1460-9568.1991.tb00043.x
- Brown JE, Cohen LB, De Weer P, et al (1975) Rapid changes in intracellular free calcium concentration. Detection by metallochromic indicator dyes in squid giant axon. *Biophys J* 15:1155–1160. doi: 10.1016/S0006-3495(75)85891-7
- Caceres A, Banker G, Steward O, et al (1984) MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Developmental Brain Research* 13:314–318. doi: 10.1016/0165-3806(84)90167-6
- Cajal SRY (1906) The structure and connexions of neurons. Nobel lecture

- Cajal SRY (1913) Estudios sobre la degeneración y la regeneración del sistema nervioso.
- Callewaert G, Eilers J, Konnerth A (1996) Axonal calcium entry during fast “sodium” action potentials in rat cerebellar Purkinje neurones. *The Journal of Physiology* 495:641–647. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021622
- Campagnola L, Manis PB (2014) A map of functional synaptic connectivity in the mouse anteroventral cochlear nucleus. *J Neurosci* 34:2214–2230. doi: 10.1523/JNeurosci.4669-13.2014
- Catterall WA (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annual Review of Biochemistry* 64:493–531. doi: 10.1146/annurev.biochem.64.1.493
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International union of pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57:411–425. doi: 10.1124/pr.57.4.5
- Collins F (1978) Axon initiation by ciliary neurons in culture. *Dev Biol* 65:50–57. doi: 10.1016/0012-1606(78)90178-1
- Connor JA (1986) Digital imaging of free calcium changes and of spatial gradients in growing processes in single, mammalian central nervous system cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6179–6183. doi: 10.1073/pnas.83.16.6179
- Coombs JS, Curtis DR, Eccles JC (1957) The interpretation of spike potentials of motoneurons. *The Journal of Physiology* 139:198–231. doi: 10.1113/jphysiol.1957.sp005887
- Craig A (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17:267–310. doi: 10.1146/annurev.neuro.17.1.267
- D'Ascenzo M, Piacentini R, Casalbore P, et al (2006) Role of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in neural stem/progenitor cell differentiation. *European Journal of Neuroscience* 23:935–944. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04628.x
- Davis TL, Sterling P (1979) Microcircuitry of cat visual cortex: Classification of neurons in layer IV of area 17, and identification of the patterns of lateral geniculate input. *J Comp Neurol* 188:599–627. doi: 10.1002/cne.901880407
- Deisseroth K, Singla S, Toda H, et al (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42:535–552.
- Del Cerro MP, Snider RS (1972) Axo-somatic and axo-dendritic synapses in the cerebellum of the newborn rat. *Brain Research* 43:581–586. doi: 10.1016/0006-8993(72)90410-6
- Denk W, Strickler J, Webb W (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248:73–76. doi: 10.1126/science.2321027

## 7 - Literaturverzeichnis

- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209–227. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00633-0
- Di Santo S (2013) Creatine supports propagation and promotes neuronal differentiation of inner ear progenitor cells. *Neuroreport* 1. doi: 10.1097/WNR.000000000000112
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046–5061. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-13-05046.1997
- Dolmetsch RE (1994) Signaling between intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and depletion-activated Ca<sup>2+</sup> channels generates [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in T lymphocytes. *The Journal of General Physiology* 103:365–388. doi: 10.1085/jgp.103.3.365
- Dotti CG (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454–1468.
- Dotti CG, Banker GA, Binder LI (1987) The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23:121–130. doi: 10.1016/0306-4522(87)90276-4
- Duchen MR (2004) Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *The Journal of Physiology* 516:1–17. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.001aa.x
- Dučić T, Barski E, Salome M, et al (2012) X-ray fluorescence analysis of iron and manganese distribution in primary dopaminergic neurons. *Journal of Neurochemistry* 124:250–261. doi: 10.1111/jnc.12073
- Eccles JC (1964) *The physiology of synapses*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Eilers J, Augustine GJ, Konnerth A (1995) Subthreshold synaptic Ca<sup>2+</sup> signalling in fine dendrites and spines of cerebellar Purkinje neurons. *Nature* 373:155–158. doi: 10.1038/373155a0
- Elfvín LG (1961) The ultrastructure of the nodes of Ranvier in cat sympathetic nerve fibers. *J Ultrastruct Res* 5:374–387. doi: 10.1016/s0022-5320(61)80014-2
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313–1317. doi: 10.1038/3305
- Eyzaguirre C, Kuffler SW (1955) Further study of soma, dendrite, and axon excitation in single neurons. *The Journal of General Physiology* 39:121–153. doi: 10.1085/jgp.39.1.121
- Fagerlund M, Jaff N, Danilov AI, et al (2011) Proliferation, migration and differentiation of ependymal region neural progenitor cells in the brainstem after hypoglossal nerve avulsion. *Restor Neurol Neurosci* 29:47–59. doi: 10.3233/RNN-2011-0578

- Fatt P (1957) Physiology of nerve cells. *Br Med J* 2:1223–1223. doi: 10.1136/bmj.2.5055.1223-a
- Ferreira A, Caceres A (1992) Expression of the class III beta-tubulin isotype in developing neurons in culture. *J Neurosci Res* 32:516–529. doi: 10.1002/jnr.490320407
- Fucile S (2004) Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35:1–8. doi: 10.1016/j.ceca.2003.08.006
- Fuortes MGF (1957) Steps in the production of motoneuron spikes. *The Journal of General Physiology* 40:735–752. doi: 10.1085/jgp.40.5.735
- Gage FH, Ray J, Fisher LJ (1995) Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 18:159–192. doi: 10.1146/annurev.ne.18.030195.001111
- Garaschuk O, Hanse E, Konnerth A (1998) Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *The Journal of Physiology* 507:219–236. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.219bu.x
- Garaschuk O, Linn J, Eilers J, Konnerth A (2000) Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* 3:452–459. doi: 10.1038/74823
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2390–2394.
- Gonzalez-Islas C, Wenner P (2006) Spontaneous network activity in the embryonic spinal cord regulates ampaergic and gabaergic synaptic strength. *Neuron* 49:563–575. doi: 10.1016/j.neuron.2006.01.017
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MSA, Gross CG (1999) Neurogenesis in the Neocortex of Adult Primates. *Science* 286:548–552. doi: 10.1126/science.286.5439.548
- Grabrucker A, Vaida B, Bockmann J, Boeckers TM (2009) Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture. *Cell Tissue Res* 338:333–341. doi: 10.1007/s00441-009-0881-z
- Gray EG (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 93:420–433. doi: 10.1111/(ISSN)1469-7580
- Grienberger C, Konnerth A (2012) Imaging calcium in neurons. *Neuron* 73:862–885. doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.011
- Gritti A, Cova L, Parati EA, et al (1995) Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. *Neurosci Lett* 185:151–154.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450.

## 7 - Literaturverzeichnis

- Hallett M, Carbone E (1972) Studies of calcium influx into squid giant axons with aequorin. *Journal of Cellular Physiology* 80:219–226. doi: 10.1002/jcp.1040800208
- Harper MM, Ye E-A, Blong CC, et al (2010) Integrins contribute to initial morphological development and process outgrowth in rat adult hippocampal progenitor cells. *J Mol Neurosci* 40:269–283. doi: 10.1007/s12031-009-9211-x
- Harris A (1973) Location of cellular adhesions to solid substrata. *Dev Biol* 35:97–114. doi: 10.1016/0012-1606(73)90009-2
- Helmchen F, Borst JG, Sakmann B (1997) Calcium dynamics associated with a single action potential in a CNS presynaptic terminal. *Biophys J* 72:1458–1471. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78792-7
- Helmchen F, Denk W (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2:932–940. doi: 10.1038/nmeth818
- Helmchen F, Imoto K, Sakmann B (1996) Ca<sup>2+</sup> buffering and action potential-evoked Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophys J* 70:1069–1081. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79653-4
- Helmchen F, Waters J (2002) Ca<sup>2+</sup> imaging in the mammalian brain in vivo. *European Journal of Pharmacology* 447:119–129. doi: 10.1016/S0014-2999(02)01836-8
- Henley J, Poo M-M (2004) Guiding neuronal growth cones using Ca<sup>2+</sup> signals. *Trends Cell Biol* 14:320–330. doi: 10.1016/j.tcb.2004.04.006
- Higley MJ, Sabatini BL (2008) Calcium signaling in dendrites and spines: practical and functional considerations. *Neuron* 59:902–913. doi: 10.1016/j.neuron.2008.08.020
- Hilaire C, Desmadryl G, Diochot S, et al (1996) Opposite developmental regulation of P- and Q-type calcium currents during ontogenesis of large diameter mouse sensory neurons. *Neuroscience* 75:1219–1229. doi: 10.1016/0306-4522(96)00347-8
- Hille B (1978) Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophys J* 22:283–294. doi: 10.1016/S0006-3495(78)85489-7
- Hinds JW (1968a) Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J Comp Neurol* 134:287–304. doi: 10.1002/cne.901340304
- Hinds JW (1968b) Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration. *J Comp Neurol* 134:305–321. doi: 10.1002/cne.901340305
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* 117:500–544. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004764

- Hodgkin AL, Huxley AF (1990) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Bulletin of Mathematical Biology* 52:25–71. doi: 10.1007/BF02459568
- Huxley AF (1964) Excitation and conduction in nerve: quantitative analysis. *Science* 145:1154–1159. doi: 10.1126/science.145.3637.1154
- Huxley AF, Stämpfli R (1949) Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *The Journal of Physiology* 108:315–339.
- Ikegaya Y, Le Bon-Jego M, Yuste R (2005) Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neuroscience Research* 52:132–138. doi: 10.1016/j.neures.2005.02.004
- Jones EG (1999) Golgi, Cajal and the neuron doctrine. *Journal of the History of the Neurosciences* 8:170–178. doi: 10.1076/jhin.8.2.170.1838
- Jones H, Kan A, Litovsky RY (2014) Comparing sound localization deficits in bilateral cochlear-implant users and vocoder simulations with normal-hearing listeners. *Trends Hear.* doi: 10.1177/2331216514554574
- Jori FP, Galderisi U, Piegari E, et al (2003) EGF-responsive rat neural stem cells: molecular follow-up of neuron and astrocyte differentiation in vitro. *Journal of Cellular Physiology* 195:220–233. doi: 10.1002/jcp.10249
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T, et al (2012) *Principles of neural science*, fifth edition. McGraw-Hill Professional
- Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, et al (2000) Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci* 22:139–153.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092–1094. doi: 10.1126/science.887941
- Kater SB, Mattson MP, Cohan C, Connor J (1988) Calcium regulation of the neuronal growth cone. *Trends Neurosci* 11:315–321. doi: 10.1016/0166-2236(88)90094-X
- Kilb W, Kirischuk S, Luhmann HJ (2011) Electrical activity patterns and the functional maturation of the neocortex. *European Journal of Neuroscience* 34:1677–1686. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07878.x
- Kirkby LA, Sack GS, Firl A, Feller MB (2013) A role for correlated spontaneous activity in the assembly of neural circuits. *Neuron* 80:1129–1144. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.030
- Klueva J, Meis S, de Lima AD, et al (2008) Developmental downregulation of GABAergic drive parallels formation of functional synapses in cultured mouse neocortical networks. *Dev Neurobiol* 68:934–949. doi: 10.1002/dneu.20632
- Kodama T, Guerrero S, Shin M, et al (2012) Neuronal classification and marker gene identification via single-cell expression profiling of brainstem vestibular neurons

## 7 - Literaturverzeichnis

- subserving cerebellar learning. *J Neurosci* 32:7819–7831. doi: 10.1523/JNeurosci.0543-12.2012
- Kole MHP (2018) The electrical significance of axon location diversity. *Curr Opin Neurobiol* 51:52–59. doi: 10.1016/j.conb.2018.02.016
- Kole MHP, Stuart GJ (2012) Signal processing in the axon initial segment. *Neuron* 73:235–247. doi: 10.1016/j.neuron.2012.01.007
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027–2033.
- Lasser-Ross N, Miyakawa H, Lev-Ram V, et al (1991) High time resolution fluorescence imaging with a CCD camera. *J Neurosci Methods* 36:253–261. doi: 10.1016/0165-0270(91)90051-Z
- Lendahl U, McKay RDG (1990) The use of cell lines in neurobiology. *Trends Neurosci* 13:132–137. doi: 10.1016/0166-2236(90)90004-T
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585–595.
- Li H, Liu H, Heller S (2003) Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 9:1293–1299. doi: 10.1038/nm925
- Liberman MC (1993) Central projections of auditory nerve fibers of differing spontaneous rate, II: Posteroventral and dorsal cochlear nuclei. *J Comp Neurol* 327:17–36. doi: 10.1002/cne.903270103
- Liljelund P, Netzeband JG, Gruol DL (2000) L-type calcium channels mediate calcium oscillations in early postnatal purkinje neurons. *J Neurosci* 20:7394–7403. doi: 10.1523/JNeurosci.20-19-07394.2000
- Lingrel JB, Van Huysse J, O'Brien W, et al (1994) Na,K-ATPase: structure-function studies. *Kidney and Blood Pressure Research* 17:198–200. doi: 10.1159/000173818
- Llinás R, Nicholson C (1975) Calcium role in depolarization-secretion coupling: an aequorin study in squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:187–190. doi: 10.1073/pnas.72.1.187
- Lock JT, Parker I, Smith IF (2015) A comparison of fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators for imaging local Ca<sup>2+</sup> signals in cultured cells. *Cell Calcium* 58:638–648. doi: 10.1016/j.ceca.2015.10.003
- Looger LL, Griesbeck O (2012) Genetically encoded neural activity indicators. *Curr Opin Neurobiol* 22:18–23. doi: 10.1016/j.conb.2011.10.024
- Lowery LA, Van Vactor D (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10:332–343. doi: 10.1038/nrm2679

- Luhmann HJ, Reiprich RA, Hanganu I, Kilb W (2000) Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex: Intrinsic membrane properties, sodium and calcium currents. *J Neurosci Res* 62:574–584. doi: 10.1002/1097-4547(20001115)62:4<574::AID-JNR12>3.0.CO;2-0
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173–189. doi: 10.1016/0896-6273(93)90281-U
- Maden M (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8:755–765. doi: 10.1038/nrn2212
- Maden M (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3:843–853. doi: 10.1038/nrn963
- Mank M, Griesbeck O (2008) Genetically encoded calcium indicators. *Chemical Reviews* 108:1550–1564. doi: 10.1021/cr078213v
- Mao T, O'Connor DH, Scheuss V, et al (2008) Characterization and subcellular targeting of GCaMP-type genetically-encoded calcium indicators. *PLoS One* 3:e1796. doi: 10.1371/journal.pone.0001796
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, et al (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793–807. doi: 10.1038/nrn1519
- Maruyama I, Hasegawa T, Yamamoto T, Momose K (1989) Effects of Pluronic F-127 on loading of fura 2/AM into single smooth muscle cells isolated from guinea pig taenia coli. *J Toxicol Sci* 14:153–163. doi: 10.2131/jts.14.153
- Maruyama R, Maeda K, Moroda H, et al (2014) Detecting cells using non-negative matrix factorization on calcium imaging data. *Neural Netw* 55:11–19. doi: 10.1016/j.neunet.2014.03.007
- Masland RH (2004) Neuronal cell types. *Current Biology* 14:R497–R500. doi: 10.1016/j.cub.2004.06.035
- Mazia D (1975) Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol* 66:198–200. doi: 10.1083/jcb.66.1.198
- McCabe AK, Chisholm SL, Picken-Bahrey HL, Moody WJ (2006) The self-regulating nature of spontaneous synchronized activity in developing mouse cortical neurones. *The Journal of Physiology* 577:155–167. doi: 10.1113/jphysiol.2006.117523
- McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66–71.
- Meister M, Wong RO, Baylor DA, Shatz CJ (1991) Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science* 252:939–943. doi: 10.1126/science.2035024
- Misonou H, Mohapatra DP, Park EW, et al (2004) Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nat Neurosci* 7:711–718. doi: 10.1038/nn1260

## 7 - Literaturverzeichnis

- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, et al (1997) Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388:882–887. doi: 10.1038/42264
- Molitor SC, Manis PB (2003) Dendritic Ca<sup>2+</sup> transients evoked by action potentials in rat dorsal cochlear nucleus pyramidal and cartwheel neurons. *J Neurophysiol* 89:2225–2237. doi: 10.1152/jn.00709.2002
- Moody SA, Heaton MB (1981) Morphology of migrating trigeminal motor neuroblasts as revealed by horseradish peroxidase retrograde labeling techniques. *Neuroscience* 6:1707–1723. doi: 10.1016/0306-4522(81)90206-2
- Moore AR, Filipovic R, Mo Z, et al (2008) Electrical excitability of early neurons in the human cerebral cortex during the second trimester of gestation. *Cerebral Cortex* 19:1795–1805. doi: 10.1093/cercor/bhn206
- Morita M, Susuki J, Moto T, et al (2004) A novel method to quantify calcium response pattern and oscillation using Fura2 and Acridine Orange. *Journal of Pharmacological Sciences* 94:25–30. doi: 10.1254/jphs.94.25
- Morris RGM (1999) D.O. Hebb: The organization of behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Research Bulletin* 50:437. doi: 10.1016/S0361-9230(99)00182-3
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, et al (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071–1082. doi: 10.1016/0896-6273(94)90046-9
- Nakayama K, Kiyosue K, Taguchi T (2005) Diminished neuronal activity increases neuron-neuron connectivity underlying silent synapse formation and the rapid conversion of silent to functional synapses. *J Neurosci* 25:4040–4051. doi: 10.1523/JNeurosci.4115-04.2005
- Neher E (1995) The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharmacology* 34:1423–1442.
- Neher E, Augustine GJ (1992) Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *The Journal of Physiology* 450:273–301. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp019127
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799–802. doi: 10.1038/260799a0
- Nelson SB, Sugino K, Hempel CM (2006) The problem of neuronal cell types: a physiological genomics approach. *Trends Neurosci* 29:339–345. doi: 10.1016/j.tins.2006.05.004
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, et al (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462–465. doi: 10.1038/307462a0
- Nowakowski RS, Rakic P (1979) The mode of migration of neurons to the hippocampus: a Golgi and electron microscopic analysis in foetal rhesus monkey. *J Neurocytol* 8:697–718. doi: 10.1007/BF01206671

- Nwabuisi-Heath E, LaDu MJ, Yu C (2012) Simultaneous analysis of dendritic spine density, morphology and excitatory glutamate receptors during neuron maturation in vitro by quantitative immunocytochemistry. *J Neurosci Methods* 207:137–147. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.04.003
- Oliver AE, Baker GA, Fugate RD, et al (2000) Effects of temperature on calcium-sensitive fluorescent probes. *Biophys J* 78:2116–2126. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76758-0
- Opitz T, de Lima AD, Voigt T (2002) Spontaneous development of synchronous oscillatory activity during maturation of cortical networks in vitro. *J Neurophysiol* 88:2196–2206. doi: 10.1152/jn.00316.2002
- Oshima K (2007) Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 8:18–31. doi: 10.1007/s10162-006-0058-3
- Oshima K, Teo DTW, Senn P, et al (2007) LIF promotes neurogenesis and maintains neural precursors in cell populations derived from spiral ganglion stem cells. *BMC Developmental Biology* 2007 7:1 7:112. doi: 10.1186/1471-213X-7-112
- Palay SL (1956) Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol* 2:193–202.
- Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM (1968) The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 38:193–201. doi: 10.1083/jcb.38.1.193
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, et al (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19:8487–8497.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH (1995) FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6:474–486. doi: 10.1006/mcne.1995.1035
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997) The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8:389–404. doi: 10.1006/mcne.1996.0595
- Pang Z, Bondada V, Sengoku T, et al (2003) Calpain facilitates the neuron death induced by 3-nitropropionic acid and contributes to the necrotic morphology. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:633–643. doi: 10.1093/jnen/62.6.633
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, et al (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46:143–151. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.09.025
- Park IJ, Bobkov YV, Ache BW, Principe JC (2013) Quantifying bursting neuron activity from calcium signals using blind deconvolution. *J Neurosci Methods* 218:196–205.
- Patel TP, Man K, Firestein BL, Meaney DF (2015) Automated quantification of neuronal networks and single-cell calcium dynamics using calcium imaging. *J Neurosci Methods* 243:26–38. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.01.020

## 7 - Literaturverzeichnis

- Peters A (2007) Golgi, Cajal, and the fine structure of the nervous system. *Brain Research Reviews* 55:256–263. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.12.002
- Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM (2007) SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol, Cell Physiol* 293:C1073–81. doi: 10.1152/ajpcell.00586.2006
- Prada J, Sasi M, Martin C, et al (2018) An open source tool for automatic spatiotemporal assessment of calcium transients and local “signal-close-to-noise” activity in calcium imaging data. *PLoS Comput Biol* 14:e1006054. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006054
- Rak K, Völker J, Frenz S, et al (2014) Effects of the neurotrophic factors BDNF, NT-3, and FGF2 on dissociated neurons of the cochlear nucleus. *Neuroreport* 25:960–964. doi: 10.1097/WNR.0000000000000220
- Rak K, Wasielewski NV, Radeloff A, et al (2011) Isolation and characterization of neural stem cells from the neonatal rat cochlear nucleus. *Cell Tissue Res* 343:499–508. doi: 10.1007/s00441-010-1118-x
- Ramón y Cajal S (1909) *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Maloine,, Paris :
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annual Review of Physiology* 68:619–647. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431
- Rasband MN (2010) The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11:552–562. doi: 10.1038/nrn2852
- Rask-Andersen H, Boström M, Gerdin B, et al (2005) Regeneration of human auditory nerve. In vitro/in video demonstration of neural progenitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion. *Hear Res* 203:180–191. doi: 10.1016/j.heares.2004.12.005
- Ray J, Gage FH (2005) Differential properties of adult rat and mouse brain-derived neural stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31:560–573. doi: 10.1016/j.mcn.2005.11.010
- Regehr WG, Tank DW (1994) Dendritic calcium dynamics. *Curr Opin Neurobiol* 4:373–382. doi: 10.1016/0959-4388(94)90099-X
- Rehberg M, Lepier A, Solchenberger B, et al (2008) A new non-disruptive strategy to target calcium indicator dyes to the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 44:386–399. doi: 10.1016/j.ceca.2008.02.002
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707–1710. doi: 10.1126/science.1553558
- Robertson JD (1957) New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 3:1043–1048. doi: 10.1083/jcb.3.6.1043

- Rocheffort NL, Jia H, Konnerth A (2008) Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine* 14:389–399. doi: 10.1016/j.molmed.2008.07.005
- Roe MW, Lemasters JJ, Herman B (1990) Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium* 11:63–73. doi: 10.1016/0143-4160(90)90060-8
- Rosenberg SS, Spitzer NC (2011) Calcium signaling in neuronal development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3:a004259–a004259. doi: 10.1101/cshperspect.a004259
- Rushton WAH (1951) A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *The Journal of Physiology* 115:101–122. doi: 10.1113/jphysiol.1951.sp004655
- Sakashita S, Engvall E, Ruoslahti E (2001) Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. *FEBS Letters* 116:243–246. doi: 10.1016/0014-5793(80)80654-5
- Sakashita S, Ruoslahti E (1980) Laminin-like glycoproteins in extracellular matrix of endodermal cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 205:283–290. doi: 10.1016/0003-9861(80)90109-5
- Sansom MSP (2000) Potassium channels: Watching a voltage-sensor tilt and twist. *Current Biology* 10:R206–R209. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00354-7
- Schneider T, Wei X, Olcese R, et al (1994) Molecular analysis and functional expression of the human type E neuronal Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1 subunit. *Receptors Channels* 2:255–270.
- Schultz SR, Kitamura K, Post-Uiterweer A, et al (2009) Spatial pattern coding of sensory information by climbing fiber-evoked calcium signals in networks of neighboring cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 29:8005–8015. doi: 10.1523/JNeurosci.4919-08.2009
- Senn P (2007) Robust postmortem survival of murine vestibular and cochlear stem cells. *J Assoc Res Otolaryngol* 8:194–204. doi: 10.1007/s10162-007-0079-6
- Sher E, Biancardi E, Passafaro M, Clementi F (1991) Physiopathology of neuronal voltage-operated calcium channels. *FASEB j* 5:2677–2683. doi: 10.1096/fasebj.5.12.1655547
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59:223–239. doi: 10.1002/jcp.1030590302
- Shoukimas GM, Hinds JW (1978) The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: An electron microscopic serial section analysis. *J Comp Neurol* 179:795–830. doi: 10.1002/cne.901790407
- Smetters D, Majewska A, Yuste R (1999) Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. *Methods* 18:215–221. doi: 10.1006/meth.1999.0774

## 7 - Literaturverzeichnis

- Smith SJ, Augustine GJ (1988) Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci* 11:458–464. doi: 10.1016/0166-2236(88)90199-3
- Sohur US (2006) Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 361:1477–1497. doi: 10.1098/rstb.2006.1887
- Stinnakre J, Tauc L (1973) Calcium influx in active aplysia neurones detected by injected Aequorin. *Nature New Biology* 242:113–115. doi: 10.1038/newbio242113b0
- Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, Konnerth A (2003) In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7319–7324. doi: 10.1073/pnas.1232232100
- Stuart G, Spruston N, Sakmann B, Häusser M (1997) Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 20:125–131. doi: 10.1016/S0166-2236(96)10075-8
- Stühmer W, Ruppersberg JP, Schröter KH, et al (1989) Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J* 8:3235–3244.
- Subramanian N, Wetzel A, Dombert B, et al (2012) Role of Nav1.9 in activity-dependent axon growth in motoneurons. *Human Molecular Genetics* 21:3655–3667. doi: 10.1093/hmg/dds195
- Suzuki S, Namiki J, Shibata S, et al (2010) The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem* 58:721–730. doi: 10.1369/jhc.2010.955609
- Svoboda K, Yasuda R (2006) Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* 50:823–839. doi: 10.1016/j.neuron.2006.05.019
- Swandulla D, Hans M, Zipser K, Augustine GJ (1991) Role of residual calcium in synaptic depression and posttetanic potentiation: Fast and slow calcium signaling in nerve terminals. *Neuron* 7:915–926. doi: 10.1016/0896-6273(91)90337-Y
- Syed NI (2009) Neuron: structure/function, cellular/molecular. In: *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 2764–2768
- Tetzlaff C, Okujeni S, Egert U, et al (2010) Self-organized criticality in developing neuronal networks. *PLoS Comput Biol* 6:e1001013. doi: 10.1371/journal.pcbi.1001013
- Thivierge J-P (2009) How does non-random spontaneous activity contribute to brain development? *Neural Netw* 22:901–912. doi: 10.1016/j.neunet.2009.01.001
- Timpl R, Engel J, Martin GR (1983) Laminin - a multifunctional protein of basement membranes. *Trends in Biochemical Sciences* 8:207–209. doi: 10.1016/0968-0004(83)90213-X

- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY (2006) How does voltage open an ion channel? <http://dxdoi.org/10.1146/annurevcellbio21020404145837> 22:23–52. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.020404.145837
- Tritsch NX, Yi E, Gale JE, et al (2007) The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature* 450:50–55. doi: 10.1038/nature06233
- Tsien R (1989) Fluorescent probes of cell signaling. *Annu Rev Neurosci* 12:227–253. doi: 10.1146/annurev.neuro.12.1.227
- Tsien RY (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19:2396–2404. doi: 10.1021/bi00552a018
- Uhlén P, Fritz N, Smedler E, et al (2015) Calcium signaling in neocortical development. *Dev Neurobiol* 75:360–368. doi: 10.1002/dneu.22273
- Verderio C, Coco S, Fumagalli G, Matteoli M (1995) Calcium-dependent glutamate release during neuronal development and synaptogenesis: different involvement of omega-agatoxin IVA- and omega-conotoxin GVIA-sensitive channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6449–6453. doi: 10.1073/pnas.92.14.6449
- Vogelstein JT, Watson BO, Packer AM, et al (2009) Spike inference from calcium imaging using sequential Monte Carlo methods. *Biophys J* 97:636–655. doi: 10.1016/j.bpj.2008.08.005
- Voigt T, Opitz T, de Lima AD (2005) Activation of early silent synapses by spontaneous synchronous network activity limits the range of neocortical connections. *J Neurosci* 25:4605–4615. doi: 10.1523/JNeurosci.3803-04.2005
- Volkenstein S, Oshima K, Sinkkonen ST, et al (2013) Transient, afferent input-dependent, postnatal niche for neural progenitor cells in the cochlear nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:14456–14461. doi: 10.1073/pnas.1307376110
- Wakamori M, Niidome T, Furutama D, et al (1994) Distinctive functional properties of the neuronal BII (class E) calcium channel. *Receptors Channels* 2:303–314.
- Watt AJ, Cuntz H, Mori M, et al (2009) Traveling waves in developing cerebellar cortex mediated by asymmetrical Purkinje cell connectivity. *Nat Neurosci* 12:463–473. doi: 10.1038/nn.2285
- Waxman SG, Bennett MVL (1972) Relative Conduction Velocities of Small Myelinated and Non-myelinated Fibres in the Central Nervous System. *Nature New Biology* 238:217–219. doi: 10.1038/newbio238217a0
- Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, et al (1996) Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci* 19:387–393.
- Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, et al (2004) Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron* 43:647–661. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.015

## 7 - Literaturverzeichnis

- Wessells NK, Nuttall RP (1978) Axon initiation and growth cone regeneration in cultured motor neurons. *Experimental Cell Research* 117:335–345. doi: 10.1016/0014-4827(78)90147-7
- Yamamoto N, Bendito GL (2012) Shaping brain connections through spontaneous neural activity. *European Journal of Neuroscience* 35:1595–1604. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08101.x
- Yang JSJ, Sladky JT, Kallen RG, Barchi RL (1991) TTX-sensitive and TTX-insensitive sodium channel mRNA transcripts are independently regulated in adult skeletal muscle after denervation. *Neuron* 7:421–427. doi: 10.1016/0896-6273(91)90294-A
- Yu Y, Maureira C, Liu X, McCormick D (2010) P/Q and N channels control baseline and spike-triggered calcium levels in neocortical axons and synaptic boutons. *J Neurosci* 30:11858–11869. doi: 10.1523/JNeurosci.2651-10.2010
- Yuste R, Denk W (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682–684. doi: 10.1038/375682a0
- Yuste R, MacLean J, Vogelstein J, Paninski L (2011) Imaging action potentials with calcium indicators. *Cold Spring Harb Protoc* 2011:pdb.prot5650–pdb.prot5650. doi: 10.1101/pdb.prot5650
- Zhai S, Shi L, Wang B-E, et al (2005) Isolation and culture of hair cell progenitors from postnatal rat cochleae. *J Neurobiol* 65:282–293. doi: 10.1002/neu.20190
- Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, et al Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons
- Zheng Y, Begum S, Zhang C, et al (2011) Increased BrdU incorporation reflecting DNA repair, neuronal de-differentiation or possible neurogenesis in the adult cochlear nucleus following bilateral cochlear lesions in the rat. *Exp Brain Res* 210:477–487. doi: 10.1007/s00221-010-2491-0
- Zilles K, Tillmann BN (2010) *Anatomie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg

## I Abkürzungsverzeichnis

AM-Ester	Acetoxymethyl-Ester
AP	Aktionspotential(e)
Aq. dem.	Aqua demineralisata
ATP	Adenosintri-phosphat
AUC	Area Under the Curve
AVNC	Anteroventraler Nucleus Cochlearis
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
BrdU	5-Bromo-3'-Desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion(en)
CCD	Charge-Coupled Device
CTX	ω-Conotoxin MVIC
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DCX	Doublecortin
DG	(Glas-) Deckglas/Deckgläser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNC	Dorsaler Nucleus Cochlearis
D-PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EPSP	Exzitatorisches Postsynaptisches Potential
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii – und andere
FGFb/FGF-2	Fibroblast Growth Factor b/2
GECI	Genetic Encoded Calcium Indicators
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GNR	gesteuerte neuronale Regeneration
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HVA	High Voltage Activated
IGF-1	Insulin-like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential

## I - Abkürzungsverzeichnis

Konz.	Konzentration
Kur	Kurtoxin
LVA	Low Voltage Activated
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MBP	Myelin Basic Protein
N.	Nervus
NaPP	Natriumphosphat-Puffer
N.C.	Nucleus Cochlearis
NeuN	Neuronal Nuclei
Nif	Nifedipin
NSC(s)	Neural Stem Cell(s)
OG	Oregon Green BAPTA-1
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
PVNC	Posteroventraler Nucleus Cochlearis
RA	Retinoic Acid
ROI	Region(s) Of Interest
SERCA	Sarco-/Endoplasmatische-Retikulum-Calcium-ATPase
SNX	SNX-482, $\omega$ -Theraphotoxin-Hg1a, $\omega$ -TRTX-Hg1a
SGZ	Subgranuläre Zone
SVZ	Subventrikuläre Zone
TBST	Tris-Buffered Saline with Tween 20
TTX	Tetrodotoxin
UE	Untereinheit(en)
VGCC(s)	Voltage Gated Calcium Channel(s)
ZNS	Zentrales Nervensystem

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung neuronaler Reifungsstadien anhand immunzytologischer Markerproteine.....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der zentralen, afferenten Hörbahn..	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Neurons mit seinen Zellbestandteilen. ....	12
Abbildung 4: Schematische Gegenüberstellung morphologisch unterschiedlicher Arten von Neuronen. ....	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines von einer Myelinscheide umhüllten Axons.....	18
Abbildung 6: Schematische Aufzeichnung einer synaptischen Endigung mit der Generierung eines Aktionspotentials.....	22
Abbildung 7: Chemische Strukturformeln der Fluorophore EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure), BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure ) und Fura-2.....	26
Abbildung 8: Darstellung des Binde- und Lösevorgangs von Ca <sup>2+</sup> -Ionen bei dem Fluorophor Oregon-Green-BAPTA-1 (OG).....	29
Abbildung 9: Konstruktion eines DG mit vergrößerter Medium-Vorratskammer. ....	45
Abbildung 10: Flusskammer und Einsatz für das DG. ....	46
Abbildung 11: Protokoll der Calcium-Imaging-Auswertung.....	49
Abbildung 12: Exemplarische Kennzeichnung primärer Neurone bei der Auswertung der Calcium-Imaging-Messungen. ....	55
Abbildung 13: Exemplarische Grafik sehr eindeutiger Spontanoszillationen eines primären Neurons. ....	57
Abbildung 14: Immunzytologische Identifikation von primären Neuronen und NSC-Neurosphären des N.C.....	58
Abbildung 15: Immunzytologische Färbung von neuronalen Einzelzellen nach Calcium-Imaging.....	60
Abbildung 16: Immunzytologische Färbung eines neuronalen Netzwerks aus primären Neuronen des N.C. 6 Tage alter Ratten.....	60
Abbildung 17: Immunzytologische Analyse unterschiedlicher Anzahlen ausplattierter Einzelzellen von NSCs des N.C. ....	62
Abbildung 18: Bildliche Darstellung einer Spontanerregung im Calcium-Imaging. ....	63
Abbildung 19: Gegenüberstellung der Anzahl spontaner Ca <sup>2+</sup> -Peaks bei DIF 0 und DIF 4. ....	64

## II - Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Quantifizierung spontaner Ca <sup>2+</sup> -Peaks im Verlauf der Zelldifferenzierung innerhalb von 16 Tagen. ....	66
Abbildung 21: Exemplarische Darstellung von Spontanoszillationen neuronaler Zellen, vermessen mit dem Calcium-Imaging-Verfahren. ....	68
Abbildung 22: Prozentualer Anteil an Ca <sup>2+</sup> -Peaks, die im jeweiligen Neuriten und dem entsprechenden Soma gleichzeitig auftraten. ....	70
Abbildung 23: Gegenüberstellung der Spontanaktivität der Zellareale Soma, Axon und Dendriten bei DIF 0 und DIF 4. ....	72
Abbildung 24: Quantifizierung spontaner Ca <sup>2+</sup> -Peaks in Soma, Axon und Dendriten bei DIF 0 und DIF 4. ....	74
Abbildung 25: Exemplarische Darstellung eines Wachstumskegels. ....	75
Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der Ca <sup>2+</sup> -Aktivität in Wachstumskegeln von NSCs gegenüber der Aktivität im zugehörigen Soma. ....	76
Abbildung 27: Gegenüberstellung der Anzahl von Spontanaktivitäten in Wachstumskegeln und Somata. ....	78
Abbildung 28: Exemplarische Darstellung globaler neuronaler Aktivität. ....	79
Abbildung 29: Exemplarische Darstellung lokaler neuronaler Aktivität. ....	80
Abbildung 30: Immunzytologische Färbung spannungsabhängiger Ca <sup>2+</sup> -Kanäle. ....	81
Abbildung 31: Exemplarische graphische Darstellung der Einflussnahme von Ca <sup>2+</sup> -Kanalinhibitoren auf Spontanerregungen primärer Neurone. ....	82
Abbildung 32: Exemplarische graphische Darstellung der Einflussnahme von Ca <sup>2+</sup> -Kanalinhibitoren auf Spontanerregungen von NSCs. ....	84
Abbildung 33: Statistische Darstellung der Regulierbarkeit unterschiedlicher Ca <sup>2+</sup> -Kanaltypen über spezifische Ca <sup>2+</sup> -Kanalinhhibitoren. ....	86

**III Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auflistung der technischen Bestandteile des Calcium-Imaging-Setups. ....	31
Tabelle 2: Auflistung sonstiger technischer Geräte.....	31
Tabelle 3: Auflistung der Labormaterialien. ....	32
Tabelle 4: Übersicht über das Präparationsinstrumentarium.....	33
Tabelle 5: Auflistung der Chemikalien für die Zellkultur.....	33
Tabelle 6: Auflistung der Chemikalien für die Immunzytologie. ....	34
Tabelle 7: Auflistung der Chemikalien für das Calcium-Imaging. ....	34
Tabelle 8: Auflistung der Fluorophore.....	35
Tabelle 9: Liste eingesetzter Wachstumsfaktoren. ....	35
Tabelle 10: Liste verwendeter Enzyme.....	35
Tabelle 11: Liste verwendeter Erst-Antikörper. ....	36
Tabelle 12: Liste eingesetzter Zweit-Antikörper. ....	37
Tabelle 13: Liste selbsthergestellter Medien für die Kulturen neuronaler Stammzellen. ....	37
Tabelle 14: Liste selbsthergestellter Puffer und Lösungen für die Immunzytochemie und Zellkultur.....	38
Tabelle 15: Liste verwendeter Produkte zur Beschichtung von Glas-Deckgläsern für Immunzytologie, Zellkultur und Calcium-Imaging.....	39
Tabelle 16: Liste eingesetzter Tierstämme.....	39

## IV - Danksagung

### **IV Danksagung**

In erster Linie möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Kristen Rak für die Stellung des Promotionsthemas und die Möglichkeit der wissenschaftlichen Forschung an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg danken. Ich möchte mich für die intensive Betreuung, die wissenschaftliche Anregung, wertvolle Hilfestellungen in allen Fragen und die enge Zusammenarbeit bei der Entwicklung neuer Ideen sowie ihrer Umsetzung bedanken. Mir war es stets möglich, Problemstellungen anzusprechen, eigene Gedanken einzubringen und sehr frei zu arbeiten. Auf etwaige Fragen gab es sofort Rückmeldung und ich konnte immer auf Unterstützung vertrauen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Rudolf Hagen als Direktor der HNO-Klinik Würzburg für die Möglichkeit, im Bereich der zellulären Grundlagenforschung der HNO wissenschaftliches Arbeiten und Schreiben erlernen und weiterzuentwickeln zu können. Die Diskussionen in regelmäßigen Treffen unseres Forschungsteams unter seiner Leitung mit Präsentationen unserer experimentellen Fortschritte brachten stets konstruktive Anregungen. Sowohl im Hinblick auf inhaltliche Aspekte als auch für das Erlernen wissenschaftlichen Arbeitens war es von besonderer Bedeutung, mit Poster-Präsentationen und Vorträgen jährlich an Kongressen der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie sowie an den internationalen Inner Ear Biology Workshops teilnehmen zu dürfen und einen Austausch mit erfahrenen Wissenschaftlern ermöglicht zu bekommen. Außerdem konnte die Erarbeitung aller Themenbereiche nur durch die Stellung der Laborräumlichkeiten und ihre Ausstattung sowie die Unterstützung durch die Mitarbeiter stattfinden.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Anna-Leena Sirén als Leiterin der experimentellen Neurochirurgie des Universitätsklinikums Würzburg für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit sowie ihr Interesse an unserem Forschungsgebiet.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Robert Mlynski bedanken, der den ersten Teil meiner Forschungszeit begleitete und meine Arbeit immer wieder mit neuen Anregungen bereicherte. Auch seine Unterstützung war mir stets sicher.

Ein besonderes Dankeschön gilt dem gesamten Forschungsteam des HNO-Labors unter der Leitung von Frau Petra Joa für die grundlegende Organisation sowie die

Hilfestellung bei labortechnischen Fragen. Eine immer zuverlässige und unabdingbare Unterstützung kam mir durch Frau Laura Halbhuber zugute, die sich stets mit ihrer sehr gewissenhaften und organisierten Arbeitsweise für den Erfolg meiner Versuche einsetzte. Aus unserer Arbeitsgruppe möchte ich Herrn Dr. Lukas Jürgens hervorheben, der zu abendlichen Laborstunden immer für positive Stimmung sorgte und mit dem das gemeinsame Forschen viel Freude bereitete.

Ein lieber Dank ergeht an Frau Bettina Bönitz und Herrn Martin Thies für die Mitwirkung an der Ausarbeitung der Vektorgrafiken sowie Herrn Dr. Christian Höhne für die gemeinsame Erarbeitung des automatisierten Auswertungsprotokolls zur Erhebung der Calcium-Imaging-Daten. Ein herzliches Dankeschön gilt auch Frau Dr. Claudia Waldhorn, die mir als Chefin bei meiner Tätigkeit als Zahnärztin stets Verständnis für die mir wichtige Forschungszeit entgegenbrachte.

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei meinem Verlobten, Herrn Martin Thies, bedanken, der mir in zahlreichen Stunden der Laborarbeit voller Verständnis zur Seite stand und mich in allen Lebenslagen entlastete, sodass mir sowohl während meines Studienabschlusses als auch neben meiner Vollzeit-Berufstätigkeit eine derartige Forschung möglich war. Er gab mir durch sein unermüdliches, geduldiges Zuhören die notwendige Ruhe zur Fertigstellung meiner Arbeit. Auch seinen Eltern Helga und Klaus Thies danke ich für die immerwährende Unterstützung in jeglicher Form.

Ganz besonders hervorheben möchte ich die Zusammenarbeit mit meinem lieben Bruder, Herrn Dr. Johannes Völker, der mir schon mein Leben lang ein großes Vorbild war und ist. Er hat den Kontakt zu der einzigartigen Forschungsgruppe hergestellt und damit den Grundstein und die Motivation zum Beginn meiner Arbeit gelegt. Er erlernte mir die Präparation des Nucleus Cochlearis, alle wichtigen Labortechniken und das wissenschaftliche Arbeiten im Detail. Neben den zur Verfügung stehenden Laborgeräten entwarfen wir mit großer Freude eigene Konstruktionen. Durch das technische Verständnis und die unermüdliche Zusammenarbeit konnten wir das Calcium-Imaging-Setup optimal gestalten und nutzen. Technische Ausfälle wurden so jederzeit gemeistert. In stetem Zusammenhalt entwickelten wir immerwährend neue Ideen und Forschungsansätze – sowohl während unzähliger Stunden bei Tag und Nacht im Labor als auch bei den zahlreichen unvergesslichen gemeinsamen Kongressen und Forschungsaufenthalten in ganz Deutschland, Spanien, Italien und Japan. Ich danke

## IV - Danksagung

meinem Bruder auch für die gemeinsame Publikation unserer Daten. Immer wieder wurde es uns angetragen: Wir bilden ein unglaubliches Forschungs-Duo.

Insbesondere danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, Frau Elvira Völker und Herrn Dr. Joachim Völker, für die Ermöglichung meiner wunderbaren schulischen Laufbahn und meines Studiums der Zahnmedizin als eigentliche Grundlage meiner Promotion. Nur durch ihre finanzielle und moralische Unterstützung konnte ich meine Ziele erarbeiten sowie meine Ergebnisse auf Kongressen präsentieren. Ich danke ihnen auch für das akribische Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift. Mit ihrem wissenschaftlichen Verständnis und Interesse waren meine Eltern oftmals Zuhörer meiner Präsentationen. Unseren familiären Dialog über entsprechende medizinische Themenbereiche und Problemstellungen habe ich stets als Ermutigung und Motivation empfunden und möchte ihn nicht missen.

Abschließend ergeht noch einmal ein gemeinsamer Dank an alle meine wichtigen Familienmitglieder für ihre uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung.

## **V Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen**

### **Wissenschaftliche Vorträge**

Voelker C, Rak K, Voelker J, Juergens L, Schendzielorz P, Radeloff A, Hagen R  
Characterization of differentiating neural stem cells from the rat cochlear nucleus by  
spontaneous calcium activity  
(51<sup>st</sup> Inner Ear Biology Workshop 2014, Kyoto, Japan)

Völker C., Rak K., Völker J., Hagen R.  
Charakterisierung der Differenzierung neuronaler Stammzellen des Nucleus cochlearis  
durch Analyse spontaner Calciumaktivität  
(86. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,  
Kopf- und Hals-Chirurgie e. V. 2015, Berlin)

Voelker C, Rak K, Voelker J, Juergens L, Schendzielorz P, Radeloff A, Hagen R  
Comparison of the differentiation of neural stem cells and primary neurons from the rat  
cochlear nucleus by spontaneous calcium activity  
(52<sup>nd</sup> Inner Ear Biology Workshop 2015, Rom, Italien)

Völker C., Völker J., Schendzielorz P., Radeloff A., Hagen R., Rak K.  
Spezifizierung der Calciumkanäle von Primärneuronen des Nucleus cochlearis der Ratte  
durch Analyse der Calciumaktivität  
(88. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,  
Kopf- und Hals-Chirurgie e. V. 2017, Erfurt)

Voelker C, Voelker J, Rak K, Schendzielorz P, Radeloff A, Hagen R  
Specify the calcium channels of primary neurons of the rat's cochlear nucleus by  
analyzing the calcium activity  
(54<sup>th</sup> Inner Ear Biology Workshop 2017 Hannover, Deutschland)

## V - Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

### Publikationsliste

Rak K., Völker J., Jürgens L., Völker C., Hagen, R. (2015).

Cochlear nucleus whole mount explants promote the differentiation of neuronal stem cells from the cochlear nucleus in co-culture experiments.

Brain Research, 1616.

<http://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.055>

Völker J., Völker C., Schendzielorz P., Hagen R., Rak K. (2017).

Pathophysiology of esophageal due to button battery ingestion.

International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 100.

<http://doi.org/10.1016/j.ijporl.2017.06.030>

Völker J., Völker C., Rak K., Hagen R. (2018).

Histological analysis and physical basis of oesophageal tissue damage due to button battery ingestion.

Laryngo-Rhino-Otologie, 97.

<http://doi.org/10.1055/s-0038-1639785>

Völker J., Völker C., Rak K., Hagen R. (2018).

Histologische Analyse und physikalische Grundlagen der ösophagealen Gewebeschädigung durch die Ingestion von Knopfzellbatterien.

Laryngo-Rhino-Otologie, 97.

<http://doi.org/10.1055/s-0038-1639785>

Völker J., Engert E., Völker C., Hagen R., Rak K. (2019).

Isolation and Characterization of Neural Stem Cells from the Rat Inferior Colliculus.

Stem Cells International, 2019(4):1-12.

<http://doi.org/10.1155/2019/5831240>

Völker J., Völker C., Schendzielorz P., Hagen R., Rak K. (2020).

Tracheal injuries due to button battery aspiration – an in vitro study.

Laryngo-Rhino-Otologie, 99.

<http://doi.org/10.1055/s-0040-1710826>

## V - Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

Völker J., Völker C., Schendzielorz P., Hagen R., Rak K. (2020).

Tracheaverletzungen durch Knopfzellbatterie-Aspiration – eine in-vitro Studie.

Laryngo-Rhino-Otologie, 99.

<http://doi.org/10.1055/s-0040-1710491>

Voelker J., Voelker C., Engert J., Schendzielorz P., Hagen R., Rak K. (2020).

Severe tracheobronchial harm due to lithium button battery aspiration: An in vitro study of the pathomechanism and injury pattern.

International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.

<http://doi.org/10.1016/j.ijporl.2020.110431>

Voelker J., Voelker C., Voelker J., Hagen R., Rak K. (2020).

Button batteries and typical swallowed foreign bodies can be differentiated in high-resolution X-rays.

International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.

<http://doi.org/10.1016/j.ijporl.2020.110604>

Voelker J., Engert J., Voelker C., Hagen R., Rak K. (2021).

Different neurogenic potential in the subnuclei of the postnatal rat cochlear nucleus.

Stem Cells International, 2021(5):1-15.

<http://doi.org/10.1155/2021/8871308>

Voelker J., Voelker C., Engert J., Goemann N., Hagen R., Rak K. (2021).

Spontaneous calcium oscillations through differentiation: A calcium imaging analysis of rat cochlear nucleus neural stem cells.

Cells, 202, 10(10), 2802.

<http://doi.org/10.3390/cells10102802>