

Aus dem

Institut für Physiologie der Universität Tübingen

Abteilung für Neurophysiologie

**Die Rolle endogener neuronaler Aktivität für die
Morphogenese, Reifung und Differenzierung adult-geborener
Körnerzellen im Riechkolben der Maus**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Gorzolka, Jessika

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. O. Garaschuk

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 27.03.2024

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Adulte Neurogenese – Der Hoffnungsträger in der Neurowissenschaft....	1
1.2 Neuronale Plastizität und adulte Neurogenese	3
1.3 Das olfaktorische System und der Aufbau des Riechkolbens.....	6
1.4 Adulte Neurogenese in der subventrikulären Zone	8
1.5 Bestimmung des Reifegrades von adult-geborenen Neuronen	15
1.6 Neuronale Aktivität.....	17
1.7 Der CREB-Signalweg	20
1.8 Kaliumkanäle	22
1.9 Bisherige Forschung zum Thema	27
1.10 Fragestellung der Arbeit.....	28
2. Material und Methoden:	29
2.1 Material	29
2.2 Methoden.....	31
3. Ergebnisse.....	45
3.1 Verifizierung der Überexpression von Kaliumkanälen (Kv1.2) in den adult-geborenen Körnerzellen durch lentivirale Transduktion.....	45
3.2 Beeinflussung der Morphogenese der adult-geborenen Körnerzellen durch die herabgesetzte endogene neuronale Aktivität durch die Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1	47

3.3 Abschätzung des Entwicklungsgrades der adult-geborenen Körnerzellen durch den Nachweis von NeuN oder DCX	56
3.4 Untersuchung des CREB-Signalweges in adult-geborenen GCs	64
4. Diskussion	73
4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse	73
4.2 Nachweis der Kaliumkanal-Überexpression in GCs	74
4.3 Die endogene neuronale Aktivität reguliert die Morphogenese von adult-geborenen Interneuronen im OB.....	74
4.4 Einfluss der endogenen Aktivität auf die Dornfortsätze und Synapsen der GCs	76
4.5 Methodische Einschränkungen durch herabgesetzte Signalhelligkeit	79
4.6 Die endogene Aktivität beeinflusst nicht die Reifestadien	80
4.7 Der CREB-Signalweg	81
4.8 Schlussfolgerungen und Ausblicke	85
5. Zusammenfassung	87
6. Literaturverzeichnis	89
7. Veröffentlichungen	104
8. Erklärung zum Eigenanteil	105
9. Danksagung	106
10. Lebenslauf	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Antikörper	29
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper	29
Tabelle 3: Lösungen.....	29
Tabelle 4: Chemikalien.....	30
Tabelle 5: Geräte	30
Tabelle 6: Softwareprogramme	30
Tabelle 7: Auswahl der Schnittdicke nach Experiment	33
Tabelle 8: Zuordnung primärer und sekundärer Antikörper je Experiment.....	35
Tabelle 9: Gesamtlänge und Anzahl der Verästelungen des Apikaldendriten..	49
Tabelle 10: Signifikante Bereiche in der Sholl-Analyse.....	51

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Histologische Schichten des Riechkolbens.....	7
Abbildung 2: Schema der adulten Neurogenese im SVZ und im OB	8
Abbildung 3: Analyse des Expressionsniveaus von Kv1.2-Kanälen in Matlab .	38
Abbildung 4: Illustration der Sholl-Analyse	39
Abbildung 5: Auswertung der pCREB Doppelfärbungen in ImageJ	42
Abbildung 6: Zeitgleiche Expression von Kv1.2 und Twitch-2B in GCs	45
Abbildung 7: Nachweis gleichzeitiger Expression von Kv1.2 und Twitch-2B in Kontroll- und Kv1.2- GCs an DPI 11 durch lentivirale Transfektion.....	46
Abbildung 8: Morphologie des apikalen Dendriten von GCs.....	48
Abbildung 9: Die Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1 inhibiert die Morphogenese der adult-geborenen GCs im OB.	50
Abbildung 10: Die Anzahl der Basaldendriten pro GCs ist durch die Überexpression von Kv1.2 bzw. Kir2.1 deutlich reduziert.....	52
Abbildung 11: Eingeschränkte Darstellbarkeit der Dornfortsätze im Bereich des apikalen Dendriten von GCs in der Kv1.2- und Kir2.1- Gruppe.	53
Abbildung 12: Vergleich der Signalhelligkeit im Bereich der Somata von Kontroll-GCs und Kv1.2-überexprimierenden GCs an DPI 28	55
Abbildung 13: Der Anteil an DCX-positiven GCs (DCX+) sinkt drastisch mit zunehmendem Zellalter.....	57
Abbildung 14: Nachweis der Entwicklungsmarker DCX und NeuN zur Abschätzung des Reifungsgrades von adult-geborenen GCs an DPI 28.....	59
Abbildung 15: Der Reifungsgrad der adult-geborenen GCs an DPI 28 wird durch eine Kv1.2- oder Kir2.1- Überexpression nicht relevant beeinflusst.....	60
Abbildung 16: Nachweis der Entwicklungsmarker in JGNs an DPI 28	62
Abbildung 17: Der Reifungsgrad von JGNS an DPI 28 zeigte sich durch die Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1 vergleichbar unbeeinflusst.....	63
Abbildung 18: Relative pCREB-Expression in der Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1- Gruppe an DPI 28 in Relation zu pCREB+ GCs der Umgebung.....	65
Abbildung 19: Anteil der NeuN-positiven GCs mit Koexpression von pCREB .	68
Abbildung 20: Relative pCREB-Expression zu NeuN+ GCs an DPI 28	70
Abbildung 21: Relative pCREB-Expression zu NeuN+ GCs an DPI 10	72

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calciumion
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DCX	Doublecortin
DG	<i>dentale gyrus</i> , Gyrus dentatus
DPI	<i>days post injection</i> , Tage nach Injektion
et al.	et altera
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GCs	<i>granule cells</i> , Körnerzellen
GCL	<i>granule cell layer</i> , Körnerzellschicht
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GL	<i>glomerular layer</i> , Glomerularschicht
IQR	<i>interquartile range</i> , Interquartilsabstände
JGNs	<i>juxtaglomerular neurons</i> , Juxtaglomeruläre Neurone
Kir	<i>inward-rectifier potassium channel</i> , einwärtsgerichteter Kaliumkanal
Kv	<i>voltage gated potassium channel</i> , spannungsabhängiger Kaliumkanal
KG	Körpergewicht
MIP	Maximum-Intensitäts-Projektion
n	<i>number</i> , Anzahl
NeuN	<i>neuronal nuclear protein</i>
OB	<i>Olfactory Bulb</i> , Bulbus olfactorius oder Riechkolben
P	Signifikanz
PBS	<i>phosphate buffer saline</i> , Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung

pCREB	phosphoryliertes <i>cAMP response element-binding protein</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMT	Photomultiplier
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
RMS	rostraler Migrationsstrom
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
s.c.	subkutan
SVZ	Subventrikuläre Zone
SYP	Synaptophysin
TDBL	<i>total dendritic branch length</i> , Gesamtlänge des Dendriten
V.	Vergrößerung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Adulte Neurogenese – Der Hoffnungsträger in der Neurowissenschaft

“Our brains renew themselves throughout life to an extent previously thought not possible.” – (Michael S. Gazzaniga)

„Unsere Gehirne erneuern sich im Laufe des Lebens in einem Ausmaß, das zuvor nicht für möglich gehalten wurde.“ So lautet die deutsche Übersetzung des Zitates von Michael S. Gazzaniga, einem 1939 geborenen Professoren für Psychologie und Direktor des *SAGE Center for the Study of the Mind* an der University of California Santa Barbara in den USA.

Das Gehirn ist plastisch – es ist zeitlebens in der Lage neue Inhalte zu erlernen, Erinnerungen zu bilden und auf Veränderungen der Umwelt zu reagieren. Um diese Funktionen gewährleisten zu können, muss sich das Gehirn ständig funktionell und strukturell anpassen. Es kann durch synaptische Reorganisation neue Verbindungen zwischen Neuronen bilden, ganze neuronale Schaltkreissysteme modifizieren und teils sogar neue Nervenzellen in bestimmten Lokalisationen im Erwachsenenalter generieren (Puderbaugh & Emmady, 2023).

In der Erforschung der strukturellen neuronalen Plastizität war die Entdeckung der adulten Neurogenese ein Meilenstein (Altman & Das, 1965; Stahnisch & Nitsch, 2002). Unser Wissen über diesen einzigartigen regenerativen Prozess wächst kontinuierlich mit der Forschung und mit dem stetigen Fortschritt der Technologien. Doch auch wenn die adulte Neurogenese als Hoffnungsträger für zukünftige Therapieverfahren gilt, wie z.B. stammzellbasierten Ersatztherapien zur Reparatur von Hirngewebe (Götz & Bocchi, 2021), stellt sie uns mit ihrer komplexen Dekodierung vor immense Herausforderungen. Um die adulte Neurogenese für medizinische Zwecke instrumentalisieren zu können, müssen wir zunächst die dafür notwendigen Grundlagen und Prinzipien verstehen (Lois & Kelsch, 2014). Dazu gehört die Aufklärung über die Mechanismen und Prozesse, wie sich migrierende im adulten Gehirn geborene Neurone in ein

Einleitung

bereits bestehendes neuronales Netzwerk integrieren können. Auch müssen die Faktoren detektiert werden, die für die erfolgreiche Differenzierung, die morphologische und funktionelle Heranreifung und das Überleben der neu-geborenen Zellen entscheidend sind.

Bisher sind die Mechanismen der Morphogenese, Differenzierung und Reifung in der adulten Neurogenese noch nicht bekannt. Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass die endogene neuronale Aktivität von großer Bedeutung für die Entwicklung, die Migration und das Überleben der adult-geborenen Neurone im Bulbus olfaktorius ist (Bugeon et al., 2021; Li et al., 2023; Lin et al., 2010).

Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Rolle der endogenen neuronalen Aktivität für die morphologische Entwicklung, Differenzierung und Reifung von adult-geborenen Neuronen am Beispiel von adult-geborenen Körnerzellen im Riechkolben der Maus. Um dies zu untersuchen, wurde in adult-geborenen Körnerzellen die endogene neuronale Aktivität durch einen vermehrten Einbau von Kaliumkanälen (Kv1.2 oder Kir2.1, siehe Kapitel 1.8) verändert. Mithilfe von *in vitro* immunhistochemischen Auswertungen wurde der Einfluss auf die Morphogenese und den Reifungsprozess untersucht. Zudem wurde nach einem Signalweg gesucht, welcher als Bindeglied zwischen der herabgesetzten endogenen Aktivität und den veränderten morphologischen Zelleigenschaften stehen könnte.

In der Einführung wird zunächst ein kurzer Überblick über den aktuellen Forschungsstand zur neuronalen Plastizität und der adulten Neurogenese gegeben. Anschließend wird der Fokus auf die adult-geborenen Neurone im Riechkolben gesetzt, der Aufbau des Riechkolbens erklärt und die darin liegenden Körnerzellen beschrieben. Im nächsten Schritt wird der Begriff der neuronalen Aktivität erklärt und auf den CREB-Signalweg eingegangen. Danach wird die Funktion und Bedeutung von Kaliumkanäle dargestellt. Zum Schluss wird der aktuelle Stand der Forschung zusammengefasst und die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit definiert.

1.2 Neuronale Plastizität und adulte Neurogenese

1.2.1 Definition und Formen neuronaler Plastizität

Neuronale Plastizität – auch Neuroplastizität genannt – bezeichnet die Fähigkeit des Gehirns, seine Struktur und Funktion in Reaktion auf neue Umgebungen, Reize oder Läsionen zu verändern. Diese Veränderung bzw. Adaptation kann auf vielen Ebenen stattfinden: sie äußert sich beispielsweise in intrazellulären Prozessen, synaptischen Veränderungen, der Neurogenese, bis hin zur Modifikation von neuronalen Netzwerkfunktionen und kortikalen Regionen (Han et al., 2023; Puderbaugh & Emmady, 2023).

Historisch gesehen prägte der Neurologe Santiago Ramón y Cajal initial den Begriff der neuronalen Plastizität durch seine Beobachtung, dass Nervenzellen im Gehirn durch Lernen und Erfahrungen ihre morphologischen Strukturen verändern können und somit neue Verbindungen zwischen Neuronen entstehen (Stahnisch & Nitsch, 2002). Weitere Meilensteine wurden durch die Theorien über die synaptische Plastizität und die Physiologie des Lernens durch den Neurowissenschaftler Donald Hebb erbracht (Brown & Milner, 2003). Die wohl extremste Form der neuronalen Plastizität wurde mit der Entdeckung der adulten Neurogenese in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts aufgedeckt (Altman, 1962; Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002): Adulte Neurogenese beschreibt die Fähigkeit des Nervensystems, auch im Erwachsenenalter kontinuierlich neue Neurone zu generieren. Die Generierungsorte der adult-geborenen Neurone sind die sogenannten neurogenen Nischen, in denen sich die neuralen Stammzellen befinden. Diese haben die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern oder sich zu Neuroblasten sowie anschließend zu ausgereiften Neuronen zu entwickeln. Zudem sind neuronale Stammzellen multipotent, das heißt, dass sie sich in unterschiedliche Zelllinien differenzieren können wie z.B. in verschiedene Nervenzelltypen, Astrozyten und Oligodendrozyten (Llorente et al., 2022).

1.2.2 Stammzellnischen in der adulten Neurogenese

Bei Säugetieren werden nahezu alle Hirnstrukturen sowie der Großteil der Nervenzellen während der embryonalen Phase generiert. Daher wurde lange Zeit angenommen, dass die Neubildung von Neuronen im Erwachsenenalter nicht möglich sei (Ramón y Cajal, 1913). Dieses Dogma wurde von Altman und weiteren Kollegen hinterfragt, und die These aufgestellt, dass die Neurogenese im erwachsenen Gehirn im Gyrus dentatus (engl. dentate gyrus (DG)) des Hippocampus und in der subventrikulären Zone (SVZ) an den Seitenventrikel möglich sei (Altman, 1969; Altman & Das, 1965; Cameron et al., 1993; Lois & Alvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993). Der Prozess der kontinuierlichen Neubildung von Nervenzellen im Erwachsenenalter wird adulte Neurogenese bezeichnet. Mittlerweile wurde bei Säugetieren die kontinuierliche Neubildung und die Einwanderung von adult-geborenen Nervenzellen in den Riechkolben und im Hippocampus mehrfach nachgewiesen (Gonçalves et al., 2016; Lim & Alvarez-Buylla, 2016). Auch bestehen zunehmende Hinweise auf die Möglichkeit weiterer neurogener Nischen im adulten Gehirn wie z.B. im Hypothalamus, in der Substantia Nigra, im Striatum und in der Amygdala, deren Existenznachweis Bestandteil gegenwärtiger Forschung ist (Choi et al., 2017; Jurkowski et al., 2020; Leal-Galicia et al., 2021; Lee et al., 2012; Magavi et al., 2000).

Zwischen verschiedenen Spezies variiert die Ausprägung der adulten Neurogenese deutlich. Im Gegensatz zu Fischen oder Amphibien, bei denen die adulte Neurogenese deutlich ausgeprägter vorhanden ist, haben Säugetiere eine eingeschränktere Fähigkeit zur Generierung von Neuronen im Erwachsenenalter (Bonfanti, 2011). Innerhalb der Gruppe der Säugetiere zeigen großhirnige und langlebige Arten, wie Menschen und Delphine, im Vergleich zu Nagetieren ein geringeres Vorkommen von adulter Neurogenese (Parolisi et al., 2018).

Kontrovers wird diskutiert, ob im menschlichen Gehirn adulte Neurogenese wirklich stattfindet (Lucassen et al., 2020). Einerseits wird berichtet, dass die adulte Neurogenese im Menschen bis ins hohe Alter nachweisbar ist (Boldrini et al., 2018; Moreno-Jiménez et al., 2019), andererseits beschreiben weitere Quellen einen dramatischen postnatalen Rückgang mit Arrest der Neurogenese

Einleitung

im zweiten Lebensjahr in der SVZ (Sanai et al., 2011) und Arrest im ersten Lebensjahrzehnt im hippocampalen Gyrus dentatus (Sorrells et al., 2018)). Wiederum andere Autoren hinterfragen kritisch, ob die bisherigen Nachweise überhaupt ausreichen, um die adulte Neurogenese im Menschen zu belegen (La Rosa et al., 2020).

Welche Faktoren die adulte Neurogenese maßgeblich beeinflussen, wurde in zahlreichen Studien untersucht. Die Studien deuten darauf hin, dass neben mentalen und psychischen Reizen (wie z.B. Lernen, Stress oder eine Stimulusreiche Umgebung), extrinsische Moleküle (z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Neurotransmitter oder Medikamente), intrazelluläre Faktoren (z.B. Transkriptionsfaktoren) sowie pathologische Reize (z.B. Ischämie, Krampfanfälle oder Trauma) von Relevanz sind (Hagg, 2005; Kempermann et al., 2004; Lledo et al., 2006; Ming & Song, 2005; Yasuda & Adams, 2010; Zhao et al., 2008).

Die Funktionen der adulten Neurogenese für das Gehirn sind vielseitig. So spielt sie beispielsweise eine entscheidende Rolle für das Lernen und die Gedächtnisbildung (Anacker & Hen, 2017; Shors et al., 2012). Es wird angenommen, dass Störungen der adulten Neurogenese im Zusammenhang mit multiplen Erkrankungen des zentralen Nervensystems stehen. Daher ist ihre Erforschung essentiell, um bestimmte Krankungsbilder im Menschen verstehen, verhindern oder gar behandeln zu können. Zu den Pathologien, die mit einer Dysregulation der adulten Neurogenese in Verbindung gebracht werden, zählen psychische Störungen (wie Schizophrenie, Depression, Suchterkrankungen und Angststörungen (Kang et al., 2016; Snyder et al., 2011)), neurodegenerative Erkrankungen (wie Parkinson, Alzheimer und Chorea Huntington (Kim et al., 2022; Winner & Winkler, 2015)) und die Epilepsie (Chen et al., 2020). Zudem wird untersucht, ob spezielle Tumorentitäten wie Glioblastome möglicherweise ihren Ursprungsort in neuronalen Stammzellnischen haben könnten (Loras et al., 2023). Auch in physiologisch regenerativen Reparaturmechanismen wie nach strukturellen Hirnläsionen nach einem ischämischen Schlaganfall wird der adulten Neurogenese eine wesentliche Rolle zugeschrieben (Han et al., 2023).

1.3 Das olfaktorische System und der Aufbau des Riechkolbens

In der SVZ werden lebenslang neue Neurone für den Riechkolben generiert. Bevor auf die adulte Neurogenese in der SVZ eingegangen wird, soll zuerst die Funktion und der strukturelle Aufbau des Riechkolbens (eng. „olfactory bulb“, OB) dargestellt werden.

Das olfaktorische System ist für die Wahrnehmung sowie Verarbeitung von Gerüchen verantwortlich und ist von elementarer Bedeutung für das Verhalten von Säugetieren sowie deren Wechselwirkung mit der Umgebung. Die Funktionen des olfaktorischen Systems reichen von der Nahrungsaufnahme und Futtersuche, Kommunikation sowie Umgebungserkennung, über Paarung und Fortpflanzung bis hin zur Gefahrenerkennung (Patel & Pinto, 2014). Hierbei spielt der Riechkolben eine entscheidende Rolle, da er als zentrale Zwischenkomponente zwischen dem olfaktorischen Epithel und den höheren kortikalen Ebenen fungiert.

Der vereinfachte Signalweg der Riechbahn wird nachfolgend kurz dargestellt: Die Geruchsstimuli werden durch Rezeptoren der Riechsinneszellen im Riechepithel der Nase wahrgenommen, prozessiert und gesammelt über den Nervus olfactorius axonal weitergeleitet an die Glomeruli des OBs. In den sogenannten Glomeruli konvergieren die Axone von Riechsinneszellen der gleichen Selektivität, mit gleichem Duftstoffrezeptor, und werden dort synaptisch auf die Dendriten der Mitralzellen oder Büschelzellen verschaltet, die wiederum das Signal an höhere Hirnzentren weiterleiten. Die Aktivität der Mitralzellen und Büschelzellen wird durch die umliegenden Interneurone (juxtaglomerulären Neurone und Körnerzellen) moduliert, die durch laterale Inhibition eine Kontrastverstärkung erzielen und somit zur besseren Diskriminierung von verschiedenen Duftstoffen beitragen können (Imai, 2014).

Einleitung

Der histologische Aufbau des Riechkolbens wird in Abbildung 1 dargestellt. Die im OB befindlichen Neurone wurden herkömmlich anhand der Schichten benannt, in denen sich deren Zellkörper befinden, z.B. Körnerzellen (engl. „granule cells“ (GCs)) in der Körnerzellschicht oder juxtaglomerulären Neurone (eng. „juxtglomerular neurons“ (JGNs)) in der Glomerularschicht. Für detaillierte Informationen bezüglich der Zelltypen im OB wird auf die Arbeit von Nagayama et al. verwiesen (Nagayama et al., 2014).

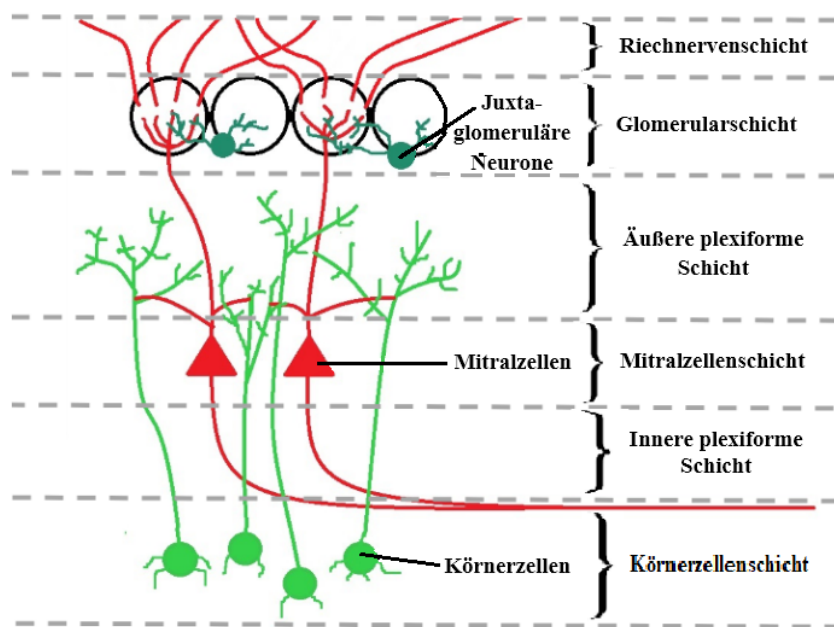


Abbildung 1 Histologische Schichten des Riechkolbens

Vereinfachte schematische Darstellung der histologischen Schichten im Riechkolben. Von außen nach innen betrachtet: (1) Riechnervenschicht; (2) Glomerularschicht (engl. „glomerular layer“ (GL)); (3) Äußere plexiforme Schicht; (4) Mitralzellenschicht; (5) Innere plexiforme Schicht; (6) Körnerzellschicht (engl. „granule cell layer“ (GCL)), inhaltliche Angaben aus (Alvites et al., 2023) übernommen.

Eine der wohl größten Besonderheiten des Riechkolbens ist sein Vermögen zur zellulären neuronalen Plastizität, die durch den lebenslangen Zustrom von neu geborenen Interneuronen (GCs und JGNs) aus der SVZ gewährleistet wird (Lois & Alvarez-Buylla, 1993).

1.4 Adulte Neurogenese in der subventrikulären Zone

Eine der am besten untersuchtesten neurogenen Nischen im Säugetier befindet sich in der subventrikulären Zone (SVZ) (Lois & Alvarez-Buylla, 1993; Luskin, 1993). Dort werden lebenslang aus neuronalen Stammzellen neue Nervenzellen generiert, die als Neuroblasten entlang des rostralen Migrationsstroms (RMS) zum Riechkolben (OB) wandern (Lois & Alvarez-Buylla, 1994) (siehe Abbildung 2). Die adult-geborenen Neurone bilden sich zum größten Teil zu GABAergen Interneuronen aus. Die überwiegende Mehrheit (ca. 90%) entwickelt sich zu Körnerzellen (engl. „granule cells“ (GCs)) und ca. 10% zu juxtaglomerulären Neuronen (JGNs) (Alvarez-Buylla et al., 2002; Lledo et al., 2008). Die Differenzierung in einen der Interneuron-Subtypen ist abhängig von ihrer ursprünglichen Lokalisation in den Stammzellkompartimenten in der SVZ. Während aus Stammzellen im lateralen Bereich der Ventrikel vornehmlich GCs entstehen, werden JGNs hauptsächlich aus den Stammzellen im Bereich der medialen und dorsalen Wand des Ventrikels generiert (Merkle et al., 2007).

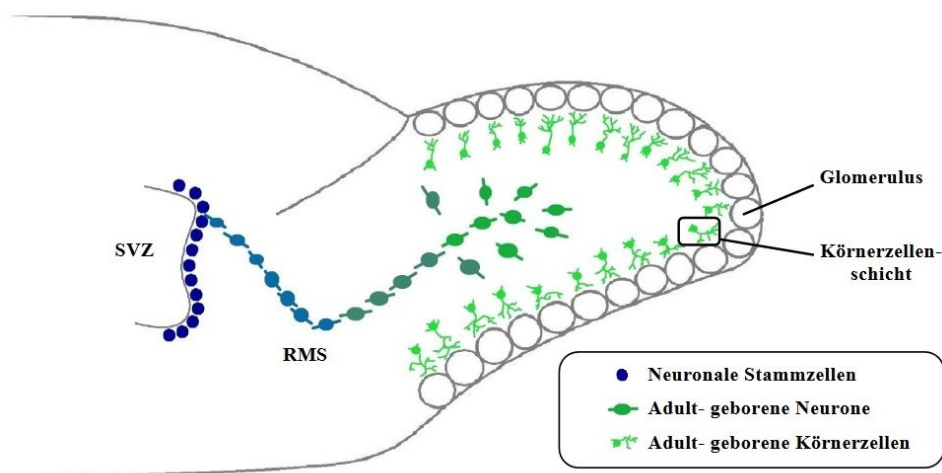


Abbildung 2: Schema der adulten Neurogenese im SVZ und im OB

In der subventrikulären Zone (SVZ) werden aus neuronalen Stammzellen adult-geborene Neurone generiert, die entlang des RMS (rostraler Migrationsstrom) tangential wandern und radial in die Riechkolben (OB) migrieren. Die adult-geborenen Neurone differenzieren sich in zwei Haupttypen von Interneuronen: zu Körnerzellen (GCs) in der Körnerzellschicht und zu juxtaglomerulären Neuronen (JGNs), die sich in den Glomeruli befinden.

1.4.1 Migration der adult-geborenen Neurone

Die adult-geborenen Neurone legen weite Strecken zurück und zeigen zunächst ein tangenciales Migrationsmuster im RMS, das sich nach ihrer Ankunft im OB in ein radiales Migrationsmuster ändert (Lois & Alvarez-Buylla, 1994). Zusätzlich weisen JGNs ein weiteres laterales Migrationsmuster auf (Liang et al., 2016). Über diese Wege gelangen die Zellen zu ihren finalen Positionen im GCL oder im GL und integrieren sich dort in das bereits bestehende neuronale Netzwerk (Platel et al., 2019). Der Migrationsprozess im RMS scheint weitestgehend unabhängig von sensorisch-evozierter Aktivität zu sein, da das Fehlen von sensorischem Input die neu-geborenen Interneurone nicht in ihrem Migrationsverhalten behindert (Liang et al., 2016; Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002). Jedoch wurde in adult-geborenen JGNs gezeigt, dass eine herabgesetzte endogene Aktivität Einfluss auf das laterale Migrationsvermögen der Zellen hat (Li et al., 2023).

1.4.2 Überleben der adult-geborenen Neurone im Riechkolben

Obwohl täglich eine Vielzahl von neugeborenen Neuronen den Riechkolben erreichen, nimmt dessen Volumen nicht zu. Es wird angenommen, dass ca. 50% der adult-geborenen Interneurone nach ihrer Ankunft im OB den programmierten Zelltod durchlaufen (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002; Winner et al., 2002). Welche Faktoren dazu führen, dass ein wesentlicher Anteil der adult-geborenen Interneurone untergeht, ist Bestandteil derzeitiger Forschung. Multiple Faktoren scheinen Einfluss auf das Überleben der neu-geborenen Neurone zu nehmen. Zum einen sollen kortikale olfaktorische Regionen das Überleben neu-geborener Neurone im OB beeinflussen (Libbrecht et al., 2021). Zum anderen scheint die Modifikation der neuronalen Aktivität durch äußere Einflüsse wie Geruchsexposition, Lernen von olfaktorischer Diskriminierung (Alonso et al., 2006; Masato et al., 2011; Mouret et al., 2008; Rochefort et al., 2002) oder sensorische Deprivation in der sensiblen Phase (3. - 4. Woche nach Generierung in der SVZ) (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002; Yamaguchi & Mori, 2005) eine Rolle für das Überleben der Zellen zu spielen. Nicht zuletzt wird auch der endogenen neuronalen Aktivität eine elementare Bedeutung zugesprochen. So

Einleitung

zeigten tierexperimentelle Untersuchungen in der Ratte, dass durch die Anhebung der endogenen Aktivität durch die Überexpression des Natriumkanals NaChBac bestimmte Negativfolgen wie z.B. der vermehrte Zelluntergang im Rahmen einer sensorischen Deprivation eingedämmt werden konnten und sich die Überlebensrate der Neurone normalisierte (Lin et al., 2010). Des Weiteren wurde in der Maus nachgewiesen, dass eine Herunterregulierung der endogenen Aktivität durch eine vermehrte Kir2.1- oder Kv1.2- Expression zu einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit von JGNs in der Präintegrationsphase führte (Li et al., 2023). Nicht zuletzt wird diskutiert, ob technisch bedingte Markierungsmethoden selbst eine Ursache für die vermehrt beobachtete Apoptose sein könnten (Platel et al., 2019).

1.4.3 Funktionale Bedeutung der adulten Neurogenese im SVZ

Die funktionale Bedeutung der anhaltenden Neubildung von Neuronen für den Riechkolben ist noch nicht im Detail verstanden, scheint jedoch im Zusammenhang mit der Optimierung von olfaktorischen Schaltkreissystemen zu stehen (Cecchi et al., 2001; Gheusi et al., 2000). Die Neurogenese im OB diene dazu, auf neue Umweltreize reagieren zu können, um bestimmte Geruchseindrücke besser diskriminieren und wahrnehmen zu können (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002; Li et al., 2018). Auch wird angenommen, dass die adulte Neurogenese wichtig für das olfaktorische Gedächtnis bzw. das geruchsassoziierte Lernen ist (Mouret et al., 2008; Sultan et al., 2010; Vincent et al., 2009). Darüber hinaus wird vermutet, dass die Neurogenese an der Modifikation der Schaltkreise des Sexualverhaltens beteiligt ist, da nachgewiesen wurde, dass gonadale Steroidhormone die Neubildung der Zellen im SVZ beeinflussen (Jorgensen & Wang, 2020). Detaillierte Informationen zur Bedeutung der adulten Neurogenese im OB wurden in anderen Arbeiten zusammengefasst (Jurkowski et al., 2020).

1.4.4 GCs im OB – Morphogenese und Synaptogenese

Die größte Population von adult-geborenen Interneuronen im OB von Nagern wird von den inhibitorischen GABAergen Körnerzellen (GCs) gebildet, deren Somata sich zumeist in der GCL befinden. Sie werden durch adulte Neurogenese stetig neu generiert und in den Riechkolben hinzugefügt. Auf ihrem Weg und bei Ankunft im OB durchlaufen die GCs einen morphologischen und physiologischen Reifungsprozess, der ca. 4 Wochen andauert (Lledo et al., 2006). Während dieser Zeit befindet sich die adult-geborenen Neurone in einer sensiblen Phase, in der ihr Überleben und ihre Entwicklung besonders anfällig auf Manipulationen, wie sensorische Deprivation, reagiert (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002). Gleichzeitig befindet sich die Synaptogenese in diesem sensiblen Zeitraum auf ihrem Höhepunkt (Kelsch et al., 2010).

1.4.5 Die fünf Entwicklungsphasen der Körnerzellen

Die Entwicklung der adult-geborenen GCs kann in 5 Phasen beschrieben werden, die sich anhand ihrer Lokalisation und bestimmten Differenzierungs- und Reifungsmustern unterscheiden (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002):

- Phase 1 (2.-7.Tag nach Generierung in der SVZ) tangentielle Migration der GCs entlang am RMS.
- Phase 2 (5.-7. Tag) Ankunft im OB und radiale Migration.
- Phase 3 (9.-13. Tag) Erreichen der Endposition im GCL und Vorhandensein eines kurzen Dendriten mit Reichweite bis zur Mitralzellschicht.
- Phase 4 (11.-12. Tag) Weiterentwicklung des Dendritenbaumes mit Reichweite bis in die äußere plexiforme Schicht.
- Phase 5 (ab Tag 15) Entwicklung von Dornfortsätzen und vergleichbare Morphologie zu bereits bestehenden GCs.

Im Gegensatz zu GCs benötigen JGNs eine deutlich längere Zeitspanne (ca. 45 Tagen) bis zur vollständigen Ausreifung ihrer Morphologie (Livneh & Mizrahi, 2011).

Einleitung

1.4.6 Beschreibung der Dendriten, Dornfortsätze und Synapsen

Anhand ihrer Morphologie können GCs in mehrere Typen unterteilt werden (Merkle et al., 2014). Allgemein handelt es sich bei GCs um axonlose Interneurone, die einen prominenten Apikaldendriten aufweisen sowie einen bis mehrere spärlich verzweigte Basaldendriten besitzen. Der Apikaldendrit teilt sich meist in der äußeren plexiformen Schicht auf und besitzt dort am distalen dendritischen Bereich reichlich Dornfortsätze (Price & Powell, 1970). An den distal gelegenen Dornfortsätzen befinden sich reziproke dendrodendritischen Synapsen, die mit den sekundären Dendriten der Mitralzellen verschaltet sind (Jahr & Nicoll, 1982; Price & Powell, 1970; Woolf et al., 1991). Die dendrodendritische Synapsen bilden die einzige Output-Struktur der GCs (Takahashi et al., 2018). Durch diese sind die GCs mit den Mitralzellen/Büschelzellen in einem gemeinsamen Schaltkreis verbunden: Glutamat, das von Mitralzellen/Büschelzellen freigesetzt wird, aktiviert die glutamatergen Rezeptoren (NMDA- und AMPA Rezeptoren) an den Dornfortsätzen der Körnerzellen. Hierdurch kommt es zum Calciumeinstrom in den Dornfortsätzen der GCs (Nathan et al., 1998). Dies führt zur Exozytose von GABA aus den GCs, welches wiederum inhibierend auf dieselben Mitralzellen/Büschelzellen wirkt (Rall & Shepherd, 1968). Daher wird dieses Prinzip auch als "Selbsthemmung" bezeichnet. Auch können sich Mitralzellen/Büschelzellen gegenseitig hemmen mithilfe der sogenannten lateralen Inhibition über GCs. Es wird angenommen, dass die laterale Inhibition bei der Kontrastverstärkung involviert ist (Isaacson & Strowbridge, 1998; Shepherd et al., 2007; Veronica et al., 2005). Darüber hinaus erhalten GCs über ihre Basaldendriten und den Stamm des Apikaldendriten Eingangssignale aus zentralen Hirnregionen, welche die Aktivität der GCs im Riechkolben modulieren (Laaris et al., 2007; Mary & Charles, 2007).

1.4.7 Verteilungsmuster der Synapsen

Die Synapsen der GCs sind in drei unterschiedlichen dendritischen Segmenten lokalisiert: im basalen Bereich (Basaldendrit), im proximalen Bereich (Stamm des Apikaldendriten) und im distalen Bereich (nach der ersten Aufzweigung des

Einleitung

Apikaldendriten). Glutamaterge Eingangssynapsen sind in allen drei Bereichen vorzufinden, wohingegen nur der distale Apikaldendritenbereich sowohl Input-Synapsen als auch Output-Synapsen besitzt und somit als einziger den Neurotransmitter (GABA) in seinen dendrodendritischen Synapsen freisetzen kann (Kelsch et al., 2009; Mori, 1987). Während ihrer Reifung entwickeln adult-geborenen GCs zunächst stammbnahe Input-Synapsen am Apikaldendriten, bevor sie weiter distal dendrodendritische Synapsen entwickeln (Kelsch et al., 2008). Die spezifischen Synapsen können mittels Proteinnachweis z.B. durch immunhistochemische Färbungen belegt werden. In glutamatergen Eingangssynapsen ist das Protein PSD-95 postsynaptisch lokalisiert (Sheng, 2001), während man in Output-Synapsen das Protein Synaptophysin in den präsynaptischen Neurotransmittervesikeln nachweisen kann (Kelsch et al., 2009; Südhof & Jahn, 1991). Bemerkenswert ist, dass die strukturelle Plastizität der adult-geborenen Interneurone auch nach ihrer Einbindung in das Neuronennetzwerk weiterhin auf einem hohen Niveau ist. So kann sogar zu relativ späten Zeitpunkten (DPI 45 oder DPI 90) *in vivo* eine Dynamik der Dornfortsätze, wie die Neuentstehung und der Verlust von Dornfortsätzen, beobachtet werden, auch wenn die Gesamtlänge und die Verzweigungen der GCs im Beobachtungsintervall nach DPI 45 stabil bleiben (Mizrahi, 2007).

1.4.8 Einfluss der neuronalen Aktivität auf die Morphogenese

Welchen Einfluss die neuronale Aktivität auf die Morphogenese der GCs und die Entstehung und den Erhalt der Synapsen hat, ist bis dato nicht genau bekannt.

Sensorische olfaktorische Reize scheinen eine wesentliche Rolle für die Entwicklung von Dendriten, Dornfortsätzen und Synapsen zu spielen: Es wurde demonstriert, dass eine sensorische Deprivation durch Kauterisation der Nasenlöcher in neugeborenen Ratten postnatal zu einer geringeren Dornfortsatzdichte und zu einer Abnahme der exzitatorischen Eingangssignale in neu generierten GCs führt. Auch zeigte sich die dendritische Morphologie eingeschränkt und das Überleben der neu-geborenen Zellen verringert (Saghatelyan et al., 2005). Wenn eine Deprivation in der Phase der Migration von

Einleitung

noch unreifen adult-geborenen Neuronen stattfindet, führt dies zu einer Abnahme der Synapsendichte an den Basaldendriten und im distalen Segment des Apikaldendriten. Bemerkenswert ist, dass diese defizitäre Entwicklung mithilfe einer Erhöhung der endogenen neuronalen Aktivität (durch vermehrte Expression von NaChBac) kompensiert werden konnte (Kelsch et al., 2009). In anderen Zellpopulationen, wie den adult-geborenen hippocampalen Neuronen, wurde durch die Überexpression des einwärtsgerichtenden Kaliumkanals Kir2.1 die endogene Aktivität der Neurone herabgesetzt und die morphologische Entwicklung mancher Zelluntergruppen inhibiert (De Marco García et al., 2011). In hippocampalen Zellkulturen, die mittels Transfektion Kir2.1 überexprimierten, wurde eine Verminderung der Synapsen in der frühen kritischen Entwicklungsphase beobachtet (Burrone et al., 2002). Auch in GCs des OB hätten ähnliche Auswirkungen durch eine Überexpression von ESKir2.1 (eine nicht-einwärts-richtende Variante des Kaliumkanals Kir2.1) erwartet werden können. Doch in den ESKir2.1-überexprimierenden neu-geborenen GCs wurde keine verminderte Anzahl von Dornfortsätzen und keine Veränderung der dendritischen Strukturen beobachtet. Lediglich die Überlebensrate der Zellen schien hierdurch eingeschränkt (Lin et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurde in jüngsten Arbeiten dargestellt, dass in adult-geborenen Interneuronen (JGNs) durch eine veränderte endogene Aktivität durch Kv1.2- oder Kir2.1-Überexpression (für detaillierte Informationen zu Kv1.2 und Kir2.1 siehe Kapitel 1.8) die Gesamtlänge und Komplexität von JGNs *in vivo* und *in vitro* deutlich eingeschränkt waren (Li et al., 2023). Zusammenfassend sind sowohl sensorische Reize, Lernen und Deprivation, genauso wie Modifikationen der endogenen Aktivität entscheidend für die morphische Entwicklung adult-geborener Neurone.

1.5 Bestimmung des Reifegrades von adult-geborenen Neuronen

Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der endogenen neuronalen Aktivität auf die Reifung von adult-geborenen Neuronen untersucht wurde, wird im kommenden Abschnitt die Bestimmung von Reifegraden anhand von Entwicklungsmarkern erläutert. Während bestimmter Zeitabschnitte der adulten Neurogenese werden spezifische Marker in neuronalen Stammzellen, Neuroblasten, sowie unreifen und ausgereiften Neuronen exprimiert, die mit ihren Differenzierungsschritten korrelieren. Zu den häufig verwendeten Markern gehören unter anderem Doublecortin und NeuN.

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Doublecortin (DCX) wird in neuronalen Vorläuferzellen während der Embryonalentwicklung des zentralen Nervensystems und während der adulten Neurogenese exprimiert. Reichlich nachgewiesen wird DCX in den neurogenen Nischen in der SGZ des Hippocampus und in der SVZ sowie den nachgeschalteten Regionen, dem RMS und im OB, in welchem sich die wandernden neuronalen Vorläuferzellen (Neuroblasten) und die jungen adult-geborenen Neurone befinden (Walker et al., 2007). Die Expression von DCX ist nur transient in Vorläuferzellen vorhanden und wird nach ca. 30 Tagen, mit Abschluss der Reifung der Neuronen, deutlich herunterreguliert (Brown et al., 2003). DCX wird daher häufig als Marker für die Neurogenese und für junge und wandernde Neuronen verwendet (Couillard-Despres et al., 2005). Zu beachten ist jedoch, dass DCX nur in den neurogenen Regionen als Marker für Neurogenese und Zellmigration gesehen werden sollte und nicht als ubiquitär geltender Marker für neuronale Unreife. Es wurde demonstriert, dass DCX auch in nicht-neurogenen Regionen wie dem piriformen Cortex exprimiert wird (Bonfanti & Nacher, 2012) und DCX eine starke Heterogenität je nach Zellpopulation und Tierart besitzt (Ghibaudi & Bonfanti, 2022), wodurch die Verallgemeinerung DCX universal als Marker für neuronale Unreife zu verwenden, nicht gegeben ist.

Einleitung

Der neuronale Marker „neuronal nuclear protein“ (NeuN) wird in den meisten Neuronen im zentralen Nervensystem von Säugetieren exprimiert und ist in den Zellkernen sowie im perinukleären Zytoplasma lokalisiert. NeuN gilt als Marker für postmitotische Nervenzellen. Hierdurch kann es zur Detektion ausgereifter Neurone dienen und als Werkzeug zur Einschätzung des Reifegrades adult-geborener Zellen verwendet werden (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015; von Bohlen Und Halbach, 2007).

In heranreifenden Körnerzellen des OB wird DCX kontinuierlich herunterreguliert und gleichzeitig NeuN hochreguliert (C. Giachino et al., 2005). Im Alter von 15 bis 30 Tagen nach Markierung der wandernden Progenitorzellen im RMS mittels Injektion (engl. day post injection (DPI)) zeigen die GCs eine vollständig ausgebildete Morphologie und gelten als größtenteils ausgereift (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002). Zu diesem Zeitpunkt an DPI 28-30 sind GCs ca. zu 70 - 80% NeuN-positiv markiert, während der Anteil DCX-exprimierender Zellen nur ca. 7% entspricht (Herold et al., 2011; Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002).

1.6 Neuronale Aktivität

Die neuronale Aktivität wurde als einer der entscheidenden Regulatoren identifiziert, der die Entwicklung und Aufrechterhaltung von neuronalen Netzwerken in der perinatalen Phase und im Erwachsenenalter steuert. In primär sensorischen Regionen, wie im olfaktorischen System, wird die Aktivität der Neurone hauptsächlich von zwei Faktoren reguliert: durch die sensorisch-evozierter neuronaler Aktivität (abhängig von sensorischen Eingaben/extrinsischer Signalgebung) und durch die endogene Aktivität (spontane/zelleigene Aktivität) (Zhang & Poo, 2001). Im sich entwickelnden Nervensystem wird zunächst eine endogene Aktivität erzeugt, bevor die sensorisch-evozierte Aktivität vorhanden ist. Beide Arten von neuronaler Aktivität regulieren die Entwicklung des Nervensystems und die Formung von neuronalen Netzwerken. (Hanganu-Opatz, 2010; Mukherjee & Kanold, 2022; Penn & Shatz, 1999).

1.6.1 Endogene neuronale Aktivität

Als endogene neuronale Aktivität wird in Neuronen oder deren Vorläuferzellen die Aktivität bezeichnet, die durch das neuronale System selbst erzeugt wird. Sie steht in Verbindung mit Prozessen wie z.B. intrazellulären Ca^{2+} - Signalen (Spitzer, 2006) und der intrinsischen Erregbarkeit der Zellen. Die endogene neuronale Aktivität spielt eine Schlüsselrolle für die Entwicklung, Migration, Differenzierung, Proliferation und das Überleben von Neuronen (De Marco García et al., 2011; Li et al., 2023; Lin et al., 2010; Spitzer, 2006).

In der perinatalen Neurogenese ist die endogene Aktivität entscheidend für die Entwicklung neuronaler Strukturen und Netzwerke, da sie die Integration von unreifen Neuronen in das sich entwickelnde neuronale Netzwerk steuert. Die endogene Aktivität reguliert hier Prozesse wie die Proliferation von neuralen Stamm- und Vorläuferzellen, die Migration, die morphologische Entwicklung und die initiale Integration unreifer Neuronen (Bando et al., 2016; De Marco García et al., 2011; Hurni et al., 2017; Luhmann et al., 2016; Warm et al., 2022).

Einleitung

Bereits in der embryonalen und frühen postnatalen Entstehungsphase des Neokortex kann die endogene „spontane“ Aktivität in Form von spontanen Ca^{2+} -Transienten beobachtet werden (Corlew et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass in neuroproliferativen radialen Gliazellen in der kortikalen Ventrikularzone die spontanen Ca^{2+} -Wellen mit der Zellproliferation korrelieren (Weissman et al., 2004). Aufgrund der maßgeblichen Bedeutung der Ca^{2+} -Transienten hat sich beispielsweise die Zwei-Photonen-Bildgebung in Verbindung mit spannungssensitiven Farbstoffen oder Calcium-Indikatoren als eine mögliche Methode zur Visualisierung neuronaler Aktivität etabliert (Stosiek et al., 2003; West & Greenberg, 2011).

Die endogene neuronale Aktivität spielt nicht nur in der embryonalen Entwicklung des Neokortex eine entscheidende Rolle, sondern auch für die Neurogenese im Erwachsenenalter. Es wurde gezeigt, dass spontane Ca^{2+} -Transienten die Formung des Verhaltens von neuronalen Progenitorzellen beeinflussen (Lacar et al., 2011). Zudem kommen spontane Ca^{2+} -Transiente ubiquitär in wandernden Neuroblasten und in den unreifen adult-geborenen Interneuronen vor (Darcy & Isaacson, 2009; Li et al., 2023; Maslyukov et al., 2018). Die neuronale Aktivität scheint jedoch eine subtypspezifische Rolle zu spielen. So zeigen adult-geborene GCs eine hohe intrinsische Calciumaktivität bevor sie vom tangentialen zum radialen Migrationsmuster wechseln, während dies bei JGNs nicht nachzuweisen ist.

Das Gesamtniveau der zellintrinsischen Aktivität scheint relevant für die korrekte Reifung, Integration und das Überleben von adult-geborenen Zellen. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte endogene Aktivität, wie z.B. durch die Überexpression von NaChBac-Natriumkanälen in adult-geborenen GCs im OB, mit einer erhöhten Überlebensrate einher ging, wohingegen die Unterdrückung der endogenen Aktivität durch die Expression von ESKir2.1-Kaliumkanälen die Überlebensfähigkeit der Zellen verringerte. Überraschenderweise wurden die synaptischen Strukturen durch keines der Verfahren beeinflusst (Lin et al., 2010). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Herabsetzung der endogenen neuronalen Aktivität durch Kir2.1-Überexpression kaum einen Effekt auf das Migrationsverhalten von adult-geborenen Neuronen hat, jedoch das Überleben

Einleitung

und die Positionierung von GCs beeinträchtigt hat. Diese Einschränkungen wurden selektiv nur an GCs beobachtet, während sich JGNs nicht betroffen zeigten (Bugeon et al., 2021). In einer dritten Arbeit wurden die Auswirkungen einer herabgesetzten endogenen neuronalen Aktivität durch die Überexpression von Kv1.2- oder Kir2.1-Kaliumkanälen in neu-geborenen JGNs im Erwachsenenalter untersucht. Hierbei zeigten die im Adulten geborenen Zellen deutliche Einschränkungen in ihrer morphologischen Entwicklung, Integration und Überlebensfähigkeit (Li et al., 2023).

Zusammenfassend wurde die endogene neuronale Aktivität als einer der entscheidenden Regulatoren für die Entwicklung neuronaler Netzwerke identifiziert. Jedoch ist die Rolle der endogenen neuronalen Aktivität für die Morphogenese und Reifung von neu-geborenen Neuronen noch nicht ausreichend geklärt.

1.6.2 Sensorisch-evozierte neuronale Aktivität

Die sensorisch-evozierte Aktivität wird, wie der Name beschreibt, durch sensorischen Input beeinflusst. In Bezug auf die sich entwickelnden Neurone im OB sind aktivitätsanhebende sensorische Stimuli beispielsweise eine geruchsreiche Umgebung oder das Üben von Geruchsdiskriminierung. Hingegen führen Prozeduren wie die Zerstörung des Riechepithels oder ein Nasenlochverschluss zu einer Deprivation von Geruchsstimuli und somit zu einer Reduktion der sensorisch-evozierten Aktivität. In kumulativen Arbeiten wurde gezeigt, dass adult-geborene Neurone im OB durch eine angehobene olfaktorisch/sensorisch-evozierte Aktivität größere und komplexere Dendritenbäume entwickeln (Livneh et al., 2009) und über eine bessere Integrierungs- und Überlebensrate im OB verfügen (Alonso et al., 2006; Rochefort et al., 2002). Hinwegens wirkt sich eine Deprivation gegenteilig auf das Integrations- und Überlebenspotential von adult-geborenen Neuronen aus (Saghatelyan et al., 2005; Yamaguchi & Mori, 2005).

1.7 Der CREB-Signalweg

Bei CREB (cAMP response element-binding protein) handelt es sich um einen phosphorylierungsabhängigen Transkriptionsfaktor. Transkriptionsfaktoren sind regulatorische Proteine, die an spezifische DNA-Regionen binden und dadurch den Beginn der Gentranskription positiv oder negativ beeinflussen.

CREB ist ubiquitär im Organismus vorhanden und ist an multiplen zellulären Prozessen beteiligt, unter anderem an der Neurogenese und neuronalen Plastizität. Der CREB-Signalweg beeinflusst die Zellproliferation, die Differenzierung, das Überleben, die Morphogenese sowie die langfristige synaptische Potenzierung (Alberini, 2009; Belgacem & Borodinsky, 2017; Chowdhury et al., 2023; Sakamoto et al., 2011).

Die Aktivierung von CREB unterliegt einer Vielzahl von vorgeschalteten Signalkaskaden. Unterschiedliche Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Stressreaktionen wie Hypoxie, Depolarisation und Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration können die CREB-Aktivität beeinflussen (Merz et al., 2011). Im Nachgang werden durch verschiedene Signaltransduktionswege Proteinkinasen aktiviert, die durch eine Phosphorylierung CREB aktivieren können. Unter anderem sind die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), Proteinkinase C (PKC), Mitogen-aktivierte Kinase (MAPK) sowie Calcium /Calmodulin-abhängige Kinase II und IV (CaMKII/IV) bekannt für die Phosphorylierung von CREB vor allem an der Serin-Position 133 (Belgacem & Borodinsky, 2017; Lonze & Ginty, 2002; Mayr & Montminy, 2001). Das phosphorylierte CREB bindet als Dimer an das konservierte cAMP-response-element (CRE), wodurch die CREB-abhängige Gentranskription initiiert wird (Hai & Hartman, 2001; Montminy et al., 1986). Der Transkriptionskomplex aus pCREB und CRE wird von weiteren Molekülen wie dem CREB-regulated transcription coactivator 1 (CRTC1) moduliert (Xue et al., 2015). Zudem rekrutiert pCREB den Koaktivator CREB-binding protein (CBP), welcher an der Regulation der Transkription beteiligt ist (Vo & Goodman, 2001). Die von pCREB regulierten Zielgene sind unter anderem wichtig für die neuronale Differenzierung und das Überleben der Zellen (Dworkin & Mantamadiotis, 2010).

Einleitung

Von großem Interesse ist die Untersuchung des CREB-Signalwegs im Zusammenhang mit der Entstehung von Nervenzellen. Der CREB-Signalweg ist nicht nur in der embryonalen Neurogenese involviert (Dworkin et al., 2007), sondern spielt auch für die adulte Neurogenese im Hippocampus und im OB eine elementare Rolle. In adult-geborenen Neuronen beeinflusst der CREB-Signalweg das Überleben, die Differenzierung und die morphologische Entwicklung der heranreifenden Zellen (Claudio Giachino et al., 2005; Herold et al., 2011; Jagasia et al., 2009; Niklison-Chirou et al., 2020).

In der adulten Neurogenese spielt der CREB-Signalweg eine essentielle Rolle in der Regulation der frühen neuronalen Entwicklung. Zu Beginn ist das phosphorylierte CREB (pCREB) kaum in den adulten neuronalen Stammzellen in den Stammzellnischen vorhanden (Merz et al., 2011). Hingegen in migrierenden Neuroblasten im RMS und in unreifen (DCX-positiven) Neuronen im OB ist pCREB bereits deutlich hochreguliert. Anschließend sinkt die pCREB-Expression wieder in ausgereiften (NeuN-positiven) Neuronen, nachdem die Entwicklung der Dendriten und Dornfortsätze bereits größtenteils abgeschlossen ist (C. Giachino et al., 2005).

Dass pCREB relevant für die morphologische Entwicklung und Reifung von adult-geborenen Neuronen ist, wurden sowohl für Neurone im Hippocampus als auch im OB beschrieben. Ein Funktionsverlust oder eine Reduktion von pCREB durch z.B. retrovirale genetische Manipulation führte in adult-geborenen Neuronen im Hippocampus zu einer Beeinträchtigung der Reifung und zu einer eingeschränkten Entwicklung des Dendritenbaums (Jagasia et al., 2009). Auch im OB in adult-geborenen Körnerzellen führte ein Funktionsverlust des CREB-Signalwegs zu einer verminderten Reife der Zellen (erhöhter Anteil DCX-positiver Zellen) und zeigte eine deutliche Retardierung der Morphologie des Apikaldendriten (Herold et al., 2011). In einer weiteren Arbeit wurde eine verminderte pCREB-Expression in adult-geborenen juxtaglomerulären Neuronen im OB detektiert, nachdem deren endogene neuronale Aktivität durch die Überexpression von Kir2.1 oder Kv1.2 verändert wurde. Gleichzeitig zeigten diese Zellen auch eine deutliche Einschränkung ihrer morphologischen Strukturen, wie eine Verkürzung der Dendritenlänge steht (Li et al., 2023). Daher

Einleitung

wurde in dieser Arbeit diskutiert, ob möglicherweise zwischen der beobachteten Inhibierung der Morphogenese der JGNs und der veränderten endogenen Aktivität durch die Kaliumkanalüberexpression der CREB-Signalweg mechanisch vermittelt (Li et al., 2023).

Zusammenfassend ist der CREB-Signalweg entscheidend für die Reifung und Morphogenese von sich entwickelnden adult-geborenen Neuronen.

1.8 Kaliumkanäle

1.8.1 Einteilung und Funktion von Kaliumkanälen

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die den selektiven Durchtritt von Ionen durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran ermöglichen und dadurch in der Lage sind, ein elektrisches Potential über der Membran aufzubauen. Sie können anhand verschiedener Ansätze kategorisiert werden, wie z. B. nach ihrer Ionen-Selektivität (z.B. Kaliumionen, Natriumionen) oder danach, wie sie geöffnet werden (z.B. durch Liganden oder Veränderungen der Spannung) (Alberts, 2017). Kalium-Kanäle werden basierend auf ihren Strukturen, biophysikalischen Eigenschaften, Reaktionen auf Pharmaka und ihrer Physiologie in vier Gruppen eingeteilt: die spannungsabhängigen (Kv)-Kanäle, die einwärtsgerichteten (Kir)-Kanäle, die Natrium (Na)-aktivierten Kanäle oder Calcium (Ca^{2+})-aktivierten Kanäle (González et al., 2012; Villa & Combi, 2016).

Die Aufgaben der Kaliumkanäle im gesamten Organismus sind vielfältig. In Neuronen beispielsweise sind Kaliumkanäle an der Regulation und Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials beteiligt. Sie sind entscheidend für die Dauer von Aktionspotentialen, modulieren die neuronale Erregbarkeit, wirken zur Aufrechterhaltung der Homöostase der Zellen bei und sind involviert in der Freisetzung von Neurotransmittern (Bean, 2007; Jan & Jan, 2012; McCoy et al., 2021; Trimmer, 2015).

1.8.2 Kaliumkanäle in neuronalen Vorläuferzellen

Dass Ionenkanäle und insbesondere Kaliumkanäle eine wesentliche Rolle für neuronalen Stammzellen spielen, wurde bereits mehrfach berichtet (Schaarschmidt et al., 2009; Swayne & Wicki-Stordeur, 2012). Während der adulten Neurogenese werden multiple Typen von Kaliumkanälen exprimiert, deren Vorkommen im Verlauf des Entwicklungsprozesses von neuronalen Stammzellen bis hin zu ausgereiften Neuronen deutlich variieren kann. Hierdurch werden sekundär auch die elektrophysiologischen Zelleigenschaften wie das Ruhemembranpotential und der Eingangswiderstand der Zellen beeinflusst. Wie genau die Ionenkanäle die adulte Neurogenese prägen, ist noch nicht ausreichend bekannt. Bisher wurde gezeigt, dass neuronale Stammzellen im SVZ zunächst ein sehr negatives Ruhemembranpotential besitzen, hervorgerufen durch eine vermehrte Expression von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen (unter anderem Kir2.1), und einen geringen Eingangswiderstand haben (Liu et al., 2006; Yasuda & Adams, 2010). Wandernde Neuroblasten im RMS hingegen besitzen ein weniger negatives Ruhemembranpotential und einen höheren Eingangswiderstand im Vergleich zu neuronalen Stammzellen (Carleton et al., 2003). Die Ursache dessen ist a.e. die deutlich reduzierte Anzahl von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen (Kir-Kanäle) in den Neuroblasten (Wang et al., 2003). Des Weiteren exprimieren Neuroblasten die spannungsabhängigen Kaliumkanal-Isoformen Kv1.1, Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.6 (Wang et al., 2003; Yasuda & Adams, 2010). Adult-geborene Neuroblasten weisen allenfalls einen sehr geringen spannungsabhängigen Natriumstrom auf, daher sind sie nicht in der Lage Aktionspotentiale zu generieren (Carleton et al., 2003). Die adult-geborenen GCs (Reifungsphase 4-5 (siehe Kapitel 1.2.5)) im Riechkolben weisen einen höheren Natriumstrom auf und sind dazu fähig Aktionspotentialen zu generieren (Belluzzi et al., 2003; Carleton et al., 2003; Liu et al., 2009; Walker et al., 2007; Yasuda & Adams, 2010). Zusammenfassend sind die charakterisierten Expressionsprofile der Ionenkanäle zu bestimmten Entwicklungsphasen in der Neurogenese von Relevanz für die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen und deren Reifung (Carleton et al., 2003; Li et al., 2023; Lin et al., 2010).

1.8.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv-Kanäle)

Spannungsabhängige Kaliumkanäle, auch Kv-Kanäle bezeichnet (engl. „v = voltage-gated“), werden in 12 Unterfamilien (Kv1-12) unterteilt und kommen in verschiedensten Organen vor, einschließlich im Muskel, im Herzen und im Gehirn. Durch ihre Spannungssensordomäne können sie Spannungsänderungen der Zellmembran erkennen und werden dadurch aktiviert. Sie regulieren die Rückkehr des Membranpotentials nach einer Depolarisation zurück in den Ruhestand (Repolarisation) und kontrollieren somit die Erregbarkeit der Zellen. Zudem regulieren sie das Schwellenpotential, die Dauer von Aktionspotentialen und die Feuerrate der Zellen (Jan & Jan, 2012; Ranjan et al., 2019). Sie beeinflussen zelluläre und molekulare Signalwege, die an der Neuroprotektion, Neuroregulation, Neurotoxizität sowie Apoptose beteiligt sind (Shah & Aizenman, 2014). In Neuroblasten im SVZ werden primär Kv1-Isoformen exprimiert, darunter fällt auch der Kv1.2-Kanal, der durch das Gen KCNA2 kodiert wird (Wang et al., 2003; Yasuda & Adams, 2010). Es wird angenommen, dass die Überexpression von Kv-Kanälen die Hyperpolarisation von Zellen nach dem Feuern von Aktionspotentialen verstärken soll. In adult-geborenen JGNs in Mäusen wurde gezeigt, dass eine Überexpression von Kv1.2-Kanälen zu einer signifikanten Verringerung der Membrankapazität führt, ohne das Ruhemembranpotential, den Eingangswiderstand oder die Dauer/Amplitude oder Feuerschwelle der Aktionspotentiale relevant zu beeinträchtigen (Li et al., 2023).

Drüber hinaus führen Mutationen des Kv1.2-Gens zu relevanten neurologischen Pathologien wie z.B. zu einer Epilepsie (Brew et al., 2007; Salpietro & Houlden, 2020; Syrbe et al., 2015; Villa & Combi, 2016).

1.8.4 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (Kir-Kanäle)

Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle, sogenannte Kir-Kanäle (abgeleitet vom Englischen „ir = inward rectifier“), kommen in einer Vielzahl von Zelltypen vor, wie beispielsweise in Nerven- und Gliazellen, in Skelett- und Herzmuskelzellen, in den Tubuluszellen der Niere oder in β -Zellen des Pankreas. Ihre physiologische Funktion ist abhängig von ihrer Lokalisation und der spezifischen Art der Kanäle. Kir-Kanäle sind relevant für die Regulierung der elektrischen Zellaktivität. Sie sind maßgeblich beteiligt an der Ausbildung und Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und sie sind involviert in der Signaltransduktion. Diese Ionenkanäle werden als „Einwärtsgleichrichter“ bezeichnet, da sie im geöffneten Zustand bei negativen Membranpotentialen unterhalb des Kaliumgleichgewichtspotentials eine höhere Durchlässigkeit für einströmende als für ausströmende Kaliumionen aufweisen. Kir-Kanäle werden in 7 Unterfamilien (Kir1- Kir7) eingeteilt, die wiederum in vier funktionale Kategorien unterteilt werden: die klassischen Kir-Kanäle, G-proteingesteuerte Kanäle, ATP-sensitive Kanäle und Kalium-Transportkanäle (Hibino et al., 2010; Walsh, 2020).

Der Kir2.1-Kanal wird zur Gruppe der klassischen Kir-Kanäle gezählt. Dieser wird durch das KCNJ2-Gen kodiert und kommt vornehmlich im Herzen, der Muskulatur und im Gehirn vor (Hibino et al., 2010). Im medizinischen Feld ist Kir2.1 bekannt aufgrund spezifischer Krankheitsbilder, die auf einer Mutation im Kir2.1-Gen basieren. So werden Missense-Mutationen mit einem Funktionsverlust von Kir2.1 in Verbindung mit dem Anderson-Syndrom gebracht, einer autosomal-dominante Störung gekennzeichnet durch periodische Lähmungen, Herzrhythmusstörungen, dysmorphe Merkmale und epileptischen Anfällen in der Kindheit (Haruna et al., 2007; Plaster et al., 2001). Eine Kir2.1-Überexpression in Neuronen kann das Ruhemembranpotential deutlich reduzieren, ohne dabei das Spiking-Muster der Zellen wesentlich zu beeinflussen. Aus diesem Grund wird die Überexpression von Kir2.1 als ein Instrument zur Herunterregulierung der neuronalen Aktivität eingesetzt (De Marco García et al., 2011; Li et al., 2023; Xue et al., 2014; Yu et al., 2004).

1.8.5 Exkurs: Die Rolle von Kalium-Kanälen in der Medizin und Forschung

Kaliumkanäle sind entscheidend für die elektrophysiologischen Eigenschaften von Neuronen. Daher ist es nicht überraschend, dass Genmutationen oder Funktionsstörungen von Kaliumkanäle mit einer Vielzahl von neurologischen Erkrankungen assoziiert werden, wie beispielsweise Epilepsie (Villa & Combi, 2016), Migräne (Al-Karagholi et al., 2022), Ataxien (D'Adamo et al., 2020; Gazulla & Berciano, 2023) und genetische bedingte Syndrome wie z.B. das Anderson-Syndrom oder das Liang-Wang-Syndrom (Gribkoff & Winkvist, 2023; Plaster et al., 2001). Insbesondere in der Epilepsieforschung sind Kaliumkanäle relevant, da diese die elektrische Aktivität der Neuronen beeinflussen und somit direkt am Mechanismus von epileptischen Anfällen beteiligt sind (de Curtis et al., 2018; Gao et al., 2022). Im Bereich der genetischen Epileptologie sind Kaliumkanal-Mutationen so imponierend, dass teils neue Nomenklaturen wie die wie „K⁺ channelopathy“ für Kaliumkanal-assoziierten-Epilepsien diskutiert werden (D'Adamo et al., 2013). Durch die Erforschung der Epilepsieursachen, wie z.B. Veränderungen von Kaliumkanälen, erhofft man sich Grundlagenwissen zu verschaffen und davon Therapien abzuleiten, die nicht nur symptomatisch, sondern auch kausal gegen die Epilepsie wirken (Ahmad et al., 2020; Gao et al., 2022).

1.9 Bisherige Forschung zum Thema

Die endogene neuronale Aktivität ist von großer Bedeutung für die Entwicklung, Migration und das Überleben von adult-geborenen Neuronen (Bugeon et al., 2021; Li et al., 2023; Lin et al., 2010). Doch in wie weit sie die Morphogenese, Differenzierung und Reifung von adult-geborenen Neuronen reguliert ist bis dato nicht ausreichend geklärt. Einige Studien berichten, dass die Herunterregulierung der endogenen Aktivität zu einer massiven Inhibierung der Morphogenese führt (De Marco García et al., 2011; Li et al., 2023), während andere Studien darauf deuten, dass eine Veränderung der endogenen Aktivität keine bis allenfalls kompensatorische Effekte auf die Morphogenese von adult-geborenen Neuronen hat (Lin et al., 2010). Zudem wurde der Einfluss der endogenen Aktivität auf die Reifestadien von adult-geborenen Neuronen bislang kaum untersucht.

Die in dieser Arbeit verwendete Technik zur Veränderung der endogenen neuronalen Aktivität mittels Kv1.2- oder Kir2.1-Überexpression durch lentivirale Transfektion wurde bereits zur Untersuchung von adult-geborenen JGNs angewandt (Li et al., 2023). Welchen Effekt eine solche Veränderung der endogenen Aktivität auf adult-geborene GCs hat, ist bisher noch nicht bekannt. GCs bilden die deutlich größere Population an stets neu generierten Interneuronen im OB ab. Viele Details über ihre morphologischen Entwicklungsstufen und ihren strukturellen Aufbau sind bekannt, sodass GCs eine besonders gut zu untersuchende Zellgruppe darstellen. Zudem verfügen sie über Dornfortsätze mit funktional wichtigen segmentspezifischen Synapsen, die durch Eingangs- und Ausgangssignale zur Kommunikation mit dem neuronalen Netzwerk fähig sind (Kelsch et al., 2009; Mori, 1987). In wie weit die Entwicklung der Dornfortsätze und die Synaptogenese von der endogenen Aktivität reguliert wird, ist ebenfalls noch unklar. Darüber hinaus ist bisher wenig über die nachgeschalteten molekularen Signalwege der endogenen Aktivität bekannt. Der CREB-Signalweg reguliert die Differenzierung, Reifung, Morphogenese und das Überleben von adult-geborenen Zellen maßgeblich (Claudio Giachino et al., 2005; Herold et al., 2011; Jagasia et al., 2009; Niklison-Chirou et al., 2020). Daher wurde der CREB-Signalweg bereits in JGNs untersucht, deren endogene neuronale Aktivität modifiziert wurde. Hierbei zeigten JGNs mit einer Kv1.2- oder

Kir2.1-Überexpression eine Herunterregulierung der pCREB-Expression. Auch Transkriptomanalysen von JGNs mit GCs detektierten eine Herunterregulierung von vor- und nachgeschalteten Molekülen aus diesem Signalweg (Li et al., 2023). Doch der explizite Nachweis, ob eine Kv1.2- oder Kir2.1-Überexpression zu einer Herunterregulierung von pCREB in neu generierten GCs führt, wurde bisher noch nicht erbracht.

1.10 Fragestellung der Arbeit

Diese Arbeit zielt darauf ab, die Auswirkungen einer veränderten endogenen neuronalen Aktivität durch die Kv1.2. oder Kir2.1-Überexpression auf die Morphogenese, Differenzierung und Reifung von adult-geborene Körnerzellen im Riechkolben der Maus zu untersuchen. Zudem sollen mögliche zwischengeschaltete Signalwege untersucht werden.

1. Als Grundlage für die Experimente soll zunächst die Funktionalität der Modelle sichergestellt werden. Kann immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass durch die letivirale Transfektion tatsächlich Kaliumkanäle (Kv.1.2) in den adult-geborenen GCs überexprimiert werden?
2. Wie wirkt sich die herabgesetzte endogene neuronaler Aktivität durch die Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1 auf die Morphogenese der adult-geborenen Körnerzellen aus?
3. Ist der Reifungsprozess der adult-geborenen Körnerzellen des OB durch die herabgesetzte endogene neuronale Aktivität beeinflusst? Gibt es hierbei wesentliche Unterschiede zwischen adult-geborenen GCs und JGNs?
4. Welcher Signalweg vermittelt mechanisch zwischen der herabgesetzten endogenen Aktivität und der inhibierten Morphogenese? Hier soll die Hypothese getestet werden, ob die herabgesetzte endogene Aktivität durch die Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1 den Anteil von phosphoryliertem cAMP response element-binding protein (pCREB) herunter reguliert.

2. Material und Methoden:

2.1 Material

2.1.1 Primäre und sekundäre Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Name	Verdünnung	Produktnummer	Hersteller
Goat polyclonal antibody against GFP	1:1,000	600-101-215,	Rockland
Mouse monoclonal antibody against Kv1.2	1:200	K14/16	NeuroMab
Rabbit monoclonal antibody against pCREB	1:400	9198S,	Cell Signaling
Mouse monoclonal antibody against NeuN	1:1,000	MAB377,	Millipore
Rabbit polyclonal antibody against DCX	1:2,000	ab18723	Abcam

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Produktnummer	Hersteller
Donkey-anti-mouse IgG-conjugated Alexa Fluor 488	1:500	A21202	Grand Island, NY
Donkey-anti-rabbit IgG-conjugated Alexa Fluor 488	1:1,000	A21206	Grand Island, NY
Donkey-anti-goat IgG-conjugated Alexa Fluor 488	1:1,000	A11055	Grand Island, NY
Donkey-anti-rabbit IgG-conjugated Alexa Fluor 594	1:1,000	A21207	Grand Island, NY
Donkey-anti-goat IgG-conjugated Alexa Fluor 594	1:1,000	A11058	Grand Island, NY
Donkey-anti-mouse IgG conjugated Alexa Fluor 680	1:1,000	A10038	Grand Island, NY

2.1.2 Lösungen und Chemikalien

Tabelle 3: Lösungen

Blocklösung	
PBS	9,4 ml
Esel-Normalserum	0,5 ml
Triton-X 100	0,1 ml

Material und Methoden

Tabelle 4: Chemikalien

Name	Hersteller
Tissue Tek	Sakura, Zoeterwoude, Neterlands
Cryo-Gel Embedding Compound	Leica Microsystems, Wetzlar,
Esel-Normalserum	Jackson Immuno Research, Dianova (#017-000-121)
Triton-X 100	Sigma, USA (# T-9284)
BSA (Bovine Serum Albumin)	Jackson Immuno Resarch/ dianova #011-000-161
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
ProLong Gold Mounting Medium	Invitrogen, Grand Island, NY, USA

2.1.3 Geräte und Softwareprogramme

Tabelle 5: Geräte

Name	Hersteller
Olympus Inversmikroskop CKX41	Olympus, Tokio, Japan
Olympus Fluoview 300 Laser-Scanning-System	Olympus, Tokio, Japan
Olympus BX51WI Mikroskop	Olympus, Tokio, Japan
MaiTai mode-locked Laser	Spectra Physics, Mountain View, USA
Wasser-Immersionsobjektiv 40x	Nikon, Tokyo, Japan
Kryostats Leica CM1950	Leica, Wetzlar, Deutschland
Ultraschallreinigungsgert Emmi 20 HC	Emag, Salach, Deutschland
Orbitalschüttler	Heidolph Titramax 100, Schwabach, Deutschland
Vortexmischer	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Stereotaxie-Gert	Stoelting, Wood Dale, IL, USA

Tabelle 6: Softwareprogramme

Name	Hersteller
Neuromantic (Version 1.7.5)	Darren Myatt, University of Reading, Berkshire, England
Matlab R2016b	The MathWorks, Natick, Massachusetts USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, USA
ImageJ 1.49g	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Microsoft® Word® und Excel® Initial release 5. Oktober 2021 / 2108 (16.0.14326.20454)	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
EndNote 20.2.1	Clarivate, Philadelphia, USA and London England

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden durch die baden-württembergische Landesregierung in Deutschland genehmigt und unter Einhaltung der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für die Experimente wurden drei Monate alte Mäuse beider Geschlechter verwendet. Bei den Zuchttieren handelte es sich um Mäuse des Stammes C57BL/6J, die von Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, USA bezogen wurden.

Die Mäuse wurden in der Tierhaltung des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, der Universität Tübingen, bei einer Temperatur von 24°C, 60% Luftfeuchtigkeit und einem geregelten Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h zu 12 h gehalten. Weibchen wurden in Gruppen von 3-5 Mäusen und Männchen einzeln in separaten Käfigen gehalten. Trinkwasser sowie Futter standen den Versuchstieren ad libitum zur Verfügung.

Im Folgenden wurden die Arbeitsschritte 2.2.2 - 2.2.4 mit freundlicher Unterstützung von Dr. Kaizhen Li durchgeführt.

2.2.2 Konstruktion des lentiviralen Vektors und Produktion des Lentivirus

Für die Experimente wurden bicistronische Lentiviren erstellt, die zum einen den Ca²⁺-Indikator Twitch-2B und zum anderen entweder Kv1.2 oder Kir2.1 kodieren. In der Kontrollgruppe wurde Twitch-2B mit mCherry zusammen exprimiert. Für die detaillierte Beschreibung der Konstruktion des lentiviralen Vektors und die Produktion des Lentivirus wird auf Vorarbeiten von Kaizhen Li Ph.D. in der Publikation (Li et al., 2023) verwiesen.

2.2.3 Injektion von Lentiviren in den rostralen Migrationsstrom (RMS)

Die Versuchstiere wurden mit Ketamin/Xylazin (80/4 µg/g KG) anästhesiert und an ein Stereotaxie-Gerät (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) fixiert. Die Augen der betäubten Tiere wurden zur Vermeidung von Austrocknung mit einer Augensalbe abgedeckt. Anschließend wurde 2% Lidocain subkutan an der jeweiligen linken und rechten Injektionsstelle appliziert. Nach sorgfältiger Entfernung der Haut zur Freilegung des Schädels wurden zwei ca. 0,5mm im Durchmesser große Schädellöcher gebohrt (Koordinaten: anterior-posterior +3,0 mm vom Bregma, medial-lateral ±0,83 mm von der Mittellinie). Durch die Öffnungen wurde stereotaktisch ca. 0,8-1 µl der virushaltigen Lösung in den RMS jeder Hemisphäre appliziert (Tiefe: $-2,95 \pm 0,05$ mm von der Pialoberfläche entfernt). Die freiliegenden Bereiche des Schädels wurden mit Zahnzement abgedeckt. Anschließend wurden die Mäuse in den Käfig zurückgebracht. Zur Behandlung der postoperativen Schmerzen wurde zudem Carprofen s.c. (5 µg/g KG) über 3 Tage zur Analgesie verabreicht (Li et al., 2023).

2.2.4 Transkardiale Perfusion

Für die transkardiale Perfusion und die darauffolgende Entnahme des Gehirngewebes wurden die Versuchstiere zunächst mittels intraperitonealer Applikation von Ketamin/ Xylazin narkotisiert. In den folgenden Schritten wurde das Herz mittels Medianschnitt freigelegt, die Perfusionskanüle in den linken Ventrikel injiziert und das Tier transkardial mit kalter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) perfundiert. Anschließend erfolgte die Perfusion mit 4% Paraformaldehyd (PFA) zur dauerhaften Fixierung des Gehirngewebes. Die Tiere wurden dekapitiert, die herausgenommenen Gehirne in 4% PFA für 24 Stunden bei 4 °C postfixiert und im Anschluss das Gewebe in einer 25%-igen Saccharose-Lösung über Nacht bei 4 °C kryoprotektiert. Die aus der Saccharose-Lösung entnommenen Gehirne wurden am Corpus callosum entlang in zwei Hälften getrennt und der posterior gelegene Teil des Cortex entfernt. Die Präparate wurden separat in Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Li et al., 2023).

2.2.5 Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung der Kryoschnitte wurden die Präparate mit Cryo-Gel Einbettmedium (Leica Microsystems, Wetzlar) auf Trägerplatten befestigt. Im Kryostat (Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden die Sagittalschnitte bei -20 °C erstellt und anschließend in PBS überführt. Die Schnittdicke betrug je nach Experiment 30 µm – 100 µm (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Auswahl der Schnittdicke nach Experiment

Experiment	Schnittdicke
KV1.2 Antikörper-Nachweis	50 µm
Morphologische Untersuchungen	50 µm- 100 µm
Entwicklungsmarker DCX/NeuN	50 µm
pCREB/Twitch-2B	50 µm
pCREB/NeuN/Twitch-2B	30 µm

2.2.6 Immunhistologische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurde an frei flottierenden, sagittalen Kryoschnitten bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Zunächst wurden die Gehirnschnitte in einer 24-well-Platte zwei Mal über 10 Minuten mit PBS gewaschen und auf einer Rüttelplatte geschüttelt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch 5% Esel-Normalserum (dianova, #017-000-121) in PBS geblockt und die Permeabilität des Gewebes durch 1% Triton X-100 (Sigma #T-9284) erhöht. Die Präparate verweilten eine Stunde bei RT in dieser Lösung.

Im nächsten Schritt wurde der primäre Antikörper zur bereits bestehenden Blocklösung pipettiert und die Hirnschnitte in dieser über Nacht bei 4°C inkubiert. Die folgenden primären Antikörper wurden verwendet: polyklonaler Antikörper Anti-GFP aus der Ziege (Rockland 600-101-215, Verdünnung 1:1000), monoklonaler Antikörper Anti-Kv1.2 aus der Maus (NeuroMab 75-008,

Material und Methoden

Verdünnung 1:200), monoklonaler Antikörper Anti-pCREB aus dem Kaninchen (Cell Signaling 9198S, Verdünnung 1:400), monoklonaler Antikörper Anti-NeuN aus der Maus (Millipore MAB377, Verdünnung 1:1000), polyklonaler Antikörper Anti-DCX aus dem Kaninchen (Abcam ab18723, Verdünnung 1:2000).

Nachdem die Hirnschnitte am nächsten Tag drei Mal je 10 Minuten mit PBS gewaschen wurden, folgte die Inkubation bei RT im Dunkeln über 2 Stunden mit dem sekundären Antikörper verdünnt in einer PBS Lösung mit 2% IgG freiem Rinderalbumin (Jackson Immuno Research/ dianova #011-000-161). Die fluorochromierten Antikörper dienten der Visualisierung der Proteinstrukturen. Je nach Experiment wurden ein oder mehrere fluoreszierenden Farbstoffe verwendet (grün Alexa 488, rot Alexa 594, tief-/infrarot Alexa 680) (siehe Tabelle 8). Die folgenden sekundären Antikörper kamen zum Einsatz: Esel-Anti-Ziege-IgG konjugiert mit Alexa Fluor 488 (A11055, Verdünnung 1:1000), Esel-Anti-Maus-IgG-konjugiert mit Alexa Fluor 488 (A21202, Verdünnung 1:500), Esel-Anti-Kaninchen-IgG-konjugiert mit Alexa Fluor 488 (A11055, Verdünnung 1:1000), Esel-Anti-Ziege-IgG konjugiert mit Alexa Fluor 594 (A11058, Verdünnung 1:1000), Esel-Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Alexa Fluor 594 (A21207, Verdünnung 1:1000), Esel-Anti-Maus-IgG-konjugiert mit Alexa Fluor 680 (A10038, Verdünnung 1:1000). Alle sekundären Antikörper waren von Invitrogen (Grand Island, NY) erworben.

Bevor die Fixierung der Hirnschnitte auf einem fluoreszenzfreien Superfrost Plus Objektträger (Langenbrink, Emmendingen, Deutschland) erfolgte, wurden diese erneut drei Mal je 10 Minuten mit PBS gewaschen. Die überschüssige Flüssigkeit am Objektträger wurde durch Löschpapier sowie durch anschließendes Trocken an der Luft entfernt. Anschließend wurde Vectashield (Vector Laboratories, USA) oder ProLong Gold (Invitrogen, Grand Island, NY) Montagemedium hinzugefügt und ein Deckglas montiert. Die Lagerung der Präparate erfolgte abgedunkelt und gekühlt bei 4 °C.

Material und Methoden

Tabelle 8: Zuordnung primärer und sekundärer Antikörper je Experiment

Experiment	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
KV1.2 Antikörper-Nachweis	Anti-Kv1.2 aus Maus Anti-GFP aus Ziege	Alexa 488 Esel-Anti-Maus-IgG Alexa 594 Esel-Anti-Ziege-IgG
Morphologische Untersuchungen	Anti-GFP aus Ziege	Alexa 488 Esel-Anti-Ziege-IgG Alexa 594 Esel-Anti-Ziege-IgG
Entwicklungsmarker DCX	Anti-GFP aus Ziege Anti-DCX aus Kaninchen	Alexa 488 Esel-Anti-Ziege-IgG Alexa 594 Esel-Anti-Kaninchen-IgG
Entwicklungsmarker NeuN	Anti-NeuN aus Maus Anti-GFP aus Ziege	Alexa 488 Esel-Anti-Maus-IgG Alexa 594 Esel-Anti-Ziege-IgG
pCREB/Twitch-2B	Anti-pCREB aus Kaninchen Anti-GFP aus Ziege	Alexa 488 Esel-Anti-Kaninchen-IgG Alexa 594 Esel-Anti-Ziege-IgG
pCREB/NeuN/Twitch-2B	Anti-pCREB aus Kaninchen Anti-GFP aus Ziege Anti-NeuN aus Maus	Alexa 488 Esel-Anti-Kaninchen-IgG Alexa 594 Esel-Anti-Ziege-IgG Alexa 680 Esel-Anti-Maus-IgG

2.2.7 In-vitro-Zwei-Photonen-Bildgebung

Die immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte der Maus wurden unter Verwendung eines Olympus Fluoview 300 Laserscanning-Mikroskops (Olympus, Tokyo, Japan) kombiniert mit einem MaiTai-Mode-locked-Laser (Spectra Physics, Mountain View, CA, USA) in einem abgedunkelten Raum aufgenommen, siehe auch Aufbau gemäß (Li et al., 2023). Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa 488, 594 und 680 erfolgte bei einer Wellenlänge von 800 nm, das emittierte Licht wurde in zwei separaten Photomultiplier-Röhren gesammelt. Für Alexa Fluor 488 und 594 wurde das emittierte Licht durch einen 570 nm oder 630 nm dichroitischen Spiegel aufgeteilt und mit einem 536/40 nm Bandpassfilter sowie einem 568 nm Langpassfilter gefiltert. Für Alexa Fluor 680 wurde das Signal im Langpasskanal eines 670 nm dichroitischen Spiegels erfasst. Für die Laser-Scan-Aufnahmen wurde entweder ein Zeiss 20x-Wasserimmersionsobjektiv (NA 1,0, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) oder ein Nikon 40x-Wasserimmersionsobjektiv (Nikon, Tokyo, Japan) verwendet. Hierdurch wurden TIFF-Bilder mit 512x 512 Pixel, 1 µm Abständen in der Z-Achse und 1 bis maximal 6-maliger Vergrößerung erstellt.

Material und Methoden

Aufnahmeeinstellungen pro Experiment:

Kv1.2 Antikörper-Nachweis: Spiegel und Filter: dichroitischer Spiegel 570 nm, Langpassfilter 568 nm, Bandpassfilter 536/40 nm. Laserpower 41 APT. PMT: Kanal 1: 655, Kanal 2: 415. Vergrößerung (V.) 40x Objektiv, Zoomfaktor 6x. Schrittweite: 1 µm. Aufnahmegeschwindigkeit: mittel. Kalman 2.

Morphologie des apikalen Dendriten: Spiegel und Filter: dichroitischer Spiegel 570 nm, Langpassfilter 568 nm, Bandpassfilter 536/40 nm. Laserpower 39-42 APT. PMT: Kanal 1: 730. V. 40x Objektiv oder 20x Objektiv, Zoomfaktor 1-1,5x. Schrittweite: 1 µm. Aufnahmegeschwindigkeit: schnell. Kalman 2.

Bestimmung der Anzahl der Basaldendriten: Spiegel und Filter: dichroitischer Spiegel 670 nm. Laserpower 41 APT. PMT: Kanal 1: 570-600. V. 40x Objektiv, Zoomfaktor 2,5x. Schrittweite: 1 µm. Aufnahmegeschwindigkeit: schnell. Kalman 2.

Dornfortsatzdarstellung: Spiegel und Filter: dichroitischer Spiegel 570 nm, Langpassfilter 568 nm, Bandpassfilter 536/40 nm. Laserpower 40-42 APT. PMT: Kanal 1: 730. V. 40x Objektiv, Zoomfaktor 4,5x. Schrittweite: 1 µm. Aufnahmegeschwindigkeit: mittel. Kalman 3.

Vergleich der Signalhelligkeit der Somata: Spiegel und Filter: dichroitischer Spiegel 570 nm, Langpassfilter 568 nm, Bandpassfilter 536/40 nm. Laserpower 38,5 APT. PMT: Kanal 1: 720. V. 40x Objektiv, Zoomfaktor 2,5x. Schrittweite: 1 µm. Aufnahmegeschwindigkeit: mittel. Kalman 2.

Entwicklungsmarker NeuN und DCX: Spiegel und Filter: dichroitischer Spiegel 570 nm oder dichroitischer Spiegel 630 nm, Langpassfilter 568 nm, Bandpassfilter 536/40 nm. Laserpower 40-42 APT. PMT: bei Dic 570 nm: Kanal 1: 690- 780 und Kanal 2: 530- 670; bei Dic 630 nm: Kanal 1: 715- 730 und Kanal 2: 630- 710. V. 40x Objektiv, Zoomfaktor 1-2x. Schrittweite: 1 µm. Aufnahmegeschwindigkeit: mittel. Kalman 2-3.

pCREB/Twitch-2B: Spiegel und Filter: dichroitischer Spiegel 630 nm, Langpassfilter 568 nm, Bandpassfilter 536/40 nm. Laserpower 42 APT. PMT:

Material und Methoden

Kanal 1: 610-730; Kanal 2: 780-790. V. 40x Objektiv, Zoomfaktor 2,5x. Schrittweite: 1 µm. Aufnahmegeschwindigkeit: mittel. Kalman 3.

pCREB/NeuN/Twitch-2B: Erste Aufnahme Darstellung NeuN: Spiegel und Filter: dichroitischer Spiegel 670 nm, keine weiteren Filter. Laserpower 41 APT. PMT: Kanal 2: 680-700. Zweite Aufnahme Darstellung pCREB und Twitch-2B/GFP: Spiegel und Filter: dichroitischer Spiegel 570 nm, Langpassfilter 568 nm, Bandpassfilter 536/40 nm. Laserpower 41 APT. PMT: Kanal 1: 725; Kanal 2: 600-750. Für beide Aufnahmen geltend: V. 40x Objektiv, Zoomfaktor 2,5x. Schrittweite: 1 µm. Aufnahmegeschwindigkeit: schnell. Kalman 2.

2.2.8 Analysen

Analyse des Expressionsniveaus von Kv1.2-Kanälen an immunhistochemisch gefärbten Hirnschnittpräparaten

Die Auswertungen der immunhistochemisch gefärbten Präparate mit Antikörpern gegen Kv1.2-Kanälen erfolgte offline mit ImageJ. Die Hirnschnitte wurden alle unter den gleichen Bedingungen gefärbt und mit gleicher Laserleistung und Photomultiplier (PMT)-Spannung aufgenommen. Zunächst wurden die jeweilige TIFF-Datei in die beiden Aufnahmekanäle aufgeteilt, sodass jeweils eine Bildserie vom Kanal 1 (Kv1.2-Antikörper) und eine Bildserie vom Kanal 2 (Twitch-2B) entstanden. Anschließend wurden die Kv1.2-Bildserien zur Reduktion von Hintergrundsignalen, generiert durch unspezifische Bindungen von Alexa Fluor 488, nach dem folgenden Protokoll bearbeitet: Es wurden 5 Negativkontrollen im Kanal 1 aufgenommen, welche mit dem sekundären Antikörper behandelt wurde, jedoch ohne Hinzugabe des Primärantikörpers. Der Medianwert der 5 Negativkontrollen wurde anschließend von der Kv1.2-Bildserie subtrahiert. Zur weiteren Analyse der Bilder wurde ein individuell entwickelter Matlab-Code verwendet, hierdurch konnte die Intensität des Fluoreszenzsignales im Bereich des Somas getrennt vom Signal des umgebenden Neuropils berechnet werden. Das Verhältnis der Fluoreszenzsignale von Soma zu Neuropil wurde als Ausdruck des relativen Kv1.2-Expressionsniveaus gewertet. Zudem konnte festgestellt werden, dass die die Intensität des Fluoreszenzsignales am

Material und Methoden

ausgeprägtesten im Bereich des Zytoplasms der Zellkörper vorhanden war, sodass sich eine halbmondförmige bis kreisförmige Signalstruktur darstellte (Abbildung 3). Das alleinige Vorhandensein dieser halbmondförmigen bis kreisförmigen Struktur pro Zellkörper wurde daher ebenfalls quantifiziert.

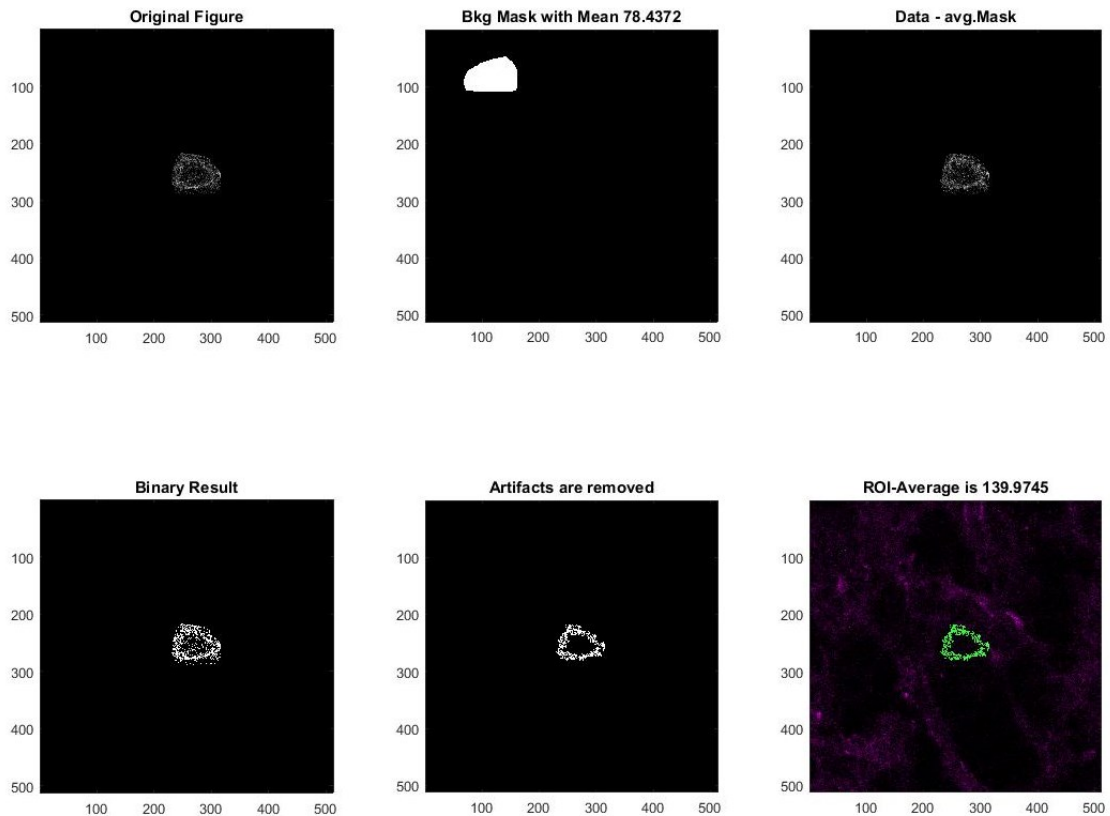


Abbildung 3: Analyse des Expressionsniveaus von Kv1.2-Kanälen in Matlab

Für die Analyse der relativen KV1.2- Expression in den adult-geborenen GCs wurde ein von Herrn Dr. N. Moitahedi individuell entwickelter Matlab-Code verwendet. Hierdurch konnte die Intensität des Fluoreszenzsignales im Bereich des Somas getrennt vom Signal des umgebenden Neuropils gemessen werden und im darauffolgenden Schritt die relative Signalhelligkeit Soma zu Neuropil ermittelt werden. Grüne Markierung entspricht der KV1.2 markierten Fläche im Soma der GC. Violette Markierung entspricht dem Neuropil und umgebenen Strukturen.

Morphologie des apikalen Dendriten

Die Untersuchungen der Morphologie der GCs wurden *in vitro* an immunhistochemisch gefärbten Gehirnschnitten mit primären Antikörpern gegen GFP und sekundären Antikörpern konjugiert mit Alexa Fluor 488 oder 594 durchgeführt. Die Aufnahmen vom Bereich der Körnerzellschicht im Bulbus olfaktorius wurden schichtweise durchgeführt, um sogenannte z-Stacks (Stapelbilder) zu erzeugen. Zunächst wurden 3D-Rekonstruktionen von apikalen Dendriten aus den aufgenommenen z-Stacks erstellt. Die Erstellung der 3D-Rekonstruktion erfolgte in der Software Neuromantic ((Version 1.7.5) Darren Myatt, University of Reading, Berkshire, England) durch manuelles Nachfahren der Dendriten. Anschließend wurden die Dendriten-Rekonstruktionen in ImageJ importiert und mit dem Plugin „Simple Neurite Tracer“ analysiert. Hierbei wurde die Gesamtlänge des apikalen Dendriten und die Anzahl der dendritischen Verästelungen der GCs gemessen. Des Weiteren wurde eine Sholl-Analyse durchgeführt, welche die Anzahl der Schnittpunkte in Abhängigkeit von der Entfernung zum Zellkörper darstellte. Berechnet wurden die Intersektionen in 10 μm Abständen vom Zellkörper. Durch die Sholl-Analyse können Rückschlüsse über die Komplexität des apikalen Dendritenbaums gezogen werden (Sholl, 1953).

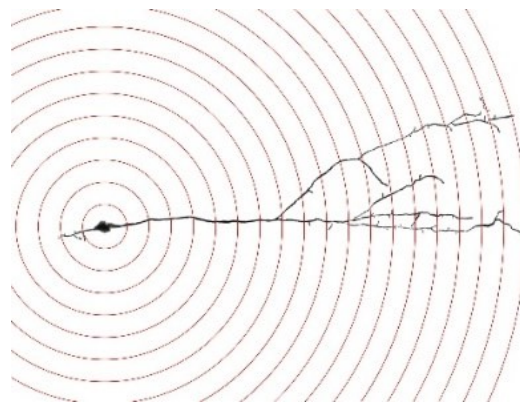


Abbildung 4: Illustration der Sholl-Analyse

Visuelle Darstellung der Sholl-Analyse am Beispiel einer adult-geborenen Körnerzelle. Den Ausgangspunkt bildet der Zellkörper der GC, in regelmäßigen 10 μm Abständen werden jeweils Kreise um den Zellkörper gezogen. Berechnet werden die Schnittstellen der Kreise mit den Verästelungen des Dendritenbaumes. Hierdurch lassen sich Parameter zur Einschätzung der Komplexität des Dendriten ablesen. Erstellung der Abbildung durch Dr. Xin Su.

Anzahl der Basaldendriten pro Körnerzelle

Zur Erfassung der Anzahl der Basaldendriten pro GC wurden ebenfalls z-Stacks von immunhistochemisch gefärbten Gehirnschnitten analysiert. Die GCs wurden mit einer 2,5-fachen Vergrößerung und einem 40x- Objektiv aufgenommen und anschließend die Gesamtzahl der Basaldendrit in ImageJ bestimmt. Der deutlich längere Apikaldendrit der GC wurde markiert und nicht in die Analyse aufgenommen. Als Basaldendrit wurde nach eigenem Schema eine Struktur gewertet, welche vom Soma der GCs direkt entsprang, bei welcher es sich nicht um den apikalen Dendriten handelte und welche eine Größe von mindestens 20 Pixeln aufwies.

Untersuchungen zur Darstellung der Dornfortsätze

Es wurden Aufnahmen des apikalen Dendriten der GCs im Bereich der Bifurkation vom primären Dendriten zu den sekundären Dendriten gemacht. Zielstrukturen waren die Dornfortsätze in der Region der sekundären Dendriten. Bei eingeschränkter Darstellbarkeit der Dornfortsätze in der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe wurden weitere Modifikationen der immunhistochemischen Färbungen oder der Einstellung der Laseraufnahmen getestet. Unter anderem wurde der Sekundarantikörper konjugiert mit Alexa Fluor 488 in höheren Konzentrationen hinzugegeben. Ebenfalls wurde der Wechsel auf Alexa Fluor 594 getestet. Zur weiteren Optimierung der visuellen Darstellung der Dornfortsätze wurden unterschiedliche Laserleistungen und PMT-Spannungen untersucht. Eine Quantifizierung der Dornfortsätze konnte nicht durchgeführt werden.

Fluoreszenzsignalintensität der Zellkörper

Um die Signalintensität ausgehend vom Soma der Körnerzellen zu messen und zu vergleichen, wurden Hirnschnitte vom Bulbus olfaktorius immunhistochemisch unter den gleichen Bedingungen gefärbt und die Aufnahmen der GCs unter identischen Bildaufnahmeeinstellungen am 2-Photonen-Laser erstellt. Die z-Stacks wurden in das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ importiert und die

Material und Methoden

Einzelnschnittbilder analysiert. Die Gesamtfläche des Körnerzellzellkörpers wurde umzeichnet und die absolute Signalintensität gemessen. Das Hintergrundsignal wurde ebenfalls in der gleichen Schnittebene und in unmittelbarer Nähe des Zellkörpers markiert und gemessen. Die relative Signalhelligkeit wurde durch das Dividieren des Zellkörpersignals durch das Hintergrundsignal berechnet.

Auswertung der Entwicklungsmarker NeuN und DCX

Ausgewertet wurden Präparate vom Bulbus olfaktorius mit einer immunhistochemischen Doppelfärbung gegen Twitch-2B/GFP (Alexa Fluor 488) und NeuN bzw. DCX (Alexa Fluor 594). In der Software FV10-ASW wurden hierbei Twitch-2B-positive Körnerzellen oder juxtaglomeruläre Zellen im OB an DPI 28 in einzelnen Schnittebene analysiert. Es wurde im Fall einer Doppelfärbung gegen NeuN untersucht, ob der Zellkörper der GCs/JGNs gleichzeitig mit NeuN markiert war. Vergleichbar wurde bei den DCX-Doppelfärbungspräparaten untersucht, ob eine gleichzeitige Markierung der GCs/JGNs mit DCX im apikalen Dendriten und Zellkörper nachzuweisen war. Darüber hinaus wurden DCX-Analysen ebenfalls an GCs DPI 11 nach gleichem Schema durchgeführt. Kontrolliert wurden die Ergebnisse durch einen zweiten Analysevorgang im Bildbearbeitungsprogramm ImageJ, in welchem mittels Verwendung des Schwellenwertstandards das Vorhandensein von NeuN oder DCX verifiziert wurde.

pCREB-Analysen

Um das relative Expressionsniveau von pCREB in adult-geborenen Körnerzellen (DPI 28) zu untersuchen, wurden weitere immunhistochemische Färbungen mit GFP (Twitch-2B) und pCREB durchgeführt. In der initialen Doppelfärbung wurden einzelne Schnittbilder in ImageJ analysiert. Die zu untersuchende Ebene wurde so ausgewählt, dass die Zellkörper der GCs zentral durchtrennt erschienen. Es wurden ROIs (region of interest) im Twitch-2B Fenster um die GCs Zellkörper gezeichnet und anschließend die Markierung auf das pCREB-

Material und Methoden

Fenster übertragen, um dort die korrespondierende pCREB Intensität der Zielzellen zu messen. Dann wurde im pCREB-Fenster der Schwellenwert angepasst, sodass die pCREB-positiven Zellen besser abgegrenzt werden konnten, und in der zuvor ausgewählten gleichen Schichthöhe ROIs um alle pCREB-positiven GCs im Sichtfeld gezeichnet sowie einmal pro Bild das Hintergrundrauschsignal gemessen. Zum Erhalt des relativen pCREB-Expressionsniveaus der Twitch-2B-markierten GCs zum Vergleich der umliegenden pCREB-positiven GCs wurde folgende Berechnung durchgeführt: (pCREB Signalintensität der Twitch-2B markierten GCs – Hintergrundsignal) / (pCREB Signalintensität umliegender pCREB-positiver GCs – Hintergrundsignal).

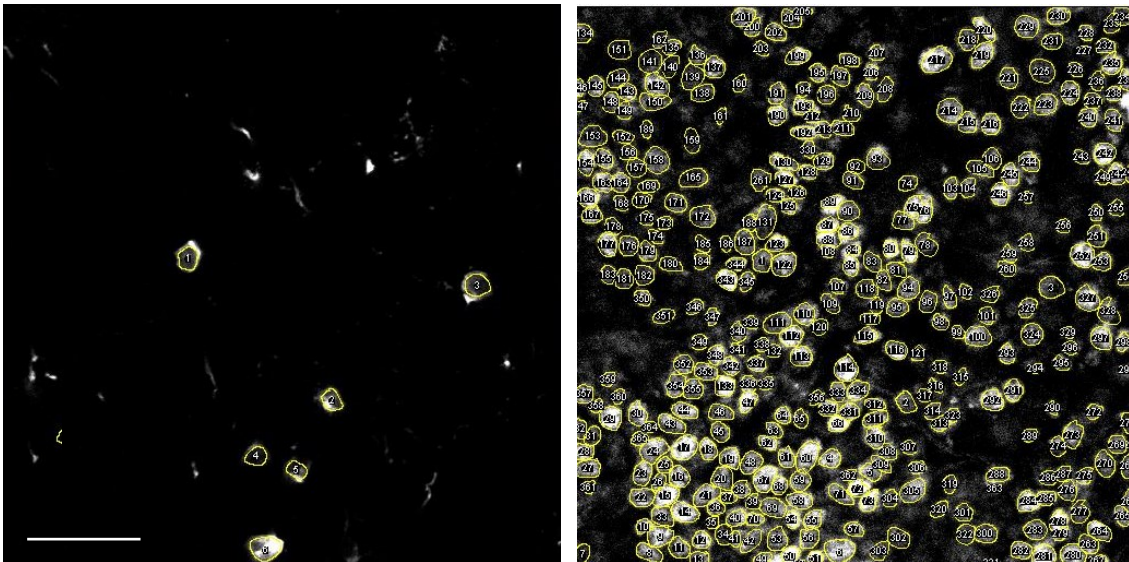


Abbildung 5: Auswertung der pCREB Doppelfärbungen in ImageJ

Links dargestellt das GFP (Twitch-2B) -Fenster mit Einzeichnung der GFP-positiven GCs. Rechts zu sehen das korrespondierende pCREB-Fenster in der gleichen Schichthöhe mit automatischer Adaptierung des Schwellenwertes zur besser Abgrenzbarkeit des pCREB-Signales. Zelle 1-6 entsprechend der Messung des pCREB-Signales der GFP-positiven GCs, weitere eingezeichnete ROIs entsprechend den umliegenden pCREB-positiven GCs. Maßstabskala 30 μm .

Material und Methoden

Ergänzt wurde diese Untersuchung zudem um eine immunhistochemische Dreifachfärbung mit Darstellung von GFP (Twitch-2B), pCREB und NeuN (siehe Tabelle 8) an GCs DPI 28 sowie DPI 10. Hierbei wurden die aufgenommenen z-Stacks in ImageJ in drei verschiedene Fenster für pCREB, GFP (Twitch-2B) und NeuN unterteilt. Im GFP (Twitch-2B) -Fenster wurden in der Einzelschnittebene ROIs um den Zellkörper der GCs eingezeichnet. In der gleichen Schnitthöhe wurden im korrespondierenden NeuN-Fenster die NeuN-positiven Körnerzellen betrachtet. Zuvor wurde jedoch das NeuN-Bild zur Reduktion des Hintergrundrauschens durch unspezifische Sekundärantikörperbindung modifiziert. Hierfür wurde der Median des Hintergrundsignales aus 5 ROIS bestimmt und vom NeuN-Originalbild subtrahiert. Anschließend wurde der Schwellenwert des Bildes in ImageJ angepasst, sodass die NeuN-positiven Regionen genauer zu differenzieren waren. Im vorhandenen Sichtfeld wurden ROIs um den Zellkörper aller NeuN-positiven Körnerzellen eingezeichnet und anschließend die Markierungsareale auf die gleiche Ebene im pCREB-Fenster übertragen. Durch das Dividieren der Intensität der pCREB-Fluoreszenz der GFP-positiven Zellen durch die pCREB-Fluoreszenzintensität aller NeuN-positiven Körnerzellen konnte der relative pCREB-Expressionsgrad bestimmt werden.

Darüber hinaus wurde zur Berechnung des Expressionsniveaus von pCREB in NeuN-positiven GCs eine immunhistochemische Doppelfärbung mit pCREB und NeuN analysiert. In der Einzelschnittebene im NeuN-Fenster wurden ROIs um die Zellkörper der NeuN-positiven GCs gezogen und diese auf das pCREB Fenster übertragen. Anschließend wurde im pCREB-Fenster die Signalintensität in den markierten Arealen gemessen und eine Messung des Hintergrundsignales vorgenommen. Eine Zelle wurde als pCREB-positiv gewertet, wenn diese mindestens zweimal die Signalstärke des Hintergrundsignales aufwies. Berechnet wurde relative Anteil der NeuN-positiven GCs, die pCREB $> 2x$ Hintergrundsignal aufwiesen.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Software GraphPad Prism 5 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Der Kolmogorov-Smirnov Test wurde zur Überprüfung der Normalverteilung verwendet. Bei normalverteilten Daten wurden parametrische Tests verwendet (Vergleich von zwei Gruppen mit dem Zwei-Stichproben-t-Test, Vergleich von drei Gruppen mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (One-way ANOVA) bzw. zweifaktoriellen Varianzanalyse (Two-way ANOVA) gefolgt vom Post-hoc Tukey-Test für multiple Vergleiche). Zur statistischen Analyse zweier nicht normalverteilter Gruppen wurden nicht-parametrische Tests (Vergleich von zwei Gruppen Mann-Whitney-U-Test, Vergleich von drei Gruppen Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Multiple Comparison Test) verwendet. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Alle Ergebnisse wurden, sofern nicht anders angegeben, als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Die Boxplots wurden verwendet, um die folgenden 5 Parameter des Datensatzes darzustellen: Median, 1. und 3. Quantil (Interquartilsabstände (IQR)), Minimum und Maximum.

Die Methoden und Auswertungsvorgänge für die Bestimmung der Apikaldendritenlänge, Sholl-Analyse, NeuN- und DCX- Auswertungen, Bestimmung des Kv1.2-Expressionsniveaus und Auswertung der pCREB-Dreifachfärbung wurden in (Li et al., 2023) bereits beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Verifizierung der Überexpression von Kaliumkanälen (Kv1.2) in den adult-geborenen Körnerzellen durch lentivirale Transduktion

Um die Effizienz der lentiviralen Transduktion zu verifizieren, wurde der Kalium Kanal Kv1.2 immunhistochemisch in den adult-geborenen Körnerzellen (DPI 11) dargestellt. Bildmorphologisch ließ sich der Antikörper gegen Kv1.2 insbesondere im Bereich des Zellkörpers nachweisen, sodass das Vorhandensein einer halbmondförmigen bis ringförmigen Kv1.2-Ringstruktur als Zeichen eines erhöhten Expressionsniveaus von Kv1.2 gewertet wurde (Abbildung 6).

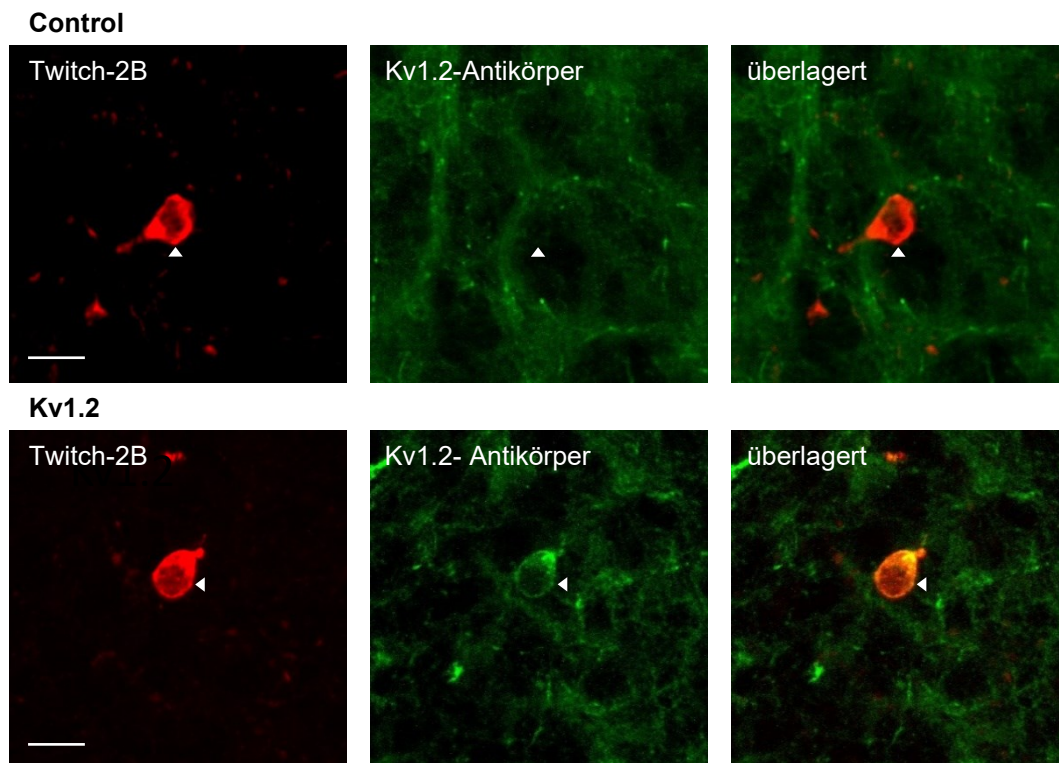


Abbildung 6: Zeitgleiche Expression von Kv1.2 und Twitch-2B in GCs

Maximum-Intensitäts-Projektionen (MIP) von Immunfluoreszenzbildern zeigen die Expression von Kv1.2 in adult-geborenen GCs am 11. Tag nach Injektion (DPI 11) in der Kontroll- (obere Reihe) und Kv1.2-Gruppe (untere Reihe). Links Twitch-2B markierte GCs mit Anti-GFP-Antikörpern verstärkt zu sehen, mittig Kv1.2-Antikörper-Färbung, rechts Überlagerung beider Signale (überlagert). Die Pfeilspitzen markieren die Position der GCs. Zu sehen ist in der Kv1.2-Gruppe ein ringförmiges Kv1.2-Expressionsmuster, welches sich in der überlagerten Darstellung (orange) genau im Bereich des Somas der GCs befindet. Maßstabsskala 10 μ m.

Ergebnisse

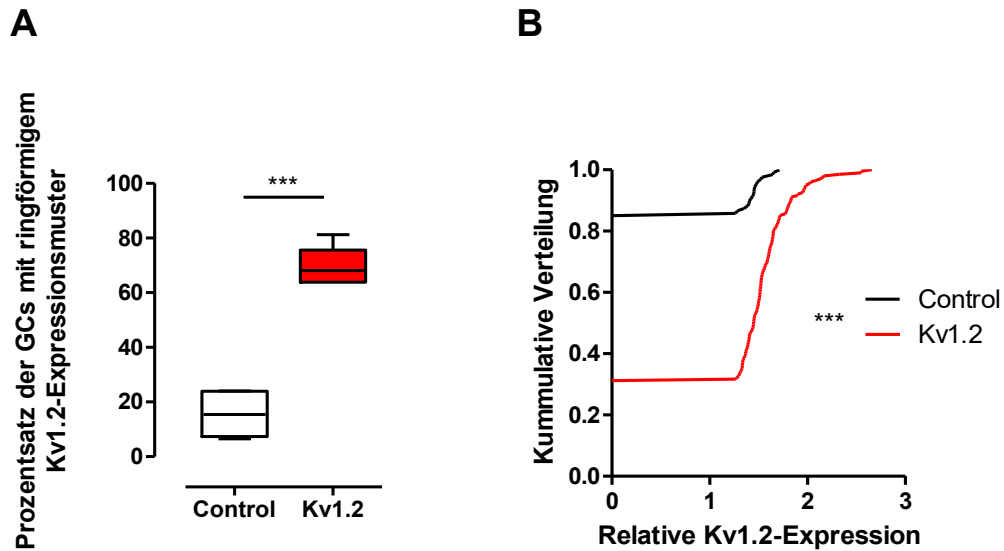


Abbildung 7: Nachweis gleichzeitiger Expression von Kv1.2 und Twitch-2B in Kontroll- und Kv1.2- GCs an DPI 11 durch lentivirale Transfektion

- (A) Die Boxplots mit Darstellung des Medians und der Interquartilsabstände (IQR) zeigen den prozentualen Anteil der Zellen mit vorhandenem Kv1.2-Expressionsmuster (pro Maus) für die Kontroll- und Kv1.2-Gruppe auf. Das Vorhandensein eines ringförmigen Kv1.2-Expressionsmuster spiegelt eine verstärkte Expression von Kv1.2 Kanälen im Bereich des Somas wider. Ungepaarter Zwei-Stichproben-t-Test, $P^{***} < 0.0001$.
- (B) Kumulative Verteilungen des relativen Kv1.2-Expressionsniveaus in adult-geborenen GCs in der Kontroll- und Kv1.2-überexprimierenden Gruppe (Angaben pro Zelle). Verglichen wurde die Signalintensität des Kv1.2 Expressionsringes zum Signal des umliegenden Neuropils. Mann Whitney Test: $P^{***} < 0.0001$.

(A, B) Control: $n=5$ Mäuse [127 Zellen], Kv1.2: $n=5$ Mäuse [202 Zellen] Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = nicht signifikant.

Wenn nicht anders angegeben, werden alle folgenden Boxplots ebenfalls den Median sowie den IQR anzeigen, ohne dies erneut explizit in der Graphikbeschreibung zu erwähnen.

In der Kv1.2- Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein statistisch signifikant erhöhter Anteil von GCs detektiert werden, die eine halbmond- bis ringförmige Signalanhebung im Bereich des Somas in der Kv1.2-Antikörperfärbung aufwiesen (Abbildung 5A; $P < 0.0001$; ungepaarter einseitiger t-Test). So zeigten in der Kv1.2-Gruppe im Mittel $69.39\% \pm 3.2\%$ der GCs (Angaben pro Maus) das beschriebene Kv1.2- Expressionsmustersignal, wohingegen in der Kontrollgruppe im Mittel nur $15.60\% \pm 3.7\%$ dieses nachwiesen. Zudem wurde die kumulative Verteilung (pro Zelle) in der Kontroll- und Kv1.2 Gruppe verglichen. Hierbei wurde nicht nur das Vorhandensein des

Ergebnisse

Kv1.2-Expressionsringes untersucht, sondern auch die relative Fluoreszenzsignalstärke der Ringstruktur im Vergleich zum Hintergrund dargestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied beider Gruppen (*Abbildung 5B*; $P < 0.0001$, Mann Whitney Test).

3.2 Beeinflussung der Morphogenese der adult-geborenen Körnerzellen durch die herabgesetzte endogene neuronale Aktivität durch die Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1

Als nächstes wurde der Einfluss der veränderten endogenen Aktivität durch die Überexpression von Kv1.2- bzw. Kir2.1-Kanälen auf die morphologische Entwicklung der adult-geborenen Körnerzellen an DPI 28 untersucht. Hierbei wurde in immunhistochemisch verstärkten Kryoschnitten (50-100 μm Schichtdicke) insbesondere der apikale Dendrit der GCs auf Länge und Komplexität untersucht. Des Weiteren wurde die Anzahl der Basaldendriten pro GCs untersucht und Versuche zur Darstellung der Dornfortsätze am apikalen Dendriten unternommen. Ebenfalls wurde die relative Fluoreszenzsignalstärke im Bereich des Somas untersucht.

3.2.1 Morphologie des apikalen Dendriten der adult-geborenen Körnerzellen

Bereits bei der rein visuellen Betrachtung der z-Stacks erschienen die adult-geborenen GCs der Kontrollgruppe deutlich länger, verzweigter und komplexer aufgebaut als jene der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe (*Abbildung 8*). Zur Verifizierung dieser Annahme wurden im Folgenden mittels 3D-Rekonstruktion die Länge und Komplexität des apikalen Dendriten ausgemessen.

Ergebnisse

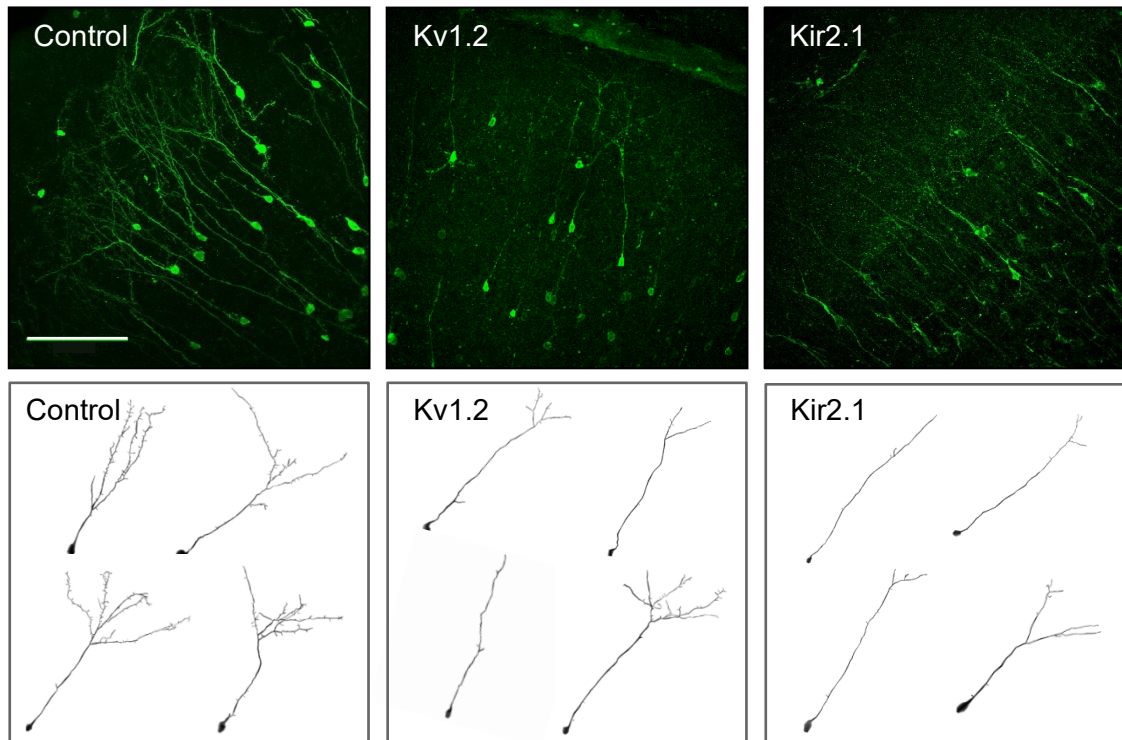


Abbildung 8: Morphologie des apikalen Dendriten von GCs

MIP von Immunfluoreszenz-Aufnahmen aus dem Bulbus olfactorius in der oberen Reihe zur Darstellung der Morphologie der adult-geborenen GCs (Kontrollgruppe links, Kv1.2-überexprimierenden GCs in der Mitte, Kir2.1-überexprimierenden GCs rechts). Die Gewebsschnitte wurden mit Anti-GFP-Antikörpern markiert. Maßstabsskala 100 μm . In der unteren Reihe sind exemplarische Rekonstruktionen (nicht maßstabsgetreu) der jeweiligen Gruppe (Kontrolle, Kv1.2 und Kir2.1) abgebildet. Die Bilder der Rekonstruktionen wurden bereits veröffentlicht in (Li et al., 2023) und werden hier durch Projektionsaufnahmen sowie weitere Rekonstruktionen von GCs ergänzt und modifiziert dargestellt.

In der Regel sind GCs nach 15 bis 30 Tagen nach Generierung im SVZ morphologisch vollständig entwickelt (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002), daher wurde auch in diesen Experimenten der Zeitpunkt 28 Tagen nach Injektion ausgewählt, um die Morphologie ausgewachsener Neurone zu vergleichen. Der Literatur zufolge haben voll entwickelte GCs eine Gesamtlänge des apikalen Dendriten von ca. 500 μm bis 600 μm (Dahlen et al., 2011). Auch Unsere Kontrollgruppe an DPI 28 wies eine ähnliche Gesamtlänge des Apikaldendriten der GCs von $644.6 \mu\text{m} \pm 31.35 \mu\text{m}$ auf. Im Gegensatz dazu zeigten adult-geborene GCs in der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe eine deutlich verminderte Länge des apikalen Dendriten. Diese betrug in der Kv1.2-Gruppe $319 \mu\text{m} \pm 7.86 \mu\text{m}$ und

Ergebnisse

in der Kir.2.1-Gruppe $315.4 \mu\text{m} \pm 40.89 \mu\text{m}$. Somit führte die Herabsetzung der endogenen Aktivität in der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtlänge des apikalen Dendriten (Abbildung 9A; $P < 0.0001$; Einfaktorielle Varianzanalyse). Auch weitere morphologische Parameter, wie die Anzahl der Verästelungen am Apikaldendriten, waren in der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe signifikant reduziert (Abbildung 9B; $P < 0.0003$; Einfaktorielle Varianzanalyse). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Gesamtlänge und Anzahl der Verästelungen des Apikaldendriten

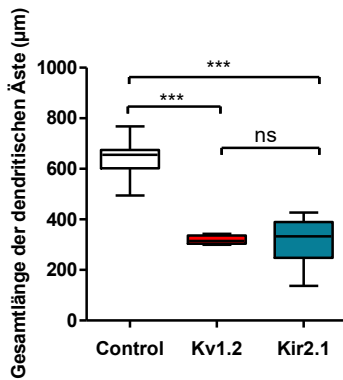
	Gesamtlänge der dendritischen Äste (μm) *	Anzahl der dendritischen Äste *
Kontrollgruppe	$644.6 \mu\text{m} \pm 31.35 \mu\text{m}$	84.21 ± 12.89
Kv1.2 Gruppe	$319 \mu\text{m} \pm 7.86 \mu\text{m}$	22.30 ± 4.57
Kir2.1 Gruppe	$315.4 \mu\text{m} \pm 40.89 \mu\text{m}$	19.75 ± 6.43

* (Verwendeter statistischer Test: Einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA), Post-hoc Tukey-Test)

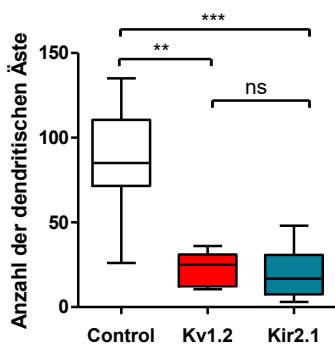
Zum Vergleich der Komplexität des Apikaldendriten wurde das Prinzip der Sholl-Analyse verwendet. Hierbei wurden im $10 \mu\text{m}$ Abständen zum Zellkörper die Anzahl der Schnittpunkte des Apikaldendriten mit regelmäßigen Sphären berechnet. In Abbildung 9 wurden die Sholl-Analysen der Kontroll- zur Kv1.2-Gruppe und der Kontroll- zur Kir2.1-Gruppe zur besseren Übersichtlichkeit getrennt voneinander dargestellt. Insbesondere im distalen Bereich zwischen $120 \mu\text{m}$ bis $200 \mu\text{m}$ Entfernung vom Soma konnten signifikante Unterschiede in der Anzahl der Verästelungen in der Kv1.2- Gruppe bzw. Kir2.1-Gruppe festgestellt werden (Abbildung 9 C-D; P siehe Tabelle 10; Zweifaktorielle Varianzanalyse).

Ergebnisse

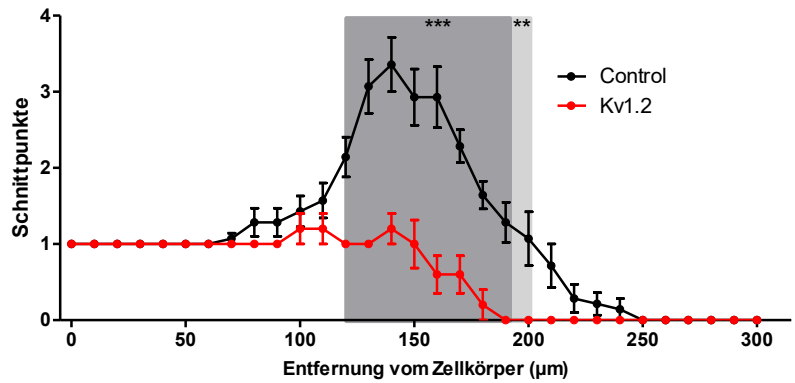
A



B



C



D

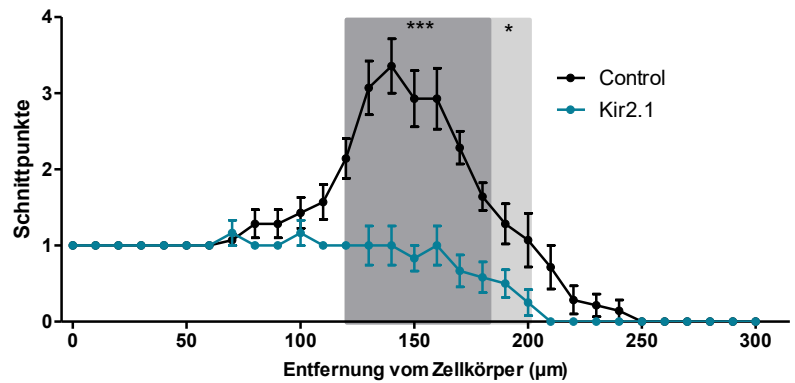


Abbildung 9: Die Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1 inhibiert die Morphogenese der adult-geborenen GCs im OB.

Analysiert wurden die Gesamtlänge des apikalen Dendriten, die Anzahl der Dendritenäste sowie die Sholl-Analyse der Kontroll-, Kv1.2- oder Kir2.1- überexprimierenden GCs an DPI 28.

(A, B) Die Box-Plots mit Darstellung des Medians zeigen in (A) die Gesamtlänge bzw. in (B) die Anzahl der Äste des apikalen Dendriten der jeweilige Kontroll-, Kv1.2 und Kir2.1- Gruppe auf. (A) Einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) $P < 0.0001$, Post-hoc Tukey-Test: Control vs. Kv1.2: $P^{***} < 0.001$; Control vs. Kir2.1: $P^{***} < 0.001$; Kv1.2 vs. Kir2.1: $P > 0.05$, ns. (B) Einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) $P^{***} = 0.0003$, Post-hoc Tukey-Test: Control vs. Kv1.2: $P^{**} < 0.01$; Control vs. Kir2.1: $P^{***} < 0.001$; Kv1.2 vs. Kir2.1: P ns > 0.05 .

(C, D) Die Sholl-Analyse spiegelt die Komplexität des apikalen Dendriten wider. Es werden die jeweiligen Schnittpunkte des Dendriten in 10 µm Abständen vom Soma gemessen. Dargestellt wird die Kontrollgruppe mit der (C) Kv1.2- bzw. (D) Kir2.1- Gruppe. (C) Zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-way ANOVA) $P < 0.0001$, Post-hoc Tukey-Test: $P < 0,001$ für Schnittpunkte von 120-180µm Entfernung vom Soma (dunkelgraues Gebiet), $P < 0,01$ für Schnittpunkte von 180-200µm Entfernung vom Soma (hellgraues Gebiet). (D) Zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-way ANOVA) $P < 0.0001$, Post-hoc Tukey-Test: $P < 0.001$ für Schnittpunkte von 120-180 µm Entfernung vom Soma (dunkelgraues Gebiet), $P < 0.05$ für Schnittpunkte von 190-200 µm Entfernung vom Soma (hellgraues Gebiet).

(A-D) Kontrollgruppe: $n=7$ Mäuse [177 Zellen], Kv1.2: $n=5$ Mäuse [149 Zellen], Kir2.1: $n=6$ Mäuse [133 Zellen]. Angaben pro Maus. Die Ergebnisse von (C) und (D) werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = nicht signifikant. Die Graphiken wurden in modifizierter Form bereits in (Li et al., 2023) veröffentlicht.

Ergebnisse

Tabelle 10: Signifikante Bereiche in der Sholl-Analyse

Vergleichsgruppen	Entfernung vom Zellkörper	Signifikanzniveau **
Kontrollgruppe zu Kv1.2 Gruppe	120-190 μm	$P < 0.001$
	200 μm	$P < 0.01$
Kontrollgruppe zu Kir2.1 Gruppe	120-180 μm	$P < 0.001$
	190- 200 μm	$P < 0.05$

** (Verwendeter statistischer Test: Zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-way ANOVA), Post-hoc Tukey-Test)

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die endogene Aktivität für die morphologische Entwicklung der adult-geborenen GCs eine wesentliche Rolle spielt. Die Ergebnisse des Abschnittes 3.2.1 wurden bereits publiziert (Li et al., 2023).

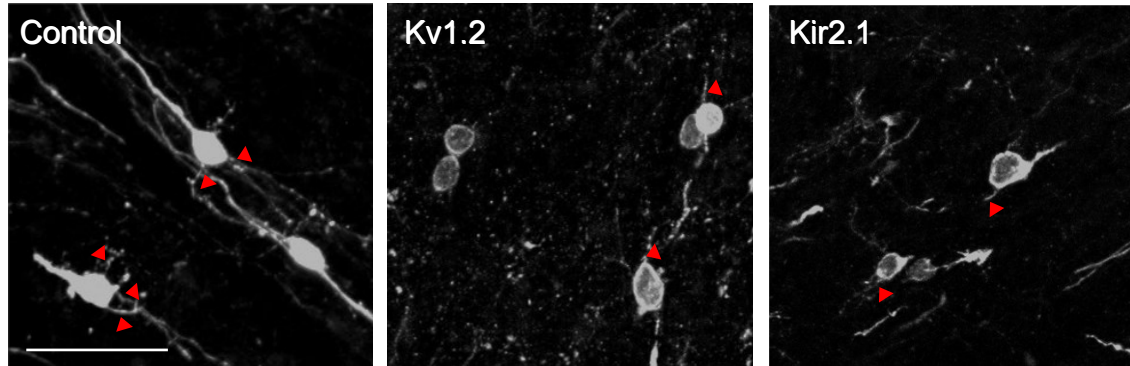
3.2.2 Anzahl der Basaldendriten der adult-geborenen Körnerzellen

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Überexpression von Kv1.2- bzw. Kir2.1 auch eine Einschränkung der Morphogenese im Bereich der Basaldendriten von GCs mit sich bringt. Hierbei wurde die Anzahl der Basaldendriten pro GCs (DPI 28) berechnet. Als Basaldendrit wurde eine Struktur gewertet, welche vom Soma der GCs direkt entsprang, bei welcher es sich nicht um den apikalen Dendriten handelte und welche eine Größe von mindestens 20 Pixeln aufwies (Abbildung 10 A). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich sowohl bei der Kv1.2-Gruppe als auch bei der Kir2.1-Gruppe eine statistisch signifikant verringerte Anzahl an Basaldendriten (Abbildung 10 B; $P < 0.0001$; Einfaktorielle Varianzanalyse). So wiesen Kontroll-GCs im Mittel 2.6 ± 0.19 Basaldendriten auf (Angaben pro Maus), wohingegen GCs der Kv1.2-Gruppe im Mittel nur 1.35 ± 0.14 und in der Kir2.1-Gruppe 1.24 ± 0.15 Basaldendriten pro Zelle aufwiesen.

Ergebnisse

Abschließend konnte festgestellt werden, dass die endogene Aktivität nicht nur die Morphogenese des Apikaldendriten in adult-geborenen GCs beeinflusst, sondern zudem die Entstehung von Basaldendriten reguliert.

A



B

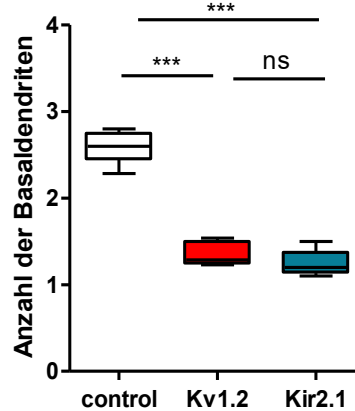


Abbildung 10: Die Anzahl der Basaldendriten pro GCs ist durch die Überexpression von Kv1.2 bzw. Kir2.1 deutlich reduziert.

- (A) MIP von Hirnschnittpräparaten des OB (10 μ m Schichttiefe) mit Darstellung der Zellkörper und Basaldendriten (rote Pfeilspitze) von GCs an DPI 28. Links Kontrollgruppe, mittig Kv1.2-Gruppe, rechts Kir2.1-Gruppe. Maßstabskala 30 μ m.
- (B) Die Box-Plots mit Darstellung des Medians und der Interquartilsabstände zeigen die Gesamtanzahl der erfassten Basaldendriten der Kontroll-, Kv1.2 und Kir2.1- Gruppe von GCs. Einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) $P < 0.0001$, Post-hoc Tukey-Test: Control vs. Kv1.2: $P < 0.05$; Control vs. Kir2.1: $P < 0.05$; Kv1.2 vs. Kir2.1: $P > 0.05$. Control: n=5 Mäuse [54 Zellen], Kv1.2: n=5 Mäuse [69 Zellen], Kir2.1: n=5 Mäuse [56 Zellen].

Die Abbildung B bezieht sich auf die Angabe pro Maus. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = nicht signifikant.

Ergebnisse

3.2.3 Darstellung der Dornfortsätze am distalen Apikaldendriten

Sowohl der Apikaldendrit als auch die Basaldendriten der GCs besitzen Dornfortsätze mit lokalisationspezifischen Synapsen. Während sich an den Basaldendriten und am unverzweigten Bereich des Apikaldendriten primär glutamaterge Eingangssynapsen befinden, besitzen die verzweigten Segmente des Apikaldendriten dendro-dendritische Synapsen, die sowohl eine Output- als auch eine Inputfunktion vorweisen (Kelsch et al., 2009; Mori, 1987). Aufgrund der funktionellen Relevanz der dendro-dendritischen Synapsen wurde in dieser Arbeit primär der Einfluss der Kv1.2- bzw. Kir2.1-Überexpression auf die Dornfortsätze im distalen Segment des Apikaldendriten untersucht.

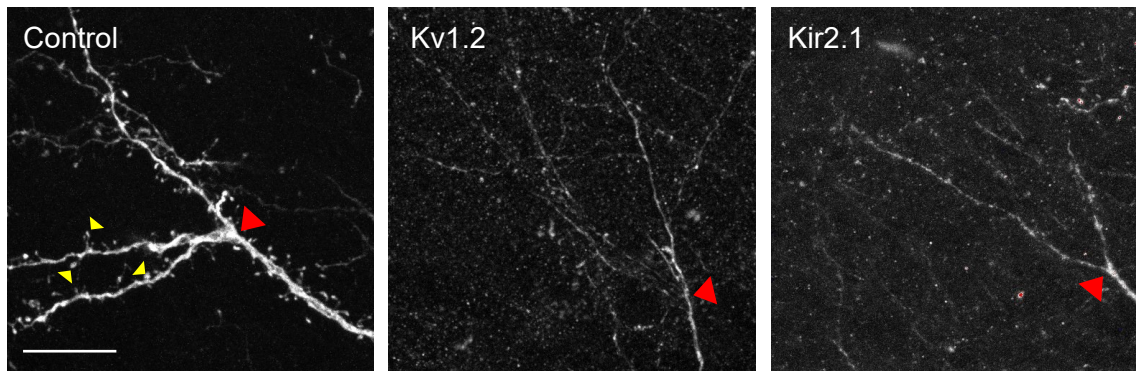


Abbildung 11: Eingeschränkte Darstellbarkeit der Dornfortsätze im Bereich des apikalen Dendriten von GCs in der Kv1.2- und Kir2.1- Gruppe.

MIP von Hirnschnittpräparaten des OB (25 μm Schichttiefe) mit Darstellung des apikalen Dendriten von GCs (DPI 28) im Bereich der ersten Aufzweigung (rote Pfeilspitzen markieren die erste Verzweigungsstelle). Links zu sehen die Kontrollgruppe mit suffizienter Darstellung der dendritischen Dornfortsätze (gelbe Pfeilspitzen). In der Mitte Kv1.2- und rechts Kir2.1-überexprimierende GCs mit unzureichender visueller Darstellbarkeit der Dornfortsätze. Die Gewebsschnitte wurden mit Anti-GFP-Antikörpern markiert. Maßstabsskala 20 μm .

Eine suffiziente Darstellung der Dornfortsätze an der ersten Verzweigungsstelle gelang in der Kontrollgruppe unter deutlicher Vergrößerung von immunhistochemisch verstärkten Präparaten (Abbildung 11, Bild links. Gelbe Pfeile markieren die Dornfortsätze). Im Gegensatz hierzu zeigten sowohl die Kv1.2- als auch die Kir2.1-Gruppe deutlich signalabgeschwächte Dendriten auf. Überraschenderweise ließen sich in diesen beiden Gruppen keine eindeutig

Ergebnisse

sichtbaren Dornfortsätze im verzweigten Bereich des Apikaldendriten darstellen (siehe Abbildung 11, Bild mittig Kv1.2-Gruppe und Bild rechts Kir2.1 Gruppe).

Ob die Dornfortsätze in der Kv1.2- bzw. Kir2.1-Gruppe lediglich visuell schlechter dargestellt wurden oder ob die Herunterregulierung der endogenen Aktivität tatsächlich die Entstehung von distalen Dornfortsätzen verhinderte, ist abschließend nicht sicher zu klären. Um die Visualisierung der Dornfortsätze weiter zu verbessern, wurden Veränderungen im Färbungsprotokoll durchgeführt, wie die Verwendung höherer Antikörper-Konzentrationen oder den Wechsel des Fluoreszenzfarbstoffs. Auch wurde das Laseraufnahmeprotokoll modifiziert durch Variationen in der Laserstärke und am Photomultiplier. Trotz dieser Modifikationen gelang die Darstellung der Dornfortsätze in der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe nicht. Aufgrund der begrenzten Möglichkeit zur Visualisierung der Dornfortsätze, konnten weiterführende Experimente zur Untersuchung der prä- und postsynaptischen Regionen unter Verwendung von Antikörpern gegen PSD95 (postsynaptisch) und SYP (präsynaptisch) nicht durchgeführt werden.

3.2.4 Eingeschränkte Beurteilbarkeit bei reduzierter Signalintensität

Im Hinblick auf die eingeschränkte Visualisierbarkeit der Dornfortsätze stellte sich folglich die Frage, ob die morphologischen Strukturen der GCs in den Kv1.2- und Kir2.1- Gruppen möglicherweise nicht nur allein aufgrund der Kv1.2- oder Kir2.1-Überexpression beeinträchtigt waren, sondern ob eine reduzierte Signalhelligkeit der Zellen ebenfalls eine Rolle spielen könnte.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde die Signalhelligkeit der GCs im Bereich des Zellkörpers in der Kontrollgruppe und in der Kv1.2-Gruppe ermittelt (Abbildung 12 A). Die zu vergleichenden Hirnschnittpräparate wurden unter dem gleichen Protokoll immunhistochemisch gefärbt und die z-Stacks am 2-Photonen-Lasermikroskop unter identischen Bildaufnahmeeinstellungen erstellt. Gemessen wurde jeweils die relative Signalhelligkeit der Somata von Kontroll- und Kv1.2-GCs zum Hintergrundsignal. In der Kontrollgruppe mit 364 Zellen aus 3 Mäusen konnte eine relative Signalhelligkeit im Mittel von 4.65 ± 0.15 (Angaben pro Zelle) festgestellt werden, wohingegen die relative Signalhelligkeit in der

Ergebnisse

Kv1.2-Gruppe mit 398 Zellen aus 5 Mäusen im Mittel lediglich 1.89 ± 0.03 betrug. Dieser Unterschied ist als statistisch signifikant zu werten (Abbildung 12 B, $P < 0.0001$, Mann Whitney Test). Messungen an Kir2.1- überexprimierenden Zellen wurden hierbei nicht durchgeführt.

Zusammenfassend ließ sich eine signifikante Reduktion der Signalhelligkeit im Bereich des Somas in der Kv1.2- überexprimierenden Gruppe feststellen.

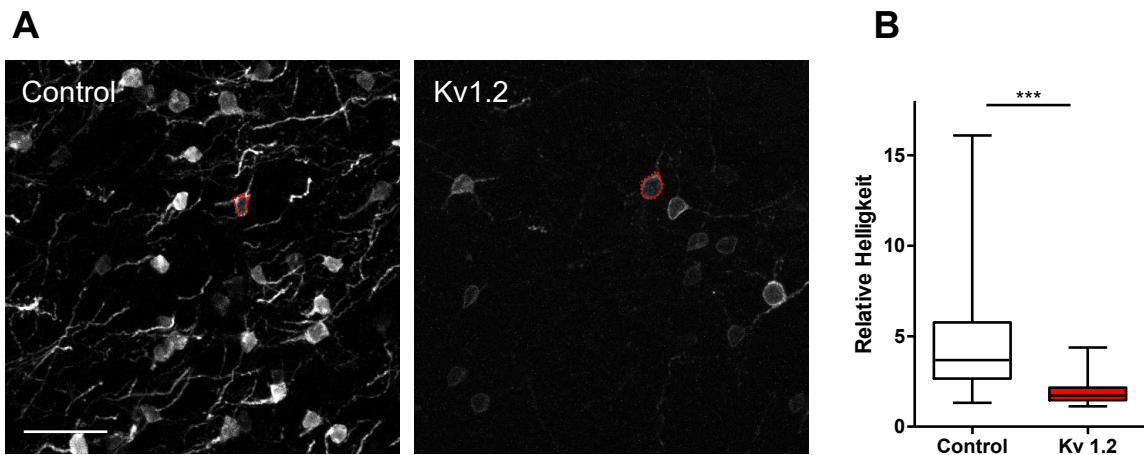


Abbildung 12: Vergleich der Signalhelligkeit im Bereich der Somata von Kontroll-GCs und Kv1.2-überexprimierenden GCs an DPI 28

(A) MIP (20µm Schichttiefe) aus dem OB. Die Hirnschnittpräparate wurden zur Verstärkung des Twitch-2B-Signales immunhistochemisch mit Anti-GFP-Antikörpern und einem sekundären farbstofftragenden Antikörper gefärbt. Die rote Markierung umkreist exemplarisch die untersuchte Region im Bereich des Zellkörpers von GCs. Zur Analyse wurden nicht MIP, sondern Einzelschnittbilder verwendet. Maßstabsskala 30 µm.

(B) Die Boxplots mit Darstellung des Medians vergleichen die relative Signalhelligkeit des Zellkörpers zum Hintergrundsignal. Verglichen wurden die Kv1.2-Gruppe mit der Kontrollgruppe. Graphisch dargestellt wird die Angabe pro Zelle. Die Kv1.2-GCs zeigten eine signifikant verringerte relative Helligkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Control: n=3 Mäuse [364 Zellen], Kv1.2: n=5 Mäuse [398 Zellen]. Mann Whitney Test: $P^{***} < 0.0001$.

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = nicht signifikant.

3.3 Abschätzung des Entwicklungsgrades der adult-geborenen Körnerzellen durch den Nachweis von NeuN oder DCX

Zur Bestimmung des Entwicklungsgrades der adult-geborenen GCs erfolgte immunhistochemisch der Nachweis spezifischer Proteine, die hauptsächlich zu gewissen Zeitpunkten in der Reifungsphase exprimiert werden. In den folgenden Experimenten diente der neuronale Marker (NeuN) als Nachweis für ausgereifte GCs (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015; von Bohlen Und Halbach, 2007), wohingegen Doublecortin (DCX) als Marker für GCs verwendet wurde, die sich in einem früheren Entwicklungszustand befinden (Brown et al., 2003).

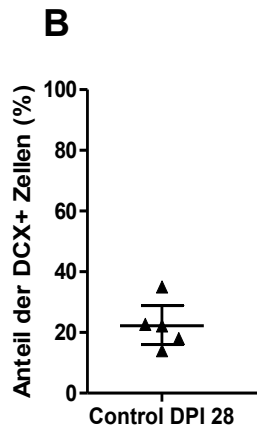
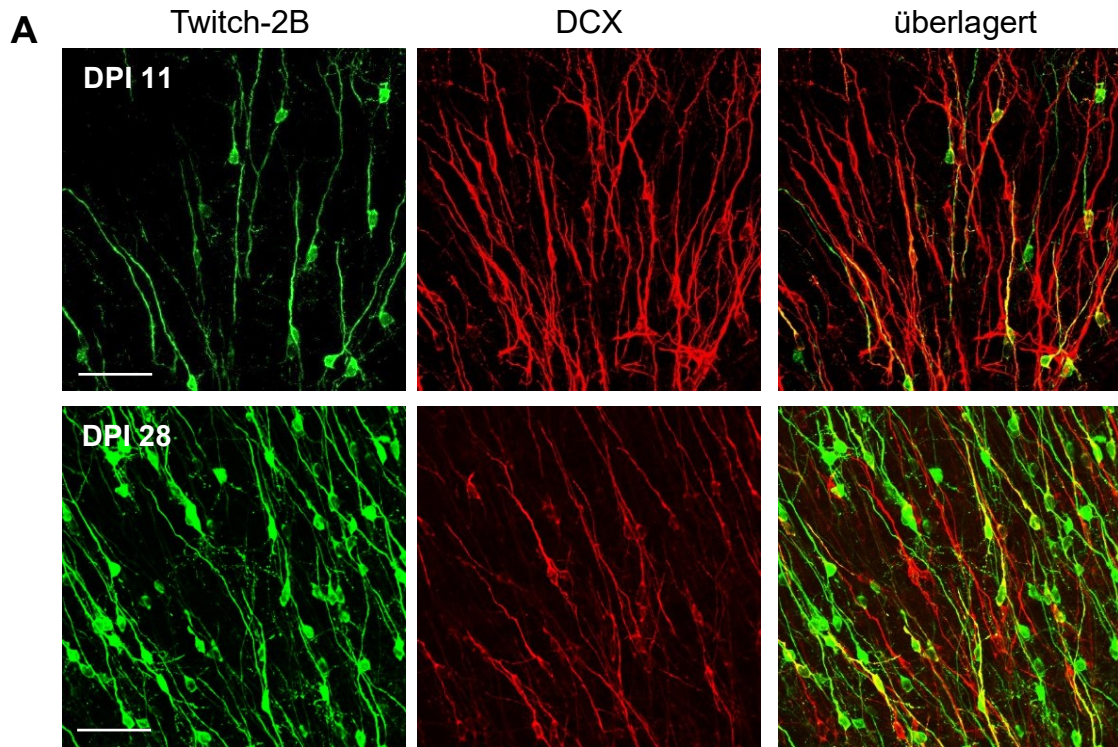
Zunächst wurde ermittelt, ob die verwendete Methode Ergebnisse für Kontroll-GCs an DPI 11 und DPI 28 hervorbringt, die mit Werten der Literatur übereinstimmen. Anschließend wurde der Entwicklungsgrad von GCs aus der Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe an DPI 28 durch Nachweis von NeuN bzw. DCX bestimmt. Im letzten Schritt wurde zudem der Effekt einer herabgesetzten endogenen Aktivität auf den Reifungsgrad von juxtaglomerulären Neuronen (JGNs) an DPI 28 untersucht.

3.3.1 Abnahme der DCX-Expression mit zunehmendem Zellalter

Zu Beginn erfolgte der Vergleich der Expression von DCX in Kontroll-GCs an DPI 11 mit DPI 28. In der Kontrollgruppe ließ sich in 34 von 52 Zellen (65.38 %) DCX an DPI 11 nachweisen (Abbildung 13). Bei der Auswertung der Kontroll-GCs an DPI 28 zeigte sich erwartungsgemäß ein rasanter Abfall des Anteils an DCX-positiven Zellen auf $22.38 \pm 3.53\%$ in den erhobenen Daten.

Hieraus abzuleiten ist, dass innerhalb des Zeitraumes von 17 Tagen (DPI 11 auf DPI 28) eine deutliche Heranreifung der Zellen stattfindet, die mit einer sichtlichen Reduktion der Expression von DCX einhergeht.

Ergebnisse



C

Anteil DCX+ GCs (Mittelwert)	
DPI 11	DPI 28
65.38 %	22.38 %

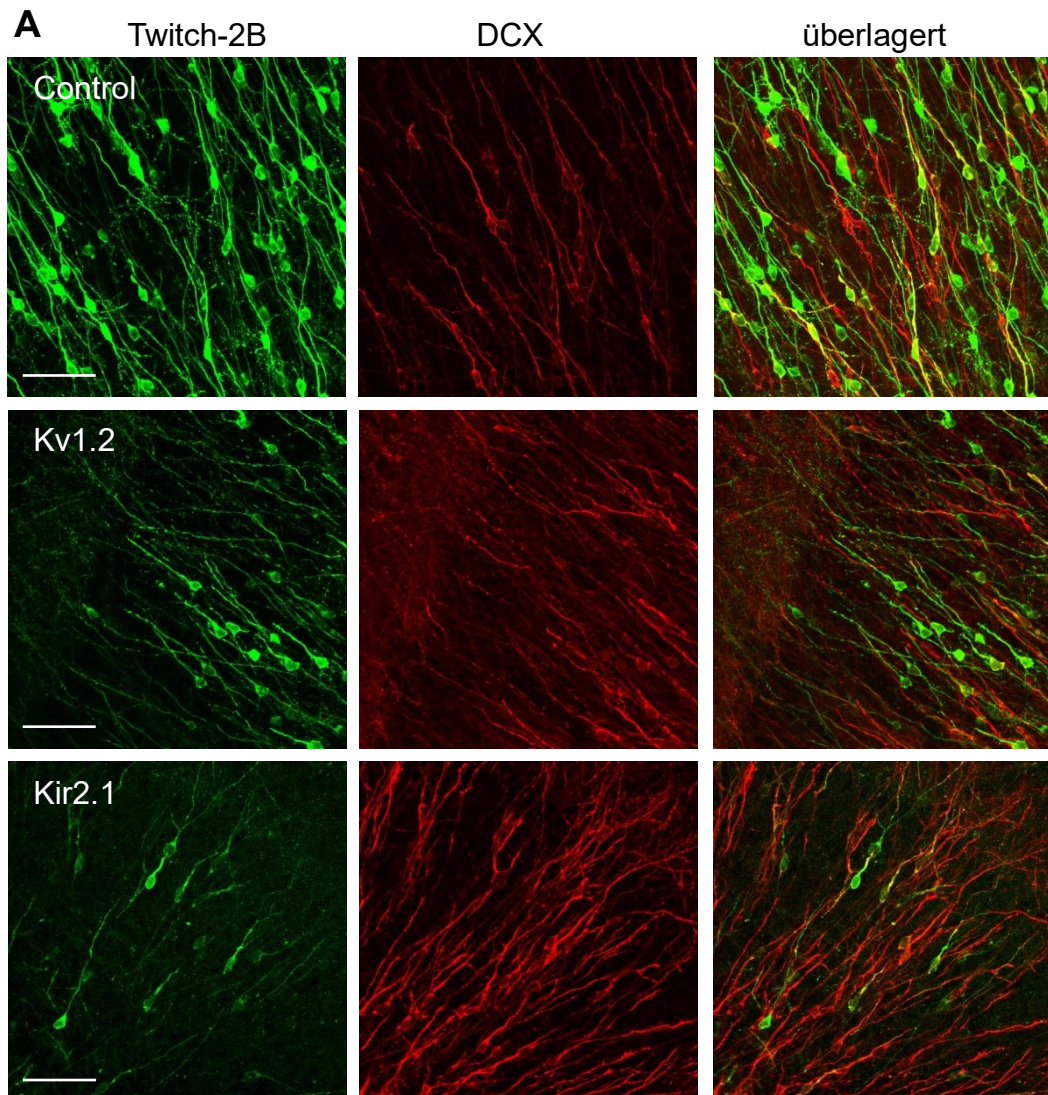
Abbildung 13: Der Anteil an DCX-positiven GCs (DCX+) sinkt drastisch mit zunehmendem Zellalter

- (A) MIP (20 μ m Schichttiefe) aus dem OB. Linke Spalte sowohl GCs an DPI 11 (obere Reihe) bzw. an DPI 28 (untere Reihe) aus der Kontrollgruppe. Mittlere Spalte Antikörperfärbung gegen (DCX), rechte Spalte Zusammenführung. Maßstabsskala 50 μ m.
- (B) Scattered Dot Plot mit Darstellung des Medians zur Gegenüberstellung des Prozentanteils der DCX markierten GCs an DPI 11 im Vergleich zu DPI 28. Mit zunehmendem Alter der Zellen zeigt sich eine deutliche Abnahme der Expression von DCX in den GCs.
- (C) Tabellarische Darstellung des prozentuellen Anteils DCX-markierter Zellen bei GCs an DPI 11 und DPI 28. Angaben als Mittelwert ohne SEM.
- (B-C) Control DPI 11: n=1 Mäuse [52 Zellen], Control DPI 28: n=5 Mäuse [329 Zellen].

Ergebnisse

3.3.2 Einfluss der Kv1.2- bzw. Kir2.1-Überexpression auf den Reifungsgrad von adult-geborenen GCs

Um die Auswirkungen einer herabgesetzten endogenen Aktivität auf den Entwicklungsgrad der Zellen zu untersuchen, wurden zunächst der Anteil DCX-positiver GCs an DPI 28 ermittelt (Abbildung 14 A). Die Kontrollgruppe zeigte, wie in Abschnitt 3.3.1 bereits beschrieben, einen mittleren Anteil von $22.38\% \pm 3.53\%$ an DCX-positiven Zellen (Angaben pro Maus). Auch die Kv1.2 bzw. Kir2.1-überexprimierenden Gruppen wiesen einen Anteil von $28.96\% \pm 4.64\%$ bzw. von $24.18\% \pm 6.49\%$ DCX-positiver GCs auf und zeigten somit keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abbildung 15 A).



Ergebnisse

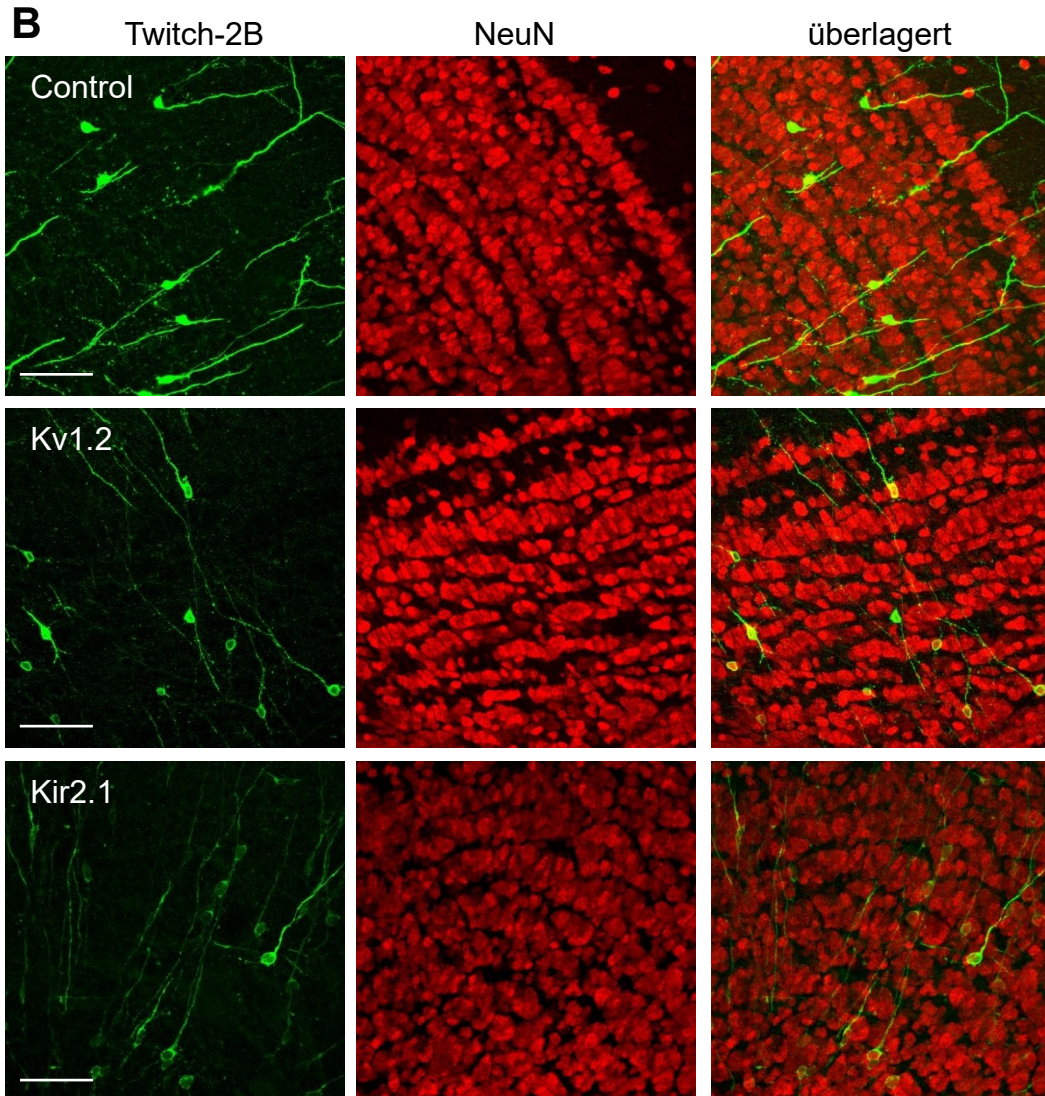


Abbildung 14: Nachweis der Entwicklungsmarker DCX und NeuN zur Abschätzung des Reifungsgrades von adult-geborenen GCs an DPI 28

Die Twitch-2B markierten GCs der Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe an DPI 28 wurden zusätzlich mit Antikörpern gegen NeuN oder gegen DCX markiert. Das Vorhandensein von NeuN suggeriert einen fortgeschrittenen Reifungszustand, wohingegen das Vorhandensein von DCX auf das Befinden in einer früheren Entwicklungsphase deutet.

(A) MIP (20 μm Schichttiefe) aus dem OB mit Darstellung der GCs und Antikörperfärbung gegen DCX. Linke Spalte GCs (Twitch-2B), mittlere Spalte DCX markierte Zellen, rechte Spalte Zusammenführung. In der oberen, mittleren und unteren Reihe werden jeweils die Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe dargestellt.

(B) MIP (20 μm Schichttiefe) aus dem OB mit Darstellung der GCs und Antikörperfärbung gegen NeuN. Linke Spalte GCs (Twitch-2B), mittlere Spalte NeuN markierte Zellen, rechte Spalte Zusammenführung. In der oberen, mittleren und unteren Reihe werden jeweils die Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe dargestellt.

(A, B) Maßstabsskala 50 μm .

Ergebnisse

Korrespondierend wurde die Expression von NeuN in GCs an DPI 28 untersucht (Abbildung 14 B). Der mittlere Anteil an NeuN-positiven Zellen betrug $81.37\% \pm 2.061\%$ in der Kontrollgruppe, $81.56\% \pm 2.59\%$ in der Kv1.2-Gruppe und $78.14\% \pm 6.05\%$ in der Kir2.1-Gruppe (Angaben pro Maus). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 15 B).

Zusammenfassend konnte in allen drei GCs-Gruppen an DPI 28 kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Entwicklungsmarker DCX und NeuN nachgewiesen werden.

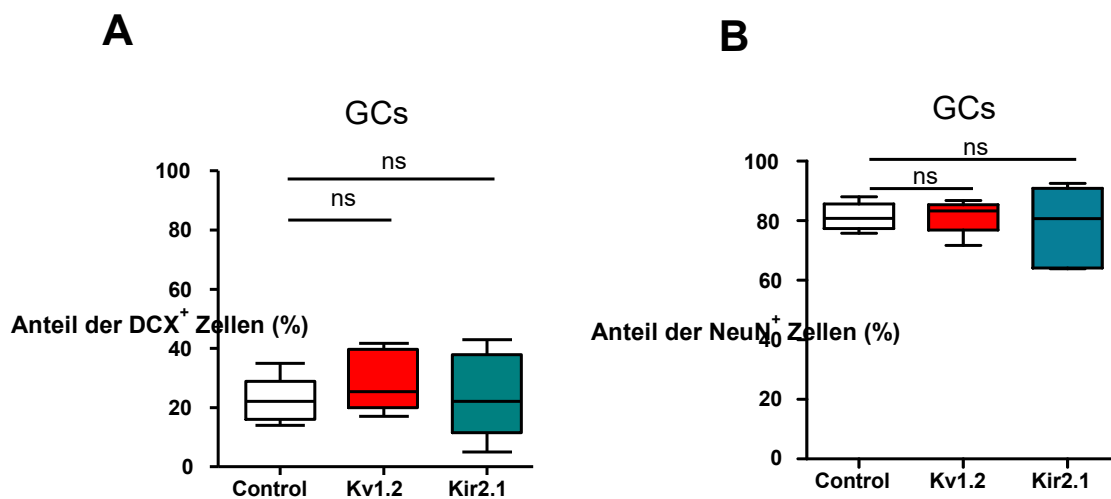


Abbildung 15: Der Reifungsgrad der adult-geborenen GCs an DPI 28 wird durch eine Kv1.2- oder Kir2.1- Überexpression nicht relevant beeinflusst.

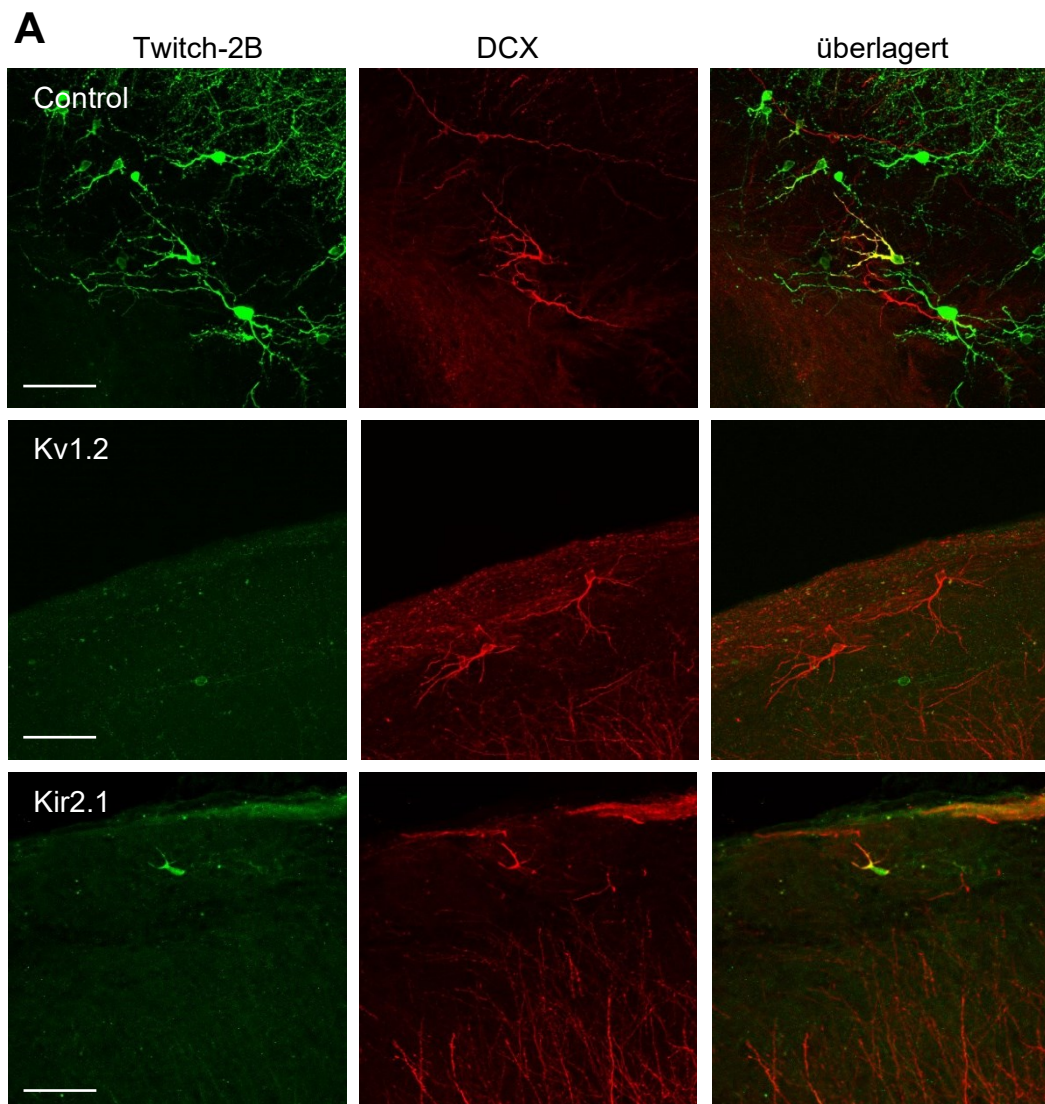
- (A) Die Box-Plots mit Darstellung des Medians und der IQR zeigen den prozentualen Anteil der DCX-positiven GCs für die jeweiligen drei Gruppen. Es zeigte sich zwischen der Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe kein signifikanter Unterschied in der DCX-Expression. Einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) $p = 0.5227$. Kontrollgruppe: $n = 5$ Mäuse [347 Zellen], Kv1.2: $n = 5$ Mäuse [350 Zellen], Kir2.1: $n = 5$ Mäuse [362 Zellen].
- (B) Die Box-Plots mit Darstellung des Medians und der IQR zeigen den prozentualen Anteil der NeuN-positiven GCs für die jeweiligen drei Gruppen. Auch die NeuN-Expression der GCs zeigte sich durch die Überexpression von Kv1.2- oder Kir2.1-Kanälen nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe. Einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) $P = 0.9115$. Kontrollgruppe: $n = 5$ Mäuse [329 Zellen], Kv1.2: $n = 5$ Mäuse [328 Zellen], Kir2.1: $n = 5$ Mäuse [367 Zellen].

Die Abbildungen (A) und (B) beziehen sich auf die Angaben pro Maus. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = nicht signifikant.

Ergebnisse

3.3.3 Vergleich zu adult-geborenen JGNs und dem Einfluss der Kv1.2- bzw. Kir2.1-Überexpression auf den Reifungsgrad

Zudem wurde untersucht, ob sich die Entwicklungsmarker DCX und NeuN trotz Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1 auch in anderen Zelltypen gleichermaßen unbeeinflusst zeigen. Daher wurde die Bestimmung des Entwicklungsgrades ebenfalls an adult-geborenen juxtaglomerulären Zellen (JGNs) an DPI 28 im OB durchgeführt (Abbildung 16). Bei den JGNs handelt sich um adult-geborenen Interneuronen, die sich in der Glomerularzellschicht befinden. Die JGNs wurden ebenfalls in eine Kontrollgruppe, Kv1.2- und Kir2.1- Gruppen unterteilt.



Ergebnisse

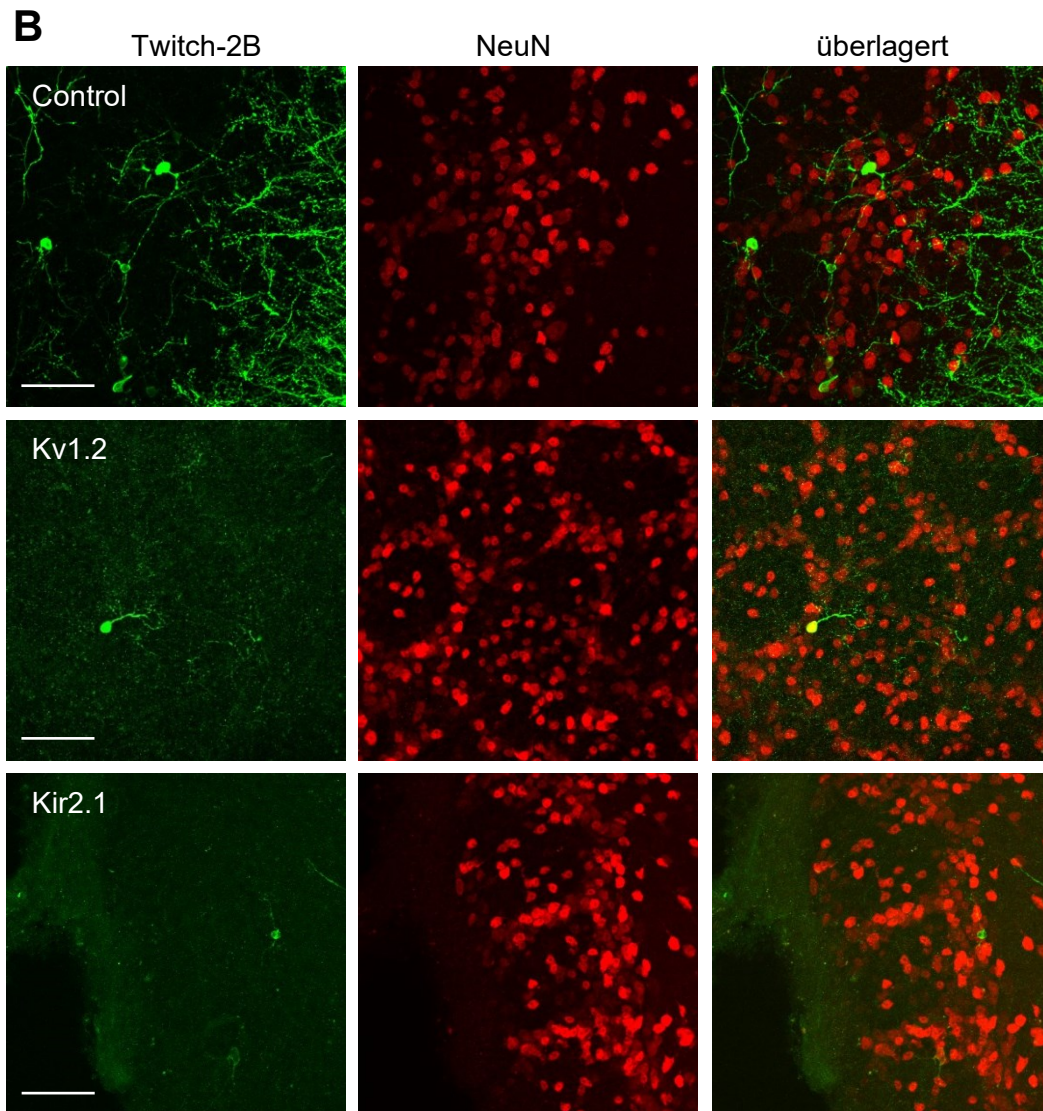


Abbildung 16: Nachweis der Entwicklungsmarker in JGNs an DPI 28

Korrespondierend zu den Untersuchungen der Entwicklungsmarker bei GCs wurden die immunhistochemische Färbung gegen DCX und NeuN auch an JGNs durchgeführt

- (A) MIP (20 μm Schichttiefe) aus dem OB mit Darstellung der JGNs und Antikörperfärbung gegen DCX. Linke Spalte JGNs (Twitch-2B), mittlere Spalte DCX markierte Zellen, rechte Spalte Zusammenführung. In der oberen, mittleren und unteren Reihe werden jeweils die Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe dargestellt.
- (B) MIP (20 μm Schichttiefe) aus dem OB mit Darstellung der JGNs und Antikörperfärbung gegen NeuN. Linke Spalte JGNs (Twitch-2B), mittlere Spalte NeuN markierte Zellen, rechte Spalte Zusammenführung. In der oberen, mittleren und unteren Reihe werden jeweils die Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe dargestellt.

(A, B) Maßstabsskala 50 μm .

Die vorliegende Abbildung wurde in modifizierter Form bereits in (Li et al., 2023) veröffentlicht.

Ergebnisse

In der Kontrollgruppe der JGNs an DPI 28 zeigten sich im Mittel $22.32\% \pm 3.25\%$ der Zellen DCX-positiv (Angaben pro Maus), in der Kv1.2-Gruppe lag der Anteil im Mittel bei $26.40\% \pm 3.25\%$ und in der Kir2.1-Gruppe bei $19.58\% \pm 4.85\%$. Somit zeigte sich bei den JGNs ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der DCX-Expression zwischen den drei Gruppen (Abbildung 17 A).

In der Auswertung von NeuN zeigte sich bei JGNs der Kontrollgruppe an DPI 28 ein Anteil von im Mittel $72.11\% \pm 2.64\%$ NeuN-positiven Zellen (Angaben pro Maus). Auch bei den Kv1.2 bzw. Kir2.1 überexprimierenden JGNs wurde ein Anteil von $67.5\% \pm 3.47\%$ bzw. von $73.04\% \pm 3.0\%$ NeuN-positiven Zellen ermittelt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abbildung 17 B).

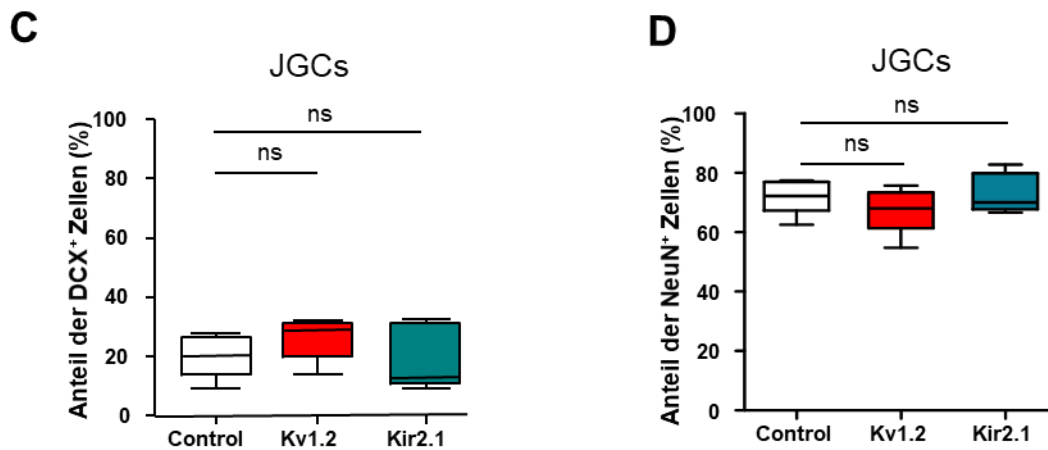


Abbildung 17: Der Reifungsgrad von JGNS an DPI 28 zeigte sich durch die Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1 vergleichbar unbeeinflusst.

- (A) Die Box-Plots mit Darstellung des Medians und der Interquartilsabstände zeigen den prozentuellen Anteil der DCX positiven JGNs für die jeweiligen drei Gruppen. Einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) $P = 0.3256$. Kontrollgruppe: $n=5$ Mäuse [170 Zellen], Kv1.2: $n=5$ Mäuse [171 Zellen], Kir2.1: $n=5$ Mäuse [180 Zellen].
- (B) Die Box-Plots mit Darstellung des Medians und der Interquartilsabstände zeigen den prozentuellen Anteil der NeuN positiven JGNS für die jeweiligen drei Gruppen. Einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) $P = 0.3939$. Kontrollgruppe: $n=5$ Mäuse [165 Zellen], Kv1.2: $n=5$ Mäuse [155 Zellen], Kir2.1: $n=5$ Mäuse [159 Zellen].

Die Abbildungen (C) und (D) beziehen sich auf die Angaben pro Maus Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = nicht signifikant.

Diese Abbildung wurde bereits in (Li et al., 2023) veröffentlicht und wird hier modifiziert dargestellt.

Ergebnisse

Der Anteil DCX-positiver Zellen ist in GCs und JGNs an DPI 28 annähernd vergleichbar. Auffallend ist jedoch, dass bei JGNs der Anteil NeuN-positiver Zellen geringer ist als bei GCs. Dies deutet darauf hin, dass weniger JGNs an DPI 28 in einem ausgereiften Zustand sind als GCs zum gleichen Zeitpunkt.

Zusammenfassend zeigt die Analyse der Entwicklungsmarker DCX und NeuN bei den GCs und JGNs an DPI 28 überraschenderweise keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kv1.2-Gruppe, Kir2.1-Gruppe und Kontrollgruppe. Daher deuten diese Daten darauf hin, dass die Überexpression von Kv1.2- oder Kir2.1-Kanälen, trotz der hemmenden Wirkung auf die Morphogenese, keinen höhergradig einschränkenden Effekt auf den Reifungsstand der adult-geborenen Neurone mit sich bringt. Die Daten zur Rolle der endogenen Aktivität auf die Expression von Entwicklungsmarkern (NeuN und DCX) wurden bereits publiziert (Li et al., 2023).

3.4 Untersuchung des CREB-Signalweges in adult-geborenen GCs

In ersten Untersuchungen an adult-geborenen JGNs konnten bereits Anhaltspunkte eruiert werden, dass eine Veränderung der endogenen Aktivität durch Kv1.2- oder Kir2.1-Überexpression mit einer Herunterregulierung der pCREB-Expression einhergeht (Li et al., 2023). Ob in adult-geborenen Kv1.2- bzw. Kir2.1- überexprimierenden GCs auch eine Herunterregulierung des CREB-Signalwegs vorzufinden ist, wurde bisher noch nicht bestätigt. Im folgenden Abschnitt wurde daher untersucht, ob durch die Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1 in adult-geborenen GCs pCREB herunterreguliert wird. Dies wurde für den Zeitpunkt DPI 10 in der frühen Entwicklungsphase sowie an DPI 28 untersucht.

Ergebnisse

3.4.1 pCREB-Anteil im Vergleich zu pCREB-positiven Zellen in der Umgebung

Zunächst wurde das Verhältnis der pCREB-Expression von adult-geborenen Twitch-2B-markierten GCs zu den pCREB-positiven GCs in ihrer unmittelbaren Umgebung bestimmt. Für die folgende Versuchsreihe wurde das pCREB-Signal der Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe (DPI 28) gemessen und in Relation zum mittleren pCREB-Signal der umliegenden pCREB-positiven Zellen gestellt (Abbildung 19). Das relative pCREB-Level der Kontrollzellen lag im Mittel bei 1.32 ± 0.14 (Angaben pro Maus). Sowohl die Kv1.2- als auch die Kir2.1-überexprimierenden GCs an DPI 28 wiesen ein ähnlich hohes relatives Expressionsniveau von pCREB mit Werten von 1.08 ± 0.13 und 1.39 ± 0.06 auf. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden. Die Daten sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

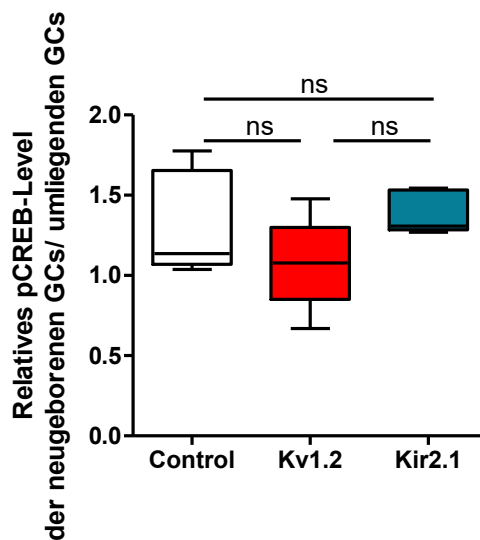


Abbildung 18: Relative pCREB-Expression in der Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1- Gruppe an DPI 28 in Relation zu pCREB+ GCs der Umgebung

Die Boxplots stellen als Median pro Maus die relative pCREB-Expression der GCs aus der jeweiligen Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe an DPI 28 im Vergleich zur mittleren pCREB-Expression aller pCREB-positiven GCs im gleichen Sichtfeld dar. Es zeigte sich eine vergleichbare relative pCREB-Expression in allen drei Gruppen. Einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) $P = 0.1142$, ns. (Kontrollgruppe: $n=5$ Mäuse [56 Zellen], Kv1.2: $n=5$ Mäuse [53 Zellen], Kir2.1: $n=5$ Mäuse [52 Zellen]). Die Abbildung bezieht sich auf die Angabe pro Maus. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = nicht signifikant.

Ergebnisse

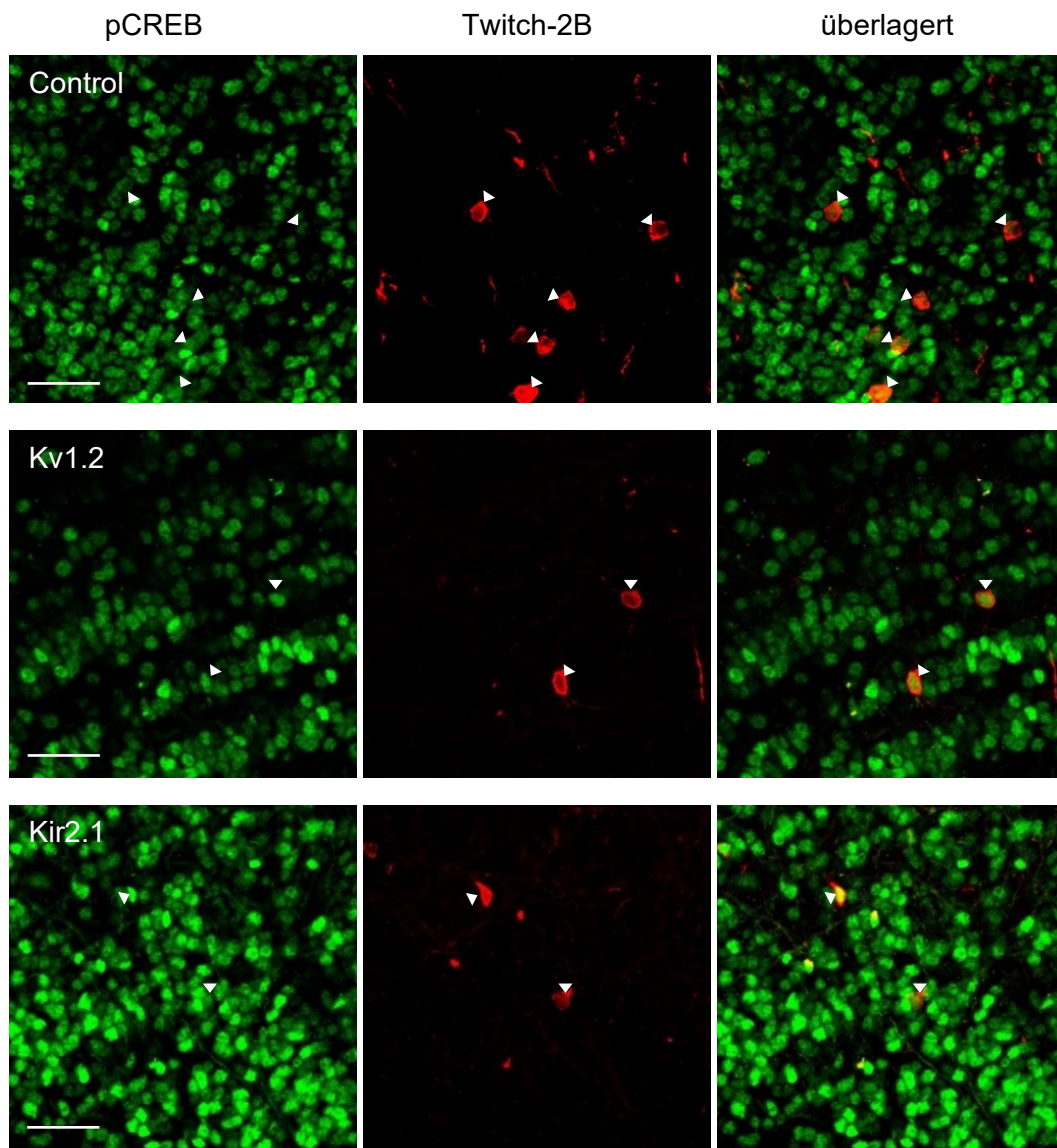


Abbildung 19: pCREB-Expression in GCs an DPI 28 gemäß Doppelfärbung

Darstellung der Doppelfärbung mit pCREB und Twitch-2B (Anti-GFP) zum Vergleich der relativen pCREB-Expression von GCs an DPI 28 aus der Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe zu allen pCREB-positiven GCs der Umgebung.

MIP (5 μm Schichttiefe) mit Darstellung der Körnerzellschicht im OB. Links pCREB-Signal (grün), mittlere Spalte Twitch-2B-markierte GCs (rot) der Kontrollgruppe (obere Reihe), Kv1.2-Gruppe (mittlere Reihe) und Kir2.1-Gruppe (untere Reihe). Rechts Zusammenführung des pCREB- und Twitch-2B-Fensters. Das Vorhandensein eines gelben Signales in den überlagerten Aufnahmen rechts deutet auf die gleichzeitige Expression von pCREB in Twitch-2B-markierten Zellen hin. Die weißen Pfeile markieren die Position der Twitch-2B-markierten Zellen. Maßstabskala 30 μm .

Ergebnisse

3.4.2 Anteil der ausgereiften (NeuN-positiven) GCs mit pCREB-Koexpression

Im nächsten Schritt sollte anstatt von pCREB-positiven GCs aus der unmittelbaren Umgebung eine andere Vergleichsgruppe getestet werden, die eher der regulären pCREB-Expression von ausgereiften GCs entspricht. Daher wurde untersucht, wie sich das pCREB-Niveau der jeweiligen Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1- Gruppe im Verhältnis zu den NeuN-positiven GCs im gleichen Sichtfeld verhält.

Zum besseren Verständnis wurde zunächst veranschaulicht, welcher Anteil der ausgereiften NeuN-positiven GCs simultan eine Koexpression von pCREB aufwies. Im Folgenden wurde von einer Koexpression von pCREB gesprochen bzw. eine Zelle als pCREB-positiv bezeichnet, wenn das pCREB-Signal mehr als doppelt so hoch lag wie das Hintergrundsignal. Hierbei konnte festgestellt werden, dass in 5 Einzelschichtaufnahmen aus einer Maus im Mittel $35.22\% \pm 7.1\%$ der NeuN-positiven GCs eine pCREB-Koexpression nachwiesen. Absolut gesehen wurden von insgesamt 403 NeuN-positiven Zellen aus 5 Bildaufnahmen 151 Zellen als pCREB-positiv gewertet.

Werte aus der Literatur besagen ebenfalls eine niedrige Koexpression von pCREB und NeuN in GCs, die sich in der Körnerzellschicht des OB befinden (für genauere Vergleiche zur Literatur siehe Kapitel 4.7).

Die vorliegenden Daten sowie deuten darauf hin, dass ein geringerer Anteil der NeuN-positiven GCs eine relevante pCREB-Koexpression aufweist.

Ergebnisse

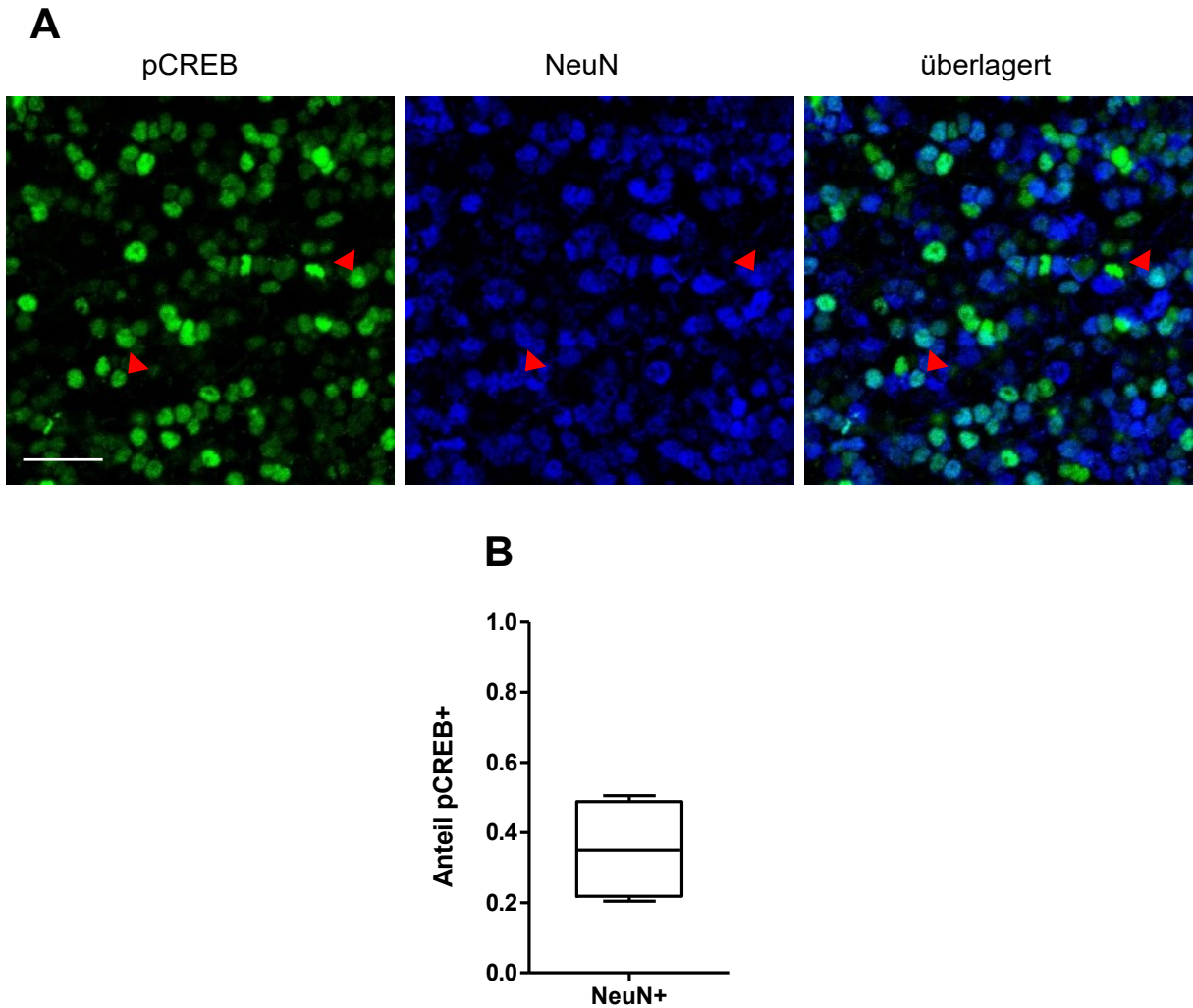


Abbildung 19: Anteil der NeuN-positiven GCs mit Koexpression von pCREB

- (A) MIP (5 μm Schichttiefe) der Körnerzellschicht des OB mit immunhistochemischer Doppelfärbung zur Darstellung von pCREB und NeuN in GCs. Links pCREB-Signal (grün), Mitte NeuN-Signal (blau), rechts Zusammenführung beider Fenster. Die roten Pfeilspitzen markieren exemplarisch zwei NeuN-markierte GCs, welche pCREB koexprimieren (Zellen wurden als pCREB+ gewertet, wenn das pCREB-Signal > 2-mal dem Hintergrundsignal entsprach). Maßstabskala 30 μm .
- (B) Der Boxplot mit Darstellung des Medians zeigt den Anteil NeuN-markierter Zellen an, welche gleichzeitig pCREB-positiv sind. Die Gesamtzahl der analysierten (NeuN-positiven) Zellen entspricht $n = 403$, hiervon waren 151 pCREB+. Graphisch dargestellt wurde der relative Anteil NeuN-markierter GCs mit pCREB Koexpression pro analysierter Bildaufnahme [$n = 5$ Bildaufnahmen] aus einer Maus. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben.

3.4.3 Relative pCREB-Expression von Kv1.2- und Kir2.1 überexprimierender GCs an DPI 28 im Vergleich zu ausgereiften GCs

Das pCREB-Level der drei Versuchsgruppen (Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe) wurde erneut ermittelt und in Relation zum pCREB-Level-Mittelwert der ausgereiften NeuN-positiven GCs gesetzt. Da, wie in 3.4.2 bereits festgestellt, nur ein geringer Teil der reifen GCs über eine höhere pCREB-Expression verfügt, entstand hierdurch eine Vergleichsgruppe mit einer deutlich geringeren durchschnittlichen pCREB-Expression.

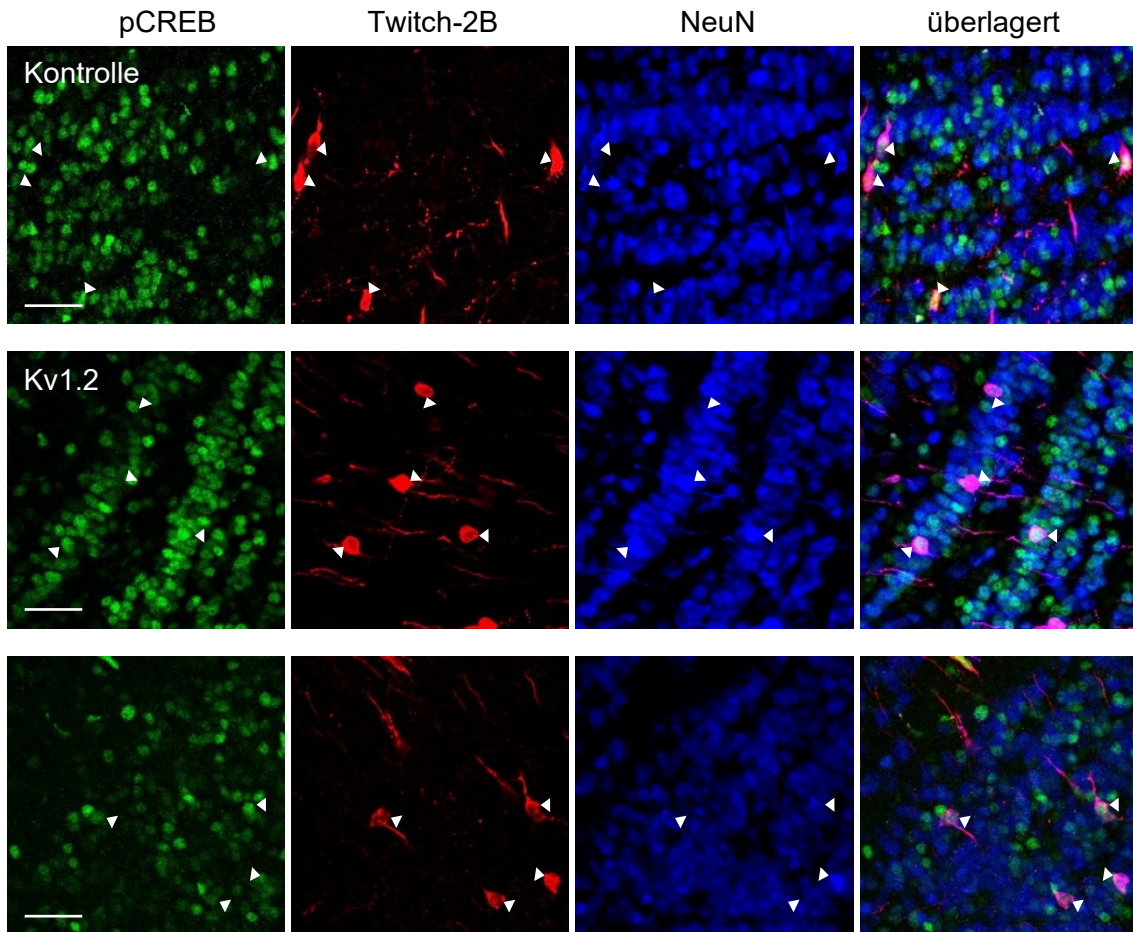
Die drei Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppen der GCs wurden zunächst für den relativ spät angesetzten Zeitpunkt DPI 28 untersucht, an welchem sich der Großteil der GCs bereits in einem ausgereiften Entwicklungszustand befinden sollte (NeuN-Expression vorwiegend vorhanden, siehe Ergebnisse Abschnitt 3.2.2). Es bestand die Bedingung, dass die adult-geborenen GCs an DPI 28 allgemein eine niedrigere pCREB-Expression aufweisen sollten als GCs an einem früheren Untersuchungszeitpunkt wie an DPI 10.

In der Kontrollgruppe der GCs an DPI 28 bestand in dieser Arbeit eine relative pCREB-Expression von 3.21 ± 0.47 . In der Kv1.2-Gruppe zeigte sich eine leicht herabgesetzte pCREB-Expression mit 2.52 ± 0.26 und in der Kir2.1-Gruppe bestand eine zur Kontrollgruppe vergleichbare relative pCREB-Expression mit 3.42 ± 0.93 (Abbildung 20). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 20, Kruskal-Wallis-Test, $P = 0.5655$).

Zusammenfassend konnte in GCs an DPI 28 weder in der Kv1.2-Gruppe noch in der Kir2.1-Gruppe eine eindeutig detektierbare Herunterregulierung von phosphoryliertem CREB nachgewiesen werden.

Ergebnisse

A



B

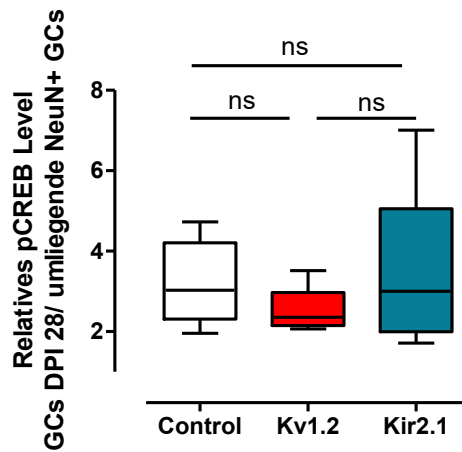


Abbildung 20: Relative pCREB-Expression zu NeuN+ GCs an DPI 28

In adult-geborenen GCs des OB zeigte sich an DPI 28 eine allenfalls geringe pCREB-Expression und keine Herunterregulierung von pCREB in den Kv1.2- oder Kir2.1- Gruppe.

Ergebnisse

(A) MIP (5 μm Schichttiefe) mit Darstellung des relativen pCREB-Levels von adult-geborenen Körnerzellen an DPI 28 aus der Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe. Das pCREB-Level (grün, linke Spalte) der Twitch-2B markierten Zellen (rot, 2. Spalte von links) wurde in Relation zum

mittleren pCREB-Level (grün) aller NeuN-positiven GCs (blau, 3. Spalte von links) gesetzt. Anti-GFP-Antikörper wurde zur Visualisierung von Twitch-2B verwendet. Der Antikörper NeuN diente zur Identifikation der Lokalisation ausgereifter GCs in der Körnerzellschicht des OB. Die weißen Pfeilspitzen zeigen die Lokalisation der Twitch-2B markierten Zellen auf. Eine gelbliche bis grünliche Markierung der Twitch-2B-markierten Zellen im überlagerten Fenster (rechte Spalte) weist auf die gleichzeitige Koexpression von pCREB hin. Maßstabskala 30 μm .

(B) Die Boxplot mit Darstellung des Medians pro Maus zeigen das relative pCREB-Expressionslevel der Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-GCs an Dpi 28 im Vergleich zum mittleren pCREB-Level der ausgereiften NeuN+-Zellen an. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei jeweiligen Gruppen. Kruskal-Wallis-Test, $P = 0.5655$, ns. (Control: $n=5$ Mäuse [53 Zellen], Kv1.2: $n=5$ Mäuse [51 Zellen], Kir2.1: $n=5$ Mäuse [51 Zellen]). Die Abbildung bezieht sich auf die Angabe pro Maus Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; ns = nicht signifikant.

3.4.4 pCREB-Level an DPI 10 in Relation zu NeuN-positiven GCs der Umgebung

In Vorarbeiten nach gleichem Analyseprinzip wurde bei adult-geborenen JGNS demonstriert, dass diese in frühen Entwicklungsphasen an DPI 10 eine deutlich höhere Expression von pCREB vorweisen als vergleichsweise an DPI 28. Auch stellte sich in diesem Zusammenhang dar, dass eine Herunterregulierung von pCREB in Kv1.2- und Kir2.1- überexprimierenden JGNS im Vergleich zur Kontrollgruppe evidenter zu früheren Analysezeiten an DPI 10 war als an DPI 28 (Li et al., 2023). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls das relative pCREB-Level an DPI 10 für die drei GCs-Gruppen bestimmt.

Allerdings zeigten sich bereits bei der Betrachtung der Kontroll-GCs an DPI 10 widersprüchliche Ergebnisse, da wider Erwartungen kein deutlicher Anstieg des pCREB-Niveaus, sondern sogar gegenteilig eine Reduktion des relativen pCREB-Niveaus an DPI 10 mit 2.1 ± 0.22 im Vergleich zu DPI 28 mit 3.21 ± 0.47 detektiert wurde. Zwar zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Analyse der drei Gruppen an DPI 10 mit einer relativen pCREB-Expression von 2.1 ± 0.22 in der Kontrollgruppe, 2.7 ± 0.28 in der Kv1.2-Gruppe und 2.7 ± 0.16 in der Kir2.1-Gruppe (Kruskal-Wallis-Test, $P = 0.2128$), jedoch sind die Ergebnisse der Analyse bei beschriebener Problematik als fehlerhaft und daher als nicht verwertbar zu betrachten.

Ergebnisse

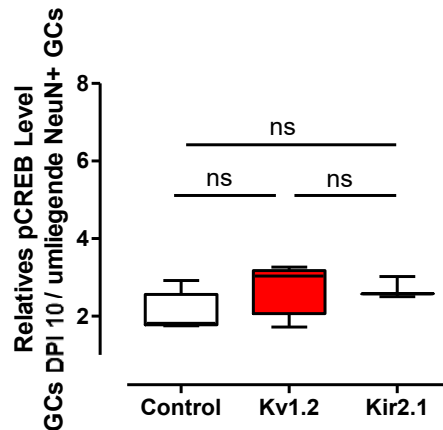


Abbildung 21: Relative pCREB-Expression zu NeuN+ GCs an DPI 10

In früheren Phasen an DPI 10 zeigen die adult-geborenen GCs im OB keine Verminderung der pCREB-Expression in der Kv1.2- oder Kir2.1-Gruppe. Das pCREB-Niveau dieser Analyse war an DPI 10 vergleichbar zu DPI 28.

Die Boxplot mit Darstellung des Medians pro Maus zeigen für DPI 10 das relative pCREB-Expressionslevel der Kontroll-, Kv1.2- und Kir2.1-GCs im Vergleich zum mittleren pCREB-Level der ausgereiften NeuN+ Zellen an. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen. Kruskal-Wallis-Test $P = 0.2128$, ns. (Kontrollgruppe: $n=5$ Mäuse [59 Zellen], Kv1.2: $n=5$ Mäuse [60 Zellen], Kir2.1: $n=3$ Mäuse [35 Zellen]). Die Abbildung bezieht sich auf die Angabe pro Maus. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = nicht signifikant.

Eine Analyse der pCREB-Expression von GCs an DPI 10 wurde bereits in (Li et al., 2023) veröffentlicht. Bei den hier aufgeführten Ergebnissen handelt es sich um eine ausführliche Reanalyse mit erneut selbst erstellten Bildern aus den identischen Präparaten.

Zusammenfassend zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen, dass in den Kv1.2- oder Kir2.1-überexprimierenden GC-Gruppen keine signifikante Herunterregulierung des pCREB-Signalwegs an DPI 28 detektiert werden konnte. Im jüngerem Zellalter an DPI 10 bestand ebenfalls keine relevante Reduktion von pCREB in den GCs der Kv1.2- und Kir2.1- Gruppe. Allerdings ist davon auszugehen, dass die Analysen an DPI 10 aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse mit fehlendem Anstieg der pCREB-Expression nicht zu verwerten sind.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die endogene neuronale Aktivität relevant für die morphologische Entwicklung von adult-geborenen GCs im OB ist. Modifikationen der endogenen Aktivität wie durch eine Überexpression von Kv1.2- oder Kir2.1-Kanälen führten zu einer signifikanten Einschränkung der Morphogenese: Die Gesamtlänge und Komplexität des apikalen Dendriten waren dramatisch reduziert (Li et al., 2023), auch war die Anzahl der Basaldendriten pro Zelle signifikant verringert. Die Dornfortsätze im distalen Bereich des Apikaldendriten konnten weder in der Kv1.2- Gruppe noch in der Kir2.1-Gruppe dargestellt werden und somit auch nicht quantitativ analysiert werden.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von Entwicklungsmarkern weder in adult-geborenen GCs noch in adult-geborenen JGNs durch eine Kv1.2- oder Kir2.1-Überexpression verändert wurden. Daraus abzuleiten ist, dass die endogene Aktivität die Reifestadien der adult-geborenen Neurone nicht wesentlich beeinflusst (Li et al., 2023).

In den immunhistochemischen Untersuchungen an adult-geborenen GCs an DPI 28 wurde in allen drei Gruppen ein niedriges pCREB-Niveau gemessen. Eine relevante Herunterregulierung von phosphoryliertem CREB in der Kv1.2- oder Kir2.1-überexprimierenden Gruppe konnte hierbei nicht detektiert werden.

Zusammenfassend steuert die endogene neuronale Aktivität maßgeblich die frühe Entwicklung der morphologischen Strukturen von adult-geborenen GCs im OB, ohne dabei wesentlich die Reifungsstadien zu beeinflussen. Ob der CREB-Signalweg mechanisch zwischen der veränderten endogenen neuronalen Aktivität und der beobachteten morphologischen Inhibierung vermittelt, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht sicher abgeleitet werden.

4.2 Nachweis der Kaliumkanal-Überexpression in GCs

Bevor die eigentlichen Analysen erfolgten, wurde zunächst geprüft, ob die lentiviralen Modelle tatsächlich eine Überexpression der Kaliumkanäle in den adult-geborenen GCs hervorriefen. Die immunhistochemischen Untersuchungen beschränkten sich lediglich auf den Nachweis einer der überexprimierenden Kaliumkanäle, den Kv1.2-Kaliumkanal, da lediglich ein suffizient einsetzbarer Antikörper für Kv1.2 nicht jedoch für Kir2.1 vorhanden war. Im Großteil der GCs aus der Kv1.2-Gruppe konnte insbesondere im Bereich des Somas eine vermehrte Kv1.2-Kanalexpression nachgewiesen werden. Anzunehmen ist jedoch, dass die Sensitivität der immunhistochemischen Methode beschränkt war, da nur in ca. 70% der Kv1.2-GCs eine vermehrte Kv1.2-Expression detektiert wurde. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit immunhistochemischen Untersuchungen von adult-geborenen JGNs sowie mit Transkriptomanalysen von Kv1.2-überexprimierenden JGNs und GCs, in welchen bestätigt wurden, dass die *Kcna2* mRNA signifikant hochreguliert war (Li et al., 2023). Die Kir-überexprimierende Modelle wurden immunhistochemisch nicht nachgeprüft, jedoch bestätigte hier eine Transkriptomanalyse aus vorherigen Arbeiten das vermehrte Vorhandensein von *KCNJ2* mRNA in diesen Zellen (Li et al., 2023). Abschließend kann davon ausgegangen werden, dass durch die lentivirale Transfektion eine suffiziente Überexpression von Kv1.2 bzw. Kir2.1 erreicht wurde.

4.3 Die endogene neuronale Aktivität reguliert die Morphogenese von adult-geborenen Interneuronen im OB

Die vorliegende Studie zeigt, dass die endogene neuronale Aktivität in der adulten Neurogenese im OB maßgeblich die Morphogenese der neu entstandenen GCs beeinflusst. Durch die Herunterregulierung der endogenen neuronalen Aktivität mittels Kv1.2- oder Kir2.1-Überexpression wurde die Entwicklung des Apikaldendriten (Li et al., 2023) sowie der Basaldendriten der GCs relevant eingeschränkt.

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch *in vivo* sowie *in vitro* Untersuchungen von adult-geborenen JGNs im OB, die mithilfe des gleichen Verfahrens Kv1.2 und

Diskussion

Kir2.1 überexprimierten. Auch in den JGNs wurde durch die Senkung der endogenen Aktivität eine signifikante Reduktion der Gesamtlänge und eine verminderte Komplexität der Dendriten festgestellt (Li et al., 2023). Zusätzlich zu den Untersuchungen an JGNs wurde in dieser Arbeit die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die wesentlich größere Population der adult-geborenen Interneuronen im OB, den GCs, ergänzt. Somit konnte diese Arbeit die Annahme, dass die endogene Aktivität die Morphogenese adult-geborener Interneurone reguliert, bekräftigen. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde zum Teil in derselben Publikation (Li et al., 2023) veröffentlicht.

In einer Arbeit von Dahlen et al. wurde ebenfalls nachgewiesen, dass eine herabgesetzte endogene Aktivität die morphologische Entwicklung des Apikaldendriten von adult-geborenen GCs inhibiert. Zur Herunterregulierung der endogenen Aktivität wurden spannungsabhängige Natriumkanäle (NaV1.1-1.3) ausgeschaltet. Der Effekt war insgesamt geringer als in den Ergebnissen dieser Arbeit. Es zeigte sich lediglich ein Trend zur Reduktion der Gesamtlänge des Apikaldendriten, wohingegen die Sholl-Analyse signifikante Unterschiede erbrachte (Dahlen et al., 2011).

Im Gegensatz hierzu steht eine Studie aus dem Jahr 2010, in der durch eine genetische Überexpression von ESKir2.1 zwar die neuronale Erregbarkeit herabgesetzt wurde, jedoch keine relevanten Effekte auf die Morphogenese von adult-geborenen Interneuronen im OB festgestellt wurde. Auch eine Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit durch die zusätzliche Expression eines bakteriellen spannungsabhängigen Natriumkanals (NaChBac) zeigte in der gleichen Studie keinen Einfluss auf die Morphogenese (Lin et al., 2010).

Auch im Rahmen der perinatalen Neurogenese wurden vergleichbare Untersuchungen zur Rolle der endogenen neuronalen Aktivität durchgeführt. Im perinatalen Gehirn inhibierte eine herabgesetzte endogene Aktivität (durch die Überexpression von Kir2.1-Kanälen) die Morphogenese von neu generierten Interneuronen des Kortex (De Marco García et al., 2011). Entsprechend zeigte eine gesteigerte endogene Aktivität durch die Expression von bakteriellen

spannungsabhängigen Natriumkanälen (NaChBac) ein verändertes Muster der Morphogenese im Neokortex (Bando et al., 2016).

Insgesamt wird berichtet, dass die endogene Aktivität von großer Bedeutung für die Regulation der Morphogenese ist. Doch wodurch kommen die teils sehr unterschiedlichen Studienergebnisse zustande? In den genannten Arbeiten kamen diverse Methoden zur Manipulation der endogenen neuronalen Aktivität zum Einsatz. Die Auswahl des modifizierten Ionenkanals und die Art des Manipulationsverfahrens könnten entscheidend dafür sein, wie und in welchem Ausmaß die endogene neuronale Aktivität verändert wird. Diese Tatsache könnte zu der Entstehung der unterschiedlichen Ergebnisse beigetragen haben.

Anzumerken ist, dass in bisherigen Studien zur endogenen Aktivität in adult-geborenen GCs im OB lediglich morphologische Parameter zum Apikaldendriten erhoben wurden. Die vorliegende Arbeit ist die erste, die explizit zeigt, dass die endogene neuronale Aktivität auch die Anzahl der Basaldendriten pro Zelle reguliert.

4.4 Einfluss der endogenen Aktivität auf die Dornfortsätze und Synapsen der GCs

Die synaptische Reifung und Dornfortsatzentwicklung erfolgt hauptsächlich in der dritten und vierten Entwicklungswoche nach Generierung der GCs in der SVZ (Carleton et al., 2003; Kelsch et al., 2008; Whitman & Greer, 2007). In diesem Zeitraum befindet sich die synaptische Plastizität in ihrer Hochphase und reagiert besonders sensibel auf Manipulationen (Kelsch et al., 2010). In adult-geborenen GCs entwickeln sich Prä- und Postsynapsen sequentiell in unterschiedlichen Dendritensegmenten. Die Entwicklung glutamaterger Eingangssynapsen im proximalen Bereich des Apikaldendriten erfolgt mehrere Tage vor der Entwicklung von dendro-dendritischen Ein- und Ausgangssynapsen im distalen Segment (Kelsch et al., 2008; Whitman & Greer, 2007). Die Analysen der GCs

Diskussion

erfolgten daher auch an DPI 28, wenn die Dornfortsätze und Synapsen am distalen Apikaldendriten in der Regel bereits ausgebildet sind.

In kumulativen Studien wurde gezeigt, dass die endogene Aktivität insbesondere während der sensiblen Phase in den ersten Wochen die Bildung von Dornfortsätzen und Synapsen in adult-geborenen Neuronen reguliert. Kelsch et al. zeigten, dass eine sensorische Deprivation die Synaptogenese am distalen Segment des Apikaldendriten und an den Basaldendriten von adult-geborenen GCs reduzierte, während die Anzahl von Synapsen am proximalen Apikaldendriten anstieg. Jedoch konnten derartige Defizite durch die Anhebung der intrinsischen Aktivität kompensiert werden. Dies spiegelt die Relevanz der endogenen neuronalen Aktivität für die Synaptogenese und Entstehung von Dornfortsätzen wider (Kelsch et al., 2009). Ergänzend dazu wurde gezeigt, dass eine herunterregulierte endogene Aktivität durch Ausschaltung von NaV1.1-1.3-Kanälen die Anzahl der Dornfortsätze am Apikaldendriten von adult-geborenen GCs reduzierte (Dahlen et al., 2011). Auch in hippocampalen Neuronen führte eine Senkung der endogenen Aktivität durch eine Kir-Überexpression zur Inhibition der Synaptogenese (Burrone et al., 2002). Gegenteilige Ergebnisse wurden jedoch ebenfalls publiziert, wie beispielsweise, dass die Herabsetzung der endogenen Aktivität durch die Überexpression von ESKir2.1 nicht die Anzahl der Synapsen in adult-geborenen GCs beeinflusste (Lin et al., 2010).

Auch in der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der endogenen Aktivität für die Bildung der Dornfortsätze und Synapsen in adult-geborenen GCs untersucht werden. Dazu sollte der Einfluss einer veränderten endogenen Aktivität durch Kv1.2- oder Kir2.1-Überexpression auf die Dornfortsätze und Synapsen im distalen Segment (im Bereich nach der ersten Bifurkation am Apikaldendriten) erörtert werden, dort wo sich die dendro-dendritischen Eingangs- und Ausgangssynapsen befinden. Beabsichtigt war, die Dornfortsätze im distalen Segment zu quantifizieren und mittels Immunhistochemie prä- und postsynaptische Strukturen darzustellen. Allerdings war festzustellen, dass in der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe die distal gelegenen morphologischen Strukturen nur spärlich vorhanden schienen und deren Signalhelligkeit deutlich reduziert war. Die Dendriten wirkten sehr schmal und davon abgehende Strukturen wie

Diskussion

potentielle Dornfortsätze waren kaum vom Hintergrundsignal zu unterscheiden. Auch Veränderungen im Färbungs- und Laseraufnahmeprotokoll erbrachten keine signifikant bessere Darstellbarkeit. In GCs mit einer herunterregulierten endogenen Aktivität war somit keine sichere Identifikation von Dornfortsätzen am distalen Apikaldendriten möglich. Ob die Ursache davon letzten Endes an einer Reduktion des Fluoreszenzsignals lag oder ob die Dornfortsätze tatsächlich nicht in der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe vorhanden waren, ist abschließend nicht sicher zu klären. Auch der immunhistochemische Nachweis von dendro-dendritischen Synapsen konnte nicht durchgeführt werden, da sich diese auf den Dornfortsätzen im distalen Apikaldendritensegment befunden hätten.

Welche weiterführenden Experimente könnten anlehnd an diese Problematik durchgeführt werden? Erstens könnten andere Methoden zur Visualisierung der Dendriten und Dornfortsätze getestet werden, wie z.B. die Elektroporation der Zelle mit einem Farbstoff. Zweitens könnte die These getestet werden, ob Dornfortsätze und glutamaterge Input-Synapsen am proximalen Teil des Apikaldendriten vorhanden wären. Diese entstehen im zeitlichen Verlauf einige Tage vor den distalen Dornfortsätzen mit ihren dendro-dendritischen Synapsen (Kelsch et al., 2008; Mary & Charles, 2007). Falls in den Kv1.2- und Kir2.1-Gruppen die proximalen Eingangssynapsen vorhanden wären und gleichzeitig die distalen reziproken Eingangs- und Ausgangssynapsen nicht, würde dies darauf deuten, dass die neu-geborenen Neurone sich noch nicht ausreichend integrieren konnten und noch nicht über ihre Output-Funktion verfügen. Auch würde die Sichtbarkeit von solchen kleinen Dornfortsatzstrukturen am proximalen Segment suggerieren, dass nicht die Signalhelligkeit der einschränkende Faktor wäre.

4.5 Methodische Einschränkungen durch herabgesetzte Signalhelligkeit

Die morphologische Entwicklung der Dendriten und Dornfortsätze zeigte sich in Kv1.2- und Kir2.1- überexprimierenden GCs deutlich inhibiert. Als einschränkender Faktor für die Analyse ergab sich jedoch, dass die Signalhelligkeit in der Kv1.2- bzw. Kir2.1- Gruppe verringert schien. Im exemplarischen Vergleich zwischen der Kontroll- und Kv1.2 Gruppe wurde nachgewiesen, dass das Fluoreszenzsignals der Kv1.2-Gruppe im Bereich des Somas um mehr als die Hälfte reduziert war. Daher stellte sich die Frage, in wie weit die morphologischen Analysen durch diese Reduktion der Signalhelligkeit beeinflusst wurde. Sicherlich können kleinere Strukturen durch diesen Effekt schlechter detektiert werden, jedoch scheint das Ausmaß der inhibierten Morphogenese fast zu dramatisch, um allein durch die halbierte Fluoreszenzsignalstärke erklärt zu werden. Für eine tatsächliche Inhibition der Morphogenese spricht jedoch, dass der morphologische Aufbau der Kv1.2- und Kir2.1-GCs von der Form her retardiert wirkt und im Gesamtbild GCs in früheren Entwicklungsstufen (Stufe 3 bis 4 z.B. ca. 10 Tage nach der Generierung im SVZ) ähnelt (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002), wenn der apikale Dendrit noch kaum verzweigt ist und distale Dornfortätze noch nicht vorhanden sind. In der Zusammenschau wird die verringerte Signalhelligkeit zu einem gewissen Maß die morphologischen Analysen mitbeeinflusst haben, jedoch ist davon auszugehen, dass die herabgesetzte endogene Aktivität als Hauptfaktor zur retardiert wirkenden Morphogenese beigetragen hat.

4.6 Die endogene Aktivität beeinflusst nicht die Reifestadien

Die Klassifizierung, Erkennung und Interpretation von Reifestadien von adult-geborenen Neuronen ist nicht ganz trivial, da es sich um einen dynamischen Prozess handelt, der gekennzeichnet ist durch die transiente Expression von bestimmten Proteinen. Auch der Mangel an hochspezifischen Markern kann Probleme hervorrufen (La Rosa et al., 2020). Beispielsweise wurde kritisiert, dass DCX nur eine eingeschränkte Spezifität für die Neurogenese vorweist, da er auch in nicht-neurogenen Gebieten des Gehirns exprimiert wird (Bonfanti & Nacher, 2012; La Rosa et al., 2020). Dennoch hat sich DCX als bewährter Marker für unreife Neurone in den neurogenen Nischen bewiesen, da er transient in wandernden Neuroblasten sowie in noch unreifen neu-geborenen Neuronen exprimiert wird (Brown et al., 2003). Auch unsere Untersuchungen bestätigten den zeitabhängigen Rückgang von DCX mit zunehmendem Zellalter und stehen im Einklang mit Angaben aus der Literatur mit Werten von ca. 70% DCX-positiven Zellen an DPI 10 (Herold et al., 2011) und 5-10% DCX-positiven GCs an DPI 28 (Herold et al., 2011). Das Gegenstück bildet NeuN. Dieser ist ein Marker für postmitotische neuronale Zellen (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine herabgesetzte endogene Aktivität keinen relevanten Einfluss auf die zeitgerechte Expression von Entwicklungsmarkern wie DCX oder NeuN in adult-geborenen GCs und JGNs im OB hatte (Li et al., 2023). Die Entwicklung der Reifestadien war somit unabhängig von der endogenen Aktivität. Soweit bekannt wurde eine Untersuchung dieser Art bislang zum ersten Mal durchgeführt und beschrieben. Vorherige Arbeiten zeigten lediglich, wie sich der Anteil von DCX- oder NeuN-positiven Neuronen zu bestimmten Zeitpunkten in der Entwicklung verhielt. So wurde mehrfach gezeigt, dass der Anteil NeuN-exprimierender Neurone mit der steigendem Zellalter zunimmt und GCs im OB schließlich an DPI 28-30 ca. zu 72% bis 90% NeuN-positiv sind (Brown et al., 2003; Herold et al., 2011; Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002). Gegenteilig verhält es sich bei DCX. Während an DPI 10 noch ca. 70% der GCs DCX exprimieren, sinkt der Anteil auf 5% bis 10% an DPI 28 (Herold et al., 2011). Auch in der Kontrollgruppe sowie in der Kv1.2- und

Kir2.1- Gruppe dieser Arbeit wurde ein ähnlicher Anteil an NeuN- und DCX-positiven Zellen an DPI 28 detektiert.

Im Gegensatz zu GCs, die oft schon nach 2 Wochen als morphologisch ausgewachsen eingestuft werden (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002), benötigen JGNs eine deutlich längere Zeit von ca. 4 Wochen um ihre vollständigen Dendriten und Axone zu entwickeln (Belluzzi et al., 2003; Lledo et al., 2006). Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Entwicklungsmarker in JGNs im zeitlichen Verlauf „retardiert“ exprimiert werden. Beispielsweise sind JGNs an DPI 28 nur zu 40% NeuN-positiv (Winner et al., 2002). Auch in unseren Ergebnissen spiegelte sich der Trend wider, dass JGNs über eine längere Zeit DCX exprimieren als GCs und erst später anfangen NeuN zu exprimieren (Li et al., 2023).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zusammenfassend gezeigt, dass I.) die endogene neuronale Aktivität nicht den Reifungszustand der neu-geborenen Neurone im OB beeinflusst und II.), dass GCs in Anbetracht der Expression von Entwicklungsmarkern tendenziell früher ausreifen als JGNs.

4.7 Der CREB-Signalweg

Der CREB-Signalweg spielt für die Regulation der adulten Neurogenese eine wesentliche Rolle. Der phosphorylierte Transkriptionsfaktor CREB (pCREB) reguliert die Transkription von Genen, die wiederum von elementarer Bedeutung für die Differenzierung, Reifung, morphologische Entwicklung und das Überleben von neugeborenen Neuronen sind (Claudio Giachino et al., 2005; Herold et al., 2011; Jagasia et al., 2009; Niklison-Chirou et al., 2020).

Insbesondere in den frühen Entwicklungsstufen der adult-geborenen Neurone ist pCREB hochreguliert und nimmt mit zunehmender Ausreifung der Neurone wieder ab, wenn die Dendriten- und Dornfortsatzformierung abgeschlossen ist (C. Giachino et al., 2005). In ausgereiften NeuN-positiven GCs im OB exprimiert lediglich nur noch ca. jede zehnte Zelle pCREB (C. Giachino et al., 2005). Auch

Diskussion

Herold et al. zeigte, dass die pCREB-Expression in GCs bereits an DPI 28 nur noch residuell vorhanden ist (Herold et al., 2011). Die Studienergebnisse dieser Arbeit detektieren, dass ca. jede dritte ausgereifte NeuN-positive Körnerzelle im OB pCREB-positiv war. Die Diskrepanz zur vorbeschriebenen Literatur erklärt sich am ehesten durch die Verwendung unterschiedlicher Auswertungsmethoden. In unseren Analysen wurden GCs bereits als pCREB-positiv gewertet, wenn ihre Expression zweimal dem Hintergrundsignal entsprach. Dadurch wurden auch Zellen mit einer relativ niedrigen bis mäßigen pCREB-Expression miteinbezogen. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse jedoch, dass der Großteil der reifen NeuN-positiven Zellen pCREB-negativ ist und lediglich ungefähr ein Drittel der ausgereiften GCs eine zumindest leichte pCREB-Expression aufweist.

Wie bereits erwähnt ist der CREB-Signalweg funktional bedeutend für die Entwicklung von adult-geborenen Neuronen. Sowohl für die adulte Neurogenese im Hippocampus (Jagasia et al., 2009) als auch im OB (Herold et al., 2011) wurde gezeigt, dass eine Inhibition des CREB-Signalwegs zu einer retardierten morphologischen Entwicklung führt und die Reifung der Zellen beeinträchtigt. Aufgrund der Tatsache, dass der CREB-Signalweg die Morphogenese und Reifung von adult-geborenen Neuronen beeinflusst und pCREB zudem durch multiple aktivitätsabhängige Signalkaskaden reguliert wird (Belgacem & Borodinsky, 2017; Lonze & Ginty, 2002; Mayr & Montminy, 2001), stellte sich die Frage, ob dieser Signalweg potentiell auch in den hier durchgeführten Experimenten eine entscheidende Rolle spielt. Konkret sollte untersucht werden, ob eine veränderte endogene Aktivität durch Kv1.2- oder Kir2.1-Überexpression zu einer Herunterregulierung des CREB-Signalweges führte und dadurch wiederum die Morphogenese der GCs inhibiert wurde.

In Vorarbeiten von Li et al. wurde die Hypothese bereits für adult-geborene JGNs im OB getestet. Mithilfe der gleichen Technik, durch letivirale Transfektion, wurden Kv1.2- bzw. Kir2.1-Kanäle in adult-geborenen JGNs überexprimiert. Dies führte nicht nur zu einer eingeschränkten Morphogenese, Veränderung der Migration und vermehrten Zelltod in JGNs, sondern auch zu einer Reduktion des relativen pCREB-Levels in immunhistochemischen Untersuchungen.

Diskussion

Insbesondere war der Unterschied evident bei JGNs an DPI 10 in frühen Entwicklungsstufen und weniger ausgeprägt in der DPI 28 Gruppe (Li et al., 2023). Somit legten diese Daten aus der Gruppe der JGNs bereits nahe, dass zwischen veränderter endogener Aktivität und inhibierter Morphogenese potentiell der CREB-Signalweg mechanisch vermitteln könnte (Li et al., 2023). Da bislang keine Untersuchungen zur Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die deutlich größere Population an Interneuronen im OB, die adult-geborenen GCs, durchgeführt wurden, wurden der Kenntnisstand durch diese Arbeit ergänzt.

Im ersten Schritt wurde die pCREB-Expression in adult-geborenen GCs an DPI 28 untersucht, einem Zeitpunkt, an welchem der Großteil der GCs bereits morphologisch ausgewachsen ist (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002) und die Expression von pCREB deutlich abgenommen hat und sich auf einem niedrigen Niveau befindet (C. Giachino et al., 2005). Literaturwerte beschreiben diesbezüglich einen Rückgang der pCREB-Koexpression von 73.5% an DPI 10 auf nur noch 7% an DPI 45 (C. Giachino et al., 2005). Aufgrund des bereits deutlich herunterregulierten pCREB-Levels an DPI 28, ist die Detektion einer spezifischen pCREB-Herunterregulierung in einer einzelnen Gruppe erschwert. Daher ist das Fehlen einer signifikanten Reduktion des pCREB-Levels in der Kv1.2- und Kir2.1-überexprimierenden GC-Gruppe an DPI 28 nicht sehr überraschend und wohlmöglich im Kontext mit dem ausgewählten Analysezeitpunkte zu erklären. Zu diskutieren ist allerdings die Tatsache, warum sich in JGNs an DPI 28 eine pCREB-Herunterregulierung in der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe detektieren ließ, in der GCs Gruppe jedoch nicht. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass GCs morphologisch (Belluzzi et al., 2003; Lledo et al., 2006; Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002) und von ihren Entwicklungsmarkern früher ausreifen als JGNs und daher zum Zeitpunkt DPI 28 das pCREB-Level in GCs stärker herunterreguliert sein könnte als in JGNs und deswegen nur in JGNs eine Inhibition des CREB-Signalwegs an DPI 28 detektierbar ist.

Abschließend hätte die Analyse der relativen pCREB-Expression an DPI 10 eindeutiger Ergebnisse hervorbringen sollen, denn gemäß der Literatur ist das pCREB-Level der GCs an DPI 10 deutlich höher mit prozentualen pCREB-

Diskussion

Koexpressionraten von ca. 73.5% (C. Giachino et al., 2005) und somit sollte eine mögliche Herunterregulierung des CREB-Signalwegs in der Kv1.2- oder Kir2.1-Gruppe besser zu detektieren sein. Wider Erwartungen zeigte sich jedoch, dass bereits vor dem Vergleich der drei Gruppen (Kontrolle, Kv1.2 und Kir2.1) an DPI 10 eine entscheidende Grundvoraussetzung nicht erfüllt war: In der Kontrollgruppe wurde statt eines deutlichen Anstiegs der pCREB-Expression von DPI 28 (relatives pCREB-Level 3.21 ± 0.47) eine Reduktion der pCREB-Expression an DPI 10 (relatives pCREB-Level 2.1 ± 0.22) gemessen. Somit stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zum aktuellen Kenntnisstand, dass in der Entwicklungsphase von adult-geborenen Neuronen pCREB mit steigendem Zellalter abnehmen sollte (C. Giachino et al., 2005; Jagasia et al., 2009). Die pCREB-Analysen an DPI 10 konnten daher nicht verwertet werden. Welches die genaue Fehlerquelle in der Versuchsreihe war, ist retrospektiv nicht eindeutig festzulegen. Zu diskutieren sind möglicherweise Fehler im Färbeprotokoll, potentiell Probleme mit Einzelprodukten, Fehler bei der Erstellung der Laseraufnahmen und weitere Ursachen. Allerdings können diesbezüglich nur Spekulationen aufgestellt werden. Interessant in diesem Zusammenhang wäre die Frage gewesen, was man sich von einer technisch gelungenen pCREB-Analyse von GCs an DPI 10 hätte erwarten können. Zum einen hätte das pCREB-Level in der Kontrollgruppe an DPI 10 im Vergleich zu DPI 28 signifikant höher sein müssen. Zudem wäre in Anbetracht der immunhistochemischen pCREB-Analysen von JNGs eine Herunterregulierung in der Kv1.2- und Kv.1- Gruppe auch bei GCs, die einen ähnlichen Entwicklungsverlauf der pCREB-Expression aufweisen, gut denkbar gewesen (Li et al., 2023). Ebenfalls im Einklang hiermit stehen publizierte Ergebnisse einer Transkriptomanalysen von GCs und JGNs, in welcher nachgewiesen wurde, dass durch die Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1 vor- und nachgeschaltet Moleküle im CREB-Signalweg herunterreguliert wurden (Li et al., 2023).

4.8 Schlussfolgerungen und Ausblicke

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern, dass die endogene neuronale Aktivität entscheidend für die Regulation der Morphogenese von adult-geborenen GCs ist (Li et al., 2023). Die endogene Aktivität ist nicht nur relevant für die vollständige Entwicklung von apikalen und basalen Dendriten von GCs im OB, sondern könnte möglicherweise auch eine wesentliche Rolle in der Ausbildung wichtiger funktioneller Strukturen wie von distalen Dornfortsätzen spielen, auf denen sich bidirektionale Synapsen zur Kommunikation mit dem Netzwerk befinden. Die Hinweise für die Bedeutung der endogenen Aktivität für die Entwicklung von Dornfortsätzen sind jedoch in Anbetracht der durchgeführten Methodik noch unvollständig und kritisch zu hinterfragen. Um diese These verifizieren zu können, bedarf es zunächst weiterer Untersuchungen, die eine quantitative Auswertung ermöglichen.

Bemerkenswerterweise deuten die Daten darauf hin, dass durch die Überexpression von Kv1.2 sowie Kir2.1 zwar eine Retardierung der Morphogenese hervorgerufen wird, ohne jedoch dabei die zeitgerechte Expression von Entwicklungsmarkern zu beeinflussen. Somit führte diese Art der Veränderung der endogenen Aktivität in GCs und JGNs zu keinem zelltoxischen Effekt im Sinne einer inhibierten Reifungsentwicklung (Li et al., 2023).

Eine Überexpression von Kv1.2 oder Kir2.1 in adult-geborenen GCs an DPI 28 zeigte in den vorliegenden Analysen keine relevante Herunterregulierung von phosphoryliertem CREB. Allerdings sollte in der Gesamtschau die Auswahl des relativ spät gesetzten Analysezeitpunktes berücksichtigt werden. Durch die deutliche Herunterregulierung der pCREB-Expression mit steigendem Zellalter (C. Giachino et al., 2005) ist zu diskutieren, ob der Effekt wohlmöglich aufgrund des niedrigen Expressionsniveaus in den 3 Gruppen nicht detektiert werden konnte. Zudem ist die Frage zu stellen, ob eventuell die Anzahl der zu analysierenden Zellen zu tief angesetzt war, um diese eher gering ausgeprägten Unterschiede wahrzunehmen.

Die pCREB-Auswertungen für adult-geborene GCs an DPI 10 konnten aufgrund des fehlenden Anstiegs von pCREB in der DPI 10 Gruppe im Vergleich zur DPI

Diskussion

28 Gruppe nicht verwertet werden. Mit Sicherheit wäre eine Wiederholung des Experimentes mit Neuerstellung der Präparate an DPI 10 hilfreich um die Frage zu beantworten, ob der CREB-Signalweg mechanisch in dem hier untersuchten Prozess vermittelt. Auch könnten mRNA oder Transkriptomanalysen in diesem Zusammenhang alternativ genutzt werden, um die Involvierung des CREB-Signalwegs oder weiterer Moleküle zu identifizieren.

Abschließend stellt sich die Frage nach dem Nutzen der hier gesammelten Erkenntnisse. Welche Rückschlüsse können gezogen werden? Dient das neu gesammelte Wissen allein der Grundlagenforschung? Wird hieraus aufbauend ein Stein gesetzt für weiterführende Forschungen? Oder können die Erkenntnisse dieser Arbeit eines Tages vielleicht zum besseren Verständnis im Rahmen der adulten Neurogenese dienen oder im Rahmen von z.B. spezifischen genetischen neurologischen Defekten mit Mutationen von Ionenkanälen weiterhelfen? Viele solcher Fragen sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortbar. Sicherlich bekräftigt diese Arbeit jedoch die Relevanz der endogenen Aktivität für die adulte Neurogenese und zeigt auf, wie dramatisch Störungen oder Veränderungen innerhalb dieses sensiblen Systems, wie beispielsweise die Überexpression von Kalium-Kanälen, die Entwicklung von spezifischen Neuronen beeinflussen können.

5. Zusammenfassung

Die Entdeckung der adulten Neurogenese hat immenses wissenschaftliches Interesse geweckt und gilt als potentieller Hoffnungsträger für die Behandlung neurologischer Erkrankungen. Im Nagetier wurden die kontinuierliche Neubildung und die Einwanderung von adult-geborenen Neuronen in den Riechkolben und in den Hippocampus bereits mehrfach nachgewiesen. In der subventrikulären Zone befindet sich eine der neurogenen Nischen, in der im adulten Alter neue Neurone generiert werden. Diese migrieren über den rostralen Migrationsstrom in den Riechkolben, wo sie sich zu GABAergen Interneuronen (zu 90% zu Körnerzellen und zu 10% zu juxtglomerulären Neuronen) entwickeln und sich erfolgreich in ein bereits vorbestehendes neuronales Netzwerk integrieren. Welche Faktoren für die korrekte morphologische Entwicklung und Reifung der adult-geborenen Neurone entscheidend sind, ist bis dato nicht ausreichend bekannt. Neben äußeren Einflüssen scheint jedoch die endogene neuronale Aktivität von essentieller Bedeutung zu sein.

Daher bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die Rolle der endogenen neuronalen Aktivität für die Morphogenese und Reifung von adult-geborenen Neuronen zu erforschen. Dies wurde fokussiert anhand von adult-geborenen Körnerzellen (GCs) im Riechkolben der Maus untersucht. Zu diesem Zweck wurde in adult-geborenen GCs mittels lentiviraler Transduktion der Calcium-Sensor Twitch-2B zur Visualisierung der Zellen exprimiert sowie entweder ein spannungsabhängiger Kalium-Kanal (Kv1.2) oder ein einwärtsgerichteter Kalium-Kanal (Kir2.1) überexprimiert, um hierdurch die endogene neuronale Aktivität der Zellen zu modifizieren. Es wurden immunhistochemisch gefärbte Gefrierschnitte des Mäusegehirns angefertigt und anschließend Aufnahmen mithilfe von Zweiphotonen-Mikroskopie zur weiteren Analyse erstellt.

Zunächst erfolgte der immunhistochemische Nachweis, dass der Großteil der modifizierten Kv1.2-GCs tatsächlich eine Überexpression von Kv1.2 zeigte und somit eine valide Basis für die weiteren Experimente bestand. Als nächstes wurde gezeigt, dass die morphologische Entwicklung sowohl in Kv1.2- als auch Kir2.1-überexprimierenden GCs deutlich eingeschränkt war: Die Gesamtlänge

Zusammenfassung

und Komplexität des Apikaldendriten war signifikant reduziert und die Anzahl der Basaldendriten pro Zelle herabgesetzt. Die relevanten Dornfortsätze an den Apikaldendriten konnten in der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe nicht eindeutig dargestellt werden. Ob die Überexpression der Kaliumkanäle dazu führte, dass die Ausbildung der Dornfortsätze inhibiert wurde, oder ob es sich hierbei lediglich um eine eingeschränkte Darstellbarkeit der schmalen Strukturen bei reduzierter Helligkeit handelt, ist abschließend nicht eindeutig einzuordnen. Des Weiteren wurden die Reifestadien der adult-geborenen GCs am 28. Tag nach Injektion (DPI 28) untersucht und nachgewiesen, dass in GCs der Kv1.2- bzw. Kir2.1-Gruppe eine zeitgerechte Expression der Entwicklungsmarker NeuN (Marker für ausgereifte Neurone) und Doublecortin (Marker für sich entwickelnde Neurone) stattfand. In ergänzenden Analysen an juxtaglomerulären Neuronen im OB mit einer Kv1.2- oder Kir2.1-Überexpression konnte ebenfalls keine Retardierung der Reifestadien festgestellt werden. Abschließend wurde nach einem Mechanismus gesucht, welcher mechanisch zwischen der Kv1.2- bzw. Kir2.1-Überexpression und der hierunter beobachteten inhibierten Morphogenese vermittelt. Im Rahmen dessen wurde der CREB (cAMP response element-binding protein) -Signalweg untersucht. In der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe konnte an DPI 28 zwar keine Herunterregulierung von pCREB (phosphoryliertem CREB) festgestellt werden, jedoch ist anzunehmen, dass dies dem ausgewählten Untersuchungszeitpunkt geschuldet ist, da die pCREB-Expression in GCs an DPI 28 bereits deutlich herunterreguliert ist und hierdurch Unterschiede zwischen den Gruppen nicht detektiert werden konnten.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die endogene neuronale Aktivität maßgeblich die Morphogenese von adult-geborenen Körnerzellen im Riechkolben der Maus steuert, ohne dabei einen wesentlichen Einfluss auf die Reifungsstadien der Zelle auszuüben. Eine verminderte pCREB-Expression ließ sich in der Kv1.2- und Kir2.1-Gruppe zwar nicht detektieren, die fehlende Detektion einer Herunterregulierung des CREB-Signalweges ist jedoch am ehesten aufgrund des gewählten Untersuchungszeitpunktes zu begründen.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmad, M. A., Pottoo, F. H., & Akbar, M. (2020). Gene Therapy Repairs for the Epileptic Brain: Potential for Treatment and Future Directions. *Curr Gene Ther*, 19(6), 367-375.
<https://doi.org/10.2174/1566523220666200131142423>
- Al-Karagholi, M. A., Hakbilen, C. C., & Ashina, M. (2022). The role of high-conductance calcium-activated potassium channel in headache and migraine pathophysiology. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 131(5), 347-354. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13787>
- Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev*, 89(1), 121-145.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2008>
- Alberts, B. (2017). *Molecular biology of the cell*. Garland science.
- Alonso, M., Viollet, C., Gabellec, M. M., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J. C., & Lledo, P. M. (2006). Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 26(41), 10508-10513. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2633-06.2006>
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135(3509), 1127-1128.
<https://doi.org/10.1126/science.135.3509.1127>
- 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(4), 433-457.
<https://doi.org/10.1002/cne.901370404>
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 124(3), 319-335. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>
- Alvarez-Buylla, A., & Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*, 22(3), 629-634.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-03-00629.2002>
- Alvarez-Buylla, A., Seri, B., & Doetsch, F. (2002). Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull*, 57(6), 751-758.
[https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00770-5](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00770-5)
- Alvites, R., Caine, A., Cherubini, G. B., Prada, J., Varejão, A. S. P., & Maurício, A. C. (2023). The Olfactory Bulb in Companion Animals-Anatomy, Physiology, and Clinical Importance. *Brain Sci*, 13(5).
<https://doi.org/10.3390/brainsci13050713>
- Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci*, 18(6), 335-346.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.45>

Literaturverzeichnis

- Bando, Y., Irie, K., Shimomura, T., Umeshima, H., Kushida, Y., Kengaku, M., Fujiyoshi, Y., Hirano, T., & Tagawa, Y. (2016). Control of Spontaneous Ca²⁺ Transients Is Critical for Neuronal Maturation in the Developing Neocortex. *Cereb Cortex*, 26(1), 106-117. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu180>
- Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 451-465. <https://doi.org/10.1038/nrn2148>
- Belgacem, Y. H., & Borodinsky, L. N. (2017). CREB at the Crossroads of Activity-Dependent Regulation of Nervous System Development and Function. *Adv Exp Med Biol*, 1015, 19-39. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_2
- Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J., & LoTurco, J. J. (2003). Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 23(32), 10411-10418. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-32-10411.2003>
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G. B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A. J., Hen, R., & Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, 22(4), 589-599.e585. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015>
- Bonfanti, L. (2011). From hydra regeneration to human brain structural plasticity: a long trip through narrowing roads. *ScientificWorldJournal*, 11, 1270-1299. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.113>
- Bonfanti, L., & Nacher, J. (2012). New scenarios for neuronal structural plasticity in non-neurogenic brain parenchyma: The case of cortical layer II immature neurons. *Progress in Neurobiology*, 98(1), 1-15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.05.002>
- Brew, H. M., Gittelman, J. X., Silverstein, R. S., Hanks, T. D., Demas, V. P., Robinson, L. C., Robbins, C. A., McKee-Johnson, J., Chiu, S. Y., Messing, A., & Tempel, B. L. (2007). Seizures and Reduced Life Span in Mice Lacking the Potassium Channel Subunit Kv1.2, but Hypoexcitability and Enlarged Kv1 Currents in Auditory Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 98(3), 1501-1525. <https://doi.org/10.1152/jn.00640.2006>
- Brown, J. P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L., & Kuhn, H. G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, 467(1), 1-10. <https://doi.org/10.1002/cne.10874>
- Brown, R. E., & Milner, P. M. (2003). The legacy of Donald O. Hebb: more than the Hebb synapse. *Nat Rev Neurosci*, 4(12), 1013-1019. <https://doi.org/10.1038/nrn1257>
- Bugeon, S., Haubold, C., Rzyzyski, A., Cremer, H., & Platel, J. C. (2021). Intrinsic Neuronal Activity during Migration Controls the Recruitment of Specific Interneuron Subtypes in the Postnatal Mouse Olfactory Bulb. *J*

- Neurosci*, 41(12), 2630-2644. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1960-20.2021>
- Burrone, J., O'Byrne, M., & Murthy, V. N. (2002). Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature*, 420(6914), 414-418. <https://doi.org/10.1038/nature01242>
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., & Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 56(2), 337-344. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90335-d](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90335-d)
- Carleton, A., Petreanu, L. T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., & Lledo, P. M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci*, 6(5), 507-518. <https://doi.org/10.1038/nn1048>
- Cecchi, G. A., Petreanu, L. T., Alvarez-Buylla, A., & Magnasco, M. O. (2001). Unsupervised learning and adaptation in a model of adult neurogenesis. *J Comput Neurosci*, 11(2), 175-182. <https://doi.org/10.1023/a:1012849801892>
- Choi, D. H., Kim, J. H., Kim, S. M., Kang, K., Han, D. W., & Lee, J. (2017). Therapeutic Potential of Induced Neural Stem Cells for Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010224>
- Chowdhury, M. A. R., An, J., & Jeong, S. (2023). The Pleiotropic Face of CREB Family Transcription Factors. *Mol Cells*, 46(7), 399-413. <https://doi.org/10.14348/molcells.2023.2193>
- Corlew, R., Bosma, M. M., & Moody, W. J. (2004). Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones. *J Physiol*, 560(Pt 2), 377-390. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.071621>
- Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H.-G., & Aigner, L. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 21(1), 1-14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x>
- D'Adamo, M. C., Catacuzzeno, L., Di Giovanni, G., Franciolini, F., & Pessia, M. (2013). K(+) channelepsy: progress in the neurobiology of potassium channels and epilepsy. *Front Cell Neurosci*, 7, 134. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00134>
- D'Adamo, M. C., Liantonio, A., Rolland, J. F., Pessia, M., & Imbrici, P. (2020). Kv1.1 Channelopathies: Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082935>
- Dahlen, J., Jimenez, D., Gerkin, R., & Urban, N. (2011). Morphological Analysis of Activity-Reduced Adult-Born Neurons in the Mouse Olfactory Bulb [Original Research]. *Frontiers in Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00066>

Literaturverzeichnis

- Darcy, D. P., & Isaacson, J. S. (2009). L-type calcium channels govern calcium signaling in migrating newborn neurons in the postnatal olfactory bulb. *J Neurosci*, *29*(8), 2510-2518. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5333-08.2009>
- de Curtis, M., Uva, L., Gnatkovsky, V., & Librizzi, L. (2018). Potassium dynamics and seizures: Why is potassium ictogenic? *Epilepsy Res*, *143*, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.04.005>
- De Marco García, N. V., Karayannis, T., & Fishell, G. (2011). Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature*, *472*(7343), 351-355. <https://doi.org/10.1038/nature09865>
- Dworkin, S., Heath, J. K., deJong-Curtain, T. A., Hogan, B. M., Lieschke, G. J., Malaterre, J., Ramsay, R. G., & Mantamadiotis, T. (2007). CREB activity modulates neural cell proliferation, midbrain–hindbrain organization and patterning in zebrafish. *Developmental Biology*, *307*(1), 127-141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.04.026>
- Dworkin, S., & Mantamadiotis, T. (2010). Targeting CREB signalling in neurogenesis. *Expert Opin Ther Targets*, *14*(8), 869-879. <https://doi.org/10.1517/14728222.2010.501332>
- Gao, K., Lin, Z., Wen, S., & Jiang, Y. (2022). Potassium channels and epilepsy. *Acta Neurol Scand*, *146*(6), 699-707. <https://doi.org/10.1111/ane.13695>
- Gazulla, J., & Berciano, J. (2023). Potential Benefit of Channel Activators in Loss-of-Function Primary Potassium Channelopathies Causing Heredoataxia. *Cerebellum*. <https://doi.org/10.1007/s12311-023-01584-8>
- Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J. D., & Lledo, P. M. (2000). Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(4), 1823-1828. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1823>
- Ghibaudi, M., & Bonfanti, L. (2022). How Widespread Are the "Young" Neurons of the Mammalian Brain? *Front Neurosci*, *16*, 918616. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.918616>
- Giachino, C., De Marchis, S., Giampietro, C., Parlato, R., Perroteau, I., Schütz, G., Fasolo, A., & Peretto, P. (2005). cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*, *25*(44), 10105-10118. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3512-05.2005>
- Giachino, C., Marchis, S. D., Giampietro, C., Parlato, R., Perroteau, I., Schütz, G., Fasolo, A., & Peretto, P. (2005). cAMP Response Element-Binding Protein Regulates Differentiation and Survival of Newborn Neurons in the Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience*, *25*(44), 10105-10118. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3512-05.2005>
- Gonçalves, J. T., Schafer, S. T., & Gage, F. H. (2016). Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*, *167*(4), 897-914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>

Literaturverzeichnis

- González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., & Latorre, R. (2012). K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol*, 2(3), 2087-2149. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110047>
- Götz, M., & Bocchi, R. (2021). Neuronal replacement: Concepts, achievements, and call for caution. *Current Opinion in Neurobiology*, 69, 185-192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.03.014>
- Gribkoff, V. K., & Winquist, R. J. (2023). Potassium channelopathies associated with epilepsy-related syndromes and directions for therapeutic intervention. *Biochem Pharmacol*, 208, 115413. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115413>
- Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42-47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4463411/pdf/AN20758251-25-042.pdf>
- Hagg, T. (2005). Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci*, 28(11), 589-595. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.08.009>
- Hai, T., & Hartman, M. G. (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene*, 273(1), 1-11. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00551-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00551-0)
- Han, P. P., Han, Y., Shen, X. Y., Gao, Z. K., & Bi, X. (2023). Enriched environment-induced neuroplasticity in ischemic stroke and its underlying mechanisms. *Front Cell Neurosci*, 17, 1210361. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1210361>
- Hanganu-Opatz, I. L. (2010). Between molecules and experience: role of early patterns of coordinated activity for the development of cortical maps and sensory abilities. *Brain Res Rev*, 64(1), 160-176. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.03.005>
- Haruna, Y., Kobori, A., Makiyama, T., Yoshida, H., Akao, M., Doi, T., Tsuji, K., Ono, S., Nishio, Y., Shimizu, W., Inoue, T., Murakami, T., Tsuboi, N., Yamanouchi, H., Ushinohama, H., Nakamura, Y., Yoshinaga, M., Horigome, H., Aizawa, Y., . . . Horie, M. (2007). Genotype-phenotype correlations of KCNJ2 mutations in Japanese patients with Andersen-Tawil syndrome. *Hum Mutat*, 28(2), 208. <https://doi.org/10.1002/humu.9483>
- Herold, S., Jagasia, R., Merz, K., Wassmer, K., & Lie, D. C. (2011). CREB signalling regulates early survival, neuronal gene expression and morphological development in adult subventricular zone neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*, 46(1), 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.08.008>
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., & Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function,

Literaturverzeichnis

- and physiological roles. *Physiol Rev*, *90*(1), 291-366.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>
- Hurni, N., Kolodziejczak, M., Tomasello, U., Badia, J., Jacobshagen, M., Prados, J., & Dayer, A. (2017). Transient Cell-intrinsic Activity Regulates the Migration and Laminar Positioning of Cortical Projection Neurons. *Cereb Cortex*, *27*(5), 3052-3063. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx059>
- Imai, T. (2014). Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *35*, 180-188.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.012>
- Isaacson, J. S., & Strowbridge, B. W. (1998). Olfactory Reciprocal Synapses: Dendritic Signaling in the CNS. *Neuron*, *20*(4), 749-761.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81013-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81013-2)
- Jagasia, R., Steib, K., Englberger, E., Herold, S., Faus-Kessler, T., Saxe, M., Gage, F. H., Song, H., & Lie, D. C. (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, *29*(25), 7966-7977. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1054-09.2009>
- Jahr, C. E., & Nicoll, R. A. (1982). An intracellular analysis of dendrodendritic inhibition in the turtle in vitro olfactory bulb. *J Physiol*, *326*, 213-234.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014187>
- Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2012). Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *The Journal of Physiology*, *590*(11), 2591-2599. <https://doi.org/https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224212>
- Jorgensen, C., & Wang, Z. (2020). Hormonal Regulation of Mammalian Adult Neurogenesis: A Multifaceted Mechanism. *Biomolecules*, *10*(8).
<https://doi.org/10.3390/biom10081151>
- Jurkowski, M. P., Bettio, L., E, K. W., Patten, A., Yau, S. Y., & Gil-Mohapel, J. (2020). Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Front Cell Neurosci*, *14*, 576444.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.576444>
- Kang, E., Wen, Z., Song, H., Christian, K. M., & Ming, G. L. (2016). Adult Neurogenesis and Psychiatric Disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *8*(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019026>
- Kelsch, W., Lin, C. W., & Lois, C. (2008). Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(43), 16803-16808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807970105>
- Kelsch, W., Lin, C. W., Mosley, C. P., & Lois, C. (2009). A critical period for activity-dependent synaptic development during olfactory bulb adult neurogenesis. *J Neurosci*, *29*(38), 11852-11858.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.2406-09.2009>
- Kelsch, W., Sim, S., & Lois, C. (2010). Watching Synaptogenesis in the Adult Brain. *Annual Review of Neuroscience*, *33*(1), 131-149.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153252>

Literaturverzeichnis

- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., & Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27(8), 447-452. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.013>
- Kim, T. A., Syty, M. D., Wu, K., & Ge, S. (2022). Adult hippocampal neurogenesis and its impairment in Alzheimer's disease. *Zool Res*, 43(3), 481-496. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.479>
- La Rosa, C., Parolisi, R., & Bonfanti, L. (2020). Brain Structural Plasticity: From Adult Neurogenesis to Immature Neurons. *Front Neurosci*, 14, 75. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00075>
- Laaris, N., Puche, A., & Ennis, M. (2007). Complementary Postsynaptic Activity Patterns Elicited in Olfactory Bulb by Stimulation of Mitral/Tufted and Centrifugal Fiber Inputs to Granule Cells. *Journal of Neurophysiology*, 97(1), 296-306. <https://doi.org/10.1152/jn.00823.2006>
- Lacar, B., Young, S. Z., Platel, J. C., & Bordey, A. (2011). Gap junction-mediated calcium waves define communication networks among murine postnatal neural progenitor cells. *Eur J Neurosci*, 34(12), 1895-1905. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07901.x>
- Leal-Galicia, P., Chávez-Hernández, M. E., Mata, F., Mata-Luévanos, J., Rodríguez-Serrano, L. M., Tapia-de-Jesús, A., & Buenrostro-Jáuregui, M. H. (2021). Adult Neurogenesis: A Story Ranging from Controversial New Neurogenic Areas and Human Adult Neurogenesis to Molecular Regulation. *Int J Mol Sci*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111489>
- Lee, D. A., Bedont, J. L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., Takebayashi, H., Aja, S., Ford, E., Fishell, G., & Blackshaw, S. (2012). Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci*, 15(5), 700-702. <https://doi.org/10.1038/nn.3079>
- Li, K., Figarella, K., Su, X., Kovalchuk, Y., Gorzolka, J., Neher, J. J., Mojtahedi, N., Casadei, N., Hedrich, U. B. S., & Garaschuk, O. (2023). Endogenous but not sensory-driven activity controls migration, morphogenesis and survival of adult-born juxtglomerular neurons in the mouse olfactory bulb. *Cell Mol Life Sci*, 80(4), 98. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04753-4>
- Li, W. L., Chu, M. W., Wu, A., Suzuki, Y., Imayoshi, I., & Komiyama, T. (2018). Adult-born neurons facilitate olfactory bulb pattern separation during task engagement. *Elife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.33006>
- Liang, Y., Li, K., Riecken, K., Maslyukov, A., Gomez-Nicola, D., Kovalchuk, Y., Fehse, B., & Garaschuk, O. (2016). Long-term in vivo single-cell tracking reveals the switch of migration patterns in adult-born juxtglomerular cells of the mouse olfactory bulb. *Cell Res*, 26(7), 805-821. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.55>
- Libbrecht, S., Van den Haute, C., Welkenhuysen, M., Braeken, D., Haesler, S., & Baekelandt, V. (2021). Chronic chemogenetic stimulation of the anterior olfactory nucleus reduces newborn neuron survival in the adult

Literaturverzeichnis

- mouse olfactory bulb. *J Neurochem*, 158(5), 1186-1198.
<https://doi.org/10.1111/jnc.15486>
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018820>
- Lin, C. W., Sim, S., Ainsworth, A., Okada, M., Kelsch, W., & Lois, C. (2010). Genetically increased cell-intrinsic excitability enhances neuronal integration into adult brain circuits. *Neuron*, 65(1), 32-39.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.001>
- Liu, X., Bolteus, A. J., Balkin, D. M., Henschel, O., & Bordey, A. (2006). GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia*, 54(5), 394-410. <https://doi.org/10.1002/glia.20392>
- Liu, X. S., Chopp, M., Zhang, X. G., Zhang, R. L., Buller, B., Hozeska-Solgot, A., Gregg, S. R., & Zhang, Z. G. (2009). Gene profiles and electrophysiology of doublecortin-expressing cells in the subventricular zone after ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(2), 297-307.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.119>
- Livneh, Y., Feinstein, N., Klein, M., & Mizrahi, A. (2009). Sensory input enhances synaptogenesis of adult-born neurons. *J Neurosci*, 29(1), 86-97. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4105-08.2009>
- Livneh, Y., & Mizrahi, A. (2011). Experience-dependent plasticity of mature adult-born neurons. *Nat Neurosci*, 15(1), 26-28.
<https://doi.org/10.1038/nn.2980>
- Lledo, P. M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, 7(3), 179-193.
<https://doi.org/10.1038/nrn1867>
- Lledo, P. M., Merkle, F. T., & Alvarez-Buylla, A. (2008). Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci*, 31(8), 392-400.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.05.006>
- Llorente, V., Velarde, P., Desco, M., & Gómez-Gaviro, M. V. (2022). Current Understanding of the Neural Stem Cell Niches. *Cells*, 11(19).
<https://doi.org/10.3390/cells11193002>
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5), 2074-2077.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.2074>
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145-1148.
<https://doi.org/10.1126/science.8178174>
- Lois, C., & Kelsch, W. (2014). Adult neurogenesis and its promise as a hope for brain repair [Opinion]. *Frontiers in Neuroscience*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00165>

Literaturverzeichnis

- Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron*, 35(4), 605-623. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00828-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00828-0)
- Loras, A., Gonzalez-Bonet, L. G., Gutierrez-Arroyo, J. L., Martinez-Cadenas, C., & Marques-Torrejon, M. A. (2023). Neural Stem Cells as Potential Glioblastoma Cells of Origin. *Life (Basel)*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/life13040905>
- Lucassen, P. J., Fitzsimons, C. P., Salta, E., & Maletic-Savatic, M. (2020). Adult neurogenesis, human after all (again): Classic, optimized, and future approaches. *Behavioural Brain Research*, 381, 112458. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112458>
- Luhmann, H. J., Sinning, A., Yang, J.-W., Reyes-Puerta, V., Stüttgen, M. C., Kirischuk, S., & Kilb, W. (2016). Spontaneous Neuronal Activity in Developing Neocortical Networks: From Single Cells to Large-Scale Interactions [Review]. *Frontiers in Neural Circuits*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2016.00040>
- Luskin, M. B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11(1), 173-189. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90281-u](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90281-u)
- Magavi, S. S., Leavitt, B. R., & Macklis, J. D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, 405(6789), 951-955. <https://doi.org/10.1038/35016083>
- Mary, C. W., & Charles, A. G. (2007). Synaptic Integration of Adult-Generated Olfactory Bulb Granule Cells: Basal Axodendritic Centrifugal Input Precedes Apical Dendrodendritic Local Circuits. *The Journal of Neuroscience*, 27(37), 9951. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1633-07.2007>
- Masato, S., Naoko, K., Hiroyuki, I., Hiroaki, W., Yasuko, K., Yuchio, Y., Kazuto, K., Tomomi, N., Junichi, N., & Kazunobu, S. (2011). Sensory Input Regulates Spatial and Subtype-Specific Patterns of Neuronal Turnover in the Adult Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience*, 31(32), 11587. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0614-11.2011>
- Maslyukov, A., Li, K., Su, X., Kovalchuk, Y., & Garaschuk, O. (2018). Spontaneous calcium transients in the immature adult-born neurons of the olfactory bulb. *Cell Calcium*, 74, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.06.001>
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(8), 599-609. <https://doi.org/10.1038/35085068>
- McCoy, M., Jayanthi, S., & Cadet, J. L. (2021). Potassium Channels and Their Potential Roles in Substance Use Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1249. <https://doi.org/10.3390/ijms22031249>

Literaturverzeichnis

- Merkle, F. T., Fuentealba, L. C., Sanders, T. A., Magno, L., Kessar, N., & Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nature Neuroscience*, *17*(2), 207-214. <https://doi.org/10.1038/nn.3610>
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, *317*(5836), 381-384. <https://doi.org/10.1126/science.1144914>
- Merz, K., Herold, S., & Lie, D. C. (2011). CREB in adult neurogenesis--master and partner in the development of adult-born neurons? *Eur J Neurosci*, *33*(6), 1078-1086. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07606.x>
- Ming, G. L., & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, *28*, 223-250. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459>
- Mizrahi, A. (2007). Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci*, *10*(4), 444-452. <https://doi.org/10.1038/nn1875>
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G., & Goodman, R. H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(18), 6682-6686. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.18.6682>
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., & Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med*, *25*(4), 554-560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
- Mori, K. (1987). Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Prog Neurobiol*, *29*(3), 275-320. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(87\)90024-4](https://doi.org/10.1016/0301-0082(87)90024-4)
- Mouret, A., Gheusi, G., Gabellec, M. M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J. C., & Lledo, P. M. (2008). Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci*, *28*(45), 11511-11516. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2954-08.2008>
- Mukherjee, D., & Kanold, P. O. (2022). Changing subplate circuits: Early activity dependent circuit plasticity. *Front Cell Neurosci*, *16*, 1067365. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.1067365>
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits [Review]. *Frontiers in Neural Circuits*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2014.00098>
- Nathan, E. S., Kinzie, J. M., Yoshinori, S., Thomas, P. S., & Gary, L. W. (1998). Dendrodendritic Inhibition in the Olfactory Bulb Is Driven by NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, *18*(17), 6790. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-17-06790.1998>

Literaturverzeichnis

- Niklison-Chirou, M. V., Agostini, M., Amelio, I., & Melino, G. (2020). Regulation of Adult Neurogenesis in Mammalian Brain. *Int J Mol Sci*, 21(14). <https://doi.org/10.3390/ijms21144869>
- Parolisi, R., Cozzi, B., & Bonfanti, L. (2018). Humans and Dolphins: Decline and Fall of Adult Neurogenesis [Mini Review]. *Frontiers in Neuroscience*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00497>
- Patel, R. M., & Pinto, J. M. (2014). Olfaction: anatomy, physiology, and disease. *Clin Anat*, 27(1), 54-60. <https://doi.org/10.1002/ca.22338>
- Penn, A. A., & Shatz, C. J. (1999). Brain waves and brain wiring: the role of endogenous and sensory-driven neural activity in development. *Pediatr Res*, 45(4 Pt 1), 447-458. <https://doi.org/10.1203/00006450-199904010-00001>
- Petreanu, L., & Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*, 22(14), 6106-6113. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-14-06106.2002>
- Plaster, N. M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canún, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M. R., Iannaccone, S. T., Brunt, E., Barohn, R., Clark, J., Deymeer, F., George, A. L., Jr., Fish, F. A., Hahn, A., Nitu, A., Ozdemir, C., Serdaroglu, P., Subramony, S. H., . . . Ptáček, L. J. (2001). Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell*, 105(4), 511-519. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00342-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00342-7)
- Platel, J. C., Angelova, A., Bugeon, S., Wallace, J., Ganay, T., Chudotvorova, I., Deloulme, J. C., Béclin, C., Tiveron, M. C., Coré, N., Murthy, V. N., & Cremer, H. (2019). Neuronal integration in the adult mouse olfactory bulb is a non-selective addition process. *Elife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.44830>
- Price, J. L., & Powell, T. P. (1970). The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci*, 7(1), 91-123. <https://doi.org/10.1242/jcs.7.1.91>
- Puderbaugh, M., & Emmady, P. D. (2023). Neuroplasticity. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
- Rall, W., & Shepherd, G. M. (1968). Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*, 31(6), 884-915. <https://doi.org/10.1152/jn.1968.31.6.884>
- Ramón y Cajal, S. (1913). Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso. *Madrid: Imprenta de Hijos de Nicolás Moya*.
- Ranjan, R., Logette, E., Marani, M., Herzog, M., Tâche, V., Scantamburlo, E., Buchillier, V., & Markram, H. (2019). A Kinetic Map of the Homomeric Voltage-Gated Potassium Channel (Kv) Family [Original Research]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00358>

Literaturverzeichnis

- Rocheffort, C., Gheusi, G., Vincent, J. D., & Lledo, P. M. (2002). Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci*, *22*(7), 2679-2689. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-07-02679.2002>
- Saghatelian, A., Roux, P., Migliore, M., Rocheffort, C., Desmaisons, D., Charneau, P., Shepherd, G. M., & Lledo, P. M. (2005). Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation. *Neuron*, *46*(1), 103-116. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.02.016>
- Sakamoto, K., Karelina, K., & Obrietan, K. (2011). CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem*, *116*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07080.x>
- Salpietro, V., & Houlden, H. (2020). Genetic epilepsies and the K(v) superfamily. *Eur J Paediatr Neurol*, *24*, 5-6. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2020.01.013>
- Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R. A., Mirzadeh, Z., Tsai, H. H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M. S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J. M., Rowitch, D. H., & Alvarez-Buylla, A. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, *478*(7369), 382-386. <https://doi.org/10.1038/nature10487>
- Schaarschmidt, G., Wegner, F., Schwarz, S. C., Schmidt, H., & Schwarz, J. (2009). Characterization of voltage-gated potassium channels in human neural progenitor cells. *PLoS One*, *4*(7), e6168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006168>
- Shah, N. H., & Aizenman, E. (2014). Voltage-Gated Potassium Channels at the Crossroads of Neuronal Function, Ischemic Tolerance, and Neurodegeneration. *Translational Stroke Research*, *5*(1), 38-58. <https://doi.org/10.1007/s12975-013-0297-7>
- Sheng, M. (2001). Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(13), 7058-7061. <https://doi.org/10.1073/pnas.111146298>
- Shepherd, G. M., Chen, W. R., Willhite, D., Migliore, M., & Greer, C. A. (2007). The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Res Rev*, *55*(2), 373-382. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.03.005>
- Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, *87*(4), 387-406.
- Shors, T. J., Anderson, M. L., Curlik, D. M., 2nd, & Nokia, M. S. (2012). Use it or lose it: how neurogenesis keeps the brain fit for learning. *Behav Brain Res*, *227*(2), 450-458. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.023>
- Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., & Cameron, H. A. (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and

Literaturverzeichnis

- depressive behaviour. *Nature*, 476(7361), 458-461.
<https://doi.org/10.1038/nature10287>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377-381.
<https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444(7120), 707-712. <https://doi.org/10.1038/nature05300>
- Stahnisch, F. W., & Nitsch, R. (2002). Santiago Ramón y Cajal's concept of neuronal plasticity: the ambiguity lives on. *Trends Neurosci*, 25(11), 589-591. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02251-8](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02251-8)
- Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., & Konnerth, A. (2003). In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(12), 7319-7324. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232232100>
- Südhof, T. C., & Jahn, R. (1991). Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron*, 6(5), 665-677.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90165-v](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90165-v)
- Sultan, S., Mandairon, N., Kermen, F., Garcia, S., Sacquet, J., & Didier, A. (2010). Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory. *Faseb j*, 24(7), 2355-2363.
<https://doi.org/10.1096/fj.09-151456>
- Swayne, L. A., & Wicki-Stordeur, L. (2012). Ion channels in postnatal neurogenesis: potential targets for brain repair. *Channels (Austin)*, 6(2), 69-74. <https://doi.org/10.4161/chan.19721>
- Syrbe, S., Hedrich, U. B. S., Riesch, E., Djémié, T., Müller, S., Møller, R. S., Maher, B., Hernandez-Hernandez, L., Synofzik, M., Caglayan, H. S., Arslan, M., Serratos, J. M., Nothnagel, M., May, P., Krause, R., Löffler, H., Detert, K., Dorn, T., Vogt, H., . . . Lemke, J. R. (2015). De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat Genet*, 47(4), 393-399. <https://doi.org/10.1038/ng.3239>
- Takahashi, H., Yoshihara, S., & Tsuboi, A. (2018). The Functional Role of Olfactory Bulb Granule Cell Subtypes Derived From Embryonic and Postnatal Neurogenesis [Review]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00229>
- Trimmer, James S. (2015). Subcellular Localization of K⁺ Channels in Mammalian Brain Neurons: Remarkable Precision in the Midst of Extraordinary Complexity. *Neuron*, 85(2), 238-256.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.042>
- Veronica, E., Karel, S., & Zachary, F. M. (2005). Dendrodendritic Synaptic Signals in Olfactory Bulb Granule Cells: Local Spine Boost and Global

- Low-Threshold Spike. *The Journal of Neuroscience*, 25(14), 3521.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4746-04.2005>
- Villa, C., & Combi, R. (2016). Potassium Channels and Human Epileptic Phenotypes: An Updated Overview. *Front Cell Neurosci*, 10, 81.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00081>
- Vincent, B.-P., Morgane, L., Modesto, R. P., III, & Armen, S. (2009). Interneurons Produced in Adulthood Are Required for the Normal Functioning of the Olfactory Bulb Network and for the Execution of Selected Olfactory Behaviors. *The Journal of Neuroscience*, 29(48), 15245. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3606-09.2009>
- Vo, N., & Goodman, R. H. (2001). CREB-binding Protein and p300 in Transcriptional Regulation *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 13505-13508. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000025200>
- von Bohlen Und Halbach, O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 329(3), 409-420.
<https://doi.org/10.1007/s00441-007-0432-4>
- Walker, T. L., Yasuda, T., Adams, D. J., & Bartlett, P. F. (2007). The doublecortin-expressing population in the developing and adult brain contains multipotential precursors in addition to neuronal-lineage cells. *J Neurosci*, 27(14), 3734-3742. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5060-06.2007>
- Walsh, K. B. (2020). Screening Technologies for Inward Rectifier Potassium Channels: Discovery of New Blockers and Activators. *SLAS Discovery*, 25(5), 420-433. <https://doi.org/10.1177/2472555220905558>
- Wang, D. D., Krueger, D. D., & Bordey, A. (2003). Biophysical properties and ionic signature of neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone in situ. *J Neurophysiol*, 90(4), 2291-2302.
<https://doi.org/10.1152/jn.01116.2002>
- Warm, D., Bassetti, D., Schroer, J., Luhmann, H. J., & Sinning, A. (2022). Spontaneous Activity Predicts Survival of Developing Cortical Neurons. *Front Cell Dev Biol*, 10, 937761.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.937761>
- Weissman, T. A., Riquelme, P. A., Ivic, L., Flint, A. C., & Kriegstein, A. R. (2004). Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, 43(5), 647-661.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.015>
- West, A. E., & Greenberg, M. E. (2011). Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005744>
- Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2007). Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *J Neurosci*, 27(37), 9951-9961.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.1633-07.2007>

Literaturverzeichnis

- Winner, B., Cooper-Kuhn, C. M., Aigner, R., Winkler, J., & Kuhn, H. G. (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, *16*(9), 1681-1689. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02238.x>
- Winner, B., & Winkler, J. (2015). Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*(4), a021287. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021287>
- Woolf, T. B., Shepherd, G. M., & Greer, C. A. (1991). Local information processing in dendritic trees: subsets of spines in granule cells of the mammalian olfactory bulb. *J Neurosci*, *11*(6), 1837-1854. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.11-06-01837.1991>
- Xue, M., Atallah, B. V., & Scanziani, M. (2014). Equalizing excitation-inhibition ratios across visual cortical neurons. *Nature*, *511*(7511), 596-600. <https://doi.org/10.1038/nature13321>
- Xue, Z. C., Wang, C., Wang, Q. W., & Zhang, J. F. (2015). CREB-regulated transcription coactivator 1: important roles in neurodegenerative disorders. *Sheng Li Xue Bao*, *67*(2), 155-162.
- Yamaguchi, M., & Mori, K. (2005). Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(27), 9697-9702. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406082102>
- Yasuda, T., & Adams, D. J. (2010). Physiological roles of ion channels in adult neural stem cells and their progeny. *J Neurochem*, *114*(4), 946-959. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06822.x>
- Yu, C. R., Power, J., Barnea, G., O'Donnell, S., Brown, H. E., Osborne, J., Axel, R., & Gogos, J. A. (2004). Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron*, *42*(4), 553-566. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00224-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00224-7)
- Zhang, L. I., & Poo, M. M. (2001). Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci*, *4 Suppl*, 1207-1214. <https://doi.org/10.1038/nn753>
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, *132*(4), 645-660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>

7. Veröffentlichungen

Inhalte der folgenden Dissertationsarbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht.

Li K, Figarella K, Su X, Kovalchuk Y, Gorzolka J, Neher JJ, Mojtahedi N, Casadei N, Hedrich UBS, Garaschuk O.

Endogenous but not sensory-driven activity controls migration, morphogenesis and survival of adult-born juxtglomerular neurons in the mouse olfactory bulb.

Cell Mol Life Sci. 2023 Mar 18;80(4):98. doi: 10.1007/s00018-023-04753-4. PMID: 36932186; PMCID: PMC10023654.

Die oben genannte Veröffentlichung steht unter der „Creative Commons Attribution 3.0 International License“. Diese erlaubt die Umgestaltung, Anpassen und die Weiterverbreitung in jedem Medium, vorausgesetzt, dass dem ursprünglichen Autor/ der ursprünglichen Autorin und der Publikationsquelle eine angemessene Anerkennung zugesprochen wird, Änderungen angegeben werden und der untenstehende Link zur Lizenz aufgeführt wird.

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Physiologie, Abteilung für Neurophysiologie, an der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Olga Garaschuk durchgeführt.

Die Konzeption der vorliegenden Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Olga Garaschuk (Leiterin der Abteilung für Neurophysiologie).

Nach der Entnahme der Gehirne aus den Mäusen erfolgten sämtliche Versuche wie die Erstellung der Gefrierschnitte, die Anfertigung immunhistochemischer Färbungen (mit Ausnahme der pCREB-NeuN-Twitch-2B Dreifachfärbung an DPI 10), die Erstellung von 2-Photonen-Laserbildern, die Analyse und Auswertung der Versuche eigenständig durch mich (nach Einarbeitung durch Dr. Yury Kovalchuk, Dr. Kaizhen Li, Dr. Xin Su, Elizabeta Zirdum and Andrea Weible).

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Kaizhen Li und Dr. Nima Mojtahedi durch mich.

Die vorgeschalteten Arbeitsschritte aus den Kapiteln 2.2.2 - 2.2.4 wurden durch Dr. Kaizhen Li durchgeführt.

Das Matlab-Analyseverfahren zur Messung der Kv1.2-Expression erfolgte durch einen individuell entwickelten Matlab-Code erstellt durch Dr. Nima Mojtahedi.

Die Abbildung 4 wurde durch Dr. Xin Su erstellt.

Die Abbildungen 1 und 2 wurden in Zusammenarbeit mit Martin Gorzolka erstellt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

9. Danksagung

Seite 106 enthält persönliche Daten. Daher ist sie nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

10. Lebenslauf

Seite 107 enthält persönliche Daten. Daher ist sie nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.