

Mannheim Center for Translational Neurosciences (MCTN)
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Institut für Neuroanatomie
(Direktor: Prof. Dr. med. Christian Schultz)

Analyse der Aktivität des neuronalen Netzwerks mit Glioblastoma multiforme

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Michael Günther Bock

aus
Boppard
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Christian Schultz

Offenlegung teilpublizierter Inhalte

Die wesentlichen methodischen Ergebnisse in Form der Etablierung von organotypischen Kulturen aus dem Hippocampus der Maus von bis zu 21 Tagen wurden bereits veröffentlicht in:

Christian Thome^{1,2,3}, Jan Maximilian Janssen^{1,4}, Seda Karabulut⁴, Claudio Acuna⁵, Elisa D'Este⁶, Konrad Baum¹, **Michael Bock**⁴, Nadja Lehmann⁴, Masashi Hasegawa⁷, Dan Alin Ganea⁸, Chloé Maëlle Benoit^{7,8}, Jan Gründemann^{7,8}, Christian Schultz⁴, Vann Bennett⁹, Paul M. Jenkins^{10*}, Maren Engelhardt^{1,4*}: Live imaging of excitable axonal microdomains in ankyrin-G-GFP mice: publiziert in *eLife* am 27.06.2023: doi:<https://doi.org/10.1101/2023.02.01.525891>

Die Ergebnisse der hippocampalen Entwicklungsreihe (abgebildet in Fig. 8 der Veröffentlichung) bildeten die Grundlage für die weiteren Experimente dieser Arbeit und unterstützen die These, dass neuronale Netzwerke strukturell in organotypischen Kulturen erhalten bleiben.

Der Autor der vorliegenden Arbeit, Michael Bock, konzipierte die Studie, die Protokolle, sowie die Kultivierung von organotypischen Kulturen, führte die Experimente, die Datenerfassung und -analyse durch und erstellte alle grafischen Darstellungen der Daten dieser Arbeit. Folgenden Mitarbeiter:innen ist der Autor für ihre Mithilfe zu Dank verpflichtet:

Nadja Lehmann, Mannheim Center for Translational Neurosciences (MCTN), Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg, Deutschland, führte teilweise die elektrophysiologischen Messungen und die zugehörige Datenanalyse durch.

Alle Herausgeber erteilten die Genehmigung zur Verwendung einiger der Abbildungen dieser Arbeit, insb. in der Einleitung. Wurde das Material aus einer anderen Publikation entnommen, so ist dies durch die Angabe "modifiziert nach" in in den einzelnen Abbildungslegenden gekennzeichnet.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Glioblastoma multiforme	4
1.1.1 Diagnostik und makroskopische Darstellung	5
1.1.2 Risikofaktoren und Pathogenese	7
1.1.3 Das funktionelle Tumornetzwerk	10
1.2 Das Axoninitialsegment	17
1.2.1 Molekularer Aufbau des AIS	18
1.2.2 Ionenkanäle am AIS	20
1.2.3 Plastizität des AIS	21
1.3 Die Gewebekulturen	25
1.3.1 Organotypische Schnittkulturen	25
1.4 Der Hippocampus	27
1.4.1 Struktur und Funktion der Hippocampusfraktion	27
1.5 Zielsetzung	29
2 MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 Gewebe	31
2.1.1 Humanes Gewebe	31
2.1.2 Mäuse	31
2.2 Präparation und Kultivierung der organotypischen Kulturen	32
2.3 Tumorimplantation	34
2.4 Immunfluoreszenz und Bilderfassung	35
2.4.1 Immunfärbungen der humanen Glioblastomschnitte	35
2.4.2 Immunfärbungen der OTC	35
2.4.3 Bilderfassung	39
2.5 Elektrophysiologie	40
2.6 Analyse und Statistik	42
2.6.1 Morphologische Analyse	42

2.6.2	Elektrophysiologische Analyse	44
2.6.3	Statistik	44
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Neuronale Strukturen in humanen Tumorresektaten	46
3.1.1	Fixierung und Färbung humaner Resektate	47
3.1.2	AIS-Vergleiche in humanen Geweberesektaten zeigten keine Unterschiede	49
3.2	Neuronale Plastizität in organotypischen Kulturen.....	50
3.2.1	Fixierung und Färbung der OTC	51
3.2.2	Die Entwicklung des AIS im Hippocampus der organotypischen Kultur	54
3.3	Der Einfluss von Glioblastomzellen auf die AIS-Plastizität in OTC	57
3.3.1	Humane Glioblastomzellen infiltrieren OTC und bilden TMs aus.....	57
3.3.2	AIS-Längenentwicklung ist in Tumor-OTC ähnlich zur Entwicklung in Kontroll-OTC.....	59
3.3.3	AIS werden unter Tumorwachstum länger.....	63
3.3.4	In Tumor-OTC bilden sich weniger Connexin 43 Kontakte am AIS aus	69
3.4	Der Einfluss von Glioblastomzellen auf elektrophysiologische Eigenschaften der Neurone	76
3.4.1	Aktive und passive Eigenschaften blieben nach Tumorwachstum größtenteils unverändert.....	76
3.4.2	Vergleich der AIS-Längen in gepatchten OTC.....	80
4	DISKUSSION	83
4.1	Überlegungen zur Methodik und statistischen Auswertung	83
4.1.1	Das AIS als Mediator neuronaler Plastizität.....	83
4.1.2	Implementierung der Färbeprotokolle	85
4.1.3	Limitationen der Modelle.....	87
4.2	Morphologische Auswirkungen des Tumorwachstums	94
4.2.1	Plastizität des AIS innerhalb eines Netzwerks	94
4.2.2	Zusammenhang der Tumorgenese mit der Entwicklung neuronaler Netzwerke	96
4.3	Auswirkung des Glioblastoms auf elektrophysiologische Eigenschaften ..	100

4.3.1	Erhöhte Epileptogenität als klinisches Korrelat der Übererregbarkeit	100
4.3.2	Die Rolle von Cx43 als Mediator modulierter Netzwerkaktivität.....	103
4.4	FAZIT.....	105
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	107
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	111
7	ANHANG.....	130
7.1	Equipment.....	130
7.2	Software.....	132
7.3	Individuelle statistische Resultate	133
8	LEBENS LAUF	142
9	DANKSAGUNG.....	143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
AcD	axon-carrying dendrite (Axon tragender Dendrit)
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AIS	Axoninitialsegment
AnkG	Ankyrin G
AP	Aktionspotential
CA	cornu ammonis
CAM	cell-adhesion molecule (Zelladhäsionsmolekül)
ch	chicken (Huhn)
CO	cisternale Organelle
CT	Computertomographie
Cx43	Connexin 43 (Gap Junction Protein)
DG	dentate gyrus (Gyrus dentatus)
DIV	Days <i>in vitro</i> (Tage <i>in vitro</i>)
EGFR	epidermal growth-factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EPSCP	exzitatorische postsynaptische Potentiale
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GABA A-R	GABA A-Rezeptor
GBM	Glioblastoma multiforme
gp	guinea pig (Meerschweinchen)
gt	goat (Ziege)
GWAS	genomweite Assoziationsstudien
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis in Joule/kg)
h	hour/s (Stunden)
ICW	intracellular calciumwave (intrazelluläre Kalziumwelle)
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IPSC	inhibitorische postsynaptische Potentiale
kDa	Kilo-Dalton (Einheit der atomaren Masse)
KV	voltage-gated (spannungsgesteuerte) Kaliumkanäle
LTP	Long-term potentiation (Langzeitpotenzierung)
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
Min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	mouse (Maus)
mV	Milivolt
NA	numerische Apertur
NaV	voltage-gated (spannungsgesteuerte) Natriumkanäle

NGS	Neuron-gliomale Synapse
NLGN	Neuroligine
NSC	neuronal stem cell (neuronale Stammzelle)
OCT	optimal cutting temperature
OTC	organotypical slice culture (organotypische Kultur)
P	postpartale Tage
pA	Pikoampere
PFA	Paraformaldehyd
rat	Ratte
rb	rabbit (Kaninchen)
Rm	Membranwiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
ROI	region of interest (Interessensregion)
Rs	Serienwiderstände
S24	humane Glioblastomzelllinie
SD	Standarddeviation (Standardabweichung)
SNP	single-nucleotid Polymorphism
SNT	"single neurite tracer"
TAM	Tumor assoziierte Makrophage
TM	Tumormicrotube (Tumor-Nanoröhrchen)
TMZ	Temozolomid
V	Volt
Wt	Wildtyp-Tiere
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
µl	microliter
µm	micrometer

1 EINLEITUNG

Das Astrozytom WHO-Grad IV, das sogenannte Glioblastoma multiforme (GBM), ist einer der häufigsten und gleichzeitig aggressivsten primären Hirntumore des Menschen. Mit einem mittleren Überleben nach Erstdiagnose von ca. 12-18 Monaten (Ostrom et al., 2014) bei stetigem Anstieg der Prävalenzen (Korja et al., 2019) gerät diese Tumorentität zunehmend in den Fokus der Forschung. Trotz stetigen Weiterentwicklungen der modernen Medizin, kennzeichnet das Glioblastom noch heute eine besonders hohe Chemo- und Strahlentherapieresistenz (Wick et al., 2018). In den vergangenen Jahren rückte daher ein besonderer Forschungsansatz vermehrt in den Fokus: die sogenannte „Cancer-Neuroscience“ (Krebs-Neurowissenschaften), die auf Erkenntnissen darüber beruht, dass Tumorzellen untereinander ein funktionelles neuronales Netzwerk ausbilden und zudem nicht nur in Kontakt miteinander stehen, sondern auch Verbindungen mit Neuronen bilden. Nachdem bereits in den 1930er Jahren der Neuropathologe Scherer die auffallende Gruppierung von Gliomzellen um Neurone herum beschrieben hatte (Scherer, 1938), zeigen mittlerweile eine Vielzahl von Studien, dass diese funktionellen Verbindungen der vermutlich bedeutendste Resistenzmechanismus des Glioblastoms gegen zytotoxische Therapiemaßnahmen darstellt (Jung et al., 2019; Osswald et al., 2015). Es konnte beobachtet werden, dass die Kommunikation der Tumore mit dem Nervensystem eine wachstumsfördernde und stabilisierende Mikroumgebung gewährleistet und zusätzlich über gegenseitige Feedbackmechanismen die Erregbarkeit des umgebenden neuronalen Netzwerks zu Gunsten einer erhöhten Invasivität, Progression und Resistenz des Tumors beeinflusst. Die zugrundeliegenden Mechanismen beinhalten sowohl parakrine, als auch elektrische Signalübertragung (Venkataramani et al., 2019; Venkatesh et al., 2015). Genauere Mechanismen sind noch zu großen Teilen unverstanden.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist es, die Verbindungen und Einflüsse des Glioblastoms auf das neuronale Netzwerk zu untersuchen. Dabei wurde besonderer Fokus auf das Axoninitialsegment (AIS) gelegt, das als Aktionspotential Initiierungsstelle eine entscheidende Rolle in der Vermittlung neuronaler Signaltransmission einnimmt (Bender and Trussell, 2012; Engelhardt et al., 2019). Die Kommunikation zwischen Tumor und Nervensystem stellt ein vielversprechendes therapeutisches Ziel dar, weshalb wir einen Beitrag zum Verständnis der Interaktion

zwischen Glioblastom und Neuronen leisten wollen. Zunächst wurden die entsprechenden neuronalen Strukturen in einem humanen Tumorsektat einer neurochirurgischen Operation untersucht, um dann in einem geeigneten zellkulturbasierten Tiermodell, den sog. organotypischen Kulturen (OTC), genauere morphologische und elektrophysiologische Fragestellungen zu adressieren.

1.1 Glioblastoma multiforme

Gliome sind mit einer altersstandardisierten Inzidenz von ca. 6/100.000 Einwohner die häufigsten primären Hirntumore bei Erwachsenen (Crocetti et al., 2012; Larjavaara et al., 2007; Louis et al., 2016). Dabei sind Männer etwa 1,5-Mal häufiger betroffen als Frauen. Das GBM, sprich das Astrozytom WHO-Grad IV, macht laut des CBTRUS' Statistikreports zwischen 60-85% der astrozytären Tumore aus (Ostrom et al., 2014; Ostrom et al., 2020).

Das Glioblastom ist gekennzeichnet durch eine hohe mitotische Aktivität, Gefäßproliferation und Nekrosen (Omuro and DeAngelis, 2013). Insgesamt steigt die Inzidenz mit dem Alter und erreicht ihren Höhepunkt in der Altersgruppe von 75-84 Jahren (Ostrom et al., 2014). Mehrere Analysen hinsichtlich der Inzidenzrate von Gliomen im Zeitverlauf zeigen zumindest zwischen 1979 und 2008 eine relative Stabilität (Deltour et al., 2012; Hess et al., 2004; Wohrer et al., 2009).

Bei der Entität des GBM handelt es sich um eine diffuse Erkrankung des gesamten Gehirns mit massiver Proliferationssteigerung von Zellen glialen Ursprungs. Die aktuelle WHO-Klassifikation 2016 sortiert das Glioblastom anhand von histomorphologischen und molekulargenetischen Merkmalen in die Gruppe der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Tumore (Louis et al., 2016). Klinisch werden das primäre und sekundäre Glioblastom unterschieden. Primäre GBMs entstehen *de novo*, zumeist bei älteren Patienten ohne klinischen oder histologischen Nachweis einer weniger malignen Vorläuferläsion. Sekundäre GBMs entstehen aus Gliomen niedrigeren Grades (Astrozytom Grad II und III) und betreffen vermehrt jüngere Patienten (Louis et al., 2016; Wick et al., 2018). Sie unterscheiden sich nicht nur durch ihren geringeren Nekrosegrad und ihre überwiegende Lokalisation im Frontallappen von den primären GBMs, sondern vor allem weichen sie hinsichtlich ihrer genetischen und epigenetischen Profile voneinander ab (Ohgaki and Kleihues, 2013). Beide Arten kennzeichnet eine sehr hohe Morbidität und Mortalität (Ostrom et

al., 2014). Im Allgemeinen sind weniger als 5% der Patienten 5 Jahre nach Erstdiagnose noch am Leben, wobei die mittlere Lebenserwartung nach Diagnose ca. 14 Monate beträgt (Hegi et al., 2005; Soomro et al., 2017; Stupp et al., 2010).

1.1.1 Diagnostik und makroskopische Darstellung

Die Symptome und das klinische Erscheinungsbild beim GBM sind stark variabel und primär abhängig von der Lokalisation der Tumormasse und der Funktion der jeweiligen Hirnregion, in die der Tumor hineinwächst und Kompressionen auslöst. Die Hauptsymptome sind Hirndruckzeichen, Wesensveränderungen, epileptische Anfälle und fokale neurologische Defizite mit sensomotorischen Lähmungen (Omuro and DeAngelis, 2013; Weller et al., 2017; Weller et al., 2015). Hemiparesen, Gangstörungen oder Gesichtsfeldeinschränkungen können dabei schon konkrete Hinweise auf die Lokalisation der Tumormasse geben (Omuro and DeAngelis, 2013). Zumeist bildet die Magnetresonanztomographie (MRT) die bildmorphologische Grundlage der Tumordiagnostik bei Verdacht. Insbesondere wenn Kontraindikationen für ein MRT bestehen (z.B. Metallimplantate oder Herzschrittmacher) erfolgt eine Computertomographie (CT). Maligne Gliome weisen typischerweise eine girlandenförmige Kontrastmittelanreicherung (Abb. 1, gelber Pfeil) der Tumordinfiltrationszone auf und können zentrale Nekrosen beinhalten. Besonders bei hochgradigen Gliomen findet sich zumeist auch ein perifokales Ödem mit T2-Gewichtung im MRT.

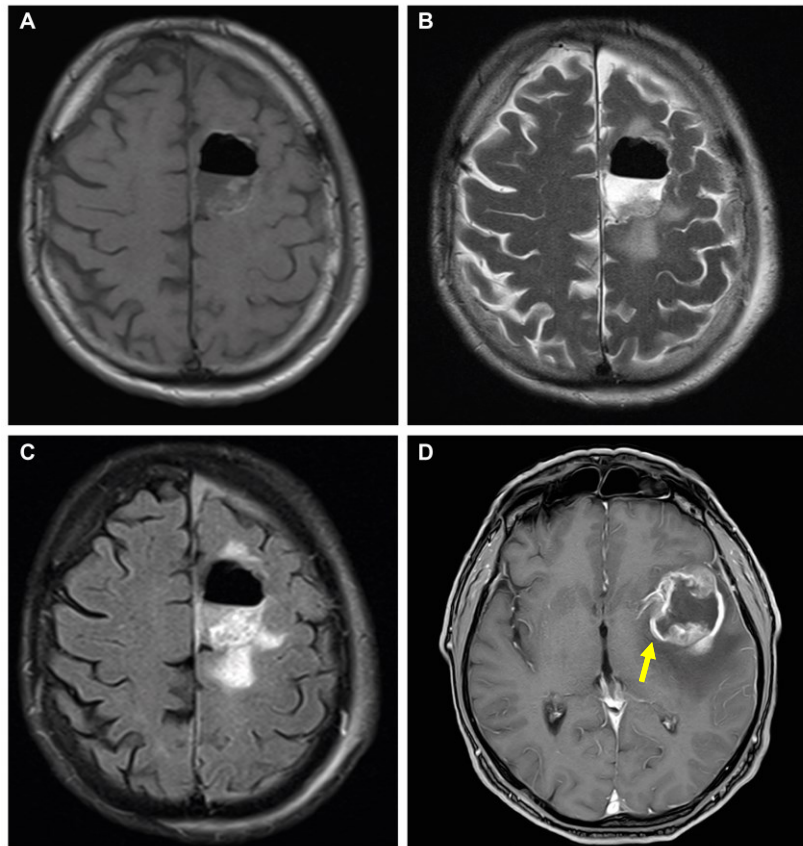


Abb. 1: Darstellung eines Glioblastoms in der radiologischen Diagnostik

Magnetresonanztomographische Untersuchung des Gehirnes zweier Patienten (Patient A: A-C; Patient B: D) mit einem Glioblastom im Cortex der linken Großhirnhemisphäre. Ein axiales T1-gewichtetes MRT ohne Kontrastmittel (**A**), das eine gut abgrenzbare Läsion mit zentraler Nekrose zeigt. Die T2-Aufnahme (**B**) zeigt deutlich eine zystisch/nekrotische zentrale Einschmelzung mit Spiegelbildung. In der FLAIR-Sequenz (**C**) ist zu sehen, dass hyperdense Areale über die Grenzen der zystischen Läsion hinaus reichen, was a.e. für ein peritumorales Ödem spricht. Die Gadolinium-Kontrastmittelinjektion in (**D**) bei einem Glioblastom eines anderen Patienten im linken Temporallappen zeigt die charakteristische randständige, girlandenförmige Kontrastmittelaufnahme der Glioblastome. Zur Verfügung gestellt von Dr. Miriam Ratliff, Institut für Neurochirurgie der Universitätsmedizin Mannheim.

Der Therapiestandard bei Verdacht auf ein malignes Gliom stellt in erster Linie die großzügige chirurgische Resektion dar. Einerseits mit dem Ziel die Tumormasse zu reduzieren und dadurch symptomatische Linderung zu verschaffen, andererseits um ausreichend Gewebe für die histologische, molekulare und genetische Tumorcharakterisierung zu gewinnen (Weller et al., 2017; Wick et al., 2017; Wick et al., 2018), die bezüglich weiterer Therapiemaßnahmen und der Prognose entscheidend ist. Das Ziel einer vollständigen makroskopischen Tumorsektion kann am ehesten mit Hilfe von intraoperativer Bildgebung (Senft et al., 2011) oder fluoreszenzgesteuerter Visualisierung durch 5-Aminolävulinsäure erreicht werden (Stummer et al., 2006). Die zusätzlich diffuse mikroskopische Invasion der

Tumornetzwerke erklärt die schlechte Prognose. Begleitend wird als Standard das Chemotherapeutikum Temozolomid aus der Klasse der Alkylantien verwendet (Louis et al., 2016).

1.1.2 Risikofaktoren und Pathogenese

Wie bei den meisten anderen Tumorpathogenesen wird auch bei Glioblastomen eine genetische Komponente vermutet (Shete et al., 2009; Sun et al., 2012). Allerdings konnten bisher noch keine Gliom-Risikovarianten mit hoher Penetranz identifiziert werden, sodass eine polygene Tumorgenese bisher als wahrscheinlich angenommen wird (de Andrade et al., 2001; Goodenberger and Jenkins, 2012). Um auf wenige dieser Mutationsorte einzugehen, seien die Signalwege von p53, TP53, IDH, PDGFRA, Retinoblastoma und verschiedene Varianten der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR) genannt (Alifieris and Trafalis, 2015; Ludwig and Kornblum, 2017). In den letzten Jahren werden zudem einige epidemiologische Risikofaktoren diskutiert. Dazu zählen vor allem die Exposition gegenüber ionisierender (Bondy et al., 2008) und mittlerweile auch nicht-ionisierender Strahlung (Barchana et al., 2012; Little et al., 2012), sowie das Vorliegen atopischer Erkrankungen und deren Therapien. Interessanterweise stellte eine große Meta-Analyse mit > 50.000 Probanden fest, dass allergische Erkrankungen das Gliomrisiko senken (Linos et al., 2007). Die Frage nach potenziellen molekularen Mediatoren dieses vermeintlich protektiven Faktors führte zum Immunglobulin E, zu verschiedenen Interleukinen und deren Rezeptoren (IL13, IL4, IL4-R etc.) (Sun et al., 2013; Wiemels et al., 2009) sowie zu CD25 (Schwartzbaum et al., 2010), einem Oberflächenmarker von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen. Den genauen Zusammenhang mit der Pathogenese der Gliome gilt es aber noch weiter zu untersuchen.

Bei der Suche nach Früherkennungsmarkern und damit verbundenen molekularen Mechanismen der Tumorgenese fällt der Blick schnell auf die Beobachtungen des belgischen Neuropathologen Scherer, der zytologische Merkmale von Gliomen beschrieben hat (Scherer, 1938). Dabei entdeckte er das Phänomen eines perineuralen Wachstums und stellte die Frage, ob Gliomzellen nur den Weg des geringsten Widerstandes entlang der Axone wählten, um in entfernte Hirnregionen vorzudringen oder ob sie tatsächlich aktiv an einer Signalbeziehung und damit einer

Netzwerkintegration in neuronale Schaltkreise involviert waren. Die neuronale Regulation von Krebszellen hat sich in den letzten Jahren als ein grundlegender Aspekt in der Biologie von Hirntumoren herausgestellt, sodass sich sogar eine eigene Forschungsrichtung, die sogenannte „Cancer-Neuroscience“ etabliert hat (Gibson et al., 2014; Monje et al., 2020). Schon lange ist bekannt, dass die Aktivität des Nervensystems die Koordinationsstelle der neuralen Stammzellentwicklung, ihrer Proliferation und Differenzierung, sowie der synaptischen Integrität und Plastizität darstellt (Deisseroth et al., 2004; Goodman and Shatz, 1993; LoTurco et al., 1995). Z.B. konnte per optogenetischer *in vivo* Studien (Gibson et al., 2014) gezeigt werden, dass neuronale Aktivität glutamaterge Projektionsneurone im prämotorischen Kortex neuronale und oligodendrozytäre Vorläuferzellen stimuliert, wodurch schlussendlich eine adaptorische Veränderung der Myelinstruktur erfolgte. Wenn neuronale Aktivität die Proliferation glialer Vorläuferzellen fördert, die als Ursprungszellen hochgradiger Gliome diskutiert werden, liegt die Hypothese nahe, dass auch Gliomzellen selbst auf neuronale Aktivität reagieren (Venkatesh et al., 2019b; Wirsching and Weller, 2020).

Erst vor circa 40 Jahren etablierte sich allmählich die Erkenntnis, dass sich Neurone nicht nur während der Embryonalzeit entwickeln können, sondern lebenslang ein kleiner Pool von neuronalen Stammzellen (NSCs) mit der Fähigkeit zur langfristigen Selbsterneuerung von Neuronen und Gliazellen durch asymmetrische Teilung von neuronalen Vorläuferzellen (NPCs; (Mattson, 2008)) persistiert, was allerdings auch kontrovers diskutiert wird (Lim and Alvarez-Buylla, 2016; Paton and Nottebohm, 1984). In adulten Säugetiergehirnen befinden sich die Mehrzahl der NSCs in der subventrikulären Zone (SVZ) der lateralen Liquorventrikel, jener Zone, in deren Nähe Glioblastome gehäuft auftreten (Larjavaara et al., 2007). Zusätzlich zu den Stamm- und Vorläuferzellen sind auch andere Zelltypen wie Astrozyten, Mikroglia, Makrophagen, sowie Bestandteile von extrazellulärer Matrix und Gefäßen Teil dieser Nischenkomplexe, um den Erhalt von Stammzeleigenschaften zu gewährleisten (Alvarez-Buylla et al., 2008). Diese Eigenschaften teilen sie sich mit Krebszellen (Hanahan and Coussens, 2012). Wie noch genauer erläutert wird, ist das Schicksal der NSCs bzw. NPCs von einer Reihe verschiedener Signalwege, welche durch Neurotransmitter, Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Zelladhäsionsmoleküle aktiviert werden, abhängig (Cameron et al., 1998; Guo et al., 2017; Mattson, 2008; Suzuki et al., 2006).

Eine spezielle Subpopulation von Zellen mit Stammzeleigenschaften und Oberflächenmarkerexpressionsprofilen, einschließlich Nestin und CD133, namens „brain tumor stem-like cells“ (BTSCs) wurden in Hirntumoren identifiziert (Galli et al., 2004; Muller Bark et al., 2020). Gemeinsam mit ihrer spezifischen Mikroumgebung von verschiedenen Wachstumsfaktoren, Neurotransmittern und Neurotrophen existieren Rückkopplungsschleifen mit verstärkter NSC-Proliferation bei Reduktion der Tumormasse (z.B. durch Bestrahlung), sodass eine Invasion zuvor inaktiver BTSCs aus der neurogenen Nische verstärkt wird (Jung et al., 2020; Kaur et al., 2014). Diesem Mechanismus liegt zugrunde, dass maligne Transformationen in Zellen mit Stammzellpotential bereits intrinsische anti-apoptotische und pro-mitotische Signalwege beherbergen (Lee et al., 2018). Voraussetzung für diese Regenerationsmechanismen ist ein gegebener Informationsaustausch und gemeinsame Signalwege zwischen Stammzellen, Vorläuferzellen, Tumorzellnetzwerk und neuronalem Netzwerk.

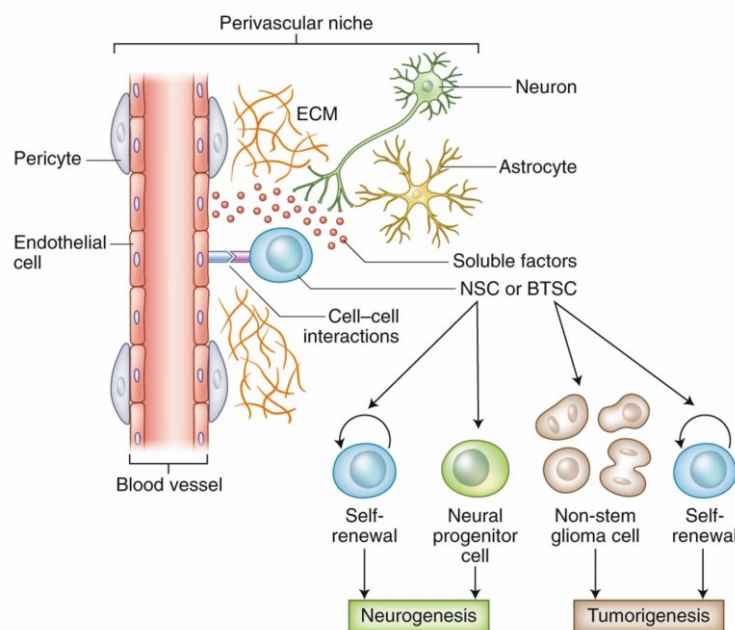


Abb. 2: Eine perivaskuläre Nische für neurale Stammzellen und BTSCs

Sowohl NSCs als auch BTSCs stehen über die perivaskuläre Nische in direkter Kommunikation mit bspw. Endothelzellen, Astrozyten, Neuronen und Perizyten. Ein spezielles Mikromillieu wird einerseits durch direkte Zell-Zell-Interaktionen und andererseits durch die Sekretion löslicher Faktoren (wie NO, Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter) bereitgestellt, wodurch die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften und eine Proliferationskontrolle möglich ist. Während die NSCs in der Neurogenese weiter differenzieren und z.B. NPCs bilden, bilden BTSCs in ähnlicher Weise schnell proliferierende Gliomzellen. Modifiziert nach *Jung et al. 2017* in *Nature Neuroscience*.

1.1.3 Das funktionelle Tumornetzwerk

1.1.3.1 Der Einfluss von Neurotransmittern

Es ist bekannt, dass die Neurogenese mitsamt Gliazellen und Mikroumgebung maßgeblich von Neurotransmitter-Signalen reguliert wird und nur durch korrekte Signalintegration korrekte Netzwerkintegration möglich ist (Platel et al., 2010). Viele Arbeiten konnten Dysregulationen in diesen Neurotransmitter-Signalwegen beim GBM feststellen. So korreliert z.B. die Expression von GABA_A-Rezeptor (GABA_A-R) invers mit dem Tumorgrad und damit der Proliferationsrate, da sie das Zellwachstum hemmen und somit GABA_A-R in GBMs auch deutlich weniger exprimiert werden (Smits et al., 2012). GABA wird u.a. von Neuroblasten und reifen Neuronen (Song et al., 2012) freigesetzt und wirkt über den GABA_A-R (Liu et al., 2005) auf NSCs depolarisierend (Labrakakis et al., 1998a). Über einen Chloridefflux und Calciuminflux wird die Proliferation von NSCs gedämpft, sodass mittlerweile von einer lokalen GABAergen Rückkopplung der Proliferation ausgegangen wird (Liu et al., 2005; Nguyen et al., 2003). Trotz des Fehlens von GABA_A-R werden im GBM GABA-bindende Proteine wie z.B. der Diazepam-bindende Inhibitor (DBI) hochreguliert, wodurch z.B. ein eigener GABA-unabhängiger Lipidstoffwechselweg aufrechterhalten wird (Alfonso et al., 2012). Neben GABA ist auch die zentrale Rolle von Glutamat in der Neurogenese, dem Neuritenwachstum und der Synaptogenese schon lange bekannt (Jansson and Akerman, 2014). Glutamat hemmt selektiv das Auswachsen von Dendriten, fördert aber gleichzeitig die Axogenese (Mattson, 2008). Ein Glutamatsignal kann über metabotrope, NMDA- und AMPA-Rezeptoren (Rao and Finkbeiner, 2007) zur Erhöhung des intrazellulären Calciums in neuronalen Vorläuferzellen führen und hat damit entscheidenden Einfluss auf Viabilität, Proliferation (Gallo et al., 1996), Plastizität (Wiltgen et al., 2010) und Differenzierung (Brazel et al., 2005; Platel et al., 2010). Diese Prozesse werden über Veränderungen der Membranerregbarkeit und der Zytoarchitektur infolge von Transkriptionsveränderungen in einer Vielzahl von Genen vermittelt (Mattson and Meffert, 2006). Durch den Calciuminflux induziert Glutamat eine schnelle Polymerisation von Aktin im Axon und hemmt die Tubulin-Polymerisation in Dendriten (Mattson, 2007; Savtchouk and Volterra, 2018). Ein anhaltender Anstieg von intrazellulärem Ca²⁺ infolge von z.B. vermehrter Aktivierung von Glutamatrezeptoren kann allerdings auch zur Depolymerisationen von Mikrofilamenten oder Mikrotubuli führen und damit eine sogenannte Exzitoxizität bewirken (Furukawa et al., 1995; Leal et al., 2014). Über postsynaptische Rezeptoren

beeinflusst Glutamat den Calciuminflux und somit schnelle Kinase- und Protease-vermittelte Signalkaskaden wodurch transkriptionsabhängige Wege aktiviert werden (Mattson, 2003, 2008).

Ähnlich wie in GABAergen Signalwegen verändern Dysregulationsmechanismen glutamaterge Signalwege, die zugunsten erhöhter Proliferation, Invasion und Migration vom GBM genutzt werden (de Groot and Sontheimer, 2011; Venkataramani et al., 2019). In Glioblastomen werden AMPA-Rezeptoren häufig ohne die spezielle GluR2-Untereinheit exprimiert (Ishiuchi et al., 2002), die für Impermeabilität von Ca^{2+} sorgt (Hollmann et al., 1991). Die Blockade von AMPA-Rezeptoren oder des Calciumeinstroms (Rzeski et al., 2002) wiederum konnte genauso wie die Reintegration der calciumpermeablen GluR2-Untereinheit das Gliomwachstum hemmen (Ishiuchi et al., 2002). Passend dazu stellte sich in einer Genexpressionsstudie eine verringerte Expression von GluR2 als Prädiktor für kürzeres Gesamtüberleben heraus (Colman et al., 2010). Zusätzlich zum parakrinen Einfluss anderer Vorläuferzellen, sezernieren Gliomzellen selbst Glutamat, sodass das Tumorwachstum sowohl über parakrine als auch autokrine Mechanismen gefördert wird (Ye and Sontheimer, 1999). Hinzu kommt, dass Gliomzellen wiederum Wachstumsfaktoren, die die Wirkung von Glutamat unterstützen können, sezernieren und dabei in direktem synaptischem Kontakt zum neuronalen Netzwerk stehen (Venkatesh et al., 2015).

Die Regulation und Expression von NMDA- und AMPA-Rezeptoren wird u.a. durch verschiedene Neurotrophine wie z.B. den basic fibroblast growth factor (bFGF; (Cheng and Mattson, 1994)), nerve growth factor (NGF; (Guo and Mattson, 2000)) oder brain-derived neurotrophic factor (BDNF; (Li et al., 2005; Marini et al., 1998)) per Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren vermittelt. Diese Tyrosinkinase-Rezeptoren dimerisieren und autophosphorylieren Tyrosinreste und setzen so einen spezifischen Signalkomplex für Wachstumsfaktoren in Gang, die dann wiederum die Empfindlichkeit gegenüber Glutamat verändern können (Cheng and Mattson, 1994) oder synaptische Endigungen und die mitochondriale Funktion stabilisieren (Guo and Mattson, 2000).

Wie Studien zur synaptischen Übertragung im murinen Hippocampus gezeigt haben, sind AMPA- und NMDA-Rezeptoren von grundlegender Bedeutung für eine aktivitätsinduzierte Stärkung der synaptischen Dichte und damit auch für den Prozess

der Langzeitpotenzierung (LTP; (Lisman, 2003)). Dabei ist allerdings zu beachten, dass die vielseitigen zellulären Adaptationen in Reaktion auf erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} in Abhängigkeit von der Frequenz der glutamatergen Stimulation sowohl zur langfristigen LTP, als auch zur Langzeitdepression (LTD) führen (Massey and Bashir, 2007) können. So kann es durch anhaltende Überstimulation zur Degeneration von postsynaptischen Spines kommen (Mattson, 2003).

Damit wird der Bogen zu einem weiteren potenziellen Einflussfaktor auf die Tumorprogression gespannt: Die neuronale Aktivität des peritumoralen Netzwerks (Gillespie and Monje, 2018).

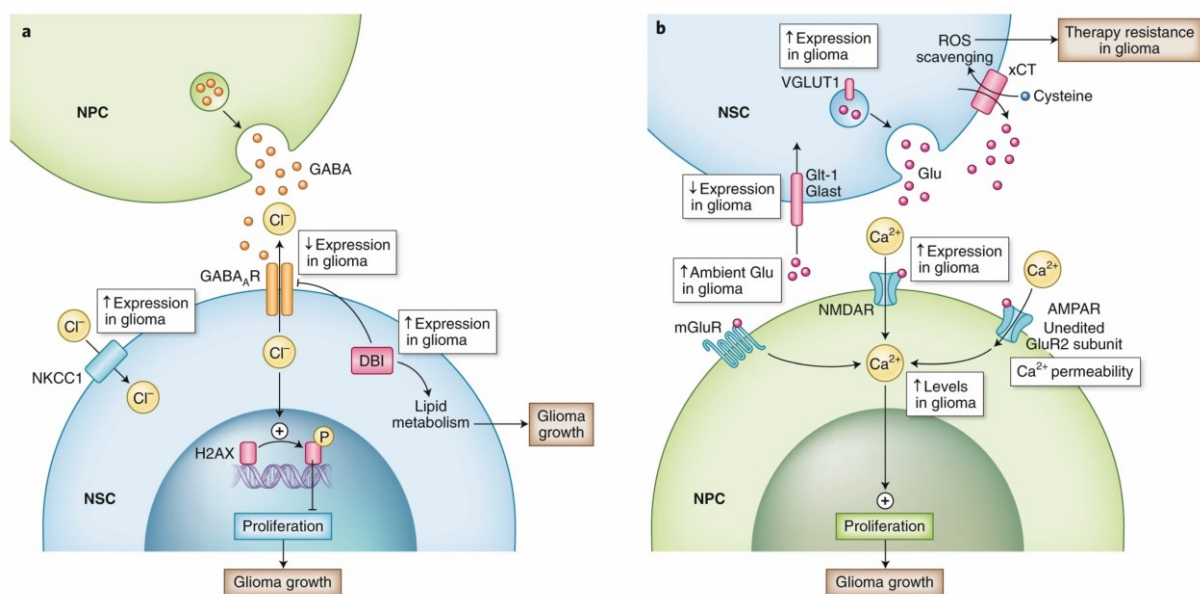


Abb. 3: Die Neurotransmitter-Signalübertragung in der neurogenen Nische bei Gliomen

A,B, Neurotransmitter-Signalübertragung in der Neurogenese und bei Gliomen. Die Illustration zeigt die Charakteristika in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen, aus denen sich auch BTSCs entwickeln können. Die mechanistischen Merkmale bei Gliomen sind in den weißen Kästen und die tumorbiologischen Folgen davon in den braunen Kästen hervorgehoben. **(A)** GABA-Signalübertragung. Die Expression des Natrium-Kalium-Chlorid-Co-Transporters (NKCC1) auf NSCs vermittelt die intrazelluläre Chloridakkumulation. Das von neuronalen Progenitorzellen (NPC) freigesetzte GABA wirkt auf ionotrope GABA_A-Rezeptoren, die wiederum einen Chlorid-Efflux und damit eine Depolarisation bewirken, sodass durch die Phosphorylierung von Histon H2AX die Proliferation hemmt und eine Rückkopplung bewirkt. GABA selbst wird durch DBI moduliert, indem die Signalübertragung am GABA_A-Rezeptor gehemmt wird. Im Gliom erfolgt durch Überexpression der NKCC1 und der damit verbundenen Hyperpolarisation in Zusammenhang mit einer Mindereexpression von GABA_A-Rezeptoren eine verminderte Phosphorylierung des H2AX-Histons und damit eine erhöhte Zellproliferation. **(B)** Glutamat-Signalübertragung. Sezerniertes Glutamat wirkt über NMDA-, metabotrope und AMPAR-Rezeptoren. Im Gliom ist die GluR2-Untereinheit Calcium-permeabel, sodass Proliferation gefördert wird. Extrazelluläres Glutamat kann über Glutamat-Cotransporter aufgenommen werden. Mittels Cystein-Antiport könnte ein weiterer Mechanismus zur Verfügung stehen, der zur zusätzlichen autokrinen und parakrinen Glutamat-Freisetzung beiträgt. Modifiziert nach Jung et al. 2017 in Nature Neuroscience.

1.1.3.2 Der Einfluss neuronaler Aktivität auf die Tumorgenese

Ein weiteres Indiz für die entscheidende Rolle durch Glutamat sowie anderer Neurotransmitter ausgelöster Effekte, stellt auch die erhöhte Epileptogenität von Gliompatienten dar (Buckingham et al., 2011; Campbell et al., 2012; Parent et al., 2002). Verursacht wird sie durch eine synchrone Erhöhung der elektrischen Netzwerkaktivität (Campbell et al.), die bishin zur Exzitotoxizität führen kann (Ye and Sontheimer, 1999). Unter Exzitotoxizität versteht man eine erhöhte Vulnerabilität von Neuronen aufgrund von übermäßiger glutamaterger Aktivierung insbesondere unter Bedingungen verringerter Energieverfügbarkeit und erhöhtem oxidativen Stress (Hazell, 2007; Mattson, 2003). Im Verlauf wird deutlich, dass auch der Zusammenhang zwischen peritumorale Netzwerkaktivität und der GBM-Progression eine entscheidende Rolle in der Entstehung bedeutender Resistenzmechanismen darstellt (Gillespie and Monje, 2018; Osswald et al., 2015). Vor allem, da je nach Spiegel der verschiedenen neurotrophen Faktoren wie NGF, BDNF oder bFGF ein Schutz vor Exzitotoxizität und Übererregung besteht. Bspw. kann BDNF über den Transkriptionsfaktor NF- κ B antioxidative Enzyme sowie anti-apoptische Proteine wie Bcl-2 induzieren (Cheng and Mattson, 1994; Pappas and Parnavelas, 1997). Die Gruppe um (Campbell et al., 2012) konnte durch extrazelluläre elektrophysiologische Ableitungen zeigen, dass bei tumortragenden Mäusen sowohl die Eintrittslatenz als auch die Häufigkeit von synchron verlaufenden Netzwerkaktivitäten erhöht war. Durch den Entzug von Mg^{2+} -Ionen aus dem Nährmedium der Hirnschnitte während Einzelzell-Ableitungen wurde die Blockierung von NMDA-Rezeptoren aufgehoben und epileptiforme Aktivitäten erzeugt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Glutamat nicht nur über autokrine und parakrine Mechanismen die eigene Progression fördern, sondern auch durch peritumorale Netzwerkaktivität verschiedenste Neurotrophine in die Mikroumgebung sezerniert wurden und dies eine Überregbarkeit des Netzwerks bewirkte (Buckingham et al., 2011; Campbell et al., 2012; Gibson et al., 2014). Auch klinisch ist festzustellen, dass Glioblastompatienten in bis zu 80% der Fälle an Krampfanfällen leiden können (Moots et al., 1995). Ein bedeutsames Bindeglied zwischen neuronaler Aktivität und Glioblastomprogression könnte die aktivitätsregulierte Sekretion von Neuroligin 3 (NLGN3) darstellen, zumal eine NLGN3-Überexpression ein potentieller Prognosemarker darstellt (Venkatesh and Monje, 2017; Venkatesh et al., 2017). Bei Neuroliginen handelt es sich um postsynaptische Adhäsionsmoleküle (Varoqueaux et al., 2006), die gekoppelt an präsynaptisches

Neurexin (Sudhof, 2008) vermutlich direkt am Expressionsverhalten von intrazellulären Wachstumsfaktoren beteiligt sind und damit auch synaptische Plastizität vermitteln (Venkatesh et al., 2017).

Zusammengenommen legt eine Fülle von Daten nahe, dass Neurotransmitter, Neuropeptide und die Netzwerkaktivität das Verhalten von Gliomzellen beeinflussen (Alfonso et al., 2017; Cuddapah et al., 2014; Robert and Sontheimer, 2014), wenn nicht sogar lenken.

1.1.3.3 Die Interkonnektivität des Tumornetzwerks

Wie auch bei Gliazellen finden sich zahlreiche elektrische Synapsen in Form von Gap Junctions zum direkten Ladungsaustausch an der Plasmamembran von Glioblastomzellen (Larson et al., 2018). Besonders die Arbeit von Osswald et al., 2015 konnte zeigen, wie bedeutsam diese Interkonnektivität zwischen Tumor und neuronalem Netzwerk für Tumorprogression, Therapieresistenz und Invasivität sind. Unter anderem prägte diese Arbeit ein neues Verständnis von der Etablierung der Gliome als diffuse Tumornetzwerke, die nicht nur eine solide Tumormasse mit zentralen Nekrosen bilden, sondern spinnennetzartig das gesamte ZNS durchziehen und sowohl miteinander über sogenannte Tumor-Nanoröhrchen (Tumormicrotubes, abgekürzt TMs), sondern auch mit Neuronen und Zellen der Mikroumgebung (z.B. Mikroglia) in direkter Verbindung stehen (Hong et al., 2015; Peinado, 2001). Wie Osswald et al. außerdem herausfanden, korrelierte die Häufigkeit und Länge der verbindenden TMs stark mit der Malignität des Glioms. Beim Glioblastom weisen 93% der TMs eine Länge zwischen 50-300 μm auf und wurden auch in der kontralateralen Hemisphäre identifiziert (Venkatesh and Monje, 2017). Zudem kommunizieren die in Verbindung stehenden Zellen mittels interzellulärer Kalziumwellen (ICWs) in multizellulären Netzwerken (Cornell-Bell et al., 1990). Die ICW Fortleitung innerhalb des TM-Netzwerks konnte durch Blockade der Gap Junctions inhibiert werden, wobei die Synchronizität selektiv in Gliomzellen, nicht aber in Astrozyten der getesteten Tumorregion, abnahm (Osswald et al., 2015). Es stellte sich heraus, dass Connexin 43 (Cx43) sowohl in IDH-mutierten, als auch Wildtyp-Glioblastomen hochreguliert wurde und besonders häufig an den TMs per Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Die Dichte der Immunreaktivität war dabei an TM-Kreuzungen besonders hoch (Osswald et al., 2015). Im Gesamten teilen sprossende Axone und TMs nicht nur morphologische Merkmale, sondern reagieren auch auf ähnliche

chemotaktische Signale und haben ähnliche molekulare Mechanismen, die an der Zellmigration beteiligt sind, wie z.B. Myosin II, Integrine, Adhärenzmoleküle und viele mehr (Devoto, 1990; Marin et al., 2010).

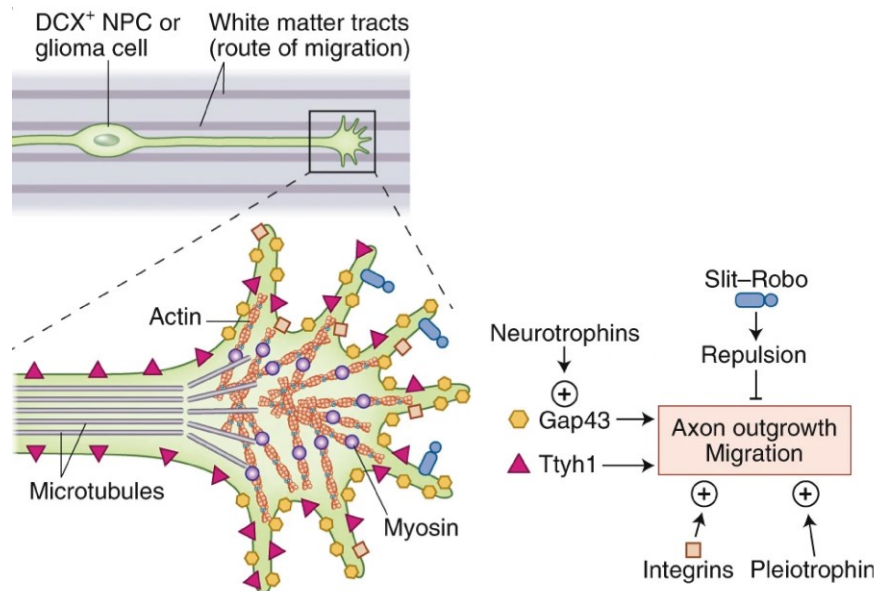


Abb. 4: Ähnlichkeit des Protrusionsverhaltens von NPCs und TMs von Gliomzellen

Das Migrationsverhalten von NPCs und auch Gliomzellen folgt ebenfalls den Regulationsmechanismen durch NKCC1 regulierten Chloridefflux und AMPA-Rezeptor-Aktivierung und calciumabhängige Proliferation. Ähnliche molekulare Mechanismen sind an der Bildung und Funktion von auswachsenden Axonen beteiligt wie auch zu zellulären Ausstülpungen wie TMs in Gliomen führen. Neurotrophine, Integrine und Pleiotrophine, die durch Gap43 induziert werden, sind an dieser Signalgebung beteiligt, die letztendlich das dynamische Gebilde des Zytoskeletts in Form von Aktin, Myosin II und Mikrotubuli beeinflussen. Modifiziert nach Jung et al. 2017 in Nature Neuroscience.

Im Zuge all der Mechanismen, die zur funktionellen Netzwerkintegration führen, wurden Reparaturprozesse bei Hirnläsionen angetrieben. Die Daten deuten darauf hin, dass Gliomzellen in der Lage sind geschädigte Netzwerkmitglieder zu erkennen (Arvidsson et al., 2002; Kreuzberg et al., 2010), zu ersetzen und die Gesamtorganisation wiederherzustellen (Osswald et al., 2015).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Gliomzellen untereinander nicht nur mittels elektrischer Synapsen verbunden sind, sondern auch *bona fide* exzitatorische Synapsen zwischen Gliom und Neuronen ausbilden (Venkataramani et al., 2019; Venkatesh and Monje, 2017). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten von Venkatesh et al. sogenannte neurogliomale Synapsen (NGS) mit präsynaptischen Vesikeln, synaptischem Spalt und einer postsynaptischen Verdichtungszone identifiziert werden (Gray, 1959; Harris and Weinberg, 2012). Einheitlich bestanden

diese NGS aus einem präsynaptisch neuronalen und postsynaptisch gliomalen Teil (Venkatesh et al., 2019a). In den Versuchen von Venkatamarani et al. und Venkatesh et al. wurde per Stimulation von Schaffer-Kollateralen und kommissuralen Afferenzen aus dem CA3-Feld des Hippocampus die Gliomantwort auf neuronale Aktivität gemessen. Dabei kam es zu depolarisierenden Strömen in der Gliomzelle, wodurch Aktionspotentiale ausgelöst wurden und über AMPA-Signalwege im Netzwerk weitergeleitet wurden (Venkatesh and Monje, 2017). Zusätzlich wurde durch die Erregung des Netzwerks mittels Ioneneinstrom die Dichte an glutamatergen NGS verstärkt (Venkatesh et al., 2015). Dabei gilt festzuhalten: Neuron-Gliom-Interaktionen sind bidirektional und neuronale Aktivität erhöht das Gliomwachstum, wobei angenommen wird, dass umgekehrt Gliome auch die neuronale Aktivität per Glutamatsignal erhöhen können (Campbell et al., 2012; Venkataramani et al., 2019). Mehrere Beweislinien unterstützen mittlerweile den direkten Einfluss der NGS-getriebenen, calciumabhängigen Aktivierung von GBM-Zellen auf die Zellinvasion (de Groot and Sontheimer, 2011; Venkataramani et al., 2022; Venkatesh et al., 2015).

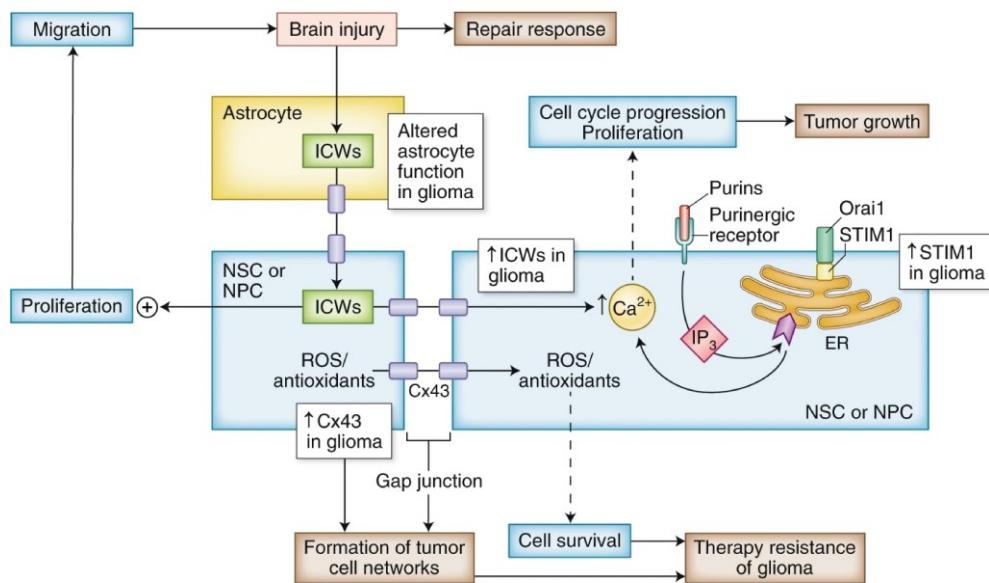


Abb. 5: Multizelluläres Netzwerk mit interzellulärer Kommunikation der neurogenen Nische und Gliomen

Schematische Darstellung der Mechanismen und Wirkungen multizellulärer Netzwerke in den neurogenen Nischen und Hirntumoren. In den weißen Kästen sind die Merkmaleigenschaften im Tumornetzwerk im Vergleich zu den Netzwerken aus NSCs und NPCs dargestellt und in braun die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Gliombiologie. Gap Junctions, die hauptsächlich aus Cx43 bestehen, werden genutzt um Zell-zu-Zell-Kontakte herzustellen und ICWs die Ausbreitung zu ermöglichen. Außerdem wird diese Verbindung genutzt, um die zelluläre Homöostase zu gewährleisten. Weitere resistenzerhöhende Mechanismen werden

durch die Calcium-aktivierten Kanäle (CRAC) Orai1 und STIM1 mittels IP3-Erhöpfung reguliert. Intrazellulär ansteigendes Calcium bewirkt dabei Progression und Proliferation. Die Komplexität dieser Netzwerke wird zusätzlich durch Zellkontakte mit Astrozyten (und weiteren Zelltypen wie Neuronen, Mikroglia etc.) erhöht. Sowohl homo- als auch heterozelluläre Verbindungen können ICWs übertragen und dadurch Reparaturreaktionen nach Läsionen des Netzwerks auslösen. Modifiziert nach *Jung et al. 2017* in Nature Neuroscience.

1.2 Das Axoninitialsegment

Das Axoninitialsegment (AIS) ist eine Mikrodomäne am proximalen Axon und ist gekennzeichnet durch eine spezifische Zusammensetzung verschiedener Gerüstproteine sowie einer hohen Dichte von Ionenkanälen an der Membran.

Das AIS ermöglicht es Neuronen, Aktionspotentiale (APs) zu generieren, ihre Erregbarkeit zu modulieren und sich an Veränderungen der Netzwerkerregbarkeit anzupassen (Grubb and Burrone, 2010; Kole and Stuart, 2012; Wefelmeyer et al., 2016). Eine weitere elementare Funktion des AIS ist die Etablierung einer Diffusionsbarriere für den vesikulären Transport, damit somatodendritische und axonale Ladungen sortiert bleiben und die Polarität der Zelle nicht verloren geht (Leterrier and Dargent, 2014).

Obwohl diese Domäne als solche schon seit den 1960ern bekannt ist, wurde seine fundamentale Rolle in der Entwicklung beispielsweise des auditorischen, somatosensiblen und motorischen Cortex, sowie auch bei Pathologien, erst während der letzten zehn Jahre genauer erkannt (Engelhardt et al., 2019; Gutzmann et al., 2014; Leterrier, 2018; Rasband, 2010; Schluter et al., 2017). Das aktuelle Lehrbuchwissen schreibt die entscheidenden plastischen Veränderungen eines Netzwerks bis dato eher der somatodendritischen Domäne zu. Einige Arbeiten deuten mittlerweile darauf hin, dass das AIS als Drehscheibe für kurz- und langfristige Veränderungen sowohl in der Struktur, als auch seiner Funktion Plastizität aufweist und damit die Leistung eines Neurons und dessen Rolle in einem funktionierenden Netzwerk entscheidend beeinflusst (Engelhardt et al., 2019; Jamann et al., 2018; Kuba and Ohmori, 2009; Wefelmeyer et al., 2016). Daran angelehnt ist es nicht besonders überraschend, dass sich das AIS auch als zentraler Bestandteil von pathophysiologischen Zuständen wie Epilepsie, Demenz oder Lähmungen herausgestellt hat, da dies Erkrankungen sind, die unmittelbar die Funktionsweise neuronaler Netzwerke betreffen (Engelhardt et al., 2019; Nelson and Jenkins, 2017; Rasband, 2010). Neben der Regulation neuronaler Erregbarkeit (Kole and Brette,

2018) kommt dem AIS vor allem noch die Aufgabe der Aufrechterhaltung neuronaler Polarität als physikalische Barriere zu (Rasband, 2010; Sobotzik et al., 2009).

1.2.1 Molekularer Aufbau des AIS

Das AIS wird durch seine spezifische Ausstattung mit Gerüstproteinen unterhalb des Axolemmas und Zytoskelettkomponenten charakterisiert, die für die Funktion entscheidend sind (Leterrier et al., 2017). Ankyrin-G aus der Proteinfamilie der Ankyrine stellt dabei eine wichtige strukturelle Basis für den Aufbau des AIS dar (Rasband, 2010)(Abb. 6), da einige der Cytoskelettkomponenten in Interaktion mit AnkG stehen (Huang and Rasband, 2018). Insgesamt werden die Ankyrine von drei Genen ANK1 (AnkR), ANK2 (AnkB) und ANK3 (AnkG) codiert (Mohler et al., 2002), wobei AnkG in drei verschiedene Isoformen exprimiert werden kann. Allerdings sind nur die 270 kDa und 480 kDa Varianten an der Bindung von Transmembranproteinen wie spannungsabhängigen Natrium- (NaV) (Akin et al., 2015) und Kaliumkanälen (KV; (Pan et al., 2006)) beteiligt. Die entscheidende Rolle von AnkG bei der AIS-Assemblierung und Aufrechterhaltung neuronaler Polarität wurde durch Deletionsversuche von AnkG bestätigt, bei denen auffiel, dass die anderen elementaren Zytoskelettkomponente am AIS ohne AnkG nicht kolokalisiert waren (Bennett and Chen, 2001; Hedstrom et al., 2008; Jenkins and Bennett, 2001; Kordeli et al., 1995; Leterrier et al., 2017; Sobotzik et al., 2009). Mutierte Mäuse, bei denen ein AnkG-Knockdown im Kleinhirn durchgeführt wurde, litten an Ataxien durch AP-Initiierungsstörungen und gestörtem Feuerverhalten der Axone (Jenkins and Bennett, 2001; Tseng et al., 2015). Ebenso bestehen Hinweise auf Assoziationen bezüglich Mutationen im ANK3-Gen und dem Auftreten von psychischen Störungen wie Schizophrenie (Harrison, 2016), Autismus (Bi et al., 2012) und bipolaren Störungen (Schulze et al., 2009). Darüber hinaus spielt die 480 kDa AnkG-Isoform auch eine wichtige Rolle in der Stabilisierung von GABA_A-Rezeptoren an der somatodendritischen Domäne (Tseng et al., 2015).

Eine weitere bedeutende strukturelle Komponente neuronaler Plastizität bilden axo-axonische Interneurone, die sogenannten Chandelier-Zellen, welche Synapsen mit dem AIS bilden (Inan and Anderson, 2014). Es wurde vorgeschlagen, dass diese Synapsen mit Chandelier-Zellen als Schaltkreisregulatoren fungieren (Woodruff et al., 2010), da sie das Feuerverhalten unmittelbar am AIS modulieren. Allerdings ist noch unklar, ob sie postsynaptische Pyramidenzellen erregen oder hemmen. Man geht

davon aus, dass dies vom Netzwerkzustand abhängt (Woodruff et al., 2010; Woodruff et al., 2011).

In Abwesenheit von AnkG verlieren Neurone ihre Polarität und Axone erhalten dendritische Eigenschaften mit veränderten Membraneigenschaften und Rezeptorverteilungen (Hedstrom et al., 2008; Sobotzik et al., 2009). Unmittelbar unterhalb des Axolemmas befinden sich Aktin-Ringe, die in Verbindung mit β IV-Spektrin (Yang et al., 2007) und α II-Spektrin (Huang and Rasband, 2018) stehen und sich so wiederum mit AnkG verbinden, wodurch sich ein periodisches Muster mit Abständen von ca. 190 nm bildet (D'Este et al., 2015; Xu et al., 2013). Auch die multiplen Querverbindungen zwischen β IV-Spektrin und den diversen Strukturproteinen des AIS, die u.a. Ionenkanäle integrieren, sprechen für eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung axonaler Funktionen (Berghs et al., 2000). In Mäusen, die β IV-Spektrin nicht exprimierten, konnten weder AnkG noch spannungsabhängige Natriumkanäle gefunden werden (Komada and Soriano, 2002) mit der Folge, dass auch in diesem Fall neuronale Dysregulationen auftraten, die in Symptomkomplexen wie Zittern und motorischen Neuropathien mündeten (Buffington and Rasband, 2011). Neben Ionenkanälen werden von AnkG auch Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) wie Neurofascin-186 kDa (NF-186) und das sogenannte „Neuron-glia related CAM“ (NrCAM) an axonale Mikrotubuli verankert (Hedstrom et al., 2008; Leterrier et al., 2017). Ihre Hauptaufgaben bestehen darin, die Polarität und molekulare Zusammensetzung am AIS zu unterstützen (Leterrier, 2018).

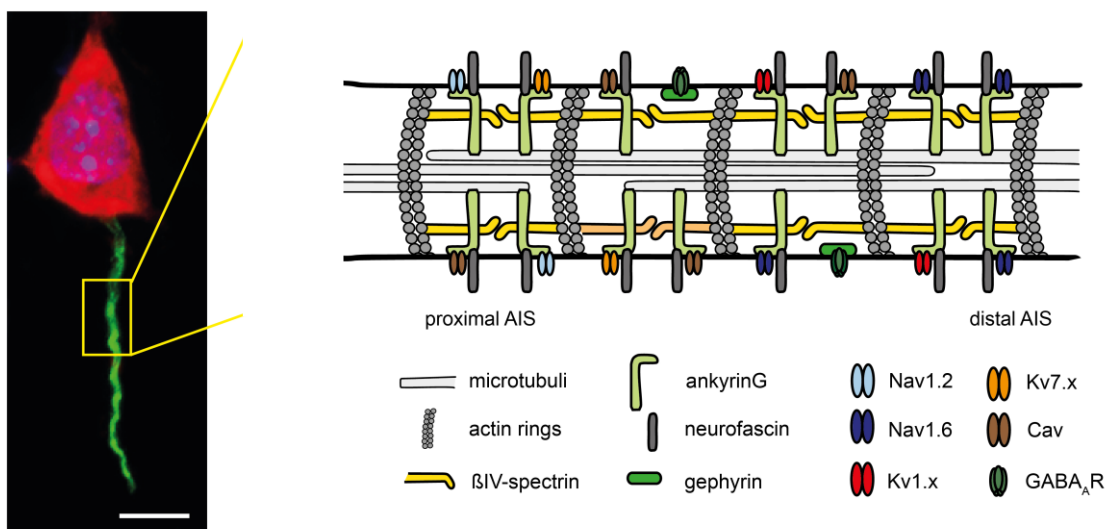


Abb. 6: Molekulare Struktur des AIS

Links: Dieses Bild zeigt eine Pyramidenzelle mit einem AIS (grün), das direkt am Soma entspringt.

rechts: Dargestellt ist der molekulare Aufbau eines AIS. Gekennzeichnet durch periodisch angeordnete Aktin-Ringe, an denen wiederum die elementaren Gerüstproteine AnkG und β IV-Spektrin verankert sind. AnkG selbst bindet verschiedene Ionenkanäle an der Membran. Für genauere Darstellungen siehe Abschnitt 1.2.2 Maßstabsbalken = 10 μ m. Modifiziert nach *Engelhardt et al., 2019* in Neuroforum.

1.2.2 Ionenkanäle am AIS

Die molekulare Grundlage für eine AP-Initiierung am AIS bilden die spannungsabhängigen Natriumkanäle, deren Dichte am AIS am höchsten ist (Kole et al., 2008). Insbesondere die Isoformen Nav1.1, Nav 1.2 und Nav1.6 sind die von den meisten exzitatorischen, kortikalen Neuronen exprimierten Formen. Allerdings können in unterschiedlichen Zelltypen auch unterschiedliche Nav-Subtypen exprimiert werden (Lorincz and Nusser, 2008; Yoshimura and Rasband, 2014).

Es hat sich herausgestellt, dass Nav1.6 der primäre, an der AP-Generierung beteiligte, Ionenkanal ist, da er schneller und bei niedrigeren Schwellenwerten aktiviert wird (Colbert and Pan, 2002; Hu et al., 2009; Katz et al., 2018; Van Wart et al., 2007). Der maximale Natriumstrom wurde am distalen AIS beobachtet, wo auch die maximale Nav1.6 Expression zu beobachten ist (Hu et al., 2009). Eine Verlagerung des AIS nach distal weg vom Soma bewirkt auch eine zunehmende Isolation von der kapazitiven Last des Somas, was die Rolle der Nav1.6 zusätzlich unterstreicht (Kole and Brette, 2018; Lorincz and Nusser, 2008). Die Nav1.2-Kanäle akkumulieren jedoch näher am proximalen Beginn des AIS nahe der somatodendritischen Domäne wodurch ihre Rolle in der AP Rückübertragung (backpropagation) im Gegensatz zur AP-Generierung betont wird (Hu et al., 2009). Die Rückübertragung beschreibt neben der unidirektional ausbreitenden AP-Spannung das Phänomen eines weiteren, vom Soma erzeugten Impulses, der sich in Richtung der apikalen Dendriten ausbreitet (Hu et al., 2009). Da die Ionenkanäle während der Entwicklung unterschiedlich verteilt sind, sollte betont werden, dass sich diese Erläuterungen auf adulte Stadien bezieht.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kvs) am AIS spielen eine entscheidende Rolle in der Repolarisation des Membranpotentials. Einzelzelleitungen (s. Erklärungen in Material und Methoden) haben gezeigt, dass in AIS von Pyramidenzellen hauptsächlich Kv1-Isoformen exprimiert werden (Goldberg et al., 2008), die einen schnell aktivierbaren aber nur langsam inaktivierenden Kaliumefflux bewirken und so

die Depolarisation ausgleichen und die AP-Wellenform und das repetitive Feuerverhalten beeinflussen (Shu et al., 2007). Dabei fällt auf, dass jeder Neuronentyp ein unterschiedliches Muster an spannungsabhängigen Kaliumkanälen aufweist, sodass in kortikalen Neuronen eine Inaktivierung von K_v1 -Kanälen zu langsamer Depolarisation führt und eine Verbreiterung der APs bewirkt (Kole et al., 2007). In anderen Zelltypen hat eine Blockade dieser Kanäle zu erhöhter Spike-Dauer geführt (Shu et al., 2007), sodass deutlich wird, dass das einzigartige Feuerverhalten verschiedener Neuronenpopulation vermutlich maßgeblich von unterschiedlichen Ionenkanalkonstellationen abhängt (Van Wart et al., 2007).

Die $K_v7.x$ -Kanäle werden in einem Gradienten von proximal nach distal durchaus anpassungsfähig ans Feuerverhalten der Zelle (Petersen et al., 2017) im AIS exprimiert und vermitteln den muskarinergen Strom, der auch als „M-Strom“ bezeichnet wird (Pan et al., 2006). Dieser Strom wirkt langsam nicht-inaktivierend und wird knapp unterhalb der AP-Schwelle aktiviert (Halliwell and Adams, 1982).

Aufgrund ihrer Eigenschaften, wurde auch der Einfluss verschiedener K^+ -Kanäle auf die Regulation des Tumornetzwerks beim Glioblastom mit der Fragestellung, ob der K^+ -Kanal ein potenzielles gentherapeutisches Ziel bei der Krebsbehandlung darstellen könnte, untersucht (Liu et al., 2018). Zunächst zeigte sich, dass spannungsabhängige Kaliumkanäle, auf die hier fokussiert wird, in Tumorgewebe überexprimiert werden (Bai et al., 2013; Cazares-Ordóñez and Pardo, 2017), explizit auch im Glioblastom (Patt et al., 2004; Staudacher et al., 2014). Zusammen mit einigen anderen Typen von Kaliumkanälen konnte entdeckt werden, dass ihre Überexpression nicht nur mit der Malignität von Gliomen korrelierte, sondern auch, dass ihre Inaktivierung das Wachstum signifikant reduzierte (Felipe et al., 2012; Huang et al., 2009; Liu et al., 2019).

1.2.3 Plastizität des AIS

Bei Betrachtung der Funktion und Rolle des AIS von Neuronen ist vor allem diejenige Plastizität von Interesse, die eine Veränderung des Netzwerkzustandes hervorruft.

Die axialen Ströme entlang des Axons folgen dem Grundprinzip des Ohmschen Gesetzes: Der Spannungsgradient zwischen Soma und AIS ist abhängig von der Eingangsstromstärke und dem axialen Widerstand, der wiederum von Geometrie und Komposition des AIS abhängt (Kole and Brette, 2018). Abgeleitet aus diesen

Prinzipien gibt es für jedes Neuron eine optimale Komposition des AIS in Bezug auf Position und Beschaffenheit, die minimaler Schwellenstrom und Isolation von somatischer Kapazität beinhaltet (Goethals and Brette, 2020).

Die ersten Belege dafür, dass die Struktur und damit auch die Funktion des AIS dynamisch ist und durch die Beeinflussung der neuronalen Aktivität moduliert wird, wurden 2010 von Kuba et al. und der Gruppe um Grubb und Burrone erbracht. Einerseits konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte neuronale Aktivität *in vitro* zu einer distalen Verlagerung des AIS in Hippocampus-Neuronen führte und eine verringerte intrinsische Erregbarkeit nach sich zog. Dies wurde als Hinweis auf einen homöostatischen Zweck verstanden, um die neuronale Aktivität wieder auf das Ursprungsniveau zurückzuführen (Grubb and Burrone, 2010). Kuba et al., 2010 fanden heraus, dass durch sensorische Deprivation *in vivo* eine AIS-Verlängerung und Umverteilung der Ionenkanäle erfolgt mit dem Effekt einer erhöhten Erregbarkeit (Kuba and Ohmori, 2009; Kuba et al., 2015).

Aus theoretischen Versuchen wurden folgende Paradigmen für die Funktions-Struktur-Relation des AIS definiert: Je länger und distaler das AIS liegt, desto erregbarer ist das Neuron, da die Leitfähigkeit für Natrium und Kalium zunimmt. Dies hängt jedoch stark von der Größe des Neurons und der Verteilung des somatodendritischen Inputs ab (Goethals and Brette, 2020; Gullledge and Bravo, 2016; Hamada et al., 2016; Kole and Brette, 2018). Laut Modellierungsdaten ist ein langes AIS für große Neurone optimal und ein kurzes für kleinere Neurone, da mit der Verlagerung des AIS nach distal die Strommenge verringert wird, die nach Initiation das AIS erreicht und es somit auch zu einer geringeren Anzahl schwellenwerterreichender Ereignisse kommt (Grubb and Burrone, 2010). In der Theorie müsste die Menge des Stroms, die benötigt wird, um ein AP am AIS zu erzeugen umgekehrt proportional zum axialen Widerstand zwischen AIS und Soma sein (Goethals and Brette, 2020). Folglich wäre in einem distalen AIS der axiale Widerstand hoch und die Rheobase damit niedriger. Die Rheobase ist der Mindeststrom, bei dem gerade noch APs ausgelöst werden.

Derzeit besteht noch Unklarheit darüber, ob die AIS-Länge oder seine Position den größeren Einfluss auf die Erregbarkeit habe (Gullledge and Bravo, 2016; Hamada et al., 2016). Daran angelehnt kann abgeleitet werden, dass bei größerem Durchmesser des Axons ein höherer Strom benötigt wird, um die AP-Schwelle zu erreichen. Die Fähigkeit des AIS sich an unterschiedliche dendritische Parameter anzupassen, ermöglicht erst eine elektrische Homöostase eines neuronalen Netzwerks (Hamada

et al., 2016). Dass sich die Dynamik des AIS und der Einfluss auf die Erregbarkeit nicht monokausal verhält, hat eine Folgestudie der Erkenntnisse von Grubb und Burrone von Wefelmeyer et al. ergeben, die zeigte, dass bei distaler Verlagerung des AIS die axo-axonalen Synapsen der Chandelier-Zellen ihre Position konstant halten.

Strukturelle und funktionelle Veränderungen des AIS dienen wahrscheinlich der Anpassung der Erregbarkeit an Veränderung des präsynaptischen Inputs. Bei reduziertem Input verringert das Neuron seine Erregbarkeit über bspw. eine Verlängerung des AIS, um die Homöostase innerhalb des Schaltkreises aufrechtzuerhalten und umgekehrt (Jamann et al., 2018; Kuba et al., 2010; Meza et al., 2018).

In Diskussion bleibt aber weiterhin, ob AIS-spezifische Veränderungen der Erregbarkeit eines Netzwerks kausal für einen Krankheitstypus sind oder lediglich damit korrelieren und als Symptom erscheinen. So sind z.B. Mutationen an spannungsabhängigen Natriumkanälen, die gehäuft am AIS vorkommen, mit zahlreichen Epilepsieformen oder auch mit Demyelinisierungspathologien assoziiert worden (Child and Benarroch, 2014; Hamada and Kole, 2015). Nicht zuletzt können Tumorerkrankungen und explizit die primären Hirntumore als Einflussfaktor auf die Veränderung am AIS diskutiert werden, da in ihrer Pathogenese zahlreiche Faktoren durch neuronale Netzwerkmodulation vermutet werden (Johung and Monje, 2017; Venkatesh et al., 2019b).

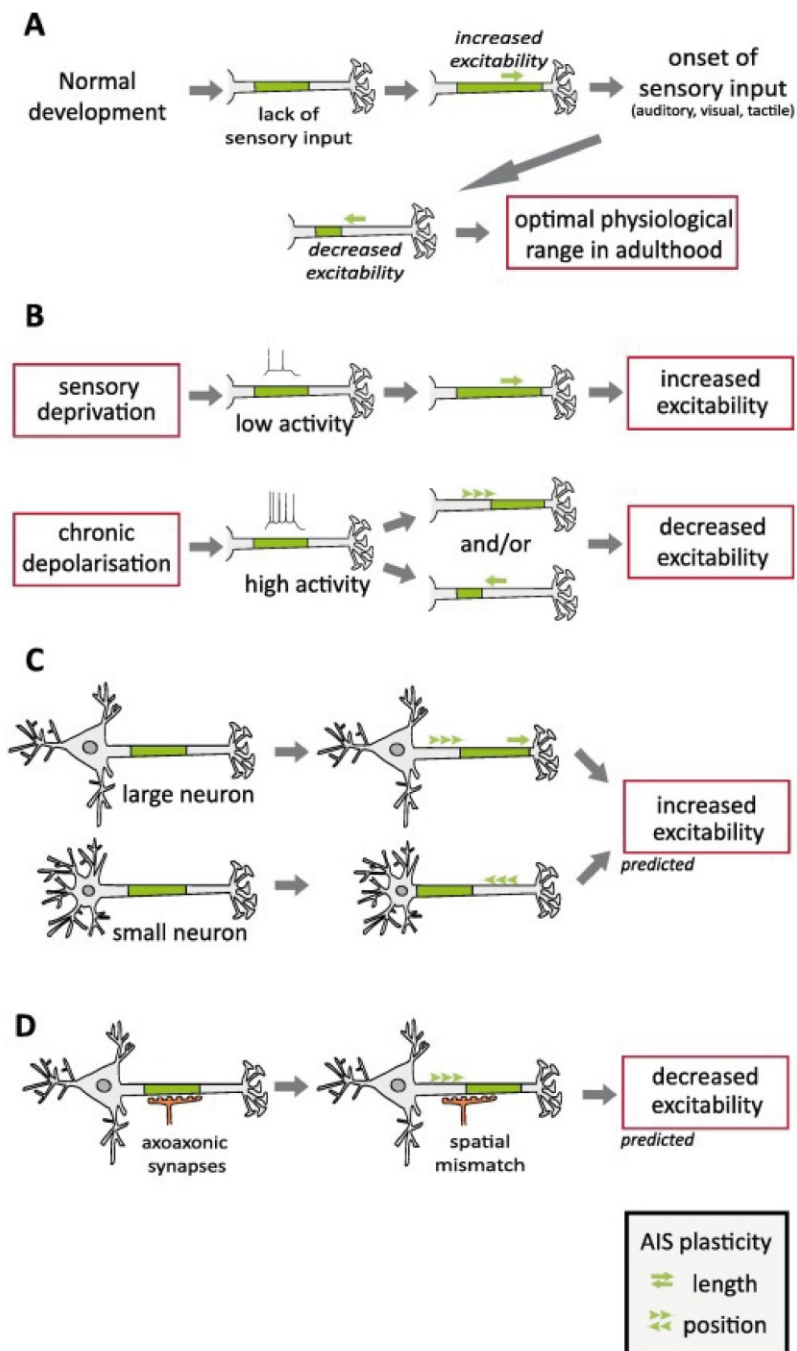


Abb. 7: Plastizität des AIS

(A) Unreife AIS sensorischer Cortices durchlaufen eine Phase der Verlängerung bis zum Einsetzen neuronalen Inputs, woraufhin sie sich meist verkürzen, um ihren optimalen physiologischen Bereich zu finden (s. *Kuba et al., 2010; Gutzmann et al., 2014* etc.). Die AIS-Länge adaptiert dabei an ein optimales Verhältnis von Input zu Output. Das Verhindern von Input, z.B. einer sensorischen Deprivation (B) führt zur Verlängerung der AIS im Rahmen eines homöostatischen Prozesses. Durch die Deprivation nimmt die Eigenaktivität ab, die AIS wachsen und steigern so ihre Erregbarkeit. Gegensätzlich verhält es sich bei chronischer Depolarisation. Je nach Region werden die AIS nach distal verschoben (*Grubb und Burrone, 2010*) und/oder verkürzen sich (*Gulledge und Bravo, 2016*), wodurch die Erregbarkeit sinkt. Zahlreiche pathologische Ursachen von AIS Plastizität sind in *Buffington und Rasband, 2011* einzusehen. (C) Daten aus Computermodellierungsversuchen weisen außerdem darauf hin, dass es ein optimales Verhältnis zwischen der Lage und Länge des AIS gibt. Bei zunehmender

Größe des Neurons erfolgt eher eine Distalisierung und Verlängerung des AIS und umgekehrt. Wie bereits erwähnt, nimmt die AIS-Länge bei chronischer Depolarisation ab und/oder werden nach distal verschoben. (D) Dabei bleiben GABAere, hemmende axo-axonale Synapsen ohne Änderung des Innervationsmusters bestehen und verringern so die Erregbarkeit. Modifiziert nach *Jamann et al., 2018* in Neuroscience.

1.3 Die Gewebekulturen

1.3.1 Organotypische Schnittkulturen

Viele Verfahren sind in der Vergangenheit getestet worden, um Explantate von neuronalem Gewebe in Kultur vital zu halten. Viele Autoren entwickelten eine detaillierte Technik, wie Schnitte von vielen verschiedenen Bereichen des ZNS mehrere Wochen lang in Kultur gehalten werden, um funktionelle Eigenschaften von Neuronen und Gliazellen gut replizierbar untersuchen zu können (Gahwiler, 1984; Gahwiler et al., 1997; Stoppini et al., 1991). Dabei bestand das Ziel, nicht nur Informationen über einzelne homogene Zellkulturen zu erhalten, sondern die Funktion von Zellen des ZNS in einem dreidimensionalen Netzwerk bei Erhalt der jeweiligen Zytoarchitektur untersuchen zu können (Humpel, 2015). Besonders für Studien zur Neuroprotektion, elektrophysiologischen Experimenten am neuronalen Netzwerk oder Fragestellungen, die Tumorinvasion betreffen, wird diese Model häufig genutzt, insbesondere da die extrazelluläre Umgebung leicht zu kontrollieren und zu manipulieren ist (Grabiec et al., 2017).

Aufgrund der unveränderten Morphologie der neuronalen Zellen und ihrer *in vivo* ähnlichen Organisation werden Schnitte als organotypisch bezeichnet (Grabiec et al., 2017). Das Modell der organotypischen Kulturen besteht darin, dass präparierte Gewebescheiben an einer Grenzfläche zwischen Luft und Kulturmedium in einem Inkubator gehalten werden. Diese Grenzfläche stellt zumeist eine sterile, poröse Membran dar, die auf Nährmedium inkubiert wird. In den Versuchen von Stoppini et al., in denen die morphologische und funktionale Integrität der OTC aus mehreren Regionen zu mehreren Zeitpunkten untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass einige Schnitte binnen weniger Tage von 500 µm auf 150 µm abflachten (Gahwiler et al., 2001; Humpel, 2015). Das Abflachen dient außerdem neben post-hoc Immunfluoreszenzfärbungen (Humpel, 2015; Lossi et al., 2010) als Vitalitätsmerkmal einer organotypischen Kultur. Neben der Abflachung kann generell die Farbe der OTC als Vitalitätszeichen angesehen werden. Nach weißlich-gräulicher Farbe sollte binnen

weniger Tage die Kultur in eine transparent-gräulich Struktur übergehen. Eine deutliche Weißfärbung bei Intransparenz würde für sklerotisch/nekrotische Veränderungen sprechen (Humpel, 2015). Der Erhalt der organisatorischen Integrität eines zellulären Netzwerks und die Vitalität der Neurone hängt natürlich auch entscheidend vom Alter des präparierten Donortieres ab (Humpel, 2015; Stoppini et al., 1991). In Bezug auf die Resistenz gegenüber mechanischen Traumata und möglichst optimalen Reorganisationspotential wird in der Literatur eine Präparation von murinen Neugeborenen an den postnatalen Tagen 4-8 empfohlen (Grabiec et al., 2017; Kim et al., 2013).

Per Immunfluoreszenz konnte ein starkes gliales Wachstum festgestellt werden, das die Möglichkeit der elektrophysiologischen Analysen per Patch-Clamp Technik und das Überleben der Pyramidenzellen jedoch nicht verringerte. Auch das Verhalten von Oligodendrozyten scheint in Kultur organotypisch zu verlaufen, sodass Axone myelinisiert werden (Berger and Frotscher, 1994). Bei Astrozyten besteht der Verdacht, dass ein größerer Anteil an Zellen keine vollständige Reifung erfährt (Derouiche et al., 1993). Abschließend kann dies aber nicht bestätigt werden, da valide Marker für die Aktivierungsschritte der Astrozyten noch fehlen (Bonde et al., 2003; Derouiche et al., 1993).

In den ersten Tagen in Kultur war deutlich zu beobachten, dass es zu synaptischen Konnektivitätsveränderungen kam, die sich aber im Verlauf wieder normalisierten (Gahwiler et al., 2001). Die Gesamtzahl der synaptischen Verbindungen ist nach einer Zeit der Äquilibration mindestens drei Wochen stabil (De Paola et al., 2003). Adaptationen in Form von LTP konnte jedoch nur verlässlich bei Kulturen festgestellt werden, die länger als 7 Tage in Kultur waren (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Debanne et al., 1996). Stoppini et al. führten ihre Untersuchungen an hippocampalen OTC durch und konnten zeigen, dass die Pyramidenzellschichten in voller Integrität erhalten blieben, auch wenn davon ausgegangen wird, dass binnen der ersten Tage in Kultur Entwicklungs- und Maturationsaspekte bedeutsam sind, um Plastizität in Kultur zu entwickeln (Harris and Teyler, 1984). Mit Hilfe von immunzytochemischen Methoden und Hybridisierungstechniken konnte gezeigt werden, dass auch die Expressions- und Verteilungsmuster von Glutamatrezeptoren denen in adultem, intaktem Gehirn ähnlich sind (Bahr et al., 1995; Gerfin-Moser and Monyer, 2002).

Es kann also rekapituliert werden, dass organotypische Schnittkulturen ein zeitliches Profil von hemmenden und erregenden synaptischen Ereignissen aufweisen, die

quantitativ und qualitativ mit entsprechenden Zeiten *in vivo* übereinstimmen (De Simoni et al., 2003; Gahwiler, 1984). Trotz aller Daten kann nicht abschließend geklärt werden, inwiefern die zwangsläufig notwendigen Axotomien durch die Präparation zu funktioniellen Veränderungen und zu beschleunigtem neuronalen Zelltod führen. Zusammengenommen zeigen alle Experimente jedoch, dass organotypische Schnittkulturen ein attraktives und potentes Modell für vielerlei Fragestellungen darstellen (Bahr et al., 1995; Humpel, 2015).

1.4 Der Hippocampus

Im Jahr 1973 konnten die Gruppen um LaVail und Wolf zum ersten Mal Studien zur postnatalen Entwicklung des Gyrus dentatus der Maus durchführen (LaVail and Wolf, 1973). Mittlerweile sind Morphologie, Histogenese und Ultrastruktur, sowie funktionelle Entwicklung der verschiedenen Hippocampusareal gut untersucht und zahlreich beschrieben worden (Booker and Vida, 2018; Lazarov and Hollands, 2016; Zimmer and Gahwiler, 1984). Seitdem dienen hippocampale organotypische Kulturen als Modell zur Untersuchung von zahlreichen Fragestellungen wie synaptischer Plastizität, Neurogenese und Pathologien wie Neurodegeneration (z.B. oxidativer Stress Hypoxie, Hypothermie, Hypoglykämie etc.), Neurotoxizität (z.B. NMDA, Metalle, Exzitoxizität), Neuroprotektion, Neuroinflammation und Tumorinvasion (Humpel, 2015).

1.4.1 Struktur und Funktion der Hippocampusfraktion

Der Hippocampus ist eine von mehreren Regionen, die zusammen die Hippocampusformation bilden. Sie bildet gemeinsam mit dem Gyrus dentatus (DG) eine doppel-C-förmige Struktur, die sich vom Boden des Schläfenhorns der Seitenventrikel am medialen Rand des Temporallappens befinden. Der Aufbau der Hippocampusformation ist bei den meisten Säugetieren sehr ähnlich (Schultz and Engelhardt, 2014). Der eigentliche Hippocampus ist ein Allocortex und besteht aus drei Unterfeldern (CA1-CA3; CA = cornu ammonis) und wird vom Gyrus dentatus, dem subiculären Komplex (Subiculum, Präsubiculum und Parasubiculum) und dem entorhinalen Kortex zur sogenannten Hippocampusformation komplettiert (Schultz and Engelhardt, 2014).

Die einzelnen Areale sind größtenteils unidirektional miteinander verbunden. Vom entorhinalen Kortex aus projiziert der Tractus perforans in den DG, dessen Hauptzellschicht die Körnerzellen bilden. Von den Körnerzellen im DG projizieren dann wiederum Moosfasern auf Pyramidenneurone des CA3-Feldes, von wo aus Schaffer-Kollaterale die verschiedenen CA-Felder miteinander verbinden. CA3-Neurone projizieren normalerweise nicht zurück Richtung DG, sondern bilden vor allem Kollaterale in die anderen CA-Felder, wo wiederum untereinander Kollaterale gebildet werden. CA1-Neurone selbst bilden keine assoziativen Verbindungen untereinander, können aber über Interneurone in CA1 ein inhibitorisches Feedback bewirken (Amaral et al., 2007; Amaral and Witter, 1989; Witter et al., 2000).

In allen Schichten des DG und CA1-CA3 finden sich verschiedenste Interneurone, die eine elementare Funktion darin besitzen, Input und Output innerhalb dieses Netzwerks zu modulieren. Eine entscheidende Rolle in der Verarbeitung sensorischer Informationen hat der entorhinale Cortex, der das Eingangstor für Informationen zum hippocampalen Netzwerk darstellt.

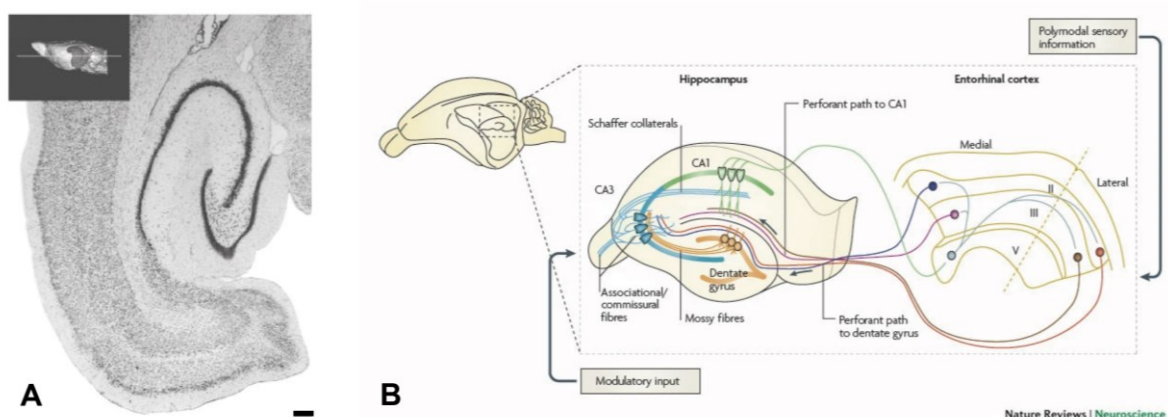


Abb. 8: Cytoarchitektur und Verschaltungen im Hippocampus von Säugern

(A) Horizontalschnitt durch eine dorsale Hippocampus-Formation der Ratte wie in der 3D-Rekonstruktion zu sehen ist. Prägnant ist die charakteristische Doppel-C-Formation, die aus Gyrus dentatus (eher V-förmig) und dem Cornu ammonis (CA1-3; eher U-förmig) gebildet wird. Maßstabsbalken = 250 μ m. Modifiziert nach *Amaral et al., 2007* in Elsevier Books.

(B) Das Schaubild zeigt die grundlegende Anatomie des Hippocampus, die im Abschnitt 1.4 beschrieben werden. Synaptischer Input erfolgt über die Perforansbahnen aus dem entorhinalen Cortex und wird über die Moosfasern von den Körnerzellen des DG auf die proximalen Dendriten der CA3-Pyramidenzellen projiziert. Von dort aus dann ihrerseits über Schaffer-Kollaterale zu ipsilateralen CA1-Pyramidenzellen, schließlich erfolgt über eine Kommissurverbindungen eine Projektion zu den kontralateralen CA-Zellen. Hemmende Neurone sind hier nicht dargestellt. Modifiziert nach *Neves et al., 2008* in Nature Review Neuroscience.

Die funktionelle Rolle des Hippocampus wurde erst durch den in der klinischen Neurowissenschaft bekannten Patient H.M. (Squire, 2009), der an einer schweren Epilepsie litt, bekannt. Im Alter von 27 Jahren wurden bei ihm beide medialen Temporallappen mitsamt Hippocampusfraktion operativ entfernt. Danach war Patient H.M. zwar anfallsfrei, jedoch fiel auf, dass er an einer anterograden und retrograden Amnesie litt. So war sein Langzeitgedächtnis unbeeinträchtigt aber sein Kurzzeitgedächtnis (ca. 3 Jahre prä-operativ) völlig erloschen (Scoville and Milner, 1957). Da die Amnesien allerdings nur das deklarative, nicht aber das prozedurale Gedächtnis betraf, stieg das Interesse an der Funktionsweise der Gedächtnisbildung im medialen Temporallappen stark, sodass sich in weiteren Studien Erkenntnisse bezüglich der Rolle des Hippocampus in der Bildung des deklarativen Gedächtnisses manifestierten (Neves et al., 2008; Squire and Zola-Morgan, 1991; Zola-Morgan et al., 1991). Tierstudien, kontrollierte Läsionen, pharmakologische Inaktivierungen oder molekulare Knock-outs, die sich auf den Hippocampus beschränkten, bestätigten diese Erkenntnisse (Martin et al., 2005; Morris, 1989; Pastalkova et al., 2006). Mit der Entdeckung des Prinzips der Langzeitpotenzierung (LTP) als physiologisches Korrelat einer Lernfunktion kamen sukzessive Erkenntnisse über die einzelnen Schritte der Gedächtnisbildung hinzu (Bliss and Lomo, 1973). Heute ist die Bedeutung der Hippocampus-Formation für Lernen und Gedächtnis weithin anerkannt (Neves et al., 2008).

1.5 Zielsetzung

Wie oben beschrieben, geht man mittlerweile davon aus, dass ein entscheidender Einfluss auf die Progression, Invasion und Resistenz gegenüber Therapiemaßnahmen des Glioblastoms die Vernetzung des gesamten Tumornetzwerks innerhalb des peritumoralen neuronalen Netzwerks darstellt (Monje et al., 2020; Venkatesh and Monje, 2017). Dabei nimmt neuronale Erregung sowohl über parakrine und autokrine Mechanismen, als auch direkte synaptische Inputs eine entscheidende Rolle auf die Tumorgenese ein (Venkataramani et al., 2022; Venkatesh et al., 2015). Auf der anderen Seite wissen wir, dass das AIS eine eminent wichtige Rolle bei der dynamischen Regulation zellulärer Erregbarkeit und der neuronalen Schaltkreisfunktion einnimmt (Engelhardt et al., 2019; Jamann et al., 2018; Kole and

Brette, 2018). Folglich entstand die Hypothese, dass Tumorwachstum in direkter Umgebung eines funktionalen neuronalen Schaltkreises eine Veränderung der Erregbarkeit einzelner Neurone bewirkt und damit eine Veränderung des AIS als homöostatischer Regulator intrinsischer Erregbarkeit einhergeht. Das Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis des Zusammenhangs zwischen Erregbarkeit der Neurone innerhalb eines neuronalen Netzwerks und Tumordinvasion in Form einer neuen experimentellen Grundlage zu erweitern.

Hier wurden die folgenden Fragestellungen untersucht:

- Exprimieren humane Resektate des Glioblastoms neuronale Strukturen, die für die neuronale Erregbarkeit entscheidend sind?
- Stellen OTC ein geeignetes Modell dar, um den Einfluss von Glioblastomen auf die neuronale Erregbarkeit des umgebenden Netzwerks zu überprüfen?
- Wie beeinflusst das Tumornetzwerk eines Glioblastoms die neuronale Erregbarkeit im murinen Hippocampus als Beispiel eines funktionellen Schaltkreises?
- Versucht ein Glioblastom plastische Veränderungen des AIS?
- Bestehen direkte Tumornetzwerk-Kontakte mit dem AIS?

Zusammengefasst zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass sich innerhalb von humanen Glioblastomen neuronale Strukturen gut mit gängigen Antikörpern in der Immunfluoreszenz darstellen lassen. Außerdem konnte das Modell der organotypischen Kulturen erfolgreich etabliert werden und eignete sich gut für den Zweck unserer Fragestellungen (s. oben), da neuronale Schaltkreise in Form des Hippocampus ausreichend lang vital blieben und sich Tumore auf den Gewebeschnitten etablierten. Es gelang uns außerdem TMs in direktem Kontakt mit neuronalen Strukturen zu identifizieren und einen morphologischen Einfluss auf das AIS zu zeigen. Trotz Limitierungen der räumlichen, dreidimensionalen Tumordinvasion, konnten funktionelle Veränderungen der Erregbarkeit und damit auch des AIS gemessen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

Detaillierte Auflistungen über die genutzten Lösungen (Tab.1 und 4), Antikörper (Tab. 2 und 3), das Equipment (Tab. 7,8 und 9) und die Software (Tab. 10) lassen sich im Laufe der Dissertation im jeweiligen Abschnitt und im Anhang finden.

Das Projekt, das dieser Dissertation zu Grunde liegt, kann in zwei Schwerpunkte unterteilt werden.

1. Morphologische Untersuchung der AIS-Längen von Pyramidenzellen in menschlichen OP-Resektaten aus unmittelbarer Tumorumbrä im Vergleich zu makroskopisch tumorfreiem Cortexgewebe.
2. Morphologische und elektrophysiologische Untersuchung von Parametern und Strukturen, die Aussagen der neuronalen Erregbarkeit ableiten lassen, in organotypischen Kulturen des murinen Hippocampus. Dieses Prozedere wird näher in Abb. 9 veranschaulicht.

2.1 Gewebe

2.1.1 Humanes Gewebe

Die humanen Astrocytom Grad IV Glioblastomschnitte (zur Verfügung gestellt von Dr. Miriam Ratliff, Institut für Neurochirurgie der Universitätsmedizin Mannheim) aus Operationsresektaten wurden in OCT-Masse (Tissue Tek®, Tab. 4) eingebettet. Anschließend wurden die Gewebeblöcke mit Isopenthan (Tab. 4) in flüssigem Stickstoff bei -20°C eingefroren. Mit einem Kryostat (Tab. 7) wurden Schnitte mit einer Dicke von 20 µm angefertigt, die dann auf einem herkömmlichen Objektträger eingebettet und mit 2% Paraformaldehyd (PFA; Tab. 4) für 10 Minuten fixiert wurden. Anschließend wurden entsprechende Immunfluoreszenzfärbungen anhand validierter Standardprotokolle des Labors und eigener Vorarbeit vorgenommen. Die genaue Prozedur ist dem Abschnitt 2.4.1 zu entnehmen.

2.1.2 Mäuse

Alle Experimente wurden nach den Richtlinien der Landesregierung von Baden-Württemberg und den Tierschutzvereinbarungen der Universität Heidelberg der

Medizinischen Fakultät Mannheim durchgeführt, in Übereinstimmung mit den Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (I-20/05). Es wurden männliche und weibliche C57BL/6N Wildtyp-Mäuse (Janvier, Frankreich) genutzt. Alle Tiere wurden im normalen 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Die Tiere waren bei der Organentnahme zwischen 4 bis 8 Tage alt.

2.2 Präparation und Kultivierung der organotypischen Kulturen

Wir wählten P4-P8 als Zeitpunkt der Präparation aus, da in diesen Altersstufen das neuronale Netzwerk noch jung genug ist, um sich aus dieser vulnerablen Phase zu reorganisieren (Gahwiler, 1984; Humpel, 2015).

Zunächst wurden die Gehirne der Mäuse nach Dekapitation unter sterilen Bedingungen schnellstmöglich entfernt und in eine Präparationslösung (Tab. 1) in die 2-8°C kalte Kühlkammer bei pH 7,4 des Vibratoms (Tab. 8) gelegt. Damit wurden Horizontalschnitte der Gehirne mit einer Dicke von 275 µm angefertigt, sodass anschließend mit Hilfe eines Binokulars selektiv der Hippocampus der jeweiligen Schnitte auf einen Transwell-Filter einer 6-Well-Platte übertragen werden konnte (s. Tab. 8). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Temperatur während des Präparationsvorgangs möglichst zwischen 2-8°C gehalten werden kann, damit die organotypischen Kulturen erst im Inkubator eine Erwärmung auf 35°C bei befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO₂ erfuhren. Die Präparationsschritte sollten unter aller Sorgfalt dennoch so schnell wie möglich durchgeführt werden. Die Kulturen wurden jeweils in 1000 µl eines auf Körpertemperatur aufgewärmten Kulturmediums (Tab. 1) bei pH 7,3 inkubiert. Ein kompletter Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage mit aufgewärmtem Medium. Unter diesen Bedingungen konnte von einer Vitalität der Kulturen von Minimum 21 Tagen ausgegangen werden (Gahwiler et al., 2001; Humpel, 2015; Stoppini et al., 1991). Ergebnisse dieser Promotion in Form der methodischen Etablierung wurden mitsamt Analyse einer hippocampalen Entwicklungsreihe aus OTC bereits publiziert (Thome et al., 2023).

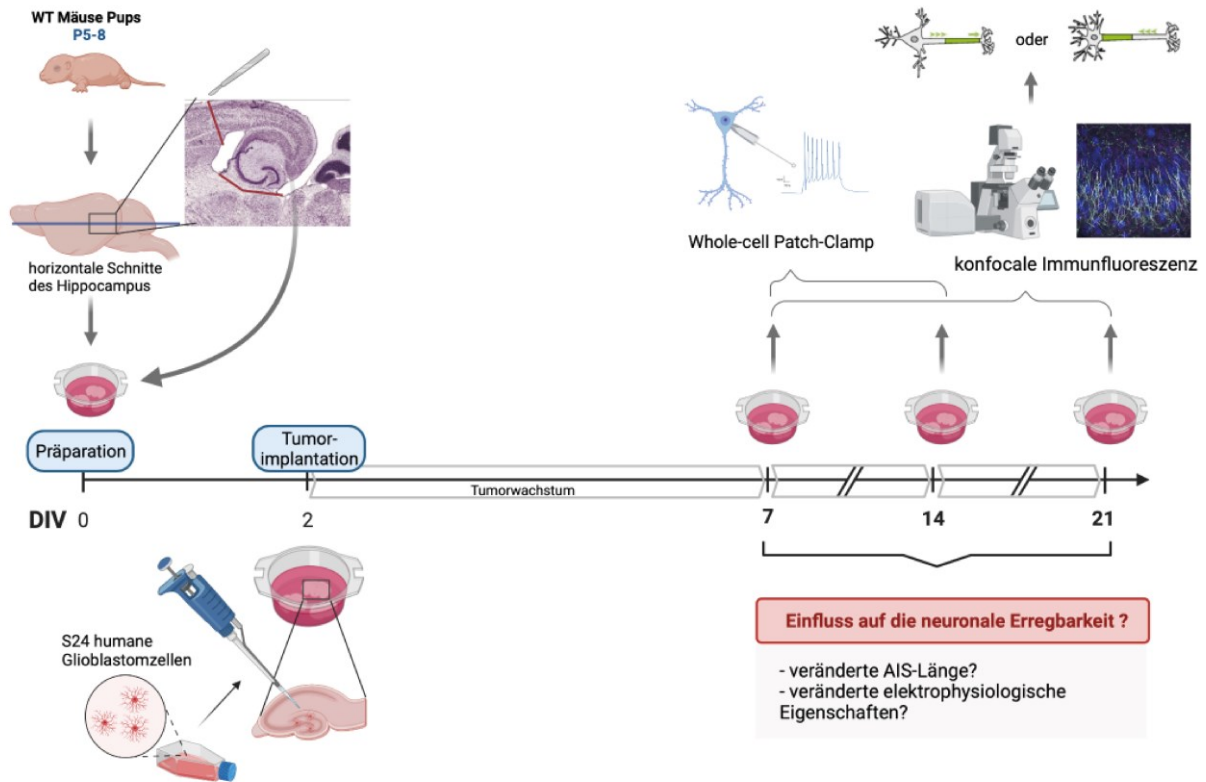


Abb. 9: Projektskizze

Zur Beantwortung der Frage, ob Glioblastome einen Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit des peritumoralen neuronalen Netzwerks haben, wurden zunächst organotypische Kulturen von horizontal geschnittenen Hippocampi 4-8 Tage alter Wildtyp-Mäuse-Pups angelegt. Für eine Versuchsreihe wurden Thy1-Mäuse verwendet, bei denen intrinsisch die Neurone der Zellschicht CA1 grün fluoreszieren. An Tag zwei *in vitro* wurde ein Teil der Kulturen mit S24 Glioblastom-Stammzellen beimpft, um dann an DIV 7, 14 und 21 jeweils verschiedene Messungen durchzuführen. Die Schwerpunkte bildeten dabei, elektrophysiologische Messungen v.a. an DIV 7 und DIV 14, sowie die Analyse der AIS-Länge und Position an allen drei Zeitpunkten. Erstellt mit *BioRender*.

Tab. 1: Lösungen zur Präparation der OTC

Lösung	Inhaltsstoffe	Quelle
Präparationslösung (pH = 7,38-7,4)	94% MEM	Thermo Fisher Scientific Invitrogen Life Technologies Corporation, Waltham, USA
	25% HEPES 1M Pufferlösung	Biowhittaker Inc, Walkersville, USA
	10% GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific Invitrogen Life Technologies Corporation, Waltham, USA
	10% Glukose 10% Penicillin and Streptomycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Kulturmedium (pH = 7,3 +/- 0,01)	42% MEM	Thermo Fisher Scientific Invitrogen Life Technologies Corporation, Waltham, USA
	25% BME	Thermo Fisher Scientific Invitrogen Life Technologies Corporation, Waltham, USA
	25% NHS (hitzeinaktiviertes Pferdeserum)	
	2,5% 1M HEPES Pufferlösung	Biowhittaker Inc, Walkersville, USA
	0,15% Bikarbonat	Biowhittaker Inc, Walkersville, USA
	0,65% Glukose	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
	0,1mg/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
	100 U/ml Penicillin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
	1% GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific Invitrogen Life Technologies Corporation, Waltham, USA
Ethanol	Ethanol 70%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.3 Tumorimplantation

Nach 2 Tagen in Kultur (DIV 2) wurden 0,5 µl einer hochdosierten S24-Glioblastom-Tumorzellsuspension, die zuvor unter mehrmaliger Waschung in PBS mit anschließender Verdauung der Extrazellulärmatrix durch Akutase vorbereitet wurden, (IDH Wildtyp, 1p/19q undeletiert; zur Verfügung gestellt von Dr. Miriam Ratliff, Klinik für Neurochirurgie der Universitätsmedizin Mannheim) mit einer feinen Pipette (1 µl) auf die OTC gegeben. Es ist darauf zu achten, dass der Suspensionstropfen auf dem Hirngewebe der Kultur verbleibt und nicht auf den Filter verläuft, da sonst die

Tumorzellen in unmittelbarer Nähe des Mediums auf dem Filter proliferieren und weniger invasiv in das Hirngewebe proliferieren.

2.4 Immunfluoreszenz und Bilderfassung

Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 zusammengefasst.

2.4.1 Immunfärbungen der humanen Glioblastomschnitte

Die bereits fixierten Kryoschnitte wurden gemäß der zuvor beschrieben und bereits veröffentlichten Methoden (Engelhardt et al., 2013; Hofflin et al., 2017) bearbeitet. Nach 10 Min Fixierung in 4% PFA wurden die Schnitte 3 x 5 Min in PBS gewaschen und anschließend 20 Min bei Raumtemperatur in Blockier- und Verdünnungspufferlösung (Tab. 3) inkubiert, um alle nicht spezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Dieser Schritt ist zur selektiven Antikörperbindungsfähigkeit an die vorgesehenen Epitope der Antikörper notwendig. Alle Primärantikörper (Tab. 1) inkubierten über Nacht bei Raumtemperatur gelöst in Verdünnungspuffer (1 % Rinderserumalbumin, 0,2 % Fischhautgelatine, 0,1 % Triton X-100 in PBS (0,1 M, pH 7,4)). Am nächsten Tag wurden die Schnitte dann wieder 3 x 5 Min zur Entfernung aller Reste der Primärantikörperlösung mit PBS gewaschen und wiederum für 2 h in Sekundärantikörperlösung (Tab. 2) nach gleichem Prinzip bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Zur Färbung von Zellkernen wurde To-Pro-3-Iodid (TOPRO) in 1:1000 Verdünnung verwendet. Negativkontrollen wurden simultan durchgeführt. Abschließend wurden die Schnitte mit Eindeckelungsmedium (Roti®-Mount, Tab. 3) benetzt und für die konfokale Mikroskopie mit einem Deckglas geschützt.

2.4.2 Immunfärbungen der OTC

Nach Entfernung des Kulturmediums aus den Wells, wurden die OTC für 20 Min mit 2% PFA noch auf dem Filter fixiert. Durch die Fixierung waren die Schnitte leicht von der Filtermembran lösbar und konnten dann mit Hilfe eines feinen Pinsels zur freischwimmenden Färbung in PBS einer 48-Well Costarplatte übertragen werden. Im Unterschied zu den zuvor beschriebenen Immunfärbungen der adhärennten Kryoschnitte wurden die OTC nach freischwimmenden Färbeprotokollen gefärbt. Um

die Penetration der Lösungen bzw. Antikörper in die Tiefe der Gewebsschnitte zu erhöhen, wurde die Inkubationszeit in Blockier- und Verdünnungspufferlösung auf 2 h erhöht. In der Sekundärantikörperlösung inkubierten die OTC über Nacht. Nicht genannte Färbeschritte unterschieden sich nicht zur adhärennten Färbeprozedur.

Tab. 2: Primärantikörper

Antikörper gegen (Spezies)	Zielstruktur	Epitop	Verdünnung	Klon/Typ	Quelle
kyrin-G (ms)	AIS Gerüstprotein	Fusionsprotein, ca. 1000 Aminosäuren, Fusionsprotein, N106/36	1:500	monoclonal	Neuromab, Davis Santa Cruz
kyrin-G (rb)	AIS Gerüstprotein	Aminosäuren 4163-4377 am C-terminus, Klon H-215 synthetisches Peptid, das der Sequenz von	1:500	polyclonal	Biotechnology, Santa Cruz, USA
Fos (rb)	Transkriptionsfaktor / nukleäres Onkogen	menschlichem c-Fos entspricht synthetisches Peptid der C-terminalen Region des	1:500	polyclonal	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Connexin 43 (ms)	elektrische Synapse (Gap Junction)	Connexin 43-Proteins, CXN-6 synthetisches Peptid der C-terminalen Region des	1:1000	monoclonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Connexin 43 (rb)	elektrische Synapse (Gap Junction)	Connexin 43-Proteins, CXN-6	1:1000	polyclonal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nestin (ms)	Neuronaler Differenzierungsmarker	Nestin-transfizierte NS0-Zellen, transfiziert mit einem humanen Nestin-Fragment aa-Reste 618-1618, 196908	1:500	monoclonal	Abcam, Cambridge, UK
NeuN (ch)	neuronales Soma	Rekombinantes Protein, Aminosäuren 1-97 von Maus-NeuN	1:500	polyclonal	Synaptic systems, Göttingen, Deutschland
NeuN (gp)	neuronales Soma	Rekombinantes Protein, das dem N-Terminus von Maus-NeuN entspricht	1:500	polyclonal	Synaptic systems, Göttingen, Deutschland
β-Spectrin (rb)	AIS Gerüstprotein	rekombinantes Protein angelehnt an humanes β-spectrin	1:1000	polyclonal	Selbstproduktion (Schluter et al., 2001) Mannheim, Deutschland

Tab. 3: Sekundärantikörper

Antikörper (Spezies)	kombiniert mit...	Verdünnung	Quelle
Anti-ch IgG (gt)	Alexa Fluor® 488	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-gp IgG (gt)	Alexa Fluor® 488	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-gp IgG (gt)	Alexa Fluor® 568	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-gp IgG (gt)	Alexa Fluor® 647	1:500	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-ms IgG (gt)	Alexa Fluor® 488	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-ms IgG (gt)	Alexa Fluor® 568	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-ms IgG (gt)	Alexa Fluor® 647	1:500	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-ms IgG (gt)	Alexa Fluor® 514	1:500	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-rb IgG (gt)	Alexa Fluor® 488	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-rb IgG (gt)	Alexa Fluor® 568	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-rb IgG (gt)	Alexa Fluor® 647	1:500	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-rb IgG (gt)	Alexa Fluor® 514	1:500	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Anti-rt IgG (gt)	Alexa Fluor® 647	1:500	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin	Alexa Fluor® 488	1:500	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin	Alexa Fluor® 568	1:500	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
ToPro3	To-Pro-3-iodide	1:1000	Thermo Fisher Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Tab. 4: Lösungen für Immunfluoreszenzfärbungen

Bezeichnung	Bestandteile	Quelle
PBS (1x)	in ddH ₂ O: 10 nM Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O 1.47 nM KH ₂ PO ₄ 130 nM NaCl 2.68 nM KCl pH = 7.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Blockier- und Verdünnungspufferlösung	In 1x TBS: 1% BSA 0.2% fish skin gelatin 0.1% Triton X-100	PAA Laboratories, Pasching, Österreich Sigma, St.Louis, USA Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TBS (1x)	in ddH ₂ O: 20 nM Tris 150 nM NaCl pH = 7.6	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PFA (2%/4%)	in 1x PBS 4% PFA 1:1 in PBS bzw. ohne Verdünnung gelagert bei -20°C filtered, 4°C, pH = 7.4	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sudanblack Ethanol	0,3g / 100ml 70% Ethanol Ethanol 99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Clear n-Butylacetat		Sakura Finetek, Alphe, Niederlanden Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einbettungsmedien	Tissue Tek ® Roti®-Mount FluorCare	Sakura Finetek, Alphe, Niederlanden Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N2-Isopenthan		AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Histofluid		neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland

PBS: phosphate-buffered saline, PFA: paraformaldehyde, POD= peroxidase, IF: Immunofluorescence, POD: peroxidase

2.4.3 Bilderfassung

Die konfokale Mikroskopie wurde an einem Nikon C2 oder Leica SP5 MultiPhoton Mikroskop (s. Tab. 7) aufgenommen, welche insgesamt mit 10x (0,3 NA), 20x (0,75 NA), 60x (Ölimmersion, 1,4 NA) und einem 63x (Glycerinemersion, 1,3 NA) Objektiv ausgestattet sind. Die Laserdetektoren und Verstärkereinstellungen wurden individuell an die Pixelintensitäten und Färbequalitäten angepasst, um ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis zu erhalten. Folgende Bedingungen galten jeweils für die Aufnahmen: Scangeschwindigkeit ¼ bei 1024 x 1024 Pixeln pro Bild. Die Anzahl der Infokusstrukturen, wie z.B. ein AIS in der Z-Ebene, konnten durch Bildstapel erhöht und anschließend zu einer Maximalintensitätsprojektion fusioniert werden. Die Dicke

der einzelnen optischen Schnitte betrug zwischen 0,25-0,5 μm und ergaben in Stapeln eine Tiefe von 7-15 μm . In einzelnen Ausnahmen wurden Bilder mit wesentlich größerer Z-Ausdehnung aufgenommen. So konnten z.B. Antikörpereindringtiefen oder die Gewebsresttiefe der OTC beurteilt werden.

2.5 Elektrophysiologie

Die OTC wurden jeweils mit Filtermembran aus dem Plastikring der Millipore-Filter herausgeschnitten, in die Flüssigkeitskammer des Patch-Setups übertragen und mit einer Harfe fixiert. Die Kammer wurde mit frischem ACSF (artificial cerebral spinal fluid: 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 25 mM Glukose bei einer Osmolarität von 295 mOsm; s. Tab. 4) gefüllt, unter kontinuierlichem Fluss mit Carbogengas (95% O_2 , 5% CO_2) begast und konstant auf 35°C beheizt (npi TC-20). Hippocampale Pyramidenzellen der CA3-CA1-Schichten wurden mit einem aufrechten Nikon Eclipse FNA1-Mikroskop, ausgestattet mit einem DIC-Kontrastfilter und einem Wasserimmersionsobjektiv (10x, 0,1 NA; 40x, 0,8 NA, Olympus), visualisiert. Die somatischen Einzelaufnahmen („whole-cell Patch-Clamp“) wurden mit einem HEKA EPC10-USB-Verstärker, der von der Patchmaster Software (HEKA Electronics) angesteuert wurde, durchgeführt. Gefiltert wurden die Daten mit 10 kHz und 2,9 kHz Tiefenfiltern, anschließend digitalisiert und mit 50kHz abgefragt. Schnelle und langsame Kapazitäten wurden mit den Autofunktionen der Patchmaster Software in den Konfigurationen „cell-attached“ und „whole-cell“ kompensiert. Der Serienwiderstand (R_s) wurde wiederholt gemessen und bei -10 mV im „voltage-clamp“-Modus überprüft.

Für die durchgeführten Messungen wurden Patch-Pipetten aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Hilfe eines Flaming/Brown-Mikropipetten Pullers auf Spitzenwiderstände zwischen 3,5-5 $\text{m}\Omega$ gezogen und mit Intrazellulärflüssigkeit (140 mM K-Gluconat, 3 mM KCl, 4 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0,2 mM EGTA, 2 mM MgATP, 0,1 mM NaGTP und 3 mg/ml Biocytin für die post-hoc Immunfluoreszenz Rekonstruktion, bei pH 7,2-7,25 mit KOH adjustiert und einer Osmolarität von 280 mOsm) gefüllt.

Das Ruhemembranpotential (RMP) wurde sofort nach Eröffnung der Zellmembran und Stabilisierung der Zelle im Ganzzellmodus bei einem Stromfluss von $I=0$ pA im „current-clamp“-Modus, sprich ohne jegliche Stimulusinjektion, gemessen. Im gleichen

Modus wurden auch intrinsisch neuronale Feuereigenschaften gemessen, indem die Stromstärke schrittweise um 10 pA bei einer Dauer von 20 ms erhöht wurde, sodass Änderungen der Membranspannung und schließlich Aktionspotentiale (APs) ausgelöst wurden. Zur Analyse von AP-Frequenzmustern wurde auch ein Protokoll mit jeweils 500 ms andauernden Stromimpulsen mit schrittweiser Erhöhung um 50 pA verwendet. Anschließend wurden spontane postsynaptische Ströme (sPSCs) für 2 Min bei -70 mV im „voltage-clamp“-Modus aufgezeichnet.

Dabei wurde ein OTC nicht länger als 2h genutzt und anschließend für 20 Min in 2% PFA fixiert. Anschließend wurden die zuvor beschriebenen Protokolle der Immunfluoreszenzfärbungen angewandt. Eine Auflistung des gesamten Equipments ist in Tab. 7 zu entnehmen.

Tab. 5: Lösungen für Elektrophysiologie

Bezeichnung	Bestandteile	Quelle
ACSF	125 mM NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	2,5 mM KCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
	1.25 mM NaH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	25 mM NaHCO ₃	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	1 mM MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
	2 mM CaCl ₂	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
	25 mM Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Constant oxygeniert mit 95% O ₂ /5% CO ₂ annähernd. 300 mosmol.	
Intracelluläre Lösung	In ddH ₂ O	
	140 mM K-Gluconate	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	3 mM KCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
	4 mM NaCl	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
	10 mM HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	0.2 mM EGTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
	2 mM Mg ATP	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
	0.1 mM Na ₃ GTP	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
260-280 mosmol pH 7.2 mit 1 M KCl +3mg/ml Biocytin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	

ACSF: artificial cerebral spinal fluid, HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid, EGTA: ethylene glycol-bis-(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid

2.6 Analyse und Statistik

2.6.1 Morphologische Analyse

Die Bilder wurden in Adobe Photoshop 2021 (Adobe Systems) und FIJI 2.0.0 (ImageJ, frei zugänglich) kontrastverstärkend bearbeitet, sodass anschließend mit einer von unserem Labor selbst entworfenen Software AISuite (Roos & Engelhardt, unveröffentlicht; github.com/jhnnrsrs/aisuite2) die AIS-Längen analysiert werden konnten (Hofflin et al., 2017; Jamann et al., 2018; Schluter et al., 2017). Die AISuite definiert proximale und distale AIS-Grenzen als Punkte mit einem vordefinierten Fluoreszenzschwellenwert in Bezug auf die maximale Fluoreszenzintensität entlang einer Linie, die über ein individuelles AIS gezogen und dann geglättet wird. Die maximale Fluoreszenzintensität jedes ausgewählten AIS wurde als 100% definiert und die Fluoreszenzschwelle dabei in Abhängigkeit vom Hintergrundrauschen zwischen 20-40% gewählt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass der Beginn und das Ende des AIS nicht individuell und damit nicht subjektiv definiert werden müssen, sondern automatisch über die Fluoreszenzschwelle bestimmt wird. Das Risiko einen sogenannten *selection bias* (Auswahlverzerrung) zu begehen wird dadurch minimiert. Anhand der Einstellungen und der Kalibrierung des konfokalen Mikroskops kann die Software die Anzahl der Pixel in μm umrechnen (beim 60x-Objektiv = $0,21 \mu\text{m}/\text{Pixel}$). Des Weiteren wurden AIS-Längen in ImageJ 2.0.0 und dem Add-on „Single neurite tracer“ (SNT) in Ergänzung eines vom Labor selbst erstellten Python-Skriptes (frei zugänglich, unveröffentlicht; github.com/NadjaLe/ChannelAnalysis) analysiert. Dazu wurden in 3-dimensionaler Ausrichtung jeweils das Soma Ende, AIS Beginn und Endpunkt pixelgenau über das Ende der Fluoreszenz hinaus definiert. Dabei wurden nur Neurone berücksichtigt, deren komplettes Soma mit NeuN angefärbt werden und ein eindeutiges AIS zugeordnet werden konnte. Auch hier kann die Software anhand der Kalibrierung des Mikroskops Pixel in μm umrechnen. Auch mit dieser Methode wurden im Verlauf Experimente AIS-Längenmessungen vorgenommen. Das Python-Skript zusammen mit dem SNT verhindert ebenfalls einen *selection bias*, da auch hier Anfang und Ende des AIS mittels einer Fluoreszenzschwelle von 40% der normierten Maximalintensität der Pixel in direkter Umgebung der definierten Interessensregion („region of interests“; ROIs) ermittelt werden. Ein Vergleich beider Methoden ist in Abb.10 zu sehen und wird im Diskussionsteil noch genauer diskutiert.

Um synaptische Strukturen wie Connexine oder andere direkte Zellkontakte zu analysieren wurden Bilderstapel zur morphologischen Veranschaulichung in der Z-Ebene mit der Software AutoQuant X3® (Media Cybernetics, USA, Tab. 10) dekonvolutioniert. Danach wurden die dekonvolvierten Bilder zur 3D-Rekonstruktion in die Software Imaris® (Bitplane, Schweiz, Tab. 10) eingeladen. Alle Rekonstruktionsverfahren wurden mit Hilfe der Anweisungen der Software durchgeführt, einschließlich der Hintergrundsubtraktion. Die quantitative Analyse der Connexin 43 Gap Junctions erfolgte anhand einer Colokalisationsanalyse mit AnkG in Abhängigkeit der AIS-Länge. Dazu wurde im ersten Schritt in ImageJ ein AIS dreidimensional als ROI bestimmt, nachdem eine Hintergrundsubtraktion durchgeführt wurde. Anschließend wurde diese ROI mit Hilfe des Tools „ComDet“ auf Colokalisationen zwischen Cx43 und AnkG hin untersucht. Die maximal geduldete Distanz zwischen zwei potentiell colokalisierten Pixeln der minimalen Größe von 5 Pixeln für AnkG und 3 Pixeln für Cx43 wurde mit 4 Pixeln (ca. 0,84 μm) definiert. Die Intensitätsschwellenwerte wurden einheitlich mit 3 Standardabweichungen (SD) für AnkG und 4 SDs für Cx43 bestimmt. Die jeweiligen AIS-Längen wurden wie zuvor beschrieben mit dem SNT gemessen.

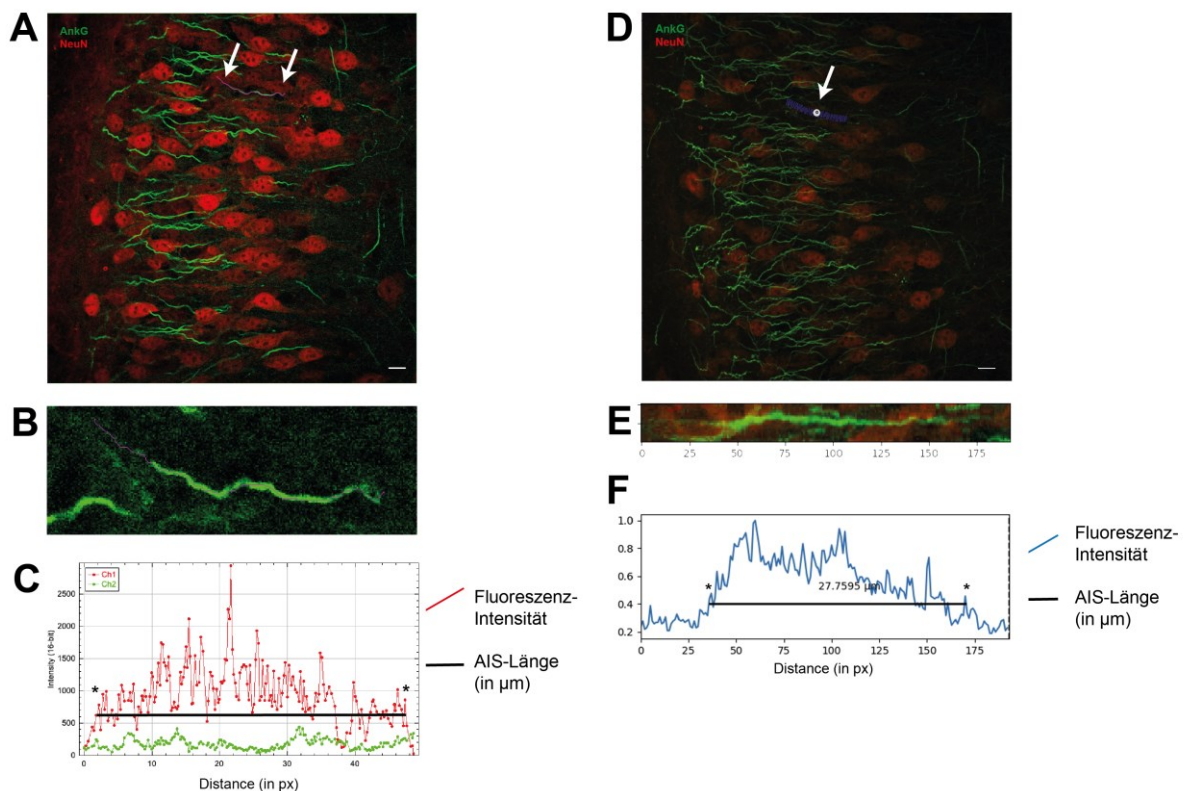


Abb.10: Darstellung SNT in ImageJ und AISuite

(A) Originalbild im Single Neurite Tracer in Image J in 1024x1024 px. Die Pfeile deuten auf ein markiertes AIS, das in (B) in einer Zoom-Darstellung gezeigt wird. Anhand der Fluoreszenz-Intensität-Kurve (C) misst ein zusätzliches Makro, das Rohwerte der Pixelintensitäten in Distanzen umwandelt mit einem vorgegebenem Schwellenwert von 40% der normierten Maximalintensität. Anfang und Ende des AIS wurden immer dann erkannt, wenn der Schwellenwert überschritten bzw. unterschritten wurde (*). Die Pixellänge wird auf Grundlage der Kalibrierung der Mikroskopeinstellungen je nach Objektiv (hier 60x = 0,21px/μm) umgerechnet. Maßstabsbalken in (A) = 10 μm

(D) Originalbild der selben Aufnahme wie in (A) in der maximalen Intensitätsprojektion in AISuite in ebenfalls 1024 x 1024 px. Auch hier zeigt der Pfeil auf das gleiche bereits markierte AIS. (E) Begradigtes markiertes AIS in zweidimensionaler Erfassung. (F) Profil der Fluoreszenzintensität des in (D) und (E) ausgewählten AIS. Aufgetragen wurde die Länge gegen die Intensität, wobei 1.0 = 100%. Hier wurden Anfang und Ende immer dann erkannt, wenn 40% der maximalen Intensität erreicht wurden (*). Pixellänge und Maßstabsbalken sind identisch zu (A-C).

2.6.2 Elektrophysiologische Analyse

Alle elektrophysiologischen Daten wurden offline mit folgenden Programmen analysiert: Fitmaster Software (HEKA Electronics, Deutschland; Tab. 10) und AxoGraph (AxoGraph Scientific, John Clements, USA; Tab. 10). Neurone mit einem Serienwiderstand >30 mΩ wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen und Spannungen auf das berechnete Flüssigkeitsübertragungspotential von 12 mV korrigiert. Der AP-Schwellenwert wurde beim ersten Impuls von 20 ms definiert, bei dem zuverlässige APs erzeugt wurden. Der Startpunkt der ansteigenden Phase und damit der Schwellenpunkt eines APs wurde bei einer Schwellenrate von 50 mV/ms definiert. Die AP-Amplitude ist die Differenz zwischen Spannungsschwelle und Spitzenspannung. Die AP-Halbwertsbreite (sog. „half-width“) ist die Breite bei mittlerer Spannung dieser AP-Amplitude. EPSCs wurden mit der automatischen Ereigniserkennungsfunktion von AxoGraph X (AxoGraph Scientific) ausgewertet.

2.6.3 Statistik

Die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der AIS-Längen und AIS-Soma-Abstände wurden in GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc.; Tab. 10) berechnet, geplottet und analysiert. Die Normalität einer Verteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test beurteilt. Um die statistische Signifikanz von parametrischen bzw. nicht-parametrischen Vergleichen zweier Gruppen/Merkmale zu testen wurde ein t-Test oder Mann-Whitney-Test im Falle einer nicht-parametrischen Verteilung angewendet,

wenn es darum ging Unterschiede der Mediane zu ermitteln. Da es in dieser Arbeit mehrfach von Bedeutung war zu ermitteln, inwiefern sich die Verteilung von Messwerten unterscheiden, wurde bei nicht-parametrischen Verteilungen vereinzelt auch der Kolmogorov-Smirnov-Test genutzt. Der Welch-Test kann verwendet werden um parametrische Verteilungen ungleicher Varianzen zu testen, allerdings wurde aufgrund gleicher Stichprobengrößen meist davon abgesehen. Für parametrische Vergleiche von >2 Gruppen/Merkmalen wurden einfache bzw. mehrfaktorielle ANOVA-Tests ggf. gefolgt von einer entsprechenden Post-hoc-Korrektur (Tukey's multiple comparisons) durchgeführt. Bei nicht-parametrischen Verteilungen wurden ein- oder zweifache ANOVA-Tests über Ränge (Kruskal-Wallis-Test) durchgeführt und ggf. post-hoc korrigiert. Alle Daten werden in Diagrammen oder Tabellen nach folgendem Schema dargestellt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Boxplots zeigen den Median, die Interquartilverteilung und den Minimal- bzw. Maximalwert der Stichprobe. Genauere Informationen zu den Tests, p-Werten und dem Stichprobenumfang sind jeweils in den Legenden der Abbildungen erläutert.

3 ERGEBNISSE

Für eine detaillierte Zusammenfassung aller statistischer Ergebnisse siehe Tab. 11-28 im Anhang.

In dieser Arbeit untersuchten wir, inwiefern ein Glioblastom als interkonnektives Tumornetzwerk die Erregbarkeit des peritumoralen neuronalen Netzwerks beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde neben morphologischen Aspekten im humanen Tumorpräparat und der organotypischen Kultur muriner Hippocampusschnitte wie die AIS-Länge und die Verteilung möglicher Kontaktpunkte zwischen Tumorausläufern und AIS auch elektrophysiologische Parameter im Vergleich zu nicht tumorbefallenen Kulturen untersucht. Mit der Charakterisierung der AIS-Plastizität wollen wir strukturelle und funktionelle Korrelate der Tumor-Neuron-Kommunikation finden, die bekanntlich einen Einfluss auf die Therapieresistenz der Tumorerkrankung hat (Venkataramani et al., 2019).

3.1 Neuronale Strukturen in humanen Tumorresektaten

Das AIS nimmt als molekulare Mikrodomäne am Axon eine besondere Stellung in der neuronalen Funktion ein, da es für die Generierung von APs essenziell ist (Kole and Stuart, 2012). Das AIS kann mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen seine wichtigsten Gerüstproteine AnkG und β IV-Spektrin mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Alle genutzten Antikörper und Färbeprotokolle wurden bereits zuvor in unserem Labor erprobt und etabliert (Gutzmann et al., 2014; Hofflin et al., 2017; Jamann et al., 2018). Für diese Arbeit wurden die in Tab. 1 und 2 genutzten Primär- und Sekundärantikörper in geeigneten Wirtskombinationen ausgewählt, um optimale Färbeergebnisse zu erhalten. Die Verwendung und Anpassung erprobter Färbeprotokolle soll reproduzierbare und konsistent gute Ergebnisse garantieren. Obwohl bereits geeignete Protokolle für den Hippocampus getestet worden sind (Thome et al., 2014), mussten geeignete Protokolle für humane OP-Tumorresektate, sowie organotypische Kulturen aus Maushirn getestet werden.

Die Güte einer Färbung wurde anhand folgender Parameter beurteilt, die von verschiedenen Antikörperkonzentrationen und Fixierungstechniken abhängen:

- Intensität der Färbung als solche gegen die Zielstruktur
- Intensität der Hintergrundfärbung mit optimalem Signal-zu-Rauschen Verhältnis und Minimierung unspezifischer Immunreaktivität
- Integrität des Gewebes nach der Fixierung und Färbung

3.1.1 Fixierung und Färbung humaner Resektate

Die Prüfung von Antikörpern und Färbeprotokollen in verschiedenen Konzentrationen, Kombinationen und Wirtsarten führte zu dem Ergebnis, dass die relevanten getesteten Antikörper zur Färbung des AIS, neuronaler Somata und Zellkerne auch in humanem, in 4% PFA fixiertem Gewebe verwendet werden können (Abb.11). Allerdings waren auf nahezu allen Objektträgern im Hintergrund Lipofuszingranula sichtbar (gelbe Pfeile in Abb.11). Um die unspezifische Hintergrundfluoreszenz des Lipofuszins zu reduzieren, wurde eine Sudanschwarz-Färbung durchgeführt (Neumann and Gabel, 2002). Trotz verschiedener Inkubationszeiten (10 Sek., 1 Min. und 10 Min.) konnte keine Färbung erzeugt werden, bei der die Primärantikörper ihre Epitopspezifität beibehielten und gleichzeitig die Autofluoreszenz des Lipofuszins reduziert wurde. Die qualitative Analyse der Schnitte zeigte deutlich neuronaler Strukturen, meist Somata, die sich in Nestern sammelten, während andere Bereiche weitgehend frei von neuronalen Strukturen waren (Abb.11). Bereiche, die angefärbt und analysiert wurden, entstammten zumeist aus dem Bereich der Penumbra, wo Gewebe in seiner Integrität weitestgehend erhalten blieb. Nekrosierte Tumorkerne wurden nicht analysiert.

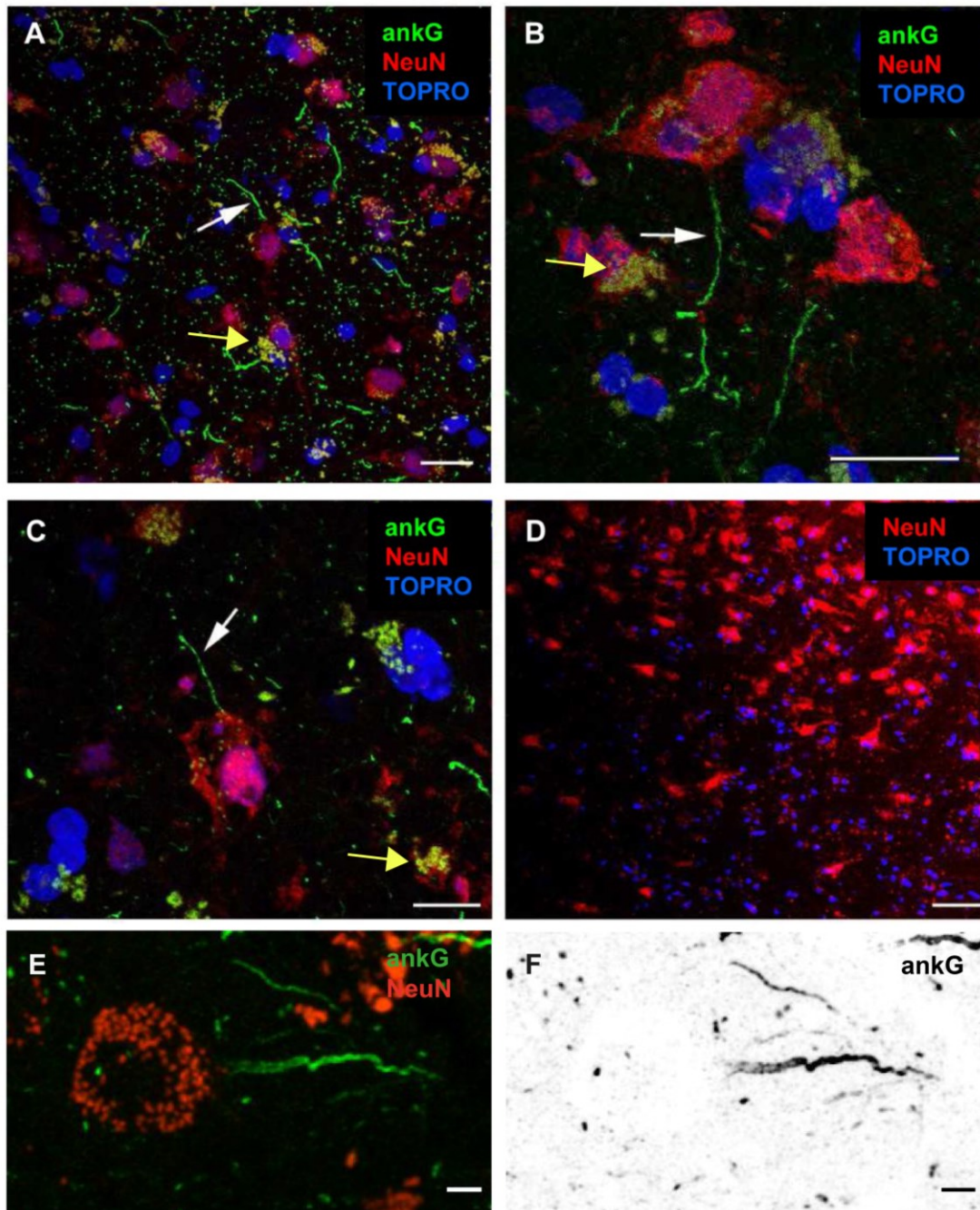


Abb.11: Implementierung einer AIS-Färbung im humanen Tumorresektat

Repräsentative Bilder der getesteten Antikörper.

(A) Neuronen (Pfeile) mit AIS, gefärbt gegen ankG (ms; grün), NeuN (gp; rot) und TOPRO (blau).

(B) Höhere Vergrößerung von Neuronen mit AIS, wie durch Pfeil angezeigt. Färbung gegen AnkG (ms; grün), NeuN (gp; rot) und TOPRO (blau).

(C) Neuron mit AIS (Pfeil), gefärbt gegen AnkG (ms; grün), NeuN (gp; rot) und TOPRO (blau).

(D) Übersicht über das Gebiet mit hoher Neuronendichte, gefärbt gegen NeuN (gp; rot) und TOPRO (blau).

(E) und (F) Vergrößerte Aufnahme eines Neurons mit ebenfalls NeuN, (gp; rot) und ankG (ms; blau) mit invertierter schwarz-weiß Darstellung des AnkG in (F). Gelbe Pfeile deuten auf Lipofuszingranula.

(A,B,C,E,F) Neben AIS färbt der ankG-Ak putativ auch die punktförmigen Ranvier'sche Knoten

im neuronalen Gewebe an. Maßstabsbalken in A = 25 μm ; B = 50 μm ; C = 20 μm ; D = 50 μm ; E = 5 μm

3.1.2 AIS-Vergleiche in humanen Geweberesektaten zeigten keine Unterschiede

Wie sich gezeigt hat, spielt das AIS eine entscheidende Rolle als Modulator bzw. Indikator für Veränderungen eines Netzwerkzustandes (Engelhardt et al., 2019; Jamann et al., 2018). Jüngste Erkenntnisse zeigen, dass Malignität und Therapieresistenz astrozytärer Tumore direkt mit den Kommunikationsprinzipien der Tumorzellen untereinander und dem neuronalen Netzwerk zusammenhängen (Jung et al., 2020; Jung et al., 2019; Osswald et al., 2016). Ergebnisse legten nahe, dass neuronale Aktivität die Proliferation glialer Vorläuferzellen fördert und sich daraus die Hypothese bildete, dass Gliomzellen direkten, funktionellen Einfluss auf die neuronale Aktivität nehmen (Osswald et al., 2015; Osswald et al., 2016).

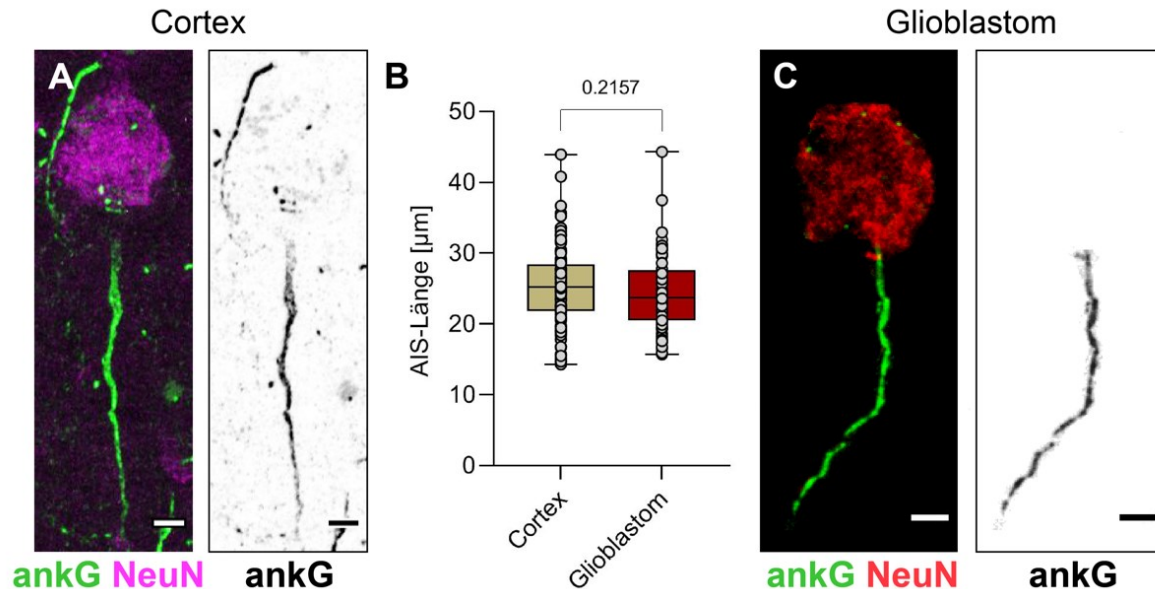
Um die Verteilung neuronaler Strukturen im Tumorsektat zu untersuchen, analysierten wir, inwiefern sich AIS morphologisch in Neuronenclustern, wie wir sie in humanen Tumorsektaten beobachten konnten, im Vergleich zu einem mikroskopisch nicht befallenen Resektionsgebiet des peritumoralen Cortex unterscheiden. Wie unter 1.1 beschrieben, handelt es sich bei den Astrozytomen um diffus wachsende Tumore, deren Fortsätze und TMs nicht nur als solide, lokale Tumormassen zu finden sind, sondern spinnennetzartig das gesamte Gehirn befallen können (Louis et al., 2016). Dieser Fakt erschwerte die Auswahl eines geeigneten Kontrollgewebes maßgeblich, da es erwartungsgemäß nahezu unmöglich ist gesundes, operativ gewonnenes, menschliches Hirngewebe zu untersuchen. So entschieden wir uns dazu, als Kontrollgewebe peritumoralen Cortex, der keine Tumormarker positiven Zellen (z.B. Nestin) enthielt, zu nutzen, obwohl dieses Präparat ebenso aus dem Hirn eines Glioblastopatienten stammt.

Wie in allen folgenden AIS-Längen-Analysen wurde die Immunfluoreszenzfärbung der Gerüstproteine βIV -Spektrin oder AnkG zur Bestimmung der AIS-Länge verwendet.

Die Längen der AIS im peritumoralen Cortex unterschieden sich zu den AIS in Neuronennestern des Tumorgewebes nicht signifikant ($n=100$ vs. $n=60$, Mann-Whitney-Test, $p>0,05$; Abb. 12B).

Wie bereits angedeutet wurde, ist die Datenqualität aus humanen OP-Proben stark eingeschränkt, da zunächst die Kontrollgruppe im eigentlichen Sinne keine Kontrolle

darstellt, da auch vermeindlich tumorfreie Areale dem Hirn eines Glioblastompatienten entnommen wurden und somit davon auszugehen ist, dass das Mikromillieu ebenso pathologisch verändert war. Des Weiteren waren in Schnitten von Tumorgewebe nur sehr vereinzelt und heterogen verteilte Bereiche mit hoher Neuronendichte zu finden



mit unklarer Integration ins neuronale Netzwerk des betroffenen Areals.

Abb. 12: Kein Unterschied zwischen AIS-Längen in humanen Tumorproben

Repräsentative konfokale Bilder von AIS und Somata von Pyramidenzellen.

(A) Repräsentatives AIS (ms-Anti-AnkG, grün) aus peritumoralem Cortex.

(B) AIS Längen weisen in beiden Bereichen keinen signifikanten Unterschied auf ($p=0,22$). Gemessen wurden im peritumoralen Cortex ohne Nestin-positive Astrozytomzellen in $n=100$ AIS. In Neuronennestern mitten im Glioblastom-Bereich wurden insgesamt $n=60$ AIS gemessen. Angewandt wurde der Mann-Whitney Test ($P = 0,22$) als nicht-parametrischer t-Test. Boxplots zeigen den Median mit einem Intervall von 25 bis 75% der Messwerte, die Fehlerbalken zeigen die Minimal- bzw. Maximalwerte. Die beiden Gewebeproben stammten nicht aus dem gleichen Patienten.

(C) Repräsentatives AIS (ms-Anti-AnkG, grün) aus Tumorbereich. Maßstabsbalken in A = 5 µm; C = 5 µm

3.2 Neuronale Plastizität in organotypischen Kulturen

Eine geeignete Methode, die es ermöglicht reproduzierbar ein intaktes Gewebe auf neuronale Plastizität hin innerhalb eines aktiven Netzwerks zu untersuchen und dieses auch noch mittels Tumoringektion manipulieren zu können, stellen die organotypischen Kulturen (OTC) dar. Die Wahl fiel auf das Areal des Hippocampus, der *in vitro* eine

weitestgehend unveränderte Morphologie und Funktion aufweist (Grabiec et al., 2017; Humpel, 2015; Stoppini et al., 1991).

3.2.1 Fixierung und Färbung der OTC

Zunächst wurden die im Labor etablierten Färbe- und Fixierungsprotokolle in den OTC muriner Hippocampi reproduziert.

In fixierten OTC konnten die Immunfluoreszenzfärbungen mit zuvor etablierten Protokollen nach Laborstandard zuverlässig angewendet werden (Abb.13). Je nach verwendetem Antikörper wurden reproduzierbare Färbungen sowohl mit 2% PFA, also auch 4% PFA-Fixierung erzielt. Zunächst stellte sich die Frage, ob die Filtermembranen der MilliPore®-Einsätze, auf denen die OTC kultivierten, entfernt werden müssen. Zwar erhöhten verbleibende Membranen in tiefen Schnittebenen die Hintergrundfluoreszenz, dafür konnte die Integrität des Gewebes unter Vermeidung eines traumatischen Ablöseversuchs deutlich verbessert werden.

Generell wurden für sämtliche Analysen qualitativer und quantitativer Art nur OTC verwendet, die nach den gängigen Kriterien der Vitalität solcher Kulturen für vital erachtet wurden (Einleitung Abschnitt 1.3). Neben den Antikörperfärbungen (explizit NeuN und negative Caspase-Aktivität), die mikroskopisch beurteilt eine gute Einschätzung des Kulturzustandes ergeben, wurde außerdem das makroskopische Erscheinungsbild der OTC beurteilt und auf weißliche Sklerosierungen geachtet (Humpel, 2015; Lossi et al., 2010; Noraberg et al., 1999; Noraberg et al., 2005). Nicht zuletzt zeigten auch die elektrophysiologischen Untersuchungen die Vitalität der gemessenen Neurone (Ergebnisse 3.4).

Im Zuge der Analyse neuronaler Strukturen wurden folgende reproduzierbar angefärbt:

- **AIS:** Auch in OTC dienten die Gerüstproteine AnkG und β IV-Spektrin als reproduzierbare AIS-Marker (Rasband, 2010). Wie in Abb.13 zu sehen, konnten die Ergebnisse unserer Färbeprotokolle bestätigt werden (Gutzmann et al., 2014). Sowohl die monoklonalen ms-Anti-ankG-Antikörper, als auch die polyklonalen rb-Anti- β IV-Spektrin-Antikörper zeigten keine offensichtlichen Unterschiede in Bezug auf Spezifität, Zuverlässigkeit und Überlappung der Fluoreszenzintensität.
- **Soma:** Eine zuverlässige Anfärbung der Somata von Neuronen war aus mehreren Gründen wichtig. Die erfolgreich erprobten Anti-NeuN-Antikörper

ließen nicht nur die Analyse der morphologischen Integrität der verschiedenen Zellschichten zu, sondern dienten auch als Viabilitätsnachweis der gesamten Kultur (Gusel'nikova and Korzhevskiy, 2015)

- **Glioblastom-Zellen:** Die verwendeten S24-Glioblastomzellen humanen Ursprungs waren intrinsisch mit dem Farbstoff tdTomato versehen, sodass prinzipiell keine weitere Färbung notwendig gewesen wäre. Allerdings war das Signal in jeder Zellzucht unterschiedlich stark ausgeprägt, sodass der ms-Anti-Nestin-Antikörper zusätzlich verwendet wurde, um die Färbeintensität einerseits zu verbessern und andererseits einen gängigen Tumormarker, der von vielen Laborgruppen (z.B. Osswald et al.; Singh et al.) verwendet wird, anzuwenden (Abb. 13).
- **Connexin-43:** Die Betrachtung der Connexine rückte während des Projekts in den Fokus, da sich die Anzeichen verdichteten, dass diese Gap Junction-Proteine nicht nur an der Kommunikation der einzelnen TMs untereinander eine entscheidende Rolle spielen (Osswald et al., 2015), sondern vielleicht sogar in der Tumor-Neuron-Kommunikation (Kirichenko et al., 2017; Tabernero et al., 2016; Venkataramani et al., 2019). Zwar wiesen sowohl die getesteten ms-Anti-Cx43-Antikörper, als auch die rb-Anti-Cx43-Antikörper eine maximale Eindringtiefe von ca. 15-20 μm auf, dennoch konnten sie zuverlässig sowohl an axonalen, als auch Tumorstrukturen angefärbt werden (Abb. 13)

Teile der hier genannten Ergebnisse in Form von vitalen OTC des murinen Hippocampus über 21 DIV hinweg, in denen neuronale Strukturen reproduzierbar und zuverlässig angefärbt werden konnten, wurden bereits publiziert (Thome et al., 2023). Mit der Etablierung dieser Methode wurde die Grundlage für viele experimentelle Fragestellungen gelegt, in denen einzelne Parameter und deren Auswirkungen auf bspw. das Verhalten des gesamten neuronalen Netzwerks untersucht werden können.

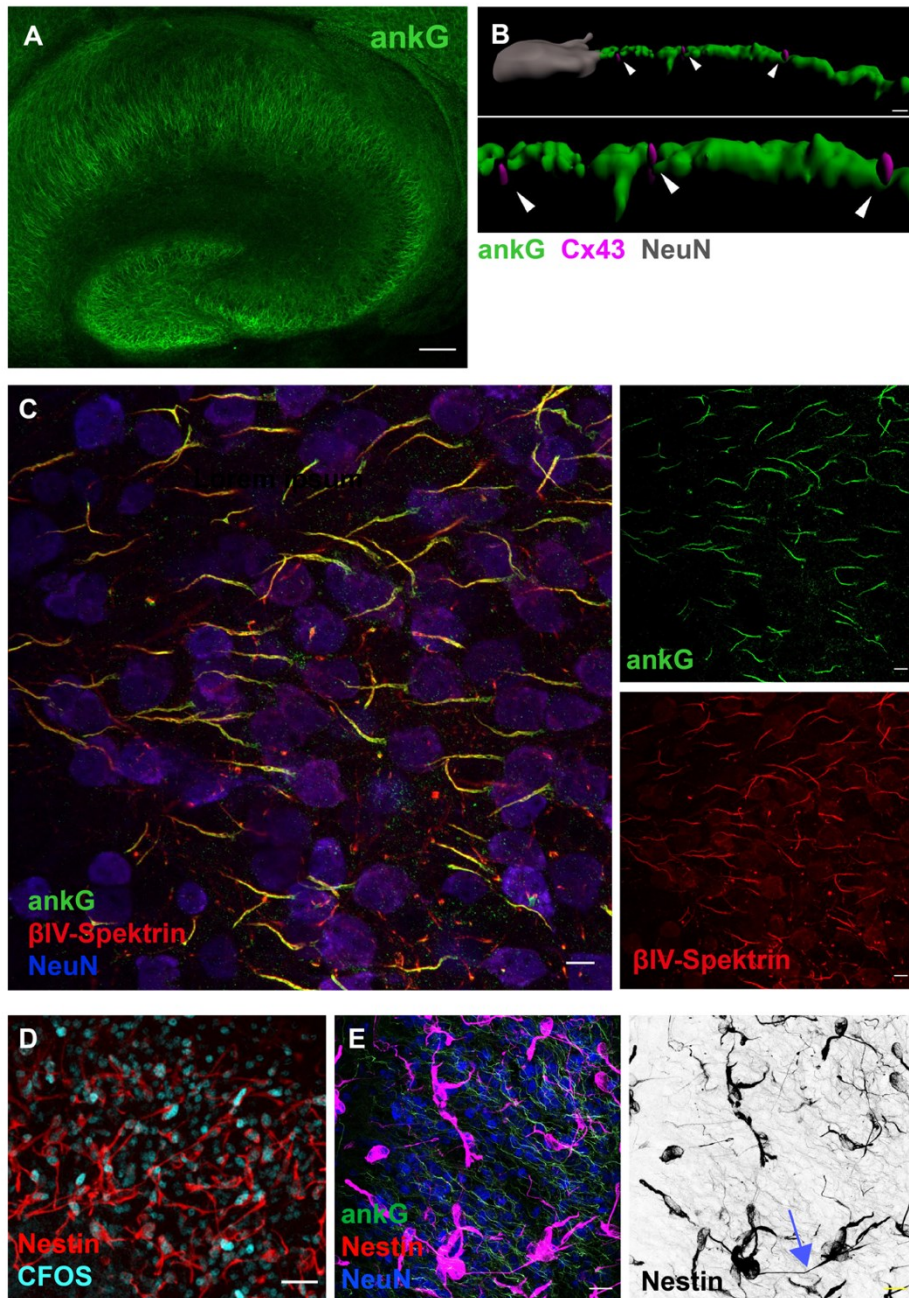


Abb.13: Implementierung der Immunfärbungen in OTC

Repräsentative Bilder der getesteten Antikörper.

(A) Aufnahme eines horizontal geschnittenen Hippocampus im OTC nach 21 Tagen in vitro mit AIS gefärbt gegen ankG (ms; grün).

(B) 3D-Rekonstruktion von Connexin 43 im AIS bei hoher Vergrößerung. Die weißen Pfeile deuten auf Cx43-Cluster.

(C) Ausschnitt auf der CA-Schicht mit kongruenten AIS-Färbungen gegen ankG (ms; grün) und β IV-Spektrin (rb; rot). Die jeweiligen Einzelkanäle sind auf der rechten Seite der Grafik (C) zu sehen.

(D) Ein Cluster von Glioblastomzellen, die gegen Nestin (ms; rot) und CFOS (rb; cyan) gefärbt wurden. Die Somata der Gliozellen sind jeweils CFOS-positiv.

(E) Glioblastomzellen auf Zellen der CA-Schicht des Hippocampus. In der invertierten schwarz-weiß Aufnahme am rechten unteren Rand der Abbildung ist ein sich entwickelnder

Tumor-Mikrotubuli mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet. Hier wurden dieselben Antikörper wie in (A)-(D) genutzt.

Maßstabsbalken in A = 100 µm; B = 1 µm; C = 10 µm; D = 50 µm; E = 20 µm

3.2.2 Die Entwicklung des AIS im Hippocampus der organotypischen Kultur

Tab. 6: Übersicht aller verwendeter OTC

Versuch	Anzahl OTC (n) / Kondition	Alter bei Präparation	gemessene AIS
3.2.2 Entwicklung der AIS in OTC im Kulturverlauf	5	5 Tage	1429
3.3.2 AIS-Längenentwicklung in OTC. Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom	5	8 Tage	1250
3.3.3 AIS-Längenentwicklung in OTC verschiedener Altersstufen	≥5	5,6,7 und 8 Tage	8091
3.3.4 Connexin 43-Versuche	4	5 Tage	400
			11.170

Wie bereits in der Einleitung ausführlich erklärt wurde, besteht die These, dass das AIS selbst als empfindlicher Indikation für Netzwerkveränderungen herangezogen werden kann (Jamann et al., 2018). Daher haben wir uns vorgenommen die Entwicklung der AIS-Länge im Modell der OTC zu untersuchen und die Frage zu stellen, inwiefern ein Glioblastomwachstum auf den OTC die Entwicklung der AIS verändert, um dadurch Rückschlüsse auf eine Netzwerkmodulation und Erregbarkeitszustände zu schließen (Jung et al., 2020; Jung et al., 2019; Monje et al., 2020; Venkataramani et al., 2022).

Anders als in anderen, bisher gut beschriebenen Cortices, gibt es bis dato keine Beschreibung über die AIS-Entwicklung im Hippocampus im Zeitverlauf, geschweige denn in OTC. Aus diesem Grund wurde eine Entwicklungsreihe zur AIS Länge in hippocampalen OTC ausgewertet. Mit dieser Grundlage sollten weitere Entwicklungen im Vergleich zur pathologischen Manipulation des Netzwerks mit Glioblastomzellen beurteilt werden können.

Zur Längenbestimmung des AIS wurde die Immunfluoreszenzfärbung gegen AnkG herangezogen (Abb.14). Es wurden in jeder Reifungsstufe >100 AIS analysiert, die jeweils aus 5 OTC stammten. Die Tiere waren bei der Präparation 5 Tage alt.

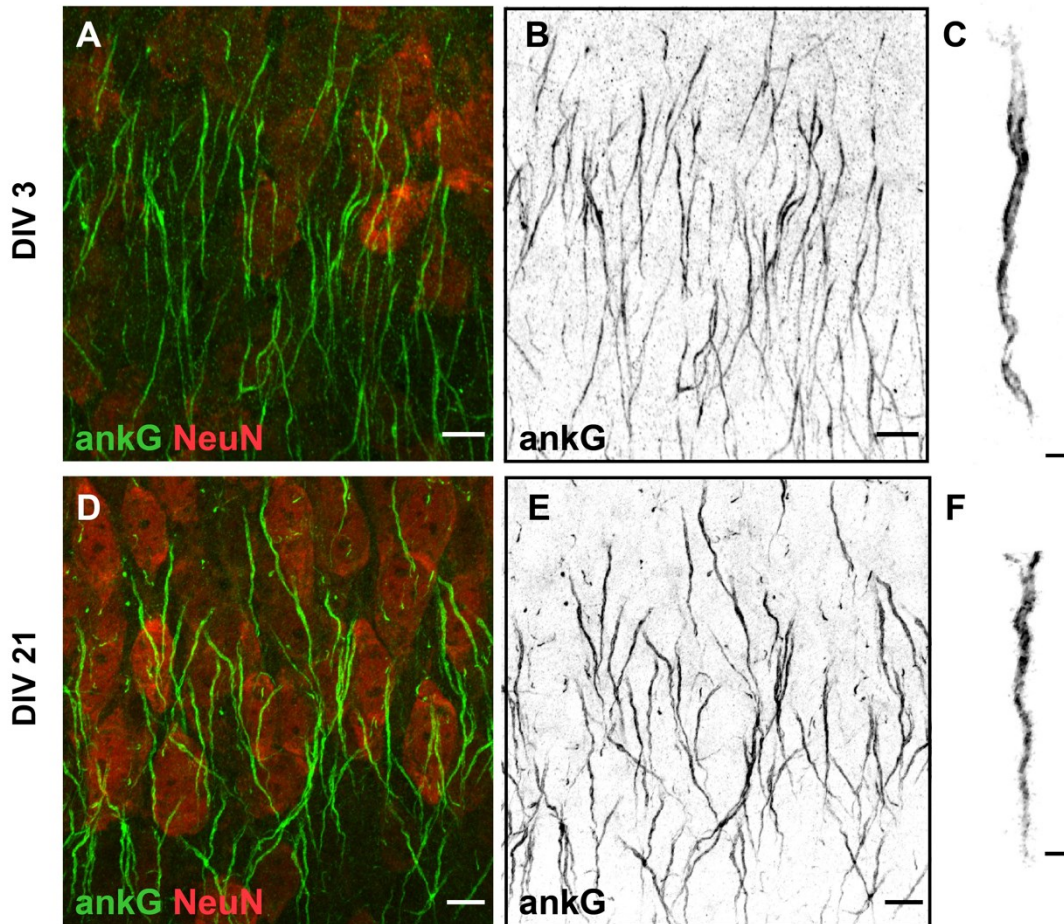


Abb.14: Repräsentative Immunfärbung von AIS in CA-Schichten der OTC

(A-F) Repräsentative konfokale Aufnahmen von AIS in Entwicklung mit Soma der Pyramidenzellen am jüngsten (DIV 3) und ältesten (DIV 21) beobachteten Zeitpunkt der CA1-Schicht eines murinen Hippocampus im OTC. Immunfärbung, wie angegeben, gegen ankG und NeuN. Zu beachten sind die repräsentativ ausgewählten AIS in (C) und (F) mit deutlichem Längenunterschied.

Maßstabsbalken in A, B, D, E = 10 μm und in C und F = 2 μm

Im jungen Stadium nach 3 Tagen *in vitro* (days in vitro, DIV) waren die AIS im Durchschnitt am längsten ($30,93 \pm 2,69 \mu\text{m}$). Auffällig war dabei, dass junge AIS dünn erschienen und eine verringerte Durchmesseränderung von proximal nach distal aufwiesen (Abb. 14). Dieser Effekt erschwerte die Analyse und könnte die größere Streuung der Messwerte erklären (SD = 2,691, Abb. 15). Im Vergleich zu DIV 3 erfolgte an DIV 10 eine signifikante Verkürzung der AIS um 11,1% ($n=5$ OTC; $30,93 \pm 2,69 \mu\text{m}$ auf $27,48 \pm 1,02 \mu\text{m}$; Einweg-ANOVA $*P<0,05$; Tab. 12-14; Abb.15). Eine weitere Verkürzung um 9,7% ereignete sich dann wieder erst von DIV 14 auf DIV 21 ($n=5$ OTC; $7,86 \pm 0,494 \mu\text{m}$ auf $24,91 \pm 1,373 \mu\text{m}$; $P=0,0569$ bei DIV 14 vs. DIV 21; Tab.

12-14). Im spätesten analysierten Reifungsstadium an DIV 21 wiesen die AIS rein qualitativ beurteilt die charakteristische Durchmesserabnahme von proximal nach distal auf (Abb.14D-F). Die Verteilung der AIS Längen in Längenfrequenzhistogrammen zeigt, dass von DIV 3 bis DIV 21 eine zunehmende Homogenität in der Längenverteilung sichtbar ist (Abb. 15C).

Bestätigung fanden diese Ergebnisse bereits in einer publizierten weiteren Versuchsreihe, in der hippocampale OTC über 20 Tage untersucht worden sind. Auch dort war eine signifikante Verkürzung nach 20 DIV zu beobachten (Thome et al., 2023). Auf die Darstellung der Originaldaten wurde verzichtet, da es sich um eine andere Mauslinie handelte.

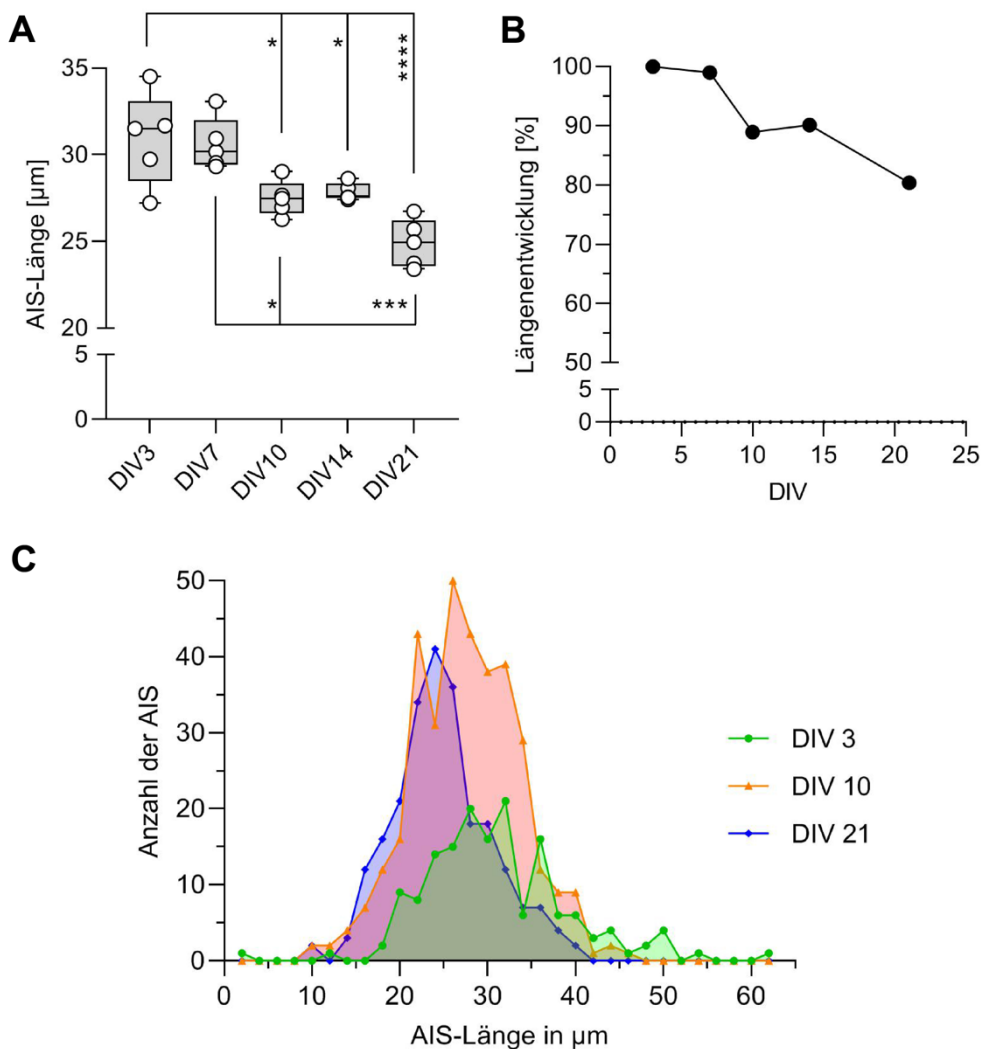


Abb.15: AIS in OTC verkürzen sich während Reifung in vitro

(A) Abgebildet sind die AIS-Längen von Neuronenpopulationen in den CA-Schichten des murinen Hippocampus in OTC im Zeitverlauf von 3 DIV bis 21 DIV in Addition zum

Präparationsalter der Mäusepups von 5 Tagen (Einweg-ANOVA, Tukeys Mehrfachvergleiche $P < 0,05$, > 100 AIS pro Kondition in $n=5$ OTC pro Reifungsstufe, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, $****P < 0,0001$). Die AIS verkürzen sich initial im Zuge der Reifung von mittleren $30,93 \mu\text{m}$ an DIV 3 bis zu mittleren $24,91 \mu\text{m}$ an DIV 21. Die größten Entwicklungsschritte erfahren sie zwischen den Reifungstagen 7-10 und 14 bis 21 mit einer Längenreduktion von jeweils knapp 10% (**B**).

(**C**) AIS-Längenpopulationsverteilung zeigt an DIV 3 deutliche Verbreiterung der AIS-Längenverteilung mit höherer Streuung im Vergleich zu späteren Stadien. Dargestellt wurden DIV3, 10 und 21 aus repräsentativen Gründen. DIV 21 zeigt die engste Verteilung an.

3.3 Der Einfluss von Glioblastomzellen auf die AIS-Plastizität in OTC

3.3.1 Humane Glioblastomzellen infiltrieren OTC und bilden TMs aus

Das diffuse, infiltrative Wachstum des Glioblastoms mit Integration in das neuronale Netzwerk stellt einen maßgeblichen Malignitätsfaktor dar (Johung and Monje, 2017; Jung et al., 2019).

Entsprechend verfolgten wir das Ziel ein replizierbares und kontinuierliches Tumorstadium auf bzw. in den OTC mit Ausbildung eines dreidimensionalen interkonnektierenden Tumornetzwerkes zu etablieren. Wie oben genauer beschrieben, nutzten wir dazu humane S24-Glioblastomstammzellen (IDH Wildtyp, 1p/19q undeletiert), indem wir auf jede OTC der Tumorgruppe $0,5 \mu\text{l}$ Tumorzellsuspension pipettierten. Wir gaben der OTC nach Präparation 2-3 Tage Zeit zur Inkubation und Äquilibration, bevor Tumorzellen hinzugefügt wurden.

Auch hier wurden wieder konfokale Immunfärbungen mit den zuvor beschriebenen Antikörpern angefertigt. Die intrinsisch tdTomato exprimierenden Tumorzellen wurden zusätzlich mit einem Nestin-Antikörper angefärbt, um das Signal zu verstärken und so TM's deutlicher darzustellen (Abb.16 und 19). In Abb. 16 sind einige repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen abgebildet, die darstellen, wie sich Tumornetzwerke nach 11 DIV ausbilden können. Jede der Aufnahmen stammt aus dem Gyrus dentatus einer OTC an DIV 14. Deutlich ist zu sehen, dass Tumorzellen zwar oberflächlicher integrieren als die CA-Schichten mitsamt Neuronen abgebildet sind, hier aber (Abb. 16E) die gesamte Kultur infiltriert haben. In anderen Kulturen konnten Tumorzellen bis in $30 \mu\text{m}$ Eindringtiefe beobachtet werden. Inwiefern dies funktionell relevant ist, bleibt noch zu überprüfen. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Tumorzellen fortlaufend Zellprotrusionen (TM's; Abb.16D;

magentafarbene Pfeile) ausbilden und so die Interkonnektivität und damit die Stabilität des Tumornetzwerks weiter erhöhen.

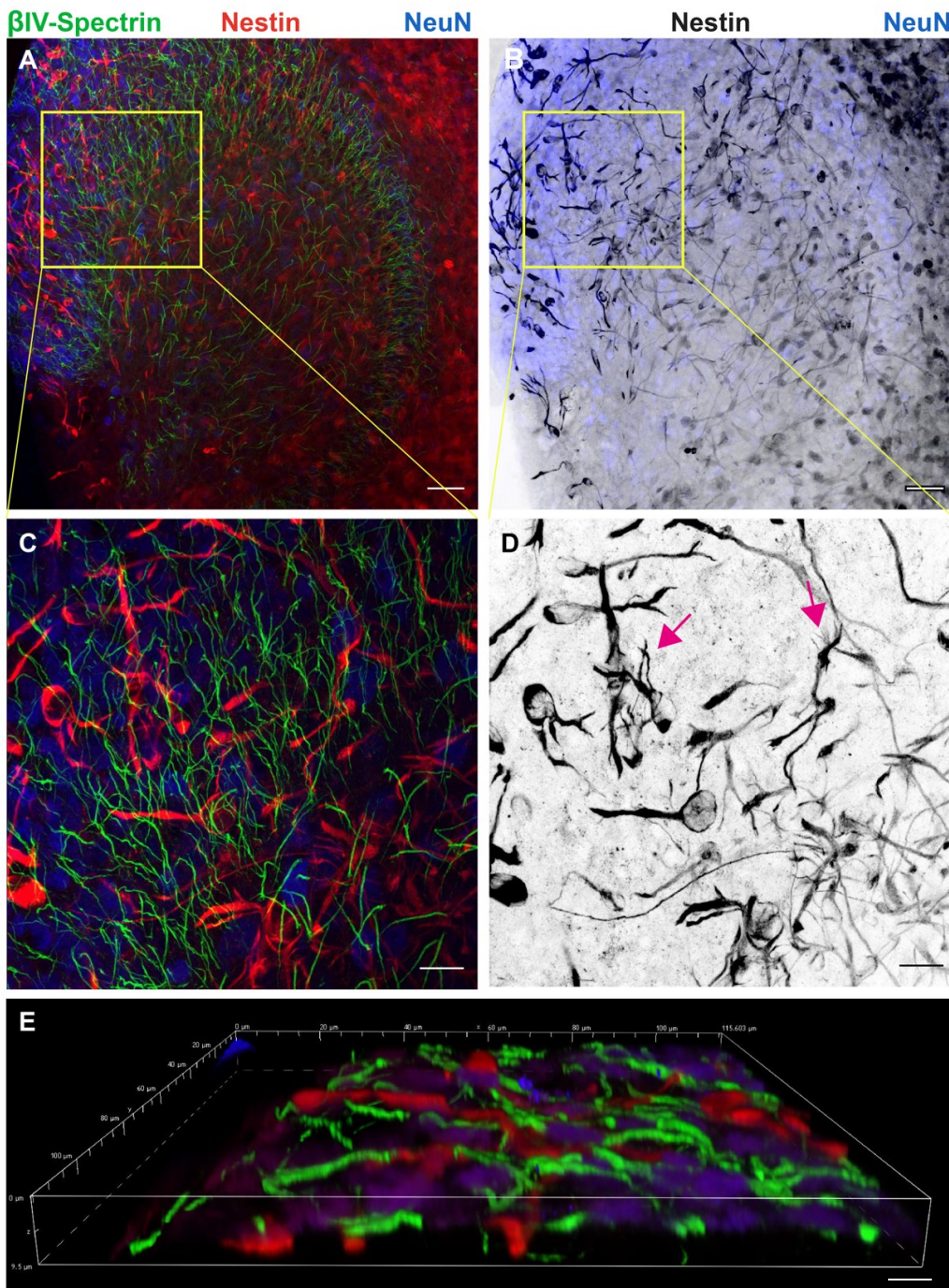


Abb.16: Tumorzellen bilden interkonnektierendes Tumornetzwerk im Hippocampus von OTC

Repräsentative Immunfärbungen von sich entwickelnden Tumorzellnetzwerken im Hippocampus von OTC.

(A) Dichtes Netzwerk von Glioblastomzellen in unmittelbarer Nähe eines DG im OTC nach 14 DIV. (B) Invertierte Darstellung des selben Bildes stellt feines Tumornanoröhrchen (TM's) deutlicher dar. (C) Vergrößerter Bereich aus dem gleichen Areal wie (A-B) mit deutlichem Fokus auf ausstülpende TM's in (D), mit magentafarbenem Pfeil markiert. (E) Aufnahme eines

9,5µm dicken Bilderstapels in X-, Y- und Z-Ebene, der die 3D-Ausbreitung der TM's inmitten einer Schicht von Pyramidenzellen zeigt.

Maßstabsbalken in A-B = 50µm; C-D = 20 µm; E = 10 µm

3.3.2 AIS-Längenentwicklung ist in Tumor-OTC ähnlich zur Entwicklung in Kontroll-OTC

Nachdem unser Model der Glio-OTC etabliert wurde und wir ein reliables Tumorwachstum ohne apoptotische bzw. nekrotische Tendenzen verzeichnen konnten, stellte sich die Frage wie sich die AIS-Längenentwicklung von DIV 3 bis DIV 21 mit Glioblastom im Vergleich zur Längenentwicklung ohne Glioblastom verhält.

Dazu wiederholten wir die ursprüngliche Entwicklungsreihe (Abb. 15), nur mit dem Unterschied, dass die Kulturen in eine Kontrollgruppe und eine Tumorgruppe geteilt wurden und die Mäuse zum Zeitpunkt der Präparation bereits 8 Tage alt waren.

Dass neuronale Plastizität durch Tumorwachstum verstärkt wird, war ein bis dahin neuer Ansatz, der die sog. „Cancer-Neuroscience“ beschäftigt. Da wir aus anderen Forschungsansätzen aus der Literatur und auch unserer eigenen Forschungsgruppen (Engelhardt AG) wissen, dass die AIS-Länge einer der relevantesten Marker für die Erregbarkeit und damit auch für plastische Veränderungen eines neuronalen Netzwerkes darstellt (Gutzmann et al., 2014; Hofflin et al., 2017; Jamann et al., 2018), untersuchten wir in erster Instanz diesen Parameter. In Abb. 17 sind repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen der Entwicklungsreihe nach DIV 3 und DIV 21 dargestellt. Neben β IV-Spektrin- und NeuN wurden die Tumorzellen mit Nestin angefärbt (auf den repräsentativen Beispielaufnahmen sind allein die Strukturen von Interesse, in diesem Fall die AIS, abgebildet). Bereits in der qualitativen Darstellung ist zu erkennen, dass AIS auch in dieser Entwicklungsreihe im Zeitverlauf kürzer werden (Abb. 18).

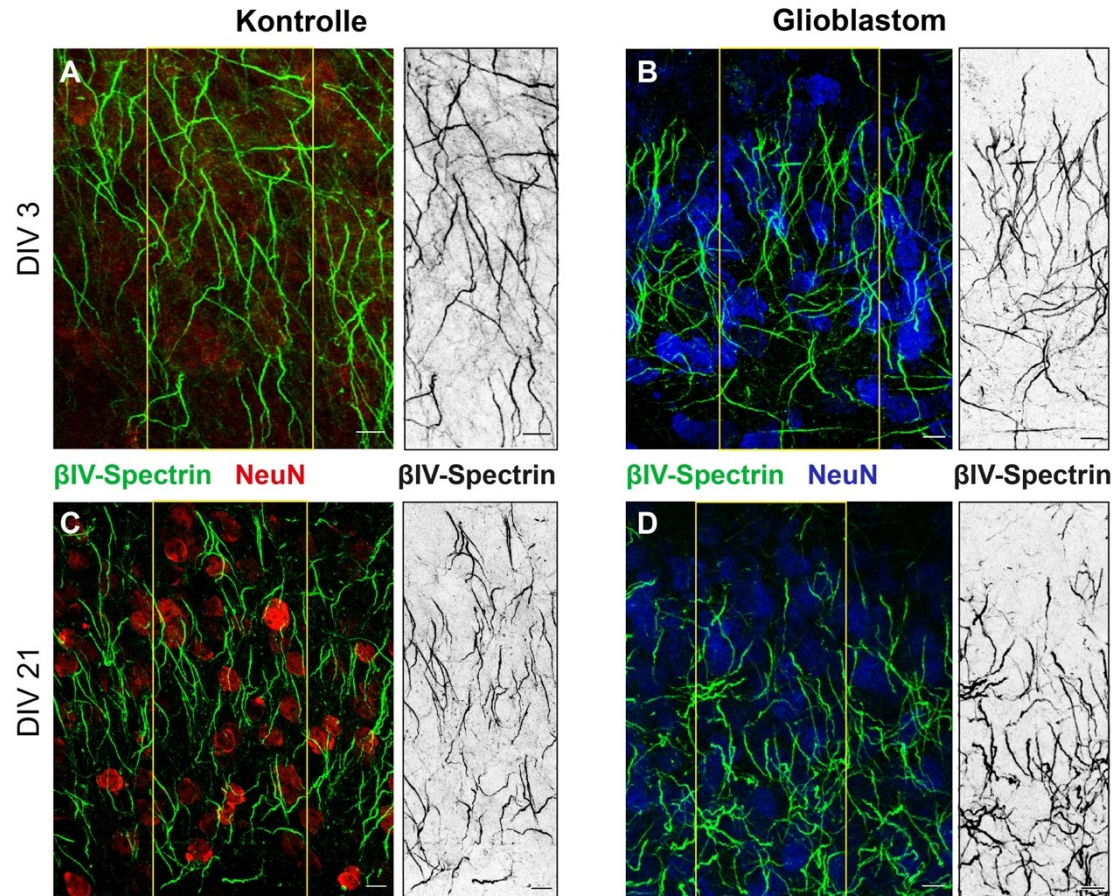


Abb.17: Repräsentative Immunfärbungen von AIS der Entwicklungsreihe in CA-Schichten der OTC

Dargestellt sind repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von AIS (β IV-Spektrin; grün) und Neuronen (NeuN; rot bzw. blau) der CA-Schicht im Hippocampus von OTC der Kontrollgruppe links (A+C) und OTC mit Glioblastom rechts (B+D). (A-B) zeigen die jüngste Altersstufe nach 3 DIV. (C-D) zeigen die älteste Altersstufe nach 21 DIV. Die Tendenz einer Verkürzung der AIS ist hier qualitativ zu erkennen. Maßstabsbalken A-D = 10 μ m

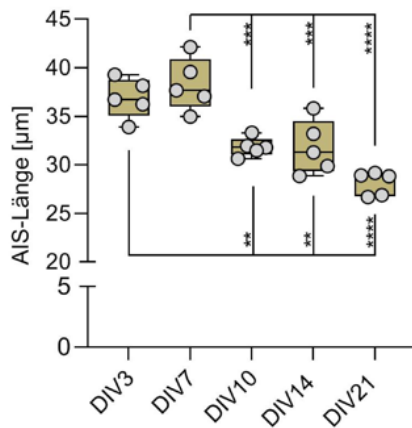
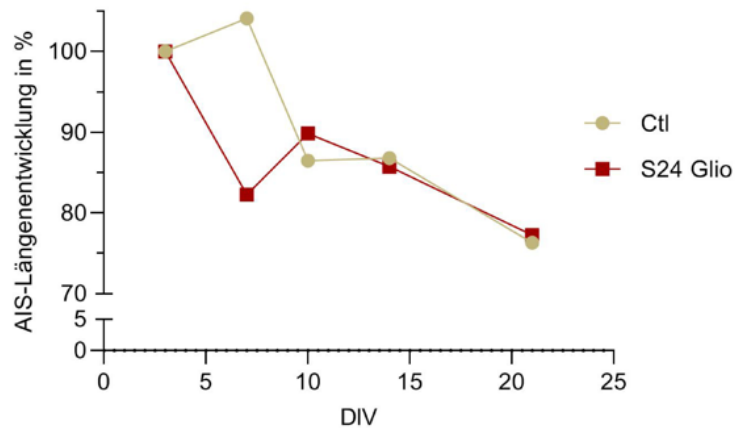
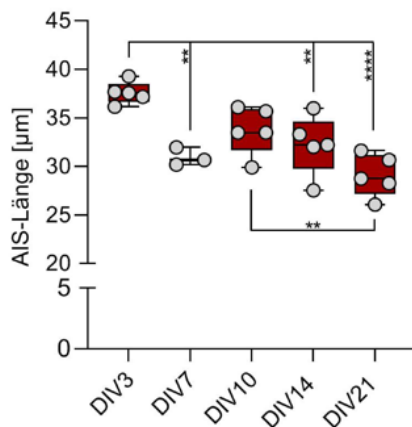
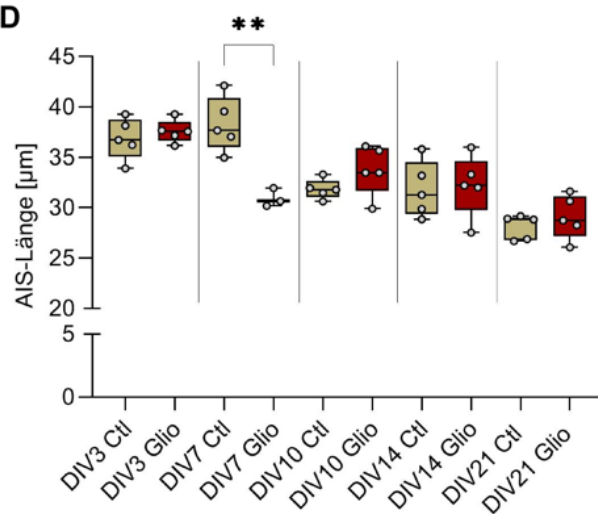
Auch bei Präparation von 8 Tage alten Mäusen wies die AIS-Längenentwicklung in den CA-Schichten des Hippocampus gleiche Tendenzen auf, wie in der Entwicklungsreihe, die an P5 präpariert wurde (Abb.15 und Abb.18). Mit der Präparation an P8 beabsichtigen wir Hinweise dahingehend zu erhalten, inwiefern die Entwicklung der AIS-Länge altersabhängig erfolgt und so die Entwicklung, die in P5 OTC beobachtet wurde, um 5 Tage nach vorn verlagert ist oder ob der beobachtete Effekt in Abb. 15 eher kulturabhängig war.

Nach 3 DIV waren die AIS mit $36,85 \pm 2,04 \mu\text{m}$ und $36,56 \pm 1,13 \mu\text{m}$ in beiden Gruppen fast exakt gleich lang ($n=5$, Einweg-ANOVA, $P=0,999$, Abb.18D, Tab.15). In beiden Gruppen erfolgte die größte Längenabnahme bis DIV 10 ($n=5$; von $38,27 \pm 2,7 \mu\text{m}$ an DIV 7 auf $31,83 \pm 0,97 \mu\text{m}$ an DIV 10 in der Kontrollgruppe; Einweg-ANOVA; $***P=0,001$; Abb.18A; Tab.15 und von $36,15 \pm 1,13 \mu\text{m}$ an DIV 3 über $30,92 \pm 0,9 \mu\text{m}$ an DIV 7 auf $33,72 \pm 2,47 \mu\text{m}$ an DIV 10 in der Glio-Gruppe, Einweg-ANOVA, $P=0,083$; Abb. 18; Tab.15) sowie zwischen DIV 14 und DIV 21 (von $31,8 \pm 2,769 \mu\text{m}$ an DIV 14 auf $28,09 \pm 1,208 \mu\text{m}$ an DIV 21 in der Kontrolle; $n=5$, Einweg-ANOVA, $P=0,07$, Abb.18; Tab. 15 und von $32,20 \pm 3,06 \mu\text{m}$ an DIV 14 auf $29,07 \pm 2,16 \mu\text{m}$ an DIV 21 in der Glio-Gruppe; Einweg-ANOVA, $P=0,207$; Abb.18; Tab.15). Damit wurde derselbe Effekt wie in der vorherigen Entwicklungsreihe, die an P5 in Kultur genommen wurde, beobachtet. In der Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($n=5$, Einweg-ANOVA, $P=0,812$; Abb.18A, B; Tab.15).

Bei den Glio-OTC hingegen konnte eine Längenreduktion von $36,56 \pm 1,13 \mu\text{m}$ an DIV 3 auf $30,92 \pm 0,91 \mu\text{m}$ an DIV 7 um 17,7% gemessen werden ($n=5$, Einweg-ANOVA, $**P=0,005$; Abb.18C, D, Tab.15). Nach DIV 21 erfuhren die AIS der Kontrollen eine Längenreduktion um 23,7% auf $28,09 \pm 1,21 \mu\text{m}$ (Abb.18; Tab.15). Die AIS von Glioblastom-OTC waren mit $29,07 \pm 2,16 \mu\text{m}$ unwesentlich länger und reduzierten ihre Länge im Verlauf der 18 Tage um 22,72% (Abb.18; Tab.15).

An den anderen Altersstufen der Tumor- und den Kontrollkulturen gab es trotz Tendenzen zur Verlängerung der AIS unter Tumorwachstum keine signifikanten Unterschiede (Abb. 18D; Tab.15).

Diese Beobachtungen führten zu der Frage, ob die AIS in Kulturen mit Tumorwachstum morphologisch reproduzierbar länger wurden oder ob dieser Effekt zufällig in dieser Kultur auftrat.

A Kontrolle**B****C Glioblastom****D****Abb.18: AIS-Längen auf Tumor-OTC verhalten sich in der Entwicklung wie Kontroll-OTC mit Tendenz zur AIS-Verlängerung**

(A+C) Abgebildet sind die AIS-Längen von Neuronenpopulationen in der CA-Schicht des murinen Hippocampus in OTC im Zeitverlauf von 3 DIV bis 21 DIV in Addition zum Präparationsalter der Mäusepups von 8 Tagen einmal in der Kontrollgruppe und in der Versuchsgruppe mit Glioblastomzellen auf den OTC (Einweg-ANOVA, Tukeys Mehrfachvergleiche $P < 0,05$, ca. 100 AIS pro Kondition (genaue Anzahl s. Tab. 15 im Anhang) in $n=5$ OTC pro Reifungsstufe mit Ausnahme DIV 3 Glio, dort $n=3$ OTC, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$).

(B) Von DIV 3 zu DIV 7 verlängerten sich die AIS nicht signifikant um 4,09%. Von da an verkürzten sich AIS bis auf 76,3% der Ausgangslänge. In der Tumorgruppe waren OTC an DIV 3 und DIV 7 noch nahezu gleich lang und verkürzten sich erst bis DIV 10 um ca. 11%, bis DIV 14 wieder um 4% und dann noch einmal bis DIV 21 um ca. 7,5%. Die Tendenzen waren in beiden Gruppen gleich.

(D) Dargestellt sind die Ergebnisse aus (A) und (C) in einer Plotgrafik im Vergleich miteinander (Zweiweg-ANOVA, Tukeys Mehrfachvergleiche * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$). Angegeben wurden nur signifikante Ergebnisse.

3.3.3 AIS werden unter Tumorwachstum länger

Um einen Alterseffekt auszuschließen, untersuchten wir zusätzlich zu den vorherigen Versuchen, inwiefern sich AIS-Längen in Tumor- und Kontrollkulturen zu verschiedenen Präparationszeitpunkten unterschieden. Wieder wurden dazu die CA-Schichten muriner Hippocampi untersucht.

Auch in diesen Experimenten nutzten wir wieder Immunfärbungen zur Visualisierung des AIS (ankG-, β IV-Spektrin-Antikörper), der Somata (NeuN) zur Orientierung innerhalb des Hippocampus und der Glioblastomzellen (Nestin, tdTomato).

Die OTC wurden nach Präparation in den verschiedenen Altersstufen (P5-P8) jeweils 14 bzw. 21 Tage inkubiert. Neben diesem Grund, der sich auf die Beschaffenheit des Gewebes bezieht, haben wir auch die Erkenntnisse aus den vorherigen Experimenten einbezogen, wo die stabilsten AIS-Längen nach der dynamischen Phase zwischen DIV 3 bis DIV 10 zu beobachten waren (Abb. 15, 18).

In Abb. 19 ist ein exemplarischer Hippocampus aus einer der OTC dargestellt, die mit Glioblastomzellen beladen wurden. Dabei ist zu sehen, dass tatsächlich feine, sich miteinander verbindende Tumornanoröhrchen (TM's) ausgebildet werden und diese in unmittelbarer Nähe zu Neuronen wachsen. Wie in Abb. 19D gut zu sehen ist, konnte eine Immunfärbung gegen Nestin die Darstellung der TM's im Vergleich zur intrinsischen tdTomato-Färbung verbessern.

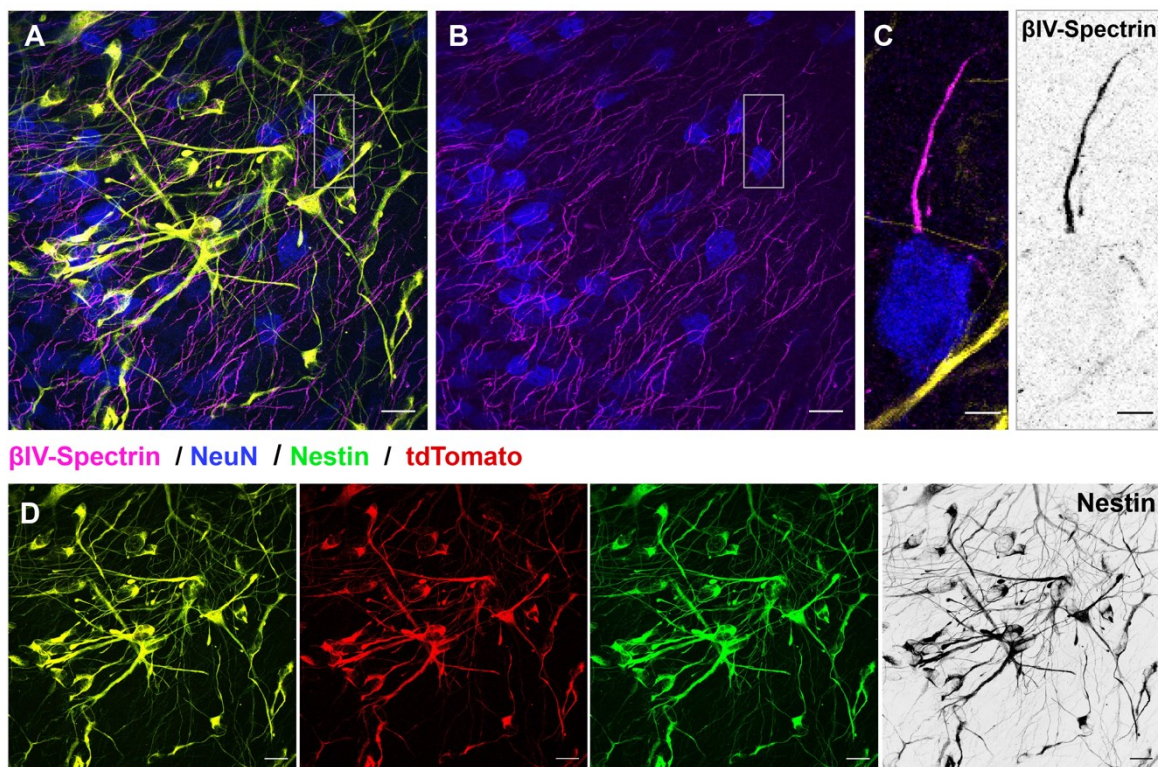


Abb. 19: Tumorzellen bilden dreidimensionales Netzwerk direkt auf CA-Schicht im Hippocampus aus

Repräsentative Immunfärbungen von sich entwickelnden Tumorzellnetzwerken im Hippocampus von OTC inmitten der neuronendichten CA-Schicht. (A) Tumorzellnetzwerk dargestellt in gelb, aufgrund der Vermischung von Signalen durch Nestin (grün) und tdTomato (rot) in der CA-Schicht eines horizontal geschnittenen Hippocampus einer OTC an DIV 21. (B) Gleiches Bild wie (A) ohne Tumorzellen mit Betonung der AIS-Struktur. Anhand solcher Aufnahmen wurden die AIS-Längenmessungen durchgeführt. (C) Darstellung eines repräsentativ ausgewählten Neurons mit AIS in Vergrößerung. (D) Alleinige Darstellung des Tumorzellnetzwerks gemischt (links) und jeweils in der alleinigen Färbung mit tdTomato (rot) und Nestin (grün) sowie einer kontrastverstärkten schwarz-weiß-Darstellung. Die Färbung mit Nestin verstärkt insbesondere die Darstellung der feinen TM's. Maßstabsbalken A-B = 20 μm ; C = 5 μm ; D = jeweils 20 μm .

Nachdem wir qualitativ deutliche Tumorerinfiltration in den OTC feststellen konnten, untersuchten wir den Einfluss des Tumorwachstums in den OTC auf die AIS-Länge als morphologischen Indikator einer plastischen Veränderung im neuronalen Netzwerk. Wir schlossen dazu OTC ein, die zwischen P5 und P8 an jeweils allen Altersstufen präpariert wurden, um wie zuvor erwähnt Alterseffekte ausschließen zu können (Abb. 21). Sowohl nach 14, als auch nach 21 Tagen *in vitro* waren die AIS in Glioblastom-OTC deutlich länger ($n=5$ Würfe; $28,82 \pm 2,88 \mu\text{m}$ in der Kontrolle vs. $n=7$ Würfe; $33,06 \pm 1,93 \mu\text{m}$ bei den Tumor-OTC nach DIV 14 und $n=6$ Würfe; $27,02 \pm 3,39$

μm im Vergleich zu $n=5$ Würfe; $30,96 \pm 1,65 \mu\text{m}$ nach DIV 21, Zweiweg-ANOVA, $*P<0,05$, Abb. 20A; Tab.18-19). Ein Entwicklungseffekt innerhalb der Konditionen war zwar qualitativ sichtbar, bestätigte sich jedoch statistisch nicht (bei den Ctl von $28,82 \pm 2,88 \mu\text{m}$ an DIV 14 auf $27,02 \pm 3,39 \mu\text{m}$ an DIV 21, Zweiweg-ANOVA, $P=0,35$; bei den Glio-OTC von $33,06 \pm 1,93 \mu\text{m}$ auf $30,96 \pm 1,65 \mu\text{m}$, Zweiweg-ANOVA, $P=0,392$, Tab. 18-19).

In der Längenfrequenzdarstellung (Abb. 20B), in die nicht die mittlere AIS-Länge der Population eines Mäusewurfs einfluss, sondern gesammelte Einzelwerte aufgetragen wurden, konnte erneut bestätigt werden, dass sich die AIS-Längenpopulationen im Vergleich zwischen Kontroll- und Tumor-OTC unterscheiden und AIS von Glioblastom-OTC deutlich länger waren (nach DIV 14 $n=2393$ AIS; $28,75 \pm 7,03 \mu\text{m}$ in den Kontroll-OTC und $n=2058$ AIS; $32,74 \pm 6,94 \mu\text{m}$ in den Tumor-OTC, sowie an DIV 21 $n=1996$ AIS; $28,12 \pm 7,31 \mu\text{m}$ in der Kontrolle und $n=1649$ AIS; $30,87 \pm 6,04 \mu\text{m}$ bei den Glio-OTC, Kolmogorov-Smirnov-Test, $****P<0,0001$, Tab.19).

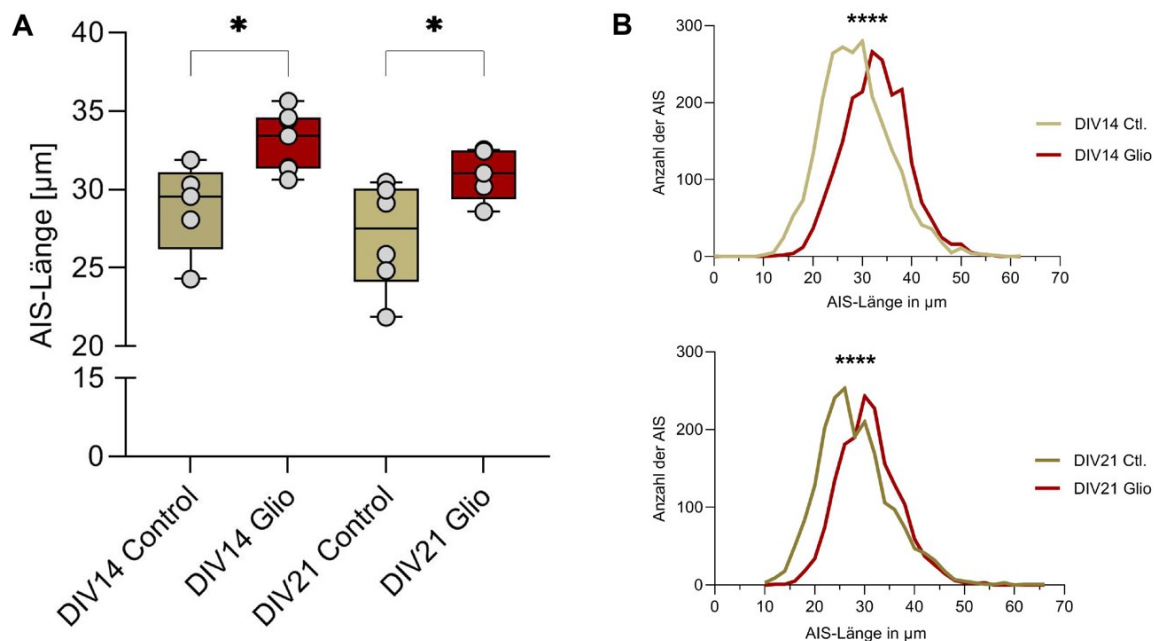


Abb. 20: AIS sind in den CA-Schichten von Glioblastom-OTC signifikant länger als in Kontroll-OTC

(A) Abgebildet sind die AIS-Längen von Neuronenpopulationen in der CA-Schicht des murinen Hippocampus in OTC im Vergleich zwischen Kontroll-OTC und Tumor-OTC nach jeweils DIV 14 bzw. 21. Sowohl an DIV 14, als auch DIV 21 weisen die Glioblastom-OTC signifikant längere AIS auf, als in den Kontroll-OTC. Zweiweg-ANOVA, Tukeys Mehrfachvergleiche $P<0,05$, 100-500 AIS pro Messwert, $n =$ Mittelwert aller AIS der OTC aus einem Wurf Mäuse zu je einem Alterspunkt (P5-P8), $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$, $****P<0,0001$.

(B) Auch die AIS-Längenverteilung zeigt zu beiden Zeitpunkten ein nach rechts verschobenes Verteilungsmaximum. Kolmogorov-Smirnov-Test, **** $P < 0,0001$, $n > 1000$ AIS pro Kondition. Als wir diesen deutlichen Effekt der AIS-Längenzunahme in der Tumorgruppe sahen, wollten wir wissen, ob sich dieser auf alle Altersstufen, an denen die OTC präpariert wurden, erstreckt und inwiefern das Präparationsalter dabei eine Rolle spielt.

Wie in Abb. 21 zu sehen ist, gibt es unter den Kontrollen kaum signifikante Unterschiede. Lediglich die P8 OTC an DIV 21 unterscheiden sich von den P5 und P6 Kulturen an DIV 14 ($n=300$ AIS; $24,91 \pm 3,33 \mu\text{m}$ P8 DIV 21 vs. $n=919$ AIS; $29,82 \pm 2,53 \mu\text{m}$ an P5 DIV 14 und $n=671$ AIS; $29,86 \pm 1,734 \mu\text{m}$ an P6 DIV 14; Einweg-ANOVA, * $P < 0,05$, Abb. 21A; Tab. 20-21). Dies ist aufgrund der Altersunterschiede aus den Entwicklungsreihen auch erwartungsgemäß, da sich die AIS physiologisch in den CA-Schichten des murinen Hippocampus im Zeitverlauf zu verkürzen scheinen (Abb. 15, 18). Besonders in den Kontroll-OTC, die an P8 präpariert wurden, ist zu sehen, dass die Tendenz zu kürzeren AIS über die Zeit *in vitro* erhalten bleibt und an DIV 21 gleiche Tendenzen zu beobachten sind hinsichtlich der entwicklungsbedingten Verkürzung (Abb. 21A und Tab. 20-21).

In Abb. 21B, D sind Violin-Plot-Darstellungen gezeigt, die die Populationsverteilung der AIS-Längen aufzeigen. Grundlage dieser Darstellung sind alle gemessenen AIS und nicht wie in Abb. 21A, C und E die Mittelwerte der verschiedenen OTC. Diese große Stichprobe liefert keine statistische Analyse, weshalb die Violin-Plots nur qualitativ beurteilt werden sollen. Die Plots zeigen, dass die Form der Plots aus den verschiedenen Altersstufen im Zeitverlauf ähnlich bleibt zu *in vitro*. Die AIS-Längenverteilung ist demnach in den P8 Kulturen jeweils ähnlich mit Verteilungspeaks an der unteren Quartile. Auch die AIS-Längen aus P6 sind sowohl an DIV 14, als auch DIV 21 annähernd tropfenförmig verteilt.

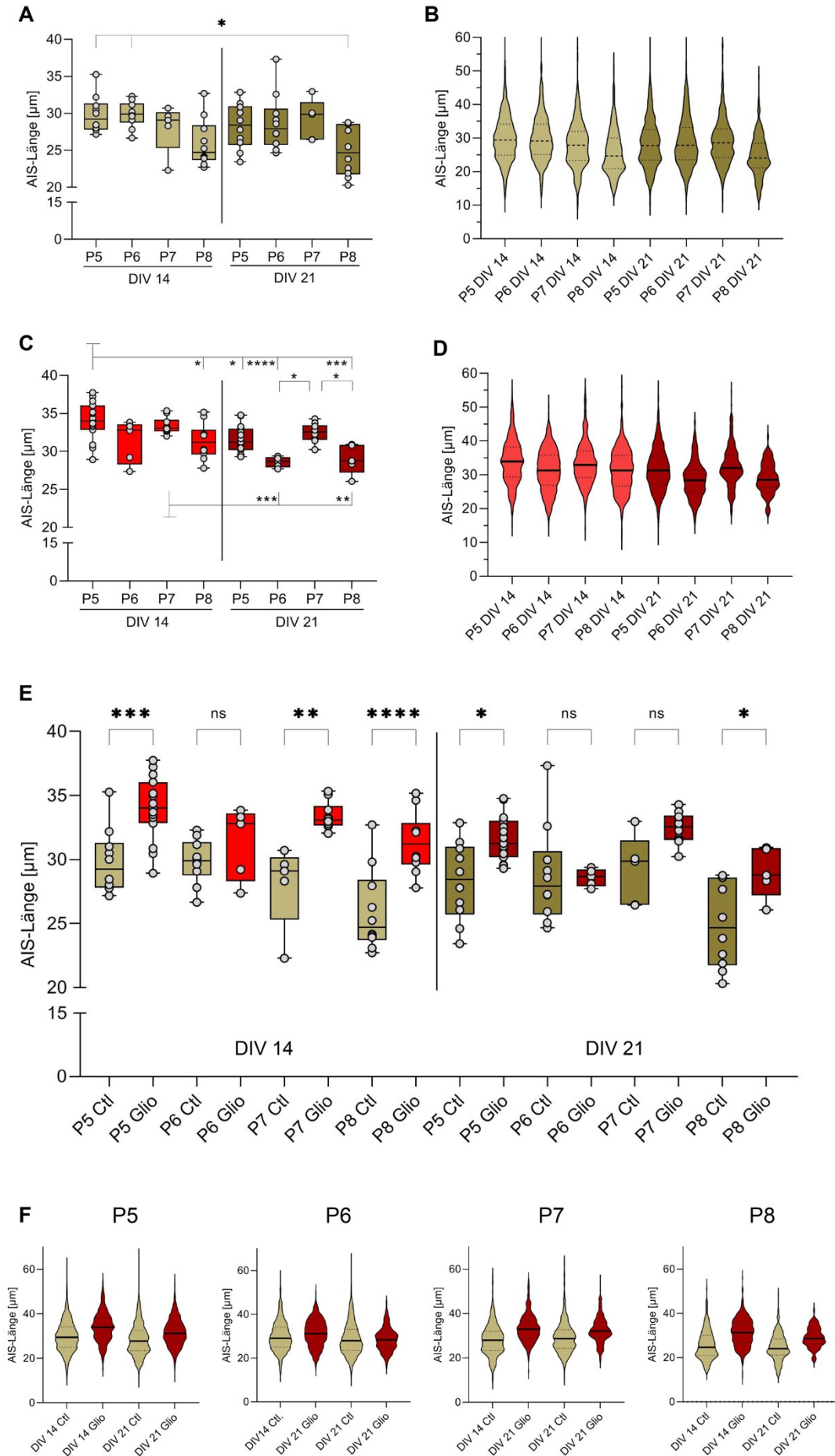


Abb. 21: Kein bedeutender Alterseffekt bei AIS-Längenvergleich zwischen Kontroll- und Glioblastom-OTC

(A) Abgebildet sind die AIS-Längen pro Altersstufe zur Präparation der OTC (P5-P8) jeweils an DIV 14 und DIV 21 in den Kontroll-OTC. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Altersstufen, bis auf DIV 14 P5 und P6 im Vergleich zu P8 an DIV 21. Einweg-ANOVA, $P < 0,05$, > 100 AIS pro Kondition in $n=5$ OTC pro Mäusewurf, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, $****P < 0,0001$.

(B) Die AIS-Längen pro Altersstufe zum Präparationsalter der Mäuse (P5-P8) jeweils an DIV 14 und DIV 21 in den Kontroll-OTC aller Einzelwerte als Violin-Plot dargestellt. Keine Statistik, dient nur der Veranschaulichung zum Vergleich der Längenhäufigkeitsverteilungen.

(C) Abgebildet sind die AIS-Längen pro Altersstufe zur Präparation der OTC (P5-P8) jeweils an DIV 14 und DIV 21 in den Tumor-OTC. Einweg-ANOVA, $P < 0,05$, > 100 AIS pro Kondition in $n=5$ OTC pro Mäusewurf, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, $****P < 0,0001$.

(D) Die AIS-Längen pro Altersstufe zum Präparationsalter der Mäuse (P5-P8) jeweils an DIV 14 und DIV 21 in den Tumor-OTC aller Einzelwerte als Violin-Plot dargestellt. Keine Statistik, dient nur der Veranschaulichung zum Vergleich der Längenhäufigkeitsverteilungen.

(E) Boxplots aus (A) und (C) in einer Grafik zum direkten Vergleich. In den OTC von P5, P7 und P8 an DIV 14 unterscheiden sich die AIS-Längen signifikant, sowieso an P5 und P8 an DIV 21. Einweg-ANOVA, $P < 0,05$, > 100 AIS pro Kondition in $n=5$ OTC pro Mäusewurf, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, $****P < 0,0001$.

(F) Violin-Plots aus (B) und (D) jeweils pro Altersstufe im direkten Vergleich zwischen Kontrolle und Glio-OTC dargestellt.

In Abb. 21C sind die AIS-Längen der verschiedenen Altersstufen in Tumor-OTC dargestellt. Auch hier bestätigt sich die Tendenz zu kürzeren AIS von P8 präparierten Kulturen im Vergleich zu P5 präparierten OTC sowohl an DIV 14, als auch nach DIV 21 ($n=522$ AIS; $33,99 \pm 2,508 \mu\text{m}$ an P5 DIV 14 bzw. $n=802$ AIS; $31,62 \pm 1,768 \mu\text{m}$ an P5 DIV 21 vs. $n=442$ AIS; $31,35 \pm 2,37 \mu\text{m}$ an P8 DIV 14 bzw. $n=83$ AIS; $28,99 \pm 2,07 \mu\text{m}$ an P8 DIV 21, Einweg-ANOVA, * bzw. ***, s. Abb. 21C und Tab. 20-21). Die AIS der Kulturen von P6 weisen sowohl an DIV 14 ($n=497$ AIS; $29,86 \pm 1,73 \mu\text{m}$), als auch an DIV 21 ($n=431$ AIS; $31,31 \pm 2,85 \mu\text{m}$) kürzere AIS auf als an P5 oder P7 präparierte OTC. Auffällig ist außerdem, dass die AIS der Glio-OTC auch in diesen Darstellungsformen in jeder Altersstufe deutlich länger waren als in Kontroll-OTC (Abb. 21E, Tab. 20-21). In Abb. 21E sind die Daten aus Abb. 21A und C gemeinsam dargestellt mit dem Unterschied, dass pro Altersstufe verglichen wurde, ob sich die AIS-Längen zwischen Kontroll-OTC und Tumor-OTC unterscheiden. Nach DIV 14 unterschieden sich die beiden Gruppen tatsächlich in den Kulturen von P5 ($n=919$ AIS; $29,82 \pm 2,52 \mu\text{m}$ Ctl vs. $n=522$ AIS; $33,99 \pm 2,51 \mu\text{m}$ Tumor, Einweg-ANOVA, $***P=0,0008$, Tab. 21), P7 ($n=480$ AIS; $28,01 \pm 3,31 \mu\text{m}$ Ctl vs. $n=380$ AIS; $33,39 \pm 1,08 \mu\text{m}$ Tumor, Einweg-ANOVA, $**P=0,0014$, Tab. 21) und P8 ($n=416$ AIS; $25,99 \pm 3,24 \mu\text{m}$ Ctl vs. $n=442$ AIS; $31,35 \pm 2,37 \mu\text{m}$ Tumor, Einweg-ANOVA, $****P < 0,0001$,

Tab. 21). Nach 21 DIV unterscheiden sich die AIS-Längen der P5 (n=724 AIS; $28,28 \pm 3,08 \mu\text{m}$ Ctl vs. n=802 AIS; $31,62 \pm 1,77 \mu\text{m}$ Tumor, Einweg-ANOVA, *P=0,0127, Tab. 21) und P8 Kulturen (n=300 AIS; $24,91 \pm 3,33 \mu\text{m}$ Ctl vs. n=83 AIS; $28,99 \pm 2,01 \mu\text{m}$ Tumor, Einweg-ANOVA, *P=0,0306, Tab. 21) voneinander. Die gesammelten Populationsdaten wurden in Abb. 20 dargestellt und beschreiben einen signifikanten Unterschied in der AIS-Länge zwischen Kontroll-OTC und Tumor-OTC insgesamt ($28,82 \pm 2,88 \mu\text{m}$ in der Kontrolle vs. $33,06 \pm 1,93 \mu\text{m}$ bei den Tumor-OTC nach DIV 14 und $27,02 \pm 3,39 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $30,96 \pm 1,65 \mu\text{m}$ nach DIV 21, Zweiweg-ANOVA, *P<0,05, Abb. 20A; Tab. 20-21).

Trotz mancher Längenunterschiede in Abhängigkeit zum Präparationsalter sind die Tendenzen in DIV 14 und DIV 21 gleich. So wie AIS in P6 DIV 14 Kulturen kürzer waren, waren sie es auch in P6 DIV 21 Kulturen.

Es kann also festgehalten werden, dass das Präparationsalter trotz aller interindividuellen Variabilität die Effektstärke in den AIS-Längenunterschieden zwischen Kontroll-OTC und Tumor-OTC nicht erklärt.

3.3.4 In Tumor-OTC bilden sich weniger Connexin 43 Kontakte am AIS aus

Bereits Abb. 19 deutet auf einen direkten Zellkontakt zwischen Tumorzellen und Neuronen hin. Die Erkenntnis, dass eine Kommunikation zwischen Tumorzellnetzwerk und neuronalem Netzwerk bspw. über parakrine und autokrine Mechanismen existiert, gilt als gesichert (Osswald et al., 2015; Venkataramani et al., 2022; Venkatesh and Monje, 2017). Daten aus der vorliegenden Arbeit untermauern diese Annahme (Abb.19, 22). Dass diese Interkonnektivität auch auf Ebene zahlreicher elektrischer Synapsen in Form von Gap Junctions und so ein direkter Ladungsaustausch in den Plasmamembranen von Glioblastomzellen besteht, konnten einige Labore in den letzten Jahren beschreiben (Cornell-Bell et al., 1990; Larson et al., 2018; Osswald et al., 2015; Venkataramani et al., 2022; Venkatesh and Monje, 2017). Wie in Abb. 22 zu sehen ist, fanden wir auch beispielhaft dargestellt einige Tumorzellen, die nicht nur untereinander mittels ihrer spinnennetzartig verlaufenden TMs Kontaktstellen aufbauten, sondern auch in unmittelbarem Kontakt mit axonalen Strukturen traten (hier mit dem AIS, grün dargestellt mittels Anti-ankG-Immunfluoreszenzfärbung). Um diesen Befund qualitativ eindeutiger darstellen zu können, wurden die Bilder

dekonvolviert und mit Hilfe der IMARIS-Software 3D rekonstruiert und in verschiedenen Perspektiven dargestellt (Abb. 22B-D). Bereiche potenzieller Kontaktstellen sind durch gelbe Pfeile markiert. Wie in Abb. 22G-H zu erkennen ist, gelang auf diesem Wege auch die Darstellung putativer Kontaktstellen zwischen Tumorzelle und Neuron (Cx43-positive Strukturen). Als eines derjenigen Proteine, für die angenommen wurde, dass es eine elementare Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation spielen könnte, rückte das Connexin 43 in den Fokus.

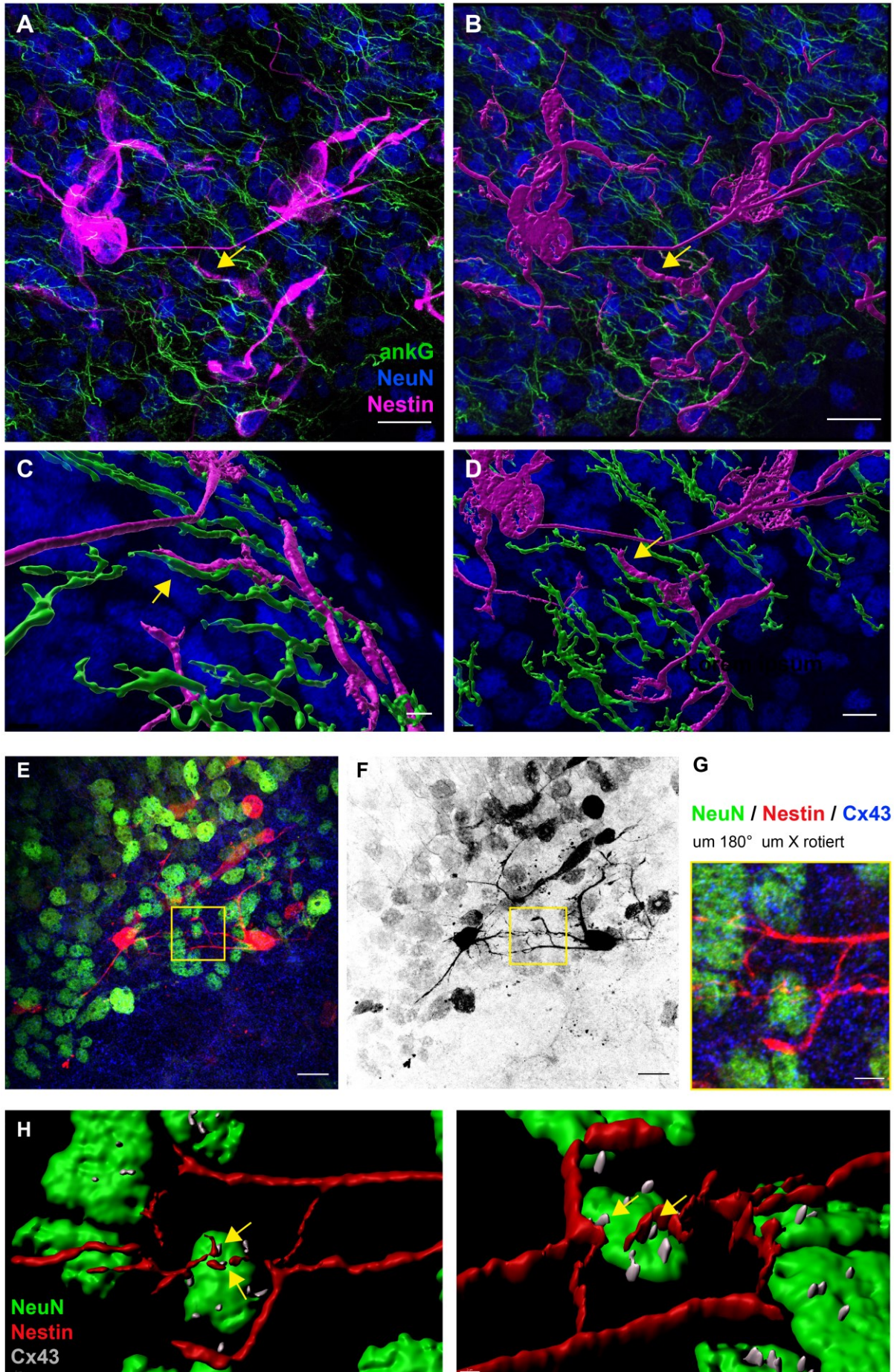


Abb. 22: Tumorzellen bilden Kontaktstellen mit axonalen Strukturen aus

(A) Dargestellt ist eine konfokale Immunfluoreszenzaufnahme von kontaktierenden Tumorzellen (Nestin; magenta) in unmittelbarer Umgebung der CA-Schicht im Hippocampus einer DIV 14 OTC in einer Übersichtsaufnahme mit Tumorzellen (Nestin), neuronalen Somata (NeuN; blau) und AIS (ankG; grün).

(B–D) Darstellung derselben Aufnahme als 3D Rekonstruktion mit IMARIS aus verschiedenen Perspektiven. Der gelbe Pfeil deutet auf eine direkte Kontaktstelle zwischen TM und AIS eines Neurons.

(E) Abgebildet ist eine weitere Kontaktaufnahme von Tumorzellen mit Neuronen. Hier neuronale Somata (NeuN, grün) und Cx43 (blau) mit Tumorzellen (Nestin, rot). In (F) sind die Tumoranteile der gleichen Abbildung in schwarz-weiß dargestellt.

(G) Bereich der in (E-F) gelb umrahmt ist, wurde hier vergrößert dargestellt. Kontaktstellen zwischen Tumorzelle und Neuron mittels Cx43 wurden in (H) mit Hilfe von IMARIS 3D rekonstruiert. Darstellung aus 2 Perspektiven. Gelbe Pfeile deuten auf mögliche Kontaktstellen. Maßstabsbalken A-B, E-F= 20 µm; C, G = 5 µm und D = 10 µm; H = 2 µm

Nachdem wir festgestellt haben, dass Tumorstadium erhebliche morphologische Effekte auf die AIS-Länge hat, wollten wir herausfinden, ob diese eventuell durch eine veränderte Dichte von Cx43 Kontakten am AIS vermittelt sein könnte.

Dazu beobachteten wir in diesem Experiment einen einzigen Wurf Mäuse, um die Einflüsse der interindividuellen Variabilität zwischen verschiedenen Würfen ausschließen zu können und untersuchten alle quantitativen Parameter im Zeitverlauf von DIV 7 und DIV 14, die für diese Arbeit von Interesse waren. Neben der AIS-Länge rückte nun also auch die Verteilung der Cx43 Kontakte am AIS in den Fokus.

Zu Beginn der Auswertung dieses Experiments galt es erneut zu überprüfen, inwiefern sich die AIS-Längenentwicklungen (Abb. 23) dieser Kulturen in das bisher gewonnene Bild einfügt.

Die AIS aus den Tumor-OTC nach DIV 7 ($n=4$ OTC; $28,34 \pm 1,83$ µm Ctl vs. $35,54 \pm 2,19$ µm Tumor, Einweg-ANOVA, $**P<0,01$, Abb. 23C; Tab 22 im Anhang) und DIV 14 ($n=4$ OTC; $28,33 \pm 1,31$ µm Ctl vs. $n=4$ OTC; $36,63 \pm 3,27$ µm Tumor, Einweg-ANOVA, $***P<0,001$, Abb.23A; Tab 22) waren deutlich länger als in den Kontroll-OTC, wodurch die Ergebnisse der in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Versuche bestätigt wurden. Die Stichproben umfassten auch hier wieder jeweils die Anzahl der OTC, aus denen die AIS gemessen wurden pro Kondition ($n=4$). Ein repräsentatives Beispielfeld zu diesen AIS-Messungen ist in Abb. 23A zu sehen.

Die Entwicklung innerhalb der 7 Tage *in vitro* zwischen DIV 7 und 14 ergab keine signifikanten Veränderungen innerhalb der Gruppen. In Abb. 23B, D sind in Ergänzung

dazu die AIS-Längenfrequenzverteilungen aufgetragen. Auch hier ist zu erkennen, dass insbesondere die AIS in der Glio DIV 14 Gruppe deutlich heterogener verteilt waren als in den anderen Gruppen.

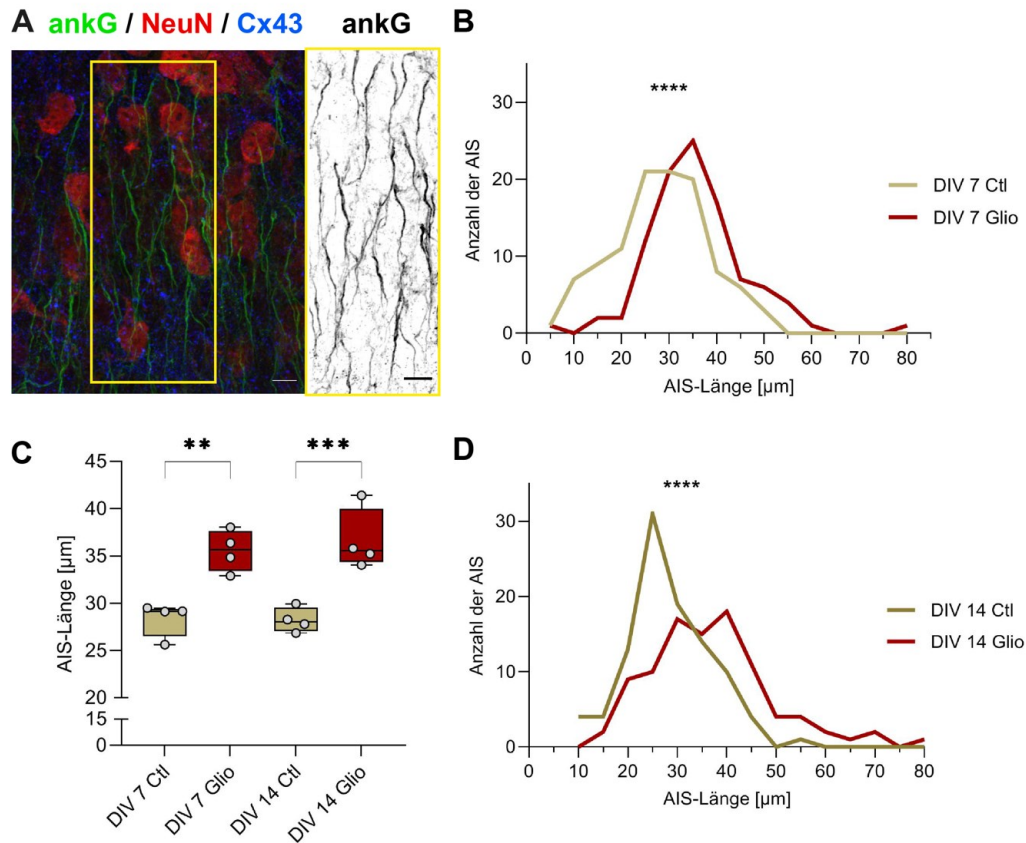


Abb. 23: AIS in Tumor-OTC sind auch in diesem Experiment länger

(A) Dargestellt ist ein repräsentatives Immunfluoreszenzbild, mit Hilfe derer die AIS-Längenmessungen durchgeführt wurden. AIS (ankG, grün), Somata (NeuN, rot) und Cx43 (blau) sind dargestellt. Gelber Rahmen zeigt Bildausschnitt der schwarz-weiß dargestellten AIS an. Maßstabsbalken A = 20 μm ; B = 10 μm

(B und D) Abgebildet sind die AIS-Längenverteilungen nach DIV 7 und DIV 14. Insbesondere an DIV 14 zeigen die AIS-Längen der Glio-OTC ein deutlich inhomogeneres Verteilungsmuster. Kolmogorov-Smirnov-Test, **** $P < 0,0001$, $n = \text{ca. } 100$ AIS pro Kondition.

(C) Dargestellt sind die AIS-Längen aus einem Wurf jeweils an DIV 7 und DIV 14 im Vergleich zwischen Kontroll-OTC und Tumor-OTC. Zu beiden Entwicklungsstufen sind die Tumor-AIS signifikant länger. Einweg-ANOVA, $P < 0,05$, > 100 AIS pro Kondition in $n = 4$ OTC pro Kondition, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

Im nächsten Experiment wurde die Cx43-Verteilung am AIS innerhalb beider Gruppen geprüft. Dazu wurden die gleichen OTC wie im vorherigen Versuch genutzt. Nach Immunfärbung gegen Cx43 wurden dessen Lokalisationen mit Hilfe des Add-Ons „ComDet“ in Image J entlang den Signalen von ankG analysiert. In Abb. 24A, B ist ein repräsentatives Bild einer Immunfärbung dargestellt. In B können am vergrößerten Bildausschnitt Immunfluoreszenzüberlagerungen zwar sichtbar, aber nur schwer eindeutig und quantifizierbar zugeordnet werden. Deshalb wurde zu qualitativen Zwecken in Abb. 24C eine Dekonvolution mit anschließender 3D-Rekonstruktion der gefärbten Strukturen vorgenommen, sodass Fluoreszenzüberlagerungen eindeutig zugeordnet werden können. In Abb. 24C ist im grünen Kanal der Thy1-Farbstoff gezeigt, der das gesamte neuronale Soma intrinsisch färbt. Mit dieser Mausreihe wurden keine weiteren Experimente gemacht. Die Färbung soll lediglich das zum AIS gehörende Soma zeigen.

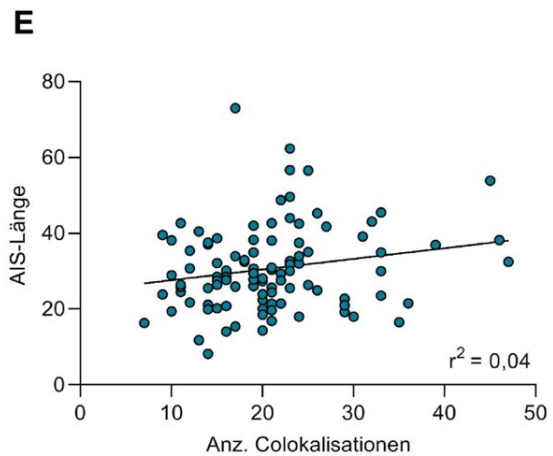
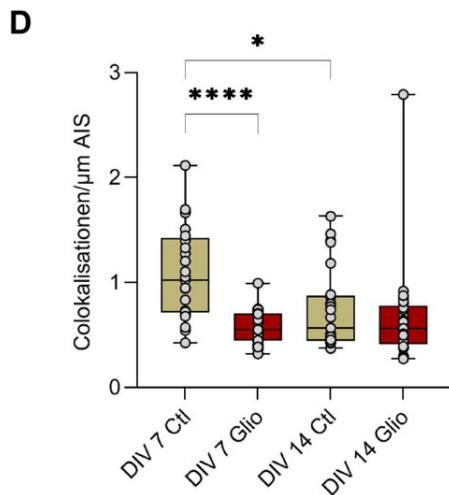
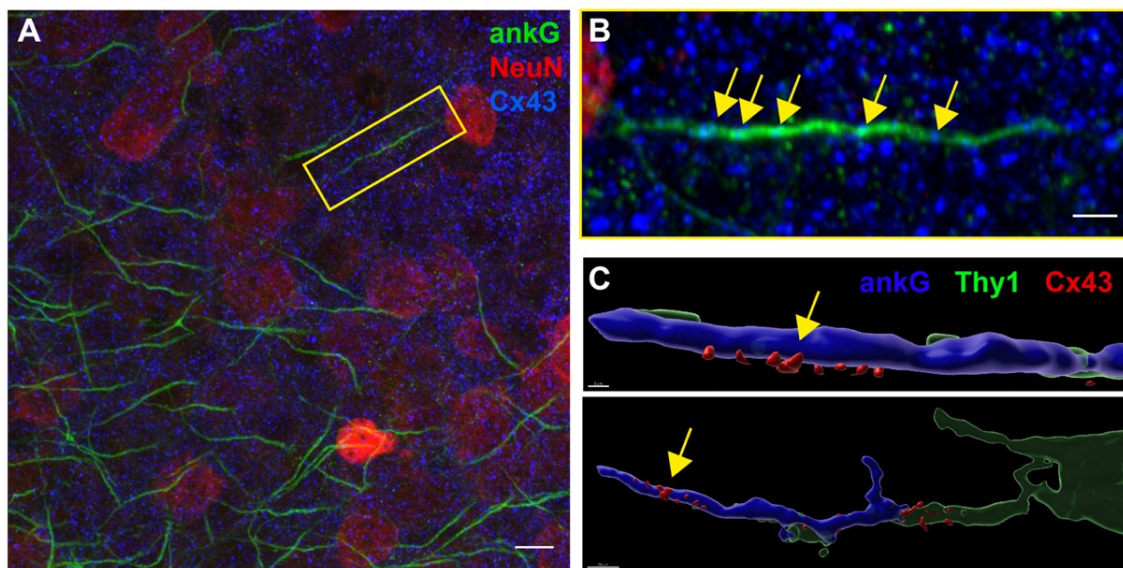


Abb. 24: Cx43-Kontakte am AIS sind in Glioblastom-OTC seltener als in Kontroll-OTC

(A) Abgebildet ist eine repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme von OTC in diesem Fall nach DIV 14 anhand derer Cx43-Analysen am AIS durchgeführt wurden. Zu sehen sind AIS (ankG, grün), neuronale Somata (NeuN, rot) und Cx43 (blau). Gelb umrahmt ist derjenige Bereich, der in (B) vergrößert dargestellt wurde. Die Pfeile deuten auf mögliche Cx43-Spots innerhalb des AIS.

(C) Darstellung eines mit IMARIS 3D rekonstruierten AIS mit Cx43-spots darin aus einem OTC anderer Versuchsreihen mit Thy1 positiven Zellen in der CA3-Schicht des Hippocampus. Zu sehen sind einige Cx43-Punkte an der Oberfläche des rekonstruierten ankG-Signals. Maßstabsbalken A = 20 μm ; B = 3 μm ; C = 5 bzw. 20 μm

(D) Darage stellt die Colokalisationen/ μm AIS zwischen Cx43 und AnkG. Nach DIV 7 sind Cx43-Kontakte in Glio-OTC deutlich reduziert. Auch innerhalb der Kontroll-OTC nahm die Anzahl an Colokalisationen von DIV 7 nach DIV 14 ab. Zweiweg-ANOVA, $P < 0,05$, in $n=25$ AIS pro Kondition, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

(E) Dargestellt ist die lineare Regression, die zeigt, dass die Anzahl der Cx43-Colokalisationen nur zu 4% von der reinen AIS-Länge abhängt. $R^2 = 0,04$, bei $n=100$ AIS-Werten.

Wir stellten fest, dass die Anzahl der Cx43-Colokalisationen am AIS nach 7 Tagen in der Glioblastom-Gruppe signifikant niedriger waren als in den Kontrollen ($1,08 \pm 0,43$ Col./ μm Ctl vs. $9,57 \pm 0,16$ Col./ μm Tumor an DIV 7, **** $P < 0,0001$, Zweiweg-ANOVA, $n=25$ AIS/Kondition, Abb. 24, Tab. 25-26). Nach 14 DIV war dieser Effekt nicht mehr messbar ($P=0,89$). Im Zeitverlauf reduzierten sich außerdem die Kolokalisationen insbesondere in der Kontroll-Gruppe ($1,08 \pm 0,43$ Col./ μm DIV 7 vs. $0,74 \pm 0,38$ Col./ μm DIV 14, * $P < 0,05$, Zweiweg-ANOVA, $n=25$ AIS/Kondition, s. Tab. 25-26). Zuletzt stellt sich in diesem Zusammenhang noch die Frage, ob die veränderten Dichten der Colokalisationen gleichmäßig am AIS verteilt vorkommen oder bspw. nur am proximalen oder distalen Ende des AIS sitzen. Die entsprechende lineare Regressionsanalyse (Anzahl der Colokalisationen pro μm AIS-Länge; $r^2 = 0,04$) ergab, dass in dieser Stichprobe kein linearer Zusammenhang zwischen AIS-Länge und der Anzahl der Colokalisationen mit Cx43 und AnkG besteht.

3.4 Der Einfluss von Glioblastomzellen auf elektrophysiologische Eigenschaften der Neurone

Änderungen der AIS-Länge können zu Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit führen (Grubb and Burrone, 2010; Jamann et al., 2018; Kuba et al., 2010). Da eine Pyramidenzelle mit längerem AIS einen niedrigeren axonalen Widerstand aufweist, sollte die AP-Schwelle laut geltender biophysikalischer Theorie niedriger sein und dadurch das Neuron erregbarer werden. Umgekehrt verhält es sich in der Theorie genauso. Ein kürzeres AIS bedeutet eine höhere AP-Schwelle und dadurch eine verringerte Erregbarkeit (Gulledge and Bravo, 2016; Kuba et al., 2010).

Um zu überprüfen, inwiefern das Wachstum von Gliomzellen auf einer OTC Einfluss auf die Erregbarkeit des einzelnen Neurons hat, haben wir Patch-Clamp-Ableitungen in Pyramidenzellen der CA-Schichten in P5-präparierten OTC nach DIV 7 bzw. 14 durchgeführt. Die OTC stammten aus demselben Wurf Mäuse wie für die Cx43-Analysen und die AIS-Längenmessungen in Abb. 23. Im Fokus der Analyse standen die aktiven AP Eigenschaften wie z.B. die Spannungs- und Stromschwelle der APs. Alle elektrophysiologischen Daten sind in Tab. 27-28 aufgeführt.

3.4.1 Aktive und passive Eigenschaften blieben nach Tumorwachstum größtenteils unverändert

Passive Eigenschaften von Neuronen, wie der Eingangswiderstand (I_R) und das Ruhemembranpotential (RMP) können das Feuerverhalten von Neuronen beeinflussen. Daher wurden zunächst diese Parameter gemessen (Abb. 25, Tab. 27 im Anhang). Zwischen Zellen von Kontroll-OTC und Tumor-OTC wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die Daten haben gezeigt, dass das RMP in beiden Gruppen jeweils ca. -70 mV betrug (Abb. 25 ; n=12 für DIV 7 Ctl: $-67,84 \pm 7,34$ mV; n=10 für DIV 7 Glio: $-67,03 \pm 2,372$ mV; n=13 für DIV 14 Ctl: $-72,31 \pm 13,68$ mV; n=9 für DIV 14 Glio: $-68,21 \pm 8,09$ mV; Mann-Whitney Test, P = 0,72 (DIV 7); P = 0,39 (DIV 14)) und Serienwiderstände (I_R ; Abb.25; DIV 7 Ctl: $18,36 \pm 11,73$ M Ω ; DIV 7 Glio: $26,53 \pm 10,55$ M Ω ; DIV 14 Ctl: $19,68 \pm 6,283$ M Ω ; DIV 14 Glio: $25,42 \pm 18,22$ M Ω ; Mann-Whitney Test, P = 0,101 (DIV 7); P = 0,3867 (DIV 14)), wie auch Eingangswiderstände unverändert blieben (DIV 7 Ctl: $165,3 \pm 67,51$ M Ω ; DIV 7 Glio:

167,5 ± 58,27 MΩ ; DIV 14 Ctl: 181,3 ± 62,08 MΩ ; DIV 14 Glio: 173,1 ± 142,2 MΩ; Mann-Whitney Test, P = 0,935 (DIV 7); P = 0,874 (DIV 14)).

Zur Messung aktiver Eigenschaften der Neurone wurde die Stromstärke bei 0 A im Stromklemmenmodus gehalten. Die AP-Schwelle wurde definitionsgemäß beim ersten AP-generierenden, depolarisierenden 20 ms Schritt gemessen, wobei die AP-Eigenschaften jeweils beim ersten AP analysiert wurden, das im Stromklemmenmodus ausgelöst wurde. Wir fanden weder nach DIV 7, noch nach DIV 14 Unterschiede in der AP-Halbwertsbreite (Abb. 25; DIV 7 Ctl: 1,867 ± 0,88 ms; DIV 7 Glio: 1,58 ± 0,17 ms; DIV 14 Ctl: 1,258 ± 0,356 ms; DIV 14 Glio: 1,35 ± 0,64 ms, Mann-Whitney Test, P=0,29 (DIV 7); P=0,7035 (DIV 14)) und der AP-Amplitude (Abb. 25; DIV 7 Ctl: 97,04 ± 16,48 mv; DIV 7 Glio: 104,7 ± 12,11 mv; DIV 14 Ctl: 109,6 ± 12,8 mV; DIV 14 Glio: 105,5 ± 32,64 mV; Mann-Whitney Test, P=0,223(DIV 7); P=0,725 (DIV 14)). Ebenso blieben auch die Stromschwelle (Abb. 25; ; DIV 7 Ctl: 179,9 ± 137,2 pA; DIV 7 Glio: 96,71 ± 61,16 pA; DIV 14 Ctl: 193,4 ± 121,9 pA; DIV 14 Glio: 132,1 ± 79,89 pA, Mann-Whitney Test, P=0,07 (DIV 7); P=0,1695 (DIV 14)) und die Spannungsschwelle zur Auslösung von APs unverändert (Abb. 25; ; DIV 7 Ctl: -48,17 ± 2,45 mV; DIV 7 Glio: -51,17 ± 4,33 mV; DIV 14 Ctl: -46,19 ± 7,45 mV; DIV 14 Glio: -44,58 ± 10,61 mV, Mann-Whitney, P=0,072 (DIV 7); P=0,7 (DIV 14)). Zusätzlich ergaben sich auch in der AP-Kinetik (Analyse der Steigungen (dV/dt) für die De- und Repolarisationsphase) keine Unterschiede. Repräsentative Phasenabbildungen sind in Abb. 26A dargestellt (Tab.27: für AIS-Spitze: Ctl: 213,66V/s; Glio: 161,1 V/s; für Soma-Spitze: Ctl: 401,71V/s; Glio: 389,21V/s). Im Vergleich beider Gruppen hatte das Tumorstadium auch keinen signifikanten Einfluss auf die AP-Frequenz (Abb. 26C; Zweifach-ANOVA, P>0,05), auch wenn die Neurone in Glio-OTC tendenziell bei niedrigem Input (50-250 pA) höhere AP-Frequenzen feuerten und bei hohem Input (>500 pA) zu niedrigeren Frequenzen tendierten (Abb. 26D).

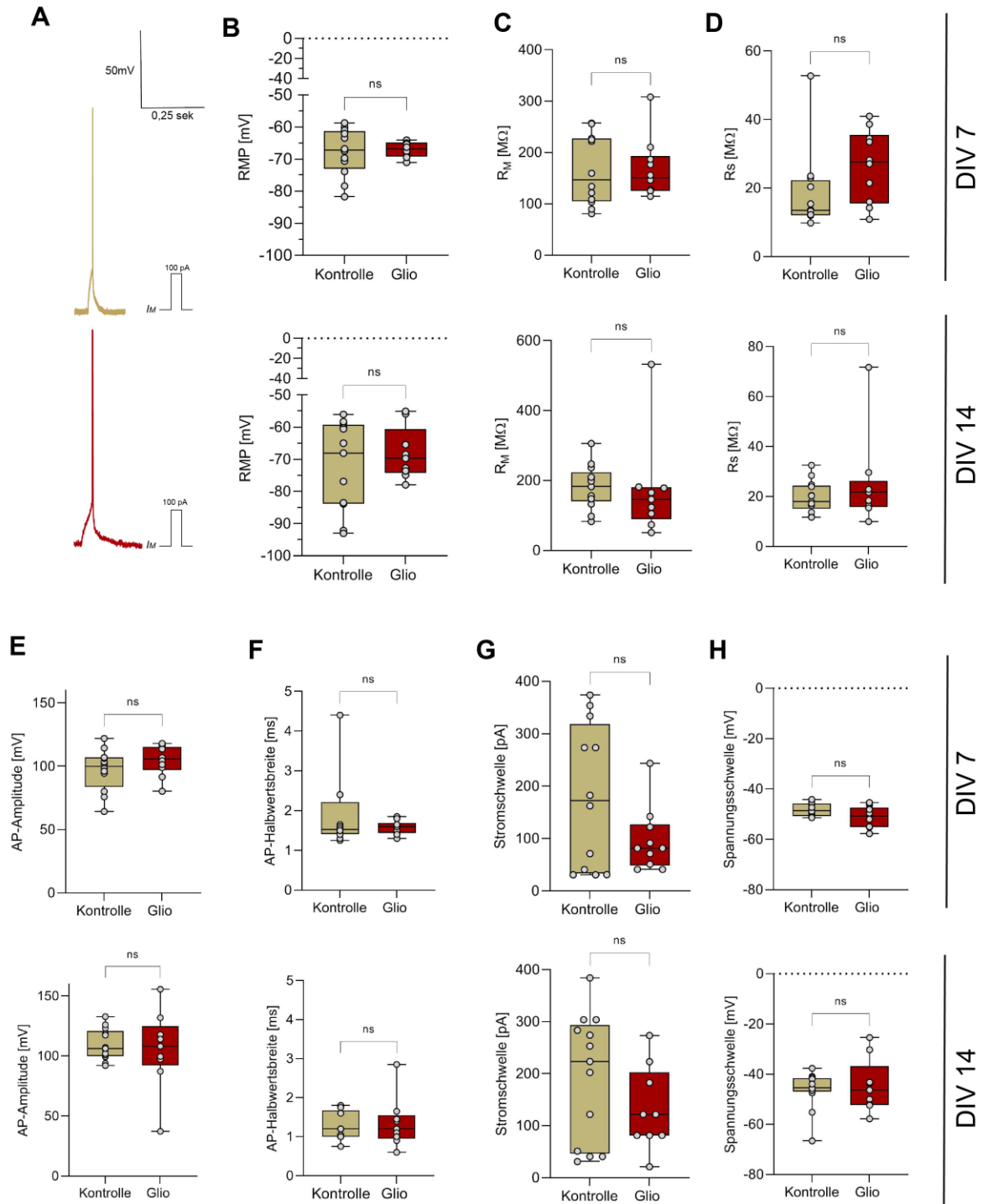


Abb. 25: Elektrophysiologische Messungen zeigen keine Veränderungen der Erregbarkeit in Tumor-OTC

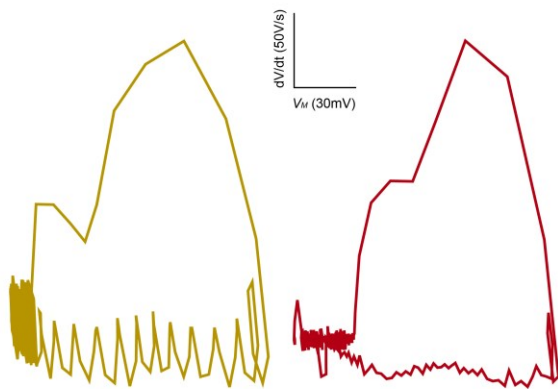
(A) Repräsentative Abbildung von einzelnen AP-Verläufen von Pyramidenzellen aus der CA-Schicht des Hippocampus, die mit 20ms langen Strominjektionen erregt wurden. 10pA Steigerungen wurden zur Bestimmung der Stromschwelle appliziert. Keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

(B-D) Statistische Analyse der passivem AP-Eigenschaften: Keine Unterschiede nach DIV 7 oder DIV 14 im Ruhemembranpotential (RMP; B), dem Eingangswiderstand (R_M; C) oder dem Serienwiderstand (R_S; D).

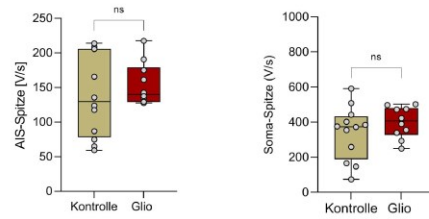
(E-H) Statistische Analyse aktiver Parameter. Auch hier keine Unterschiede zwischen Kontroll-OTC und Tumor-OTC nach DIV 7 und DIV 14 in der AP-Amplitude (E), der AP-Halbwertsbreite

(F), der Stromschwelle zur AP-Erzeugung (G) und der Spannungsschwelle (H). Jeweils Mann-Whitney Test, n=ca. 10 Zellen/Kondition.

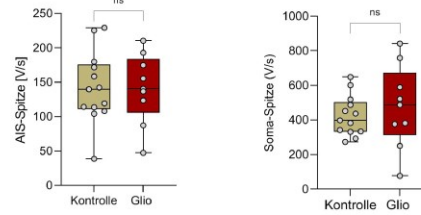
A



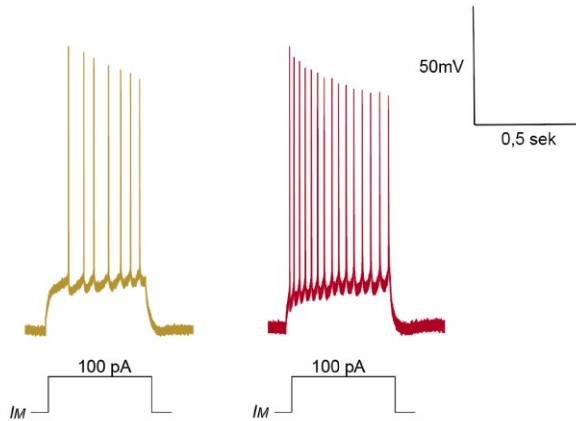
B DIV 7



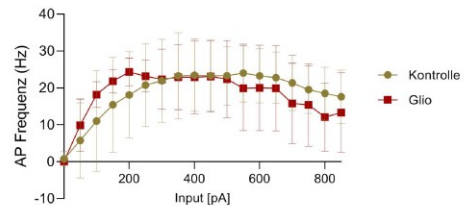
DIV 14



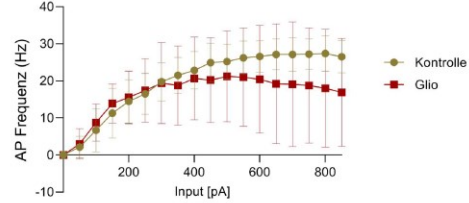
C



D DIV 7



DIV 14



E β IV-Spektrin / Biocytin / NeuN

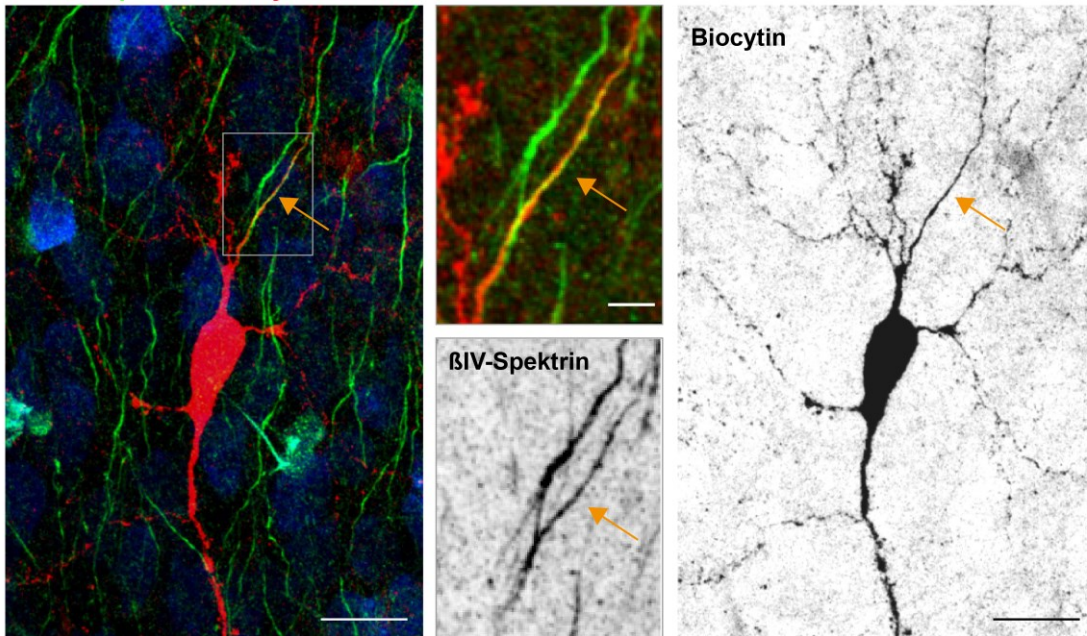


Abb. 26: AP-Verlauf zeigen keine Veränderungen in Tumor-OTC

(A) Dargestellt sind die Phasenplots von Neuronen der Kontroll- (beige) und Tumor-OTC (rot). Ähnlichkeiten im AP-Verlauf ohne signifikante Unterscheide. (B) Analyse des ersten (AIS) und der zweiten (Soma) Spitze des Phasenplots, die keine signifikanten Unterschiede nach DIV 7 und DIV 14 zwischen beiden Gruppen zeigen.

(C) Repräsentative Aufnahmen von AP-Verläufen, die bei um jeweils 50 pA aufsteigenden 500 ms langen Strominjektionen aufgenommen wurden. Keine Unterschiede (Mann-Whitney-Test, n=ca. 10 Zellen/Kondition) zwischen beiden Gruppen.

(D) Verhältnis zwischen Eingang und Frequenz, bestimmt durch die Anwendung von ansteigenden Stromschritten von 50 pA bei einer Dauer von 500 ms. Höhere Frequenzen bei niedrigen Strömen in der Glio-Gruppe und niedrigere Frequenzen bei hohen Injektionen, allerdings nicht signifikant. Zweiweg-ANOVA für Strominjektion, Frequenz und Gruppe, s. Tab. 27. (E) Repräsentative post-hoc Immunfärbung einer gepatchten Zelle aus der CA-Schicht des Hippocampus eines OTCs. Die Zelle wurde während der Patch-Clamp Aufnahmen mit Biocytin (rot) gefüllt. Neben Biocytin als Zellmarker, der innerhalb der Zelle bis in Dendriten diffundiert, wurde β IV-Spektrin als AIS-Marker (grün) genutzt und NeuN (blau) um die Somata von Neuronen zu färben. Maßstabsbalken X = 20 μ m.

3.4.2 Vergleich der AIS-Längen in gepatchten OTC

Zur Kontrolle der korrekten Lage gepatchter Zellen in der CA-Schicht des Hippocampus und Identifikation als Pyramidenzelle wurden post-hoc Immunfärbungen durchgeführt (Abb.26E). Dabei wurde Biocytin als Marker der Pyramidenzelle und β IV-Spektrin als AIS-Marker, sowie Nestin als Marker für Tumorzellen in entsprechenden Tumor-OTC verwendet. Mehrfach stellten wir in Vorversuchen fest, dass es im Zuge der Patch-Clamp-Messungen zu autolytischen Veränderungen im AIS kommt und so eine Immunfärbung für post-hoc Analysen nicht reliabel möglich war. Um zu überprüfen, ob die AIS in gepatchten OTC die vorher festgestellten Längenunterschiede im Gruppenvergleich aufwiesen, wurden stichprobenartig in genau den OTC AIS-Längen gemessen, die auch zuvor gepatcht wurden. Auf diese Art konnte eine Vorstellung von den morphologischen Verhältnissen der elektrophysiologisch untersuchten OTC gewonnen werden.

Hierzu wurden erneut die AIS mit dem „Single neurite tracer“ in Image J im 3D-Verlauf gemessen. In gepatchten OTC wurde keine signifikante Verlängerung der AIS nach DIV 7 gemessen (n= ca. 50 AIS; Ctl: $30,03 \pm 10,69 \mu$ m; Glio: $31,64 \pm 7,73 \mu$ m; Einweg-ANOVA, P=0,7671, Abb. 27C, Tab. 29-30). Die Längenunterschiede in den Glio-OTC, die nach den vorherigen Versuchen zu erwarten gewesen wären, wurden nach DIV 14

beobachtet (n=ca. 50 AIS; Ctl: $30,82 \pm 9,051 \mu\text{m}$; Glio: $38,28 \pm 9,384 \mu\text{m}$; Einweg-ANOVA, $**P < 0,01$, Abb. 27C, Tab. 29-30).

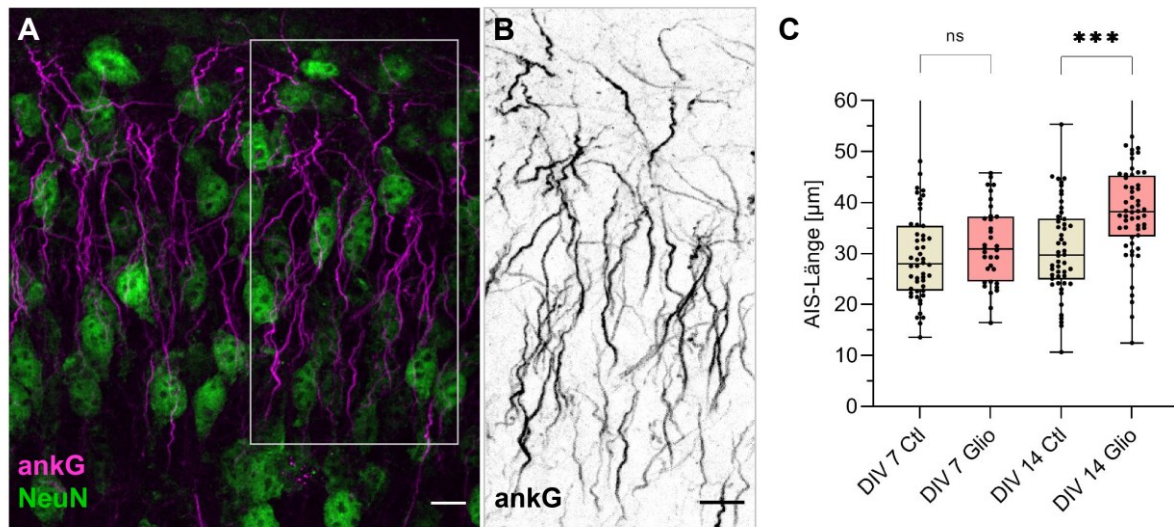


Abb. 27: AIS sind in gepatchten DIV 14 Tumor-OTC länger

(A) Abgebildet ist eine repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme von einem gepatchten OTC nach DIV 7, anhand dessen AIS-Längenmessungen durchgeführt wurden. Dargestellt sind AIS (ankG, magenta) und neuronale Somata (NeuN, grün). Grau umrahmt ist der vergrößerte Bildausschnitt, der in (B) die AIS schwarz-weiß darstellt. Deutlich zu erkennen sind die teilweise korkenzieherartigen AIS. Maßstabsbalken A-B = $10\mu\text{m}$.

(C) AIS-Längen aus den gepatchten OTC aus beiden Gruppen jeweils nach DIV 7 und DIV 14. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen ergeben sich nur nach DIV 14. Einweg-ANOVA, n= ca.50 AIS/Kondition, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, $****P < 0,0001$.

Zusammenfassend konnten wir zunächst an humanen OP-Resektaten relevante neuronale Strukturen in Tumor-Penumbra identifizieren. Aufgrund großer Heterogenitäten im Sinne von interindividueller Variabilität, mangelnder Kontrollmöglichkeiten und den limitierten Gewebeverfügbarkeiten konnten keine reliablen, quantitativen Messungen an humanem Material erfolgen (unter 3.1). Aus diesem Grund wurde zunächst bestätigt, dass auch in OTC die AIS-Dynamik typisches und vitales Verhalten aufwies und Tumorzellen im Gewebe infiltrierte (unter 3.2 und 3.3.1). Es konnte außerdem beobachtet werden, dass Tumorstadium einen deutlichen Einfluss auf die Morphologie des AIS hat. Unter Tumorstadium waren AIS in Kultur deutlich länger bei gleicher Normalentwicklung (unter 3.3.2 und 3.3.3). Das funktionelle Korrelat einer veränderten Erregbarkeit in OTC mit längeren AIS unter Tumorstadium konnte elektrophysiologisch nicht gezeigt werden. Aktive und passive

Parameter waren größtenteils gleich in beiden Gruppen (unter 3.4). Interzelluläre Kontaktpunkte zwischen Tumor und neuronalem Netzwerk konnten sowohl qualitativ, als auch quantitativ gezeigt werden. Nach 7 DIV gab es in der Tumorkultur weniger Cx43 Colokalisationen als in der Kontrolle. Eine Korrelation der Cx43 Verteilung am AIS mit der AIS-Länge konnte verneint werden (unter 3.3.4).

Sämtliche Messergebnisse und statistische Resultate sind im Anhang unter 7.6 zu finden.

4 DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Arbeit erbringen erstmals Hinweise auf eine morphologische Plastizität des AIS unter pathologischen Tumorbedingungen.

Im folgenden Kapitel werden potentielle Auslöser, Mechanismen und Zusammenhänge, die die gemessenen Effekte vermitteln könnten, diskutiert.

4.1 Überlegungen zur Methodik und statistischen Auswertung

4.1.1 Das AIS als Mediator neuronaler Plastizität

Wie eingangs beschrieben, steht das AIS als plastische Mikrodomäne am Neuron schon seit einigen Jahren im Zentrum zahlreicher Studien. Das AIS kann je nach Netzwerkzustand seine morphologischen Parameter wie Länge oder Position sowie seine molekulare Ausstattung modulieren (Jamann et al., 2018; Rasband, 2010; Yoshimura and Rasband, 2014). Dies geschieht in Anlehnung an homöostatische Mechanismen. Es wurde bereits in zahlreichen Studien gezeigt, dass längere AIS in Verbindung mit einer gesteigerten Erregbarkeit des neuronalen Netzwerkes stehen und APs leichter auslösen (Gutzmann et al., 2014; Kole and Brette, 2018; Kuba et al., 2010; Meza et al., 2018; Yamada and Kuba, 2016; Yoshimura and Rasband, 2014). Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, hängt die Erregbarkeit u.a. von der Geometrie und damit den elektrophysiologischen Eigenschaften des gesamten Neurons ab (Gulledge and Bravo, 2016). Neben der AIS-Position entlang des proximalen Axons hat sich vor allem die AIS-Länge als ein Parameter, der AIS-Plastizität widerspiegelt, erwiesen (Bender and Trussell, 2012; Engelhardt et al., 2019; Grubb and Burrone, 2010; Hofflin et al., 2017; Jamann et al., 2018; Kuba et al., 2010; Pan-Vazquez et al., 2020; Schluter et al., 2017; Wefelmeyer et al., 2015; Yamada and Kuba, 2016).

Die hier vorgelegte Arbeit bezog sich ausschließlich auf die AIS-Länge als Parameter für physiologische Reifung und plastische Netzwerkveränderungen. Dieser Entscheidung liegen mehrere Faktoren zu Grunde. Um Aussagen über Änderungen des AIS Abstandes zum Soma zu treffen, müsste grundsätzlich ein messbarer Abstand erkennbar sein. Das war aber nur in wenigen Zellen verlässlich der Fall. Neurone unterliegen, je nach Zelltyp, einer gewissen Heterogenität der AIS Positionen (Hofflin

et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit wurden überwiegend Pyramidenzellen analysiert, die grundsätzlich keine bzw. nur eine marginale Lücke zwischen AIS und Soma aufweisen (Hofflin et al., 2017). Die Somagrenzen konnten mit Hilfe des NeuN-Signals der hippocampalen Neurone in den Immunfärbungen detektiert werden, sodass sich die Lücke zwischen Ende des NeuN-Signals und Beginn des AIS-Signals (entweder AnkG oder β IV-Spektrin) ergab. Auch wenn NeuN streng genommen nur ein Marker neuronaler Kerne darstellt, färbt er das Zytoplasma zuverlässig (Mullen et al., 1992). Des Weiteren herrscht Unklarheit über die Definition des AIS-Soma Abstandes. In einigen Arbeiten wurde der kegelförmige Bereich des Axonhügels der Lücke zugerechnet, obwohl dies nicht einheitlich definiert ist (Harty et al., 2013). Die unterschiedlichen Definitionen und ungleichen Messmethoden machen Vergleiche zwischen verschiedenen Studien äußerst schwierig und unzuverlässig. Des Weiteren wurde eine Verlagerung seltener beobachtet als eine Längenänderung des AIS. Dies könnte damit zusammenhängen, dass AIS-Verlagerungen bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden konnten (Evans et al., 2013; Grubb and Burrone, 2010). Von den *in vitro* Ergebnissen des Burrone Labors abgesehen, korreliert die AIS-Länge deutlich besser mit funktionellen Veränderungen (Baalman et al., 2013; Jamann et al., 2018; Kole and Brette, 2018; Kuba et al., 2010). Teil einer möglichen Erklärung dieses multifaktoriellen Effekts könnte sein, dass *in vitro* isolierte Zellen in Kultur keine physiologische Mikroumgebung, wie die Extrazellulärmatrix, umgibt und so Modulationen einschichtiger ablaufen können. Da unsere Versuche und Messungen alle im funktionalen Zellverbund abliefen, entschieden wir uns dafür, allein die AIS-Länge als morphologischen Parameter zu untersuchen.

Um die statistische Zuverlässigkeit der verschiedenen AIS-Längenmessungen zu erhöhen, wurden in dieser Arbeit > 10.000 einzelne AIS analysiert. Aufgrund der Tatsache, dass jedes Neuron eine individuelle Rolle innerhalb der Netzwerkintegration spielt, sollten geometrische AIS-Parameter mit hoher Heterogenität immer in ausreichender Quantität beurteilt werden. Dass einzelne Werte eine signifikante Varianz auch über vergleichbaren Zelltypen hinweg aufzeigen, wurde bereits in einigen Studien festgestellt (Hofflin et al., 2017; Kole and Brette, 2018; Thome et al., 2014). Obgleich gilt es zu beachten, dass die Länge des AIS immer von der Gesamtgeometrie des Neurons abhängt (Thome et al., 2014). Daher wurden zumeist in jedem definierten Experiment aus jeder Gruppe pro Kondition mindestens 100 AIS analysiert, aus diesen dann Mittelwerte pro Tier gebildet und statistisch analysiert.

4.1.2 Implementierung der Färbeprotokolle

Wie bereits in Kapitel 1.2 und 2.4 dargelegt, wählten wir auch für diese Studie Antikörper gegen β IV-Spektrin und AnkG, um die entscheidenden Gerüstproteine des AIS per Immunfluoreszenzprotokollen anzufärben und konfokale Mikroskopieaufnahmen anzufertigen. Für die Darstellung der Gap Junctions, die TMs, Gliazellen und neuronale Strukturen miteinander verbinden, nutzen wir Antikörper gegen Cx43. Dieser sehr häufig im ZNS eingesetzte Antikörper konnte auch in unserem Labor erfolgreich an humanem und murinem Gewebe etabliert werden (Bennett and Chen, 2001; Cotrina et al., 2008; Khosla et al., 2020; Traub et al., 2018). Durch bereits publizierte Arbeiten, die Lokalisation von Connexinen an Axonen und Dendriten zeigten (Bahner et al., 2011; Schmitz et al., 2001; Traub et al., 2018), vermuteten wir, dass Connexine auch am AIS existieren könnten, zumal weitere Arbeiten innerhalb unserer Laborgruppe darauf hinweisen (bisher nicht publiziert). Die Identifikation der Cx43-Färbung am Axon gestaltet sich allerdings aufgrund der ubiquitären Expression an Gliazellen äußerst schwierig. Aufgrund der scheinbar immensen Bedeutung in der Kommunikation zwischen Tumorzellen und Mikroumgebung war es uns wichtig, diese Färbung erfolgreich zu etablieren (Osswald et al., 2015). Wie in Abb. 22 und 23 zu sehen ist, konnten wir in Form von Kollokalisationsanalysen mit AnkG bzw. β IV-Spektrin Cx43-Cluster am AIS nachweisen. Insbesondere durch die Überlagerungseffekte der vermehrt differenzierenden, Cx43 exprimierenden Astrozyten im OTC war eine quantitative Analyse nur pro einzeln markiertem AIS aussagekräftig. Das Ziel dieser Arbeit war es, diesbezüglich zu zeigen, dass Kollokalisierungen am AIS zu beobachten sind und damit den Zusammenhang von AIS-Länge und Anzahl der Kollokalisierungen zu analysieren. Die Antikörper gegen AnkG und β IV-Spektrin haben in vielen Studien voneinander unabhängiger Labore gezeigt, dass sie im Cortex und auch im Hippocampus zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefern (Hofflin et al., 2017; Huang and Rasband, 2018; Jamann et al., 2018; Jenkins et al., 2015; Rotheneichner et al., 2018). Außerdem wurden weder in unseren, noch in anderen Laboren signifikante Unterschiede zwischen AIS-Längenmessungen mit AnkG- oder β IV-Spektrin-Färbungen dokumentiert (Gutzmann et al., 2014; Jamann et al., 2018). Erfolgreiche Färbeprotokolle wurden bereits in unserem Labor erprobt und publiziert (Hofflin et al., 2017; Jamann and Kole, 2022; Schluter et al., 2017). Natürlich erfolgte eine wie in

Abschnitt 2.4 beschriebene Anpassung der Fixierungsmethodik an die Gegebenheiten in OP-Resektaten bzw. OTC.

4.1.2.1 Standardisierung der AIS-Messung

Da die exakte Messung der AIS-Länge funktionell von großer Aussagekraft ist, wurden hierzu schon mehrere verschiedene Methoden publiziert (Baalman et al., 2013; Grubb and Burrone, 2010; Gutzmann et al., 2014; Jamann et al., 2018). Entscheidend waren jeweils die Fragen nach der Wahl der Antikörper, des mikroskopischen Ansatzes, der Software, die zur Messung der Länge benutzt wurde und der Bestimmung des Anfangs- und Endpunktes des AIS. Neben manuellen Methoden, bei denen Anfang und Ende des AIS subjektiv bestimmt wird, wurden häufig auch halbautomatische Methoden genutzt, bei denen die AIS Erkennung durch den Nutzer erfolgte, Anfangs- und Endpunkte jedoch nach definierten Kriterien automatisch ermittelt wurden. Wie in Abschnitt 2.6 ausgeführt, wurde in dieser Arbeit jeweils ein halbautomatischer Ansatz gewählt. In den meisten anderen Publikationen erfolgte ebenso eine halbautomatische Analysemethode (Grubb and Burrone, 2010; Gutzmann et al., 2014; Jamann et al., 2018; Kuba et al., 2015). Insbesondere in Regionen mit sehr dichten Neuronenschichten und komplizierten 3-dimensionalen Verläufen der Axone wird eine vollautomatische Analyse zu fehleranfällig und intransparent (Baalman et al., 2013). Der entscheidende Unterschied zwischen verschiedenen Studien zur AIS-Länge liegt meist in der Festlegung des Schwellenwertes der Fluoreszenzschwelle. Manche Studien definierten z.B. Anfang und Ende der gemessenen Fluoreszenzschwelle als 50% der maximalen Fluoreszenzintensität (Duflocq et al., 2011). Bei Grubb and Burrone et al. wurde die Schwelle wiederum als 33% des durchschnittlichen Intensitätsprofils definiert, Kuba et al. definierten die Schwelle der Immunfluoreszenzintensität in Bezug auf die Färbung des Somas. Um die Vergleichbarkeit künftiger Studien zur AIS-Länge besser vergleichen zu können, ist ein einheitlicher Ansatz erstrebt.

Das Problem dabei ist jedoch, dass die definierte relative Fluoreszenzschwelle erheblich von den Mikroskopiereinstellungen, der Färbequalität und des Verhältnisses von Signal zum Rauschen abhängt. Je weniger Hintergrund im entsprechenden Kanal gefärbt ist, desto niedriger kann die Schwelle definiert werden, sodass zuvor bereits eine Bildbearbeitung zur Reduktion des Signal-zu-Rauschens Verhältnis erfolgt ist.

Auch diese sogenannte Hintergrundsubtraktion kann automatisiert erfolgen, sodass für jedes zu analysierende Bild die gleichen Analysebedingungen herrschen. Durch die Nutzung des von unserem Labor modifizierten ImageJ Add-ons „Single neurite tracer“ gelang es, insbesondere für die Cx43-Analysen durch automatisierte Hintergrundsubtraktion und Fluoreszenzschwellenwertbestimmung unter immer gleichen Bildbedingungen AIS im dreidimensionalen Bildstapel zu identifizieren und halbautomatisch auszuwerten. Insbesondere in der 3-dimensionalen und zeldichten CA Region des Hippocampus konnte so die Genauigkeit der Analysen erhöht werden. Auch wenn für die vorherigen Messungen der Versuche, die in den Abschnitten 3.1 bis 3.3.2 ausgeführt wurden, die AISuite genutzt wurde und bei dieser Methode durch die Reduktion von Informationen der Z-Ebene in 2-dimensionale Bilder eine potenzielle Fehlerquelle darstellt, lag immer derselbe Fehler vor. Auch bei dieser Software liegt der wesentliche Vorteil darin, dass die AIS Anfangs- und Endpunkte halbautomatisch entsprechend einer zur Färbequalität adaptierten Intensitätsschwelle gemessen werden und so keine subjektive Selektion erfolgt. Um tatsächlich eine Fehlerkonsistenz zu erreichen, ist es hierbei wichtig, dass nur eine Person die Messungen durchführt um interindividuelle Variabilität innerhalb von zusammenhängenden Versuchsreihen ausschließen zu können und den „*selection bias*“ konstant zu halten. Insbesondere in zeldichten Regionen wie dem Hippocampus muss auch hier explizit auf Überschneidungen verschiedener AIS geachtet werden.

4.1.3 Limitationen der Modelle

In der Auswahl passender Modelle zur Überprüfung einer Hypothese gilt die Prämisse, dass ein Modell umso besser geeignet ist, je physiologischer die Versuchsbedingungen sind. Auch wenn Nagetiermodelle ein sehr beliebtes Modell zur Untersuchung molekularer, struktureller oder funktioneller Veränderungen sowohl in der physiologischen Entwicklung, als auch im Fortschreiten von Pathologien sind, müssen Gütekriterien immer neu angewandt werden. Inwiefern ein Modell geeignet ist, um ein Krankheitsgeschehen abzubilden, hängt u.a. von konditionellen Gemeinsamkeiten und physiologischen Ähnlichkeiten zum Menschen ab. Dabei gilt zu beachten, dass Tiermodelle, in diesem Falle OTC, nie ideale Bedingungen abbilden können, oft aber valide Aussagen zulassen (Gahwiler, 1984; Gahwiler et al., 2001). Um die Gültigkeit eines Nagetiermodells zur Untersuchung von Veränderungen durch

Tumorexposition zu bewerten, müssen Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede der hippocampalen Schaltkreise zwischen Nagetieren und Menschen berücksichtigt werden. Im Folgenden sollen Vor- und Nachteile der genutzten Modelle beschrieben werden.

4.1.3.1 Limitationen der OP-Resektate

Hinsichtlich der inhaltlichen Validität scheint es naheliegend zu sein, Experimente aus humanen OP-Resektaten abzuleiten, da diese aus der pathophysiologischen Situation eines Menschen heraus resiziert wurden. Erwartungsgemäß konnten in dieser Arbeit allerdings keine echten Kontrollen identifiziert werden, da Resektate aus „gesunden“ Hirnen aus ethischen Gründen nicht zur Verfügung stehen. Insbesondere hinsichtlich der Erkenntnisse des diffusen Tumorwachstums in Form spinnennetzartiger TMs (s. 1.1.3), lässt sich ableiten, dass auch Gewebeproben aus umliegenden, nicht tumorbefallenen Zonen keinesfalls als „gesunde“ Kontrolle angesehen werden können und das neuronale Netzwerk ebenso unter pathologischen Einflüssen steht. Neben der problematischen Augenscheinvalidität, konnte zudem die heterogene Verteilung von Neuronennestern als Störvariable identifiziert werden, sodass selektive Stichproben einzelner Verdichtungen von neuronalen Clustern wiederum die Validität der Aussagen aus OP-Resektaten gefährden. Dennoch war es hinsichtlich der Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus den Tiermodellen nützlich, die Regionen von Interesse zunächst im humanen Präparat nachzuweisen.

4.1.3.2 OTC und Tumorinvasion

Wir konnten feststellen, dass auch in unseren Versuchen Tumorzellen nach Implantation auf OTC aus Mäusen zuverlässig wachsen und eine leichte Tumorinvasion erfolgt (Chadwick et al., 2015).

Obwohl OTC immer wieder von verschiedenen Laboren zu Experimenten mit Ko-Kultivierung von Tumorzellen mit Messung der Zellinvasion genutzt worden sind, gibt es noch kein standardisiertes reproduzierbares Protokoll (Del Turco and Deller, 2007; Eisemann et al., 2018; Grabiec et al., 2017). Hinsichtlich der Konstruktvalidität, sprich der Ähnlichkeit in Ätiologie und Phänotyp, ließen sich mit den OTC bessere Ergebnisse erzielen als mit früheren zweidimensionalen Zellkulturmodellen wie z.B. den Rollertubes (Gahwiler et al., 2001; Grabiec et al., 2017; Stoppini et al., 1991).

Neben der Frage nach adäquater Tumorzellinvasion nach Applikation war vor allem die Frage der Vitalität der hippocampalen Kulturen nach Präparation von großer Bedeutung, da nur unter diesen Umständen eine Vergleichbarkeit zum lebenden Organismus bestehen kann.

Wir entschieden uns für ein Präparationsalter von 4-8 Tagen und eine Schnittdicke zwischen 250-300 μm , auch wenn Glioblastome in der Regel Tumore ältere Menschen sind. Dementsprechend würde die Präparation erwachsener Maushirne die prädiktive Validität eventuell erhöhen, jedoch steht dem eine verminderte Vitalität der Neurone innerhalb der Kultur gegenüber (Eisemann et al., 2018; Gahwiler, 1984; Grabiec et al., 2017). In früheren Stadien sind die zellulären Bestandteile noch weniger differenziert, migrieren und können dabei zum Verlust der organotypischen Zellstruktur führen (Gahwiler, 1984; Gahwiler et al., 2001). Der Vorteil junger Präparationsalter (<12 Tagen) liegt in der höheren Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Traumata bei der Präparation aufgrund höherer Plastizität des Gewebes (Gahwiler et al., 2001; Noraberg et al., 1999; Noraberg et al., 2005). Dickere Schnitte degenerieren aufgrund von Diffusionsbeschränkungen und dünnere sind noch anfälliger gegenüber mechanischen Traumata und Integritätsverlust (Gahwiler et al., 2001). Unsere Beobachtungen bestätigten auch eine erhöhte Tendenz zur Gewebsnekrose bei Schichten >300 μm Dicke. Binnen der ersten drei Tage *in vitro* reagieren Mikrogliazellen mit Migration und Proliferation an der Gewebeoberfläche, wo sie zusammen mit Astrozyten die sogenannte Glianarbe bilden (Grabiec et al., 2017). Ein zellulär hochreaktiver Zustand wird durch die Ödembildung angezeigt, die auch wir bestätigen konnten. Die Axone werden auch in Kultur binnen 14 Tagen myelinisiert (Grabiec et al., 2017). Über die regelrechte Differenzierung der Astrozyten kann aufgrund fehlender Aktivitätsmarker keine abschließende Aussage getroffen werden (Derouiche et al., 1993; Grabiec et al., 2017).

Das phänotypische Erscheinungsbild der Glioblastome lässt sich in *ex vivo*-Versuchen wie OTC natürlich nur auf zellulärer und abstrahierter Ebene beurteilen, nicht auf klinisch symptomatischer Ebene. Ein typisches Krankheitssymptom der primären Hirntumore stellt die erhöhte Epileptogenität aufgrund neuronaler Übererregbarkeit dar, passend zu der Frage dieser Arbeit nach Veränderung der Erregbarkeit durch Tumorwachstum (Louis et al., 2016). Das morphologische Korrelat der erhöhten Erregbarkeit stellt neben veränderten AP-Eigenschaften in elektrophysiologischen Messungen u.a. auch die Veränderung der AIS-Länge dar (Baalman et al., 2013; Harty

et al., 2013; Wimmer et al., 2010). Aufgrund dessen verfolgt diese Arbeit einen aktuellen und innovativen Ansatz.

Die typischen Auswirkungen eines Glioblastoms wie z.B. oxidativer Stress, Veränderungen der Neurotransmitterhomöostase, Rezeptorplastizität und Veränderung von Zellzyklen und Mikroumgebung erfolgen ebenso in OTC (Chadwick et al., 2015; Jung et al., 2020; Osswald et al., 2015; Venkatesh and Monje, 2017). Zwar war es nicht Ziel dieser Studie, aber es wäre außerdem möglich die äußeren Bedingungen der OTC durch Manipulation des Nährmediums (z.B. durch Medikamente etc.) zu verändern und so Einflussfaktoren zu untersuchen. Zudem deckten sich die Beschreibungen von Gahwiler et al. und Humpel et al. mit unseren Beobachtungen hinsichtlich einer Restgewebssdicke von mindestens 50 μm *in vitro* bei physiologischen Bedingungen (4% CO_2 bei 37°C).

Interessanterweise konnten wenige Regelmäßigkeiten in Etablierung der Tumorzellen und Ausbildung zu interkonnektierenden Tumornetzwerken beobachtet werden, obwohl auf jeder Kultur unter gleichen Bedingungen die gleiche Menge Tumorzellsuspension (0,5 μl) appliziert wurde. Auch zuvor wurde eine geringere Zellinvasion beobachtet, wenn die Tumorzellen allein auf die Gewebeoberfläche appliziert wurden, als im Vergleich zur Implantation in Form von Sphäroiden ins Gewebe hinein (Eisemann et al., 2018). Wir entschieden uns trotz der Vermutungen, dass sich Tumorwachstum vor allem an der Grenzfläche zwischen Luft und Gewebe und damit auf der Kulturoberfläche ablaufen wird, für eine oberflächliche Tumorzellimplantation, aufgrund des deutlich stärkeren Gewebstraumas bei Applikation in das Gewebe hinein. Dennoch konnten zahlreiche Infiltrationen bis >30 μm ins Gewebe beobachtet werden. Das wiederum bewirkte eine höhere Reliabilität bezüglich funktioneller Verbindungen zu intaktem neuronalem Gewebe, da die oberflächliche Schnittfläche infolge von Mikroverletzungen und Gliazellrasen nur eingeschränkt beurteilbar ist.

Bezüglich einiger entscheidender Faktoren wie z.B. 3D-Gewebeintegrität, Mikroumgebung und Gliaintegration sind die OTC der herkömmlichen Zellkultur deutlich überlegen und eignen sich deshalb gut zur Untersuchung morphologischer und funktioneller Parameter nach Integration der Glioblastomzellen in eine dreidimensionale Gewebematrix. Der derzeitige Stand der Wissenschaft zur Nachahmung der natürlichen Umgebung von Gliomzellen stellen OTC dar, die mehrere Tage bis Wochen *ex vivo* kultiviert werden können, ohne ihre Zytoarchitektur

wesentlich zu verändern (Eisemann et al., 2018). Außerdem besteht so die Möglichkeit kritische Faktoren in Tumorzellen und ihre mutmaßlichen Interaktionspartner der Tumormikroumgebung zu identifizieren und therapeutisch zu manipulieren, um letztendlich neue Möglichkeiten der Therapie zu eruieren.

Um möglichst physiologische zelluläre Bedingungen zu erhalten, sahen wir von der Verwendung von Knock-Out Mäusen zur Beschleunigung des Tumorwachstums ab und verwendeten Wildtyp-Mäuse.

In Anbetracht aller Ergebnisse und Erfahrungen können folgende Fehlerquellen, die zum frühzeitigen Verlust der Vitalität der Kulturen führte, identifiziert werden:

- 1.) unsterile Bedingungen
- 2.) schwankende Temperatur- und pH-Bedingungen des Nährmediums
- 3.) mechanische Verletzungen des Gewebes bei der Präparation oder Tumorumplantation

OTC stellen demnach eine gut geeignete Ergänzung zu *in vitro* Methoden dar, um vielerlei Fragestellungen auf den Grund zu gehen. Zum Beispiel könnten auch verschiedenste Pharmaka antitumoraler Wirkstoffe getestet werden, auch wenn dies nicht Fragestellung dieser Arbeit war. Im Vergleich zur herkömmlichen, homogenen Zellpopulation in Einzellzellkulturen bieten die OTC die Möglichkeit, ein komplexes Gewebe und dessen Adaptation auf explizite Bedingungen zu untersuchen.

4.1.3.3 OTC und der Hippocampus

Der Hippocampus ist eine hochgradig geordnete und sehr komplexe Struktur. Die Projektionen der afferenten Fasern enden in verschiedenen sich nicht überlappenden Schichten. Einige Studien zeigen, dass die Efferenzen zwischen dem entorhinalen Kortex und dem DG, sowie CA-Neuronen auch nach Präparation intakt bleiben und funktionell der Situation *in vivo* ähneln (De Simoni et al., 2003; Grabiec et al., 2017; Noraberg et al., 2005). Auf Grundlage dieser Studien wurde auch festgestellt, dass die Entwicklung der Dendritenbäume, die Synapsenbildung und die extrazelluläre Netzwerkaktivität in OTC mit akuten Hirnschnitten vergleichbar sind (Grabiec et al., 2017; Noraberg et al., 2005). Passend dazu konnten Grabiec et al. auch beobachten, dass die Expression und Verteilung der Glutamatrezeptoren in OTC nicht signifikant

unterschiedlich zu akuten Schnitten waren, ebenso wenig wie die Häufigkeit synaptischer GABAerger Potentiale. Einzig die Häufigkeit glutamaterger spontaner Ströme war in OTC erhöht. Es ist bereits gelungen mittels immunzytochemischen Methoden die Ähnlichkeit von Glutamatrezeptor-Verteilungsmustern (NMDA- und AMPA-Rezeptoren) zu zeigen (Bahr, 1995; Bahr et al., 1995; Gerfin-Moser and Monyer, 2002). Laut Gahwiler et al. (2001) kommt es vor allem in den ersten Tagen nach Präparationen zur synaptischen Konnektivitätsänderungen, die sich im Verlauf normalisierten. OTC, die eine Nekrotisierungstendenz aufwiesen, zeigten dies zumeist in den ersten Tagen. Dies war auch in unseren OTC vor allem an erhöhter Labilität der Schnitte in den ersten Tagen in Kultur sichtbar. Die Gesamtzahl der synaptischen Verbindungen scheint nach einer Zeit der Äquilibration stabil zu bleiben, ebenso die Konnektivität innerhalb des Hippocampus (De Paola et al., 2003; De Simoni et al., 2003; Gahwiler et al., 2001). Wir konnten keine Veränderungen der Zytoarchitektur beobachten.

Bisherige Untersuchungen bezogen sich beispielsweise auf den visuellen Cortex, denen nach Präparation der primäre Input aus subkortikalen Quellen fehlte (Hofflin et al., 2017). Im visuellen System entspricht das Reifungsprofil der AIS-Längen weitgehend der Situation *in vivo* (Gutzmann et al., 2014), weshalb auch für den Hippocampus von keiner signifikanten Abweichung zur *in vivo* Situation ausgegangen wird (Gahwiler et al., 2001).

Die Betrachtung der Literatur deckt sich demnach mit den eigenen Beobachtungen und zieht die Schlussfolgerung nach sich, dass OTC eine geeignete Methode darstellen, um die Plastizität komplexer Hirnregionen wie dem Hippocampus zu untersuchen. Allerdings haben bisher kaum Untersuchungen stattgefunden, in denen das AIS, seine Entwicklung und Maturierung in OTC untersucht wurden. Aufgrund unseres innovativen Ansatzes in dieser Methode die komplexen Themenfelder der neuronalen Plastizität und die Tumorbilogie miteinander zu verbinden, bleiben natürlich noch einige Fragen offen. Der Mangel an externen Referenzen erschwerte zudem die Vergleichbarkeit der eigenen Versuche und stellt sicherlich eine Herausforderung bei der Bewertung der Validität dar. Gründe dafür könnten sein, dass durch die komplexe Anatomie der Neurone, der Afferenzen und Efferenzen im Hippocampus und die vielfältigen Verbindungen innerhalb des Netzwerks nur schwer kausale Aussagen getroffen werden können. Hinzu kommt, dass durch die 3-

dimensionale Ausrichtung der Axone in der CA-Region potenzielle Fehlerquellen bei morphometrischen Messungen vorliegen könnten. Aus diesem Grund haben wir für verschiedene Fragestellungen verschiedene Messmethoden weiterentwickelt.

4.1.3.4 OTC und Übererregbarkeit

Neben der morphologischen Betrachtung von Tumor- und Neuronennetzwerk war für den elektrophysiologischen Teil dieser Arbeit nicht nur die Zytoarchitektur von Bedeutung, sondern vor allem die elektrophysiologische Homöostase. Insbesondere beim Thema Epileptogenität konnte gezeigt werden, dass akute Hirnschnitte in Kultur epilepsieähnliche Ereignisse über den CA-Schichten zeigten und epilepsieartige Erregungszustände in OTC reproduzierbar durch externe Erregung oder pharmakologische Manipulationen ausgelöst werden können (Dyhrfeld-Johnsen et al., 2010; Prestigio et al., 2019; Valente et al., 2021; Ziobro et al., 2011). Auch wenn es in der vorgelegten Arbeit nicht um Epilepsie geht, sondern die veränderte Erregbarkeit durch astrozytäre Tumore, ist an diesem Themenfeld erkennbar, dass OTC eine geeignete Methode darstellen, um Erregungszustände zu überprüfen.

Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass in den meisten Studien zur Epileptogenität mit OTC extrazelluläre Ableitungen in Form von lokalen Feldpotenzialen gemessen wurden, um die Spontanaktivität eines Netzwerks aufzeichnen zu können (Valente et al., 2021). Diese Art der Messung ist deutlich weniger fehlersensibel und quantitativ besser umsetzbar als Einzelzellmessungen wie wir sie durchführten. Allerdings erlauben nur Einzelzellmessungen Aussagen über Erregungszustände einzelner Zellen spezifischer Zellarten (wie z.B. Neurone) abzuleiten. Da wir die AIS-Länge als morphologischen Parameter mit der elektrophysiologischen Eigenschaft eines einzelnen Neurons korrelieren wollten, entschieden wir uns gegen extrazelluläre Ableitungen. Auch wenn es schwer war einzelne elektrophysiologische Zustandsänderungen zu messen, wäre die Frage der erhöhten Epileptogenität auf die gesamte Region bezogen auch von Interesse und könnte in weiteren Versuchen evaluiert werden.

Als abschließenden Punkt zu den OTC sollte noch erwähnt werden, dass es zu deutlichen Verbesserungen bezüglich Replizierbarkeit und zeitlicher Effektivität der Versuchsplanungen und Durchführbarkeit im Vergleich zu alternativen Gewebeproben wie der Implantation in lebende Mäuse kam (Corcoran et al., 2003). Nicht zu vernachlässigen ist auch der deutlich geringere Einsatz von Versuchstieren, da pro

Maus zwischen 6-10 Hippocampi in Kultur genommen werden können, welche unabhängig voneinander untersucht und behandelt werden können.

4.2 Morphologische Auswirkungen des Tumorwachstums

4.2.1 Plastizität des AIS innerhalb eines Netzwerks

In der vorliegenden Arbeit wurden signifikante Längenveränderungen des AIS im Vergleich zwischen Kontroll-OTC und Glio-OTC festgestellt.

In den ersten Versuchen zeigten wir, wie sich die AIS-Entwicklung in hippocampalen OTC verhält. Auch die Verteilungsbreite der einzelner AIS-Längen bleibt ähnlich. Dies deutet darauf hin, dass ein stabiles Netzwerk vorliegt, das zum Zeitpunkt der Fixierung keinen großen Umstrukturierungen unterlegen war (Abb.15). Bisher gibt es weder *in vivo* noch *in vitro* Studien, die die AIS-Entwicklung im murinen Hippocampus untersucht haben. Deshalb führten wir diese Entwicklungsreihe durch, um zumindest eine interne Referenz der Messwerte zu erhalten. Im Abschnitt 4.1.3.3 wurde bereits diskutiert, welche Gründe es haben könnte, dass wenige Daten über hippocampale AIS vorliegen. In sensorischen Kortices gibt es einige Erkenntnisse darüber, wie sich das AIS im Zeitverlauf mit wechselnden synaptischen Inputs verhält (Gutzmann et al., 2014; Jamann et al., 2018; Kim et al., 2019; Zhang et al., 2019). Wie eingangs erwähnt, unterliegen AIS Längen einer gewissen Heterogenität und unterscheiden sich je nach Spezies, Hirnregion und neuronalem Zelltyp (Duflocq et al., 2011; Gullledge and Bravo, 2016; Hofflin et al., 2017; Jamann et al., 2018; Thome et al., 2014) . Da im Hippocampus zwar die Schaltkreise weitgehend aufgeklärt sind, ein Neuron aber über verschiedene Afferenzen direkten Input erhält und die Verschaltungsstrukturen dabei sehr komplex sind, gibt es keine klar abgeleiteten Prinzipien, wie Input und Output im Hippocampus gut modulierbar sind. Deshalb ist es komplex Fragestellungen mit verändertem Input abzuleiten. Aber auch für dieses Areal gilt die These, dass die AIS-Plastizität ähnlichen aktivitätsabhängigen Regulationsmechanismen unterworfen ist wie die unter Abschnitt 1.2 beschriebenen.

Während der normalen Entwicklung von DIV 3 zu DIV 21 erfolgte eine Längenreduktion der AIS um ca. 20% (Abb.15). Weiter zeigten wir, dass es sich ähnlich auch in Tumor-OTC verhält (Abb. 18). Nach Feststellung dieser

Vergleichbarkeit wurden AIS der CA-Regionen aus Tumor- und aus Kontroll-OTC mehrerer Präparationsalter an DIV 14 und DIV 21 verglichen. Die AIS unter Tumorwachstum waren signifikant länger als AIS der Kontrollen (Abb. 20). Auffallend dabei war, dass auch hier der Verkürzungstrend an DIV 21 im Vergleich zu DIV 14 zu sehen war, was wahrscheinlich als Zeichen vitaler Kulturen zu werten ist (Gahwiler et al., 2001; Stoppini et al., 1991). Zum Ausschluss eines Präparationsaltereffekts verglichen wir von P5 bis P8 alle eingeschlossenen Präparationsalter. Dadurch konnten wir einen Längeneffekt durch das Alter bei Präparation ausschließen (Abb.21).

Andere Studien zeigen, dass die AIS-Länge mit dem Netzwerkzustand als Folge des sensorischen Inputs zusammenhängt (Abschnitt 1.2.3) ebenso wie verschiedene Studien nahelegen, dass längere AIS die Erregbarkeit der Neuronen erhöhen (Gutzmann et al., 2014; Hofflin et al., 2017; Jamann et al., 2018; Kuba and Ohmori, 2009; Yamada and Kuba, 2016). Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass bei Neuronen mit langem AIS niedrigere Schwellenwerte für die AP-Initiierung vorliegen und auf einen Zustand erhöhter Erregbarkeit hinweisen (Jamann et al., 2018). Bei all den Daten, die die Bedeutung des AIS hinsichtlich neuronaler Erregbarkeit unterstützen, gilt es zu betonen, dass noch nicht final geklärt ist, auf welche Reize hin z.B. eine AIS-Verlängerung zur Aufrechterhaltung der Netzwerkhomeostase geschieht. So geht es nicht nur um die Relation zwischen somatischem Input und Output, sondern auch z.B. direkter axo-axonaler Modulation am AIS durch GABAerge Interneurone, die eine aktivitätsspezifische Dynamik hemmender Schaltkreise darstellen (Dudok et al., 2021; Wefelmeyer et al., 2016). Auch aus diesem Grund stellten wir in dieser Arbeit die Frage nach Cx43-Colokalisationen direkt am AIS. Cx43-Kontakte stellen zwar keine axo-axonischen GABAergen Synapsen dar, könnten möglicherweise aber auch einen direkten Input am AIS liefern und aufgrund der schnellen Übertragungsrate elektrischer Synapsen nachhaltig in die AP Initiierung eingreifen.

Bei dem Thema dieser Arbeit handelt es sich um eine Frage, die viele Themenfelder subsummiert und derartig noch nicht gestellt wurde. Dadurch ist eine monokausale Erklärung für die gemessenen Effekte nicht definierbar. Weder die Prinzipien neuronaler Plastizität und die Einflüsse auf Veränderung neuronaler Erregbarkeit,

noch die Tumorbilogie und entsprechende Interaktionen der Entwicklung sind ausreichend erforscht. Dennoch sind in dieser Arbeit viele potenzielle Einflussfaktoren, die sich gegenseitig beeinflussen, beschrieben worden. Die verschiedenen Aspekte der Interaktion zwischen Tumor- und Neuronennetzwerk werden nachfolgend diskutiert.

4.2.2 Zusammenhang der Tumorgenese mit der Entwicklung neuronaler Netzwerke

Diese Arbeit hat festgestellt, dass ein starker morphologischer Effekt des Tumors auf die AIS-Länge als Parameter der Netzwerkerregung zu beobachten ist und die AIS in Tumor-OTC signifikant länger waren (Abb. 20A, 21E). Auf Basis bisheriger Erkenntnisse zu morphologischen und elektrophysiologischen Zusammenhängen am AIS liegt die Vermutung nahe, dass individuelle Neurone erregbarer sind (ihr AIS ist länger), was wiederum auf eine homöostatische Reduktion der Netzwerkaktivität hinweist (eine Deprivation führt zur AIS Verlängerung, eine Stimulation zu seiner Verkürzung).

Im folgenden Abschnitt sollen die in Kapitel 3 beschriebenen Ergebnisse diskutiert werden und anhand der aktuellen Erkenntnisse bewertet werden. Schwerpunkt soll dabei die Interaktion mit der Mikroumgebung als einen erheblichen Einfluss auf die Interkonnektivität des Tumornetzwerks mit anderen Zelltypen sein. Die zellulären Mechanismen bezüglich der NGS, Gap Junctions, sowie die Effekte verschiedener Neurotransmitter und Rezeptoraffinitäten wurden bereits dargelegt. Die entscheidende Frage über die Initiation und die Kausalitätsketten dieser Effekte bleibt allerdings noch offen und benötigt weitergehende Forschungsprojekte.

4.2.2.1 Bedeutung der peritumoralen Mikroumgebung

Zunehmend setzt sich die Erkenntnis durch, dass Gliome komplexe Tumorgebilde sind, die sich aus neoplastischen sowie nicht-neoplastischen Zellen zusammensetzen (Louis et al., 2016). Dabei steht die Frage im Zentrum wie die verschiedenen Komponenten des neuronalen Netzwerks und dessen Mikroumgebung miteinander kommunizieren und ihre Entwicklung bzw. Differenzierung koordinieren. Lange Zeit dachte man, dass primäre Hirntumore allein aus entarteten Gliazellen bestünden, die ihre Malignität durch Verdrängung der bewucherten Hirnstrukturen erreichen.

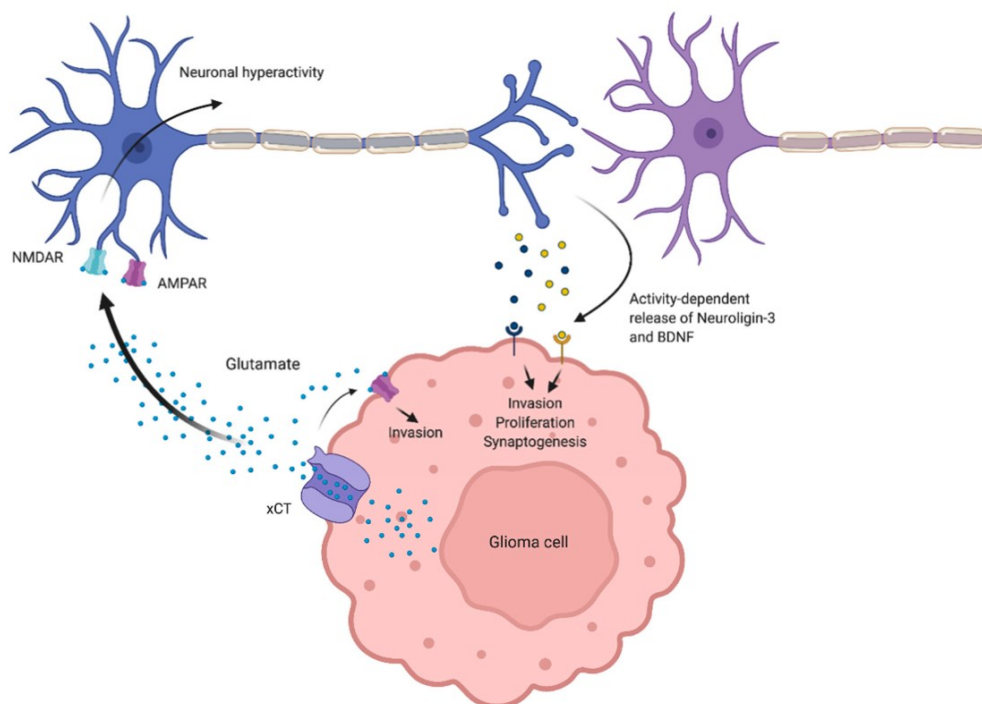
Mittlerweile ist ausreichend bekannt, dass die Malignität erst durch die Beeinflussung sämtlicher Zellstrukturen und Kommunikationswege der Mikro- und Makroumgebung zustande kommt (Buonfiglioli and Hambardzumyan, 2021; Johung and Monje, 2017; Jung et al., 2020; Jung et al., 2019; Melgarejo da Rosa, 2020; Monje et al., 2020), deren Bestandteile einzeln und in komplexer Wechselwirkung miteinander zur Progression, Malignität und Invasivität beitragen.

Nun bleibt dennoch die Frage offen, wie es im Zusammenhang zwischen Tumor und intaktem Nervengewebe zur gegenseitigen zellulären und molekularen Beeinflussung, wie z.B. der Veränderung neuronaler Erregungszustände kommen kann.

Venkatesh et al. charakterisierten die onkogene Wirkung neuronaler Aktivität in Gliomen und konnten durch Induktion von APs die Proliferation von Glioblastomzellen erhöhen (Venkatesh et al., 2015). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Neuroligin 3 (NLGN3) als primärer parakriner Treiber für Wachstum hauptverantwortlich ist und BDNF die Proliferation zusätzlich beschleunigt, da in NLGN3-Knockout-Mäusen transplantierte Gliomzellen nicht wuchsen (Venkatesh et al., 2015; Venkatesh et al., 2017). In weiteren Versuchen wurde festgestellt, dass NLGN3 aktivitätsabhängig die Freisetzung von EGFR, FGF-Rezeptor und VEGF erhöhte (Quail and Joyce, 2017; van Schaijik et al., 2019; Venkatesh and Monje, 2017; Venkatesh et al., 2017; Wirsching and Weller, 2020). Daraufhin wurde erkannt, dass Gliomzellen und Neurone synaptisch in Kontakt stehen und ca. 10% der Gliomzellen, je nach Subpopulation NGS entwickelten und somit direkt per intrazellulärer Calciumwellen (ICWs) in Kontakt mit Neuronen stehen (Osswald et al., 2015; Osswald et al., 2016; Venkatesh et al., 2015; Venkatesh et al., 2019a). Diese Ströme wiederum verbreiteten sich über die Gap Junctions der Gliomzellen über TMs im Gliomnetzwerk und regulierten die AMPA- und NMDA-Rezeptor Expression (Hollmann et al., 1991; Sommer et al., 1991).

Als ein bekannter Einflussfaktor wäre an dieser Stelle die massive Ausschüttung von Glutamat als exzitatorischen Neurotransmitter zu erwähnen, dessen potenzieller Einfluss auf die von uns gemessenen Effekte im folgenden diskutiert wird (Buckingham et al., 2011; Corsi et al., 2019; de Groot and Sontheimer, 2011; Labrakakis et al., 1998b; LoTurco et al., 1995; Mattson, 2008; Venkataramani et al., 2019; Ye and Sontheimer, 1999; Zeng et al., 2019). Von besonderem Interesse in dieser Frage ist in den letzten Jahren vor allem die Tumormikroumgebung als entscheidende Instanz darüber, wie die in der Einleitung beschriebenen Effekte der Interkonnektivität

vermittelt werden könnten. Einige Erkenntnisse weisen darauf hin, dass sich eine Vielzahl an Veränderungen in interzellulären Kommunikationswegen der Tumorgenese abspielen (Buonfiglioli and Hambardzumyan, 2021; Hambardzumyan et al., 2016; Ma et al., 2021; Pinton et al., 2019; Wolf et al., 2017). Auch vom klinischen Blickwinkel her findet diese Hypothese Unterstützung. Zwischen Tumor und intaktem Hirngewebe bildet sich eine Übergangszone, die von beiden Seiten beeinflusst wird (Hambardzumyan et al., 2016; Louis et al., 2016; Ma et al., 2021). Diese peritumorale Übergangszone wird MRT-morphologisch auch als Zone 2 des Drei-Zonen-Modell postuliert (Eyupoglu et al., 2005). Zone 1 stellt darin das stoffwechselaktive, Kontrastmittel aufnehmende Tumorgewebe dar, Zone 2 die peritumorale Übergangszone, die sich ödematös mit lokaler Entzündungsreaktion präsentiert und Zone 3 entspricht dem Gewebe, das makroskopisch nicht von nicht-neoplastischem Gewebe zu unterscheiden ist, jedoch von TMs durchzogen wird. In Zone 2 kann des Weiteren eine erhöhte Dichte von aktivierter Mikroglia und Endothelzellen identifiziert werden, was sowohl für eine erhöhte Vaskularisierung, als auch für eine immunologische Auseinandersetzung mit dem Tumor spricht (Baghban et al., 2020;



Hanahan and Coussens, 2012).

Abb. 28: Auswirkungen von abweichenden Glutamatspiegeln in der Mikroumgebung des Tumors

Das vom Gliom stammende Glutamat aktiviert AMPA-Rezeptoren auf Gliomzellen und fördert die Invasion und Proliferation. Glutamat führt außerdem zu neuronaler Übererregung, vermutlich per AMPA- und NMDA-Rezeptor Aktivierung auf peritumoralen Neuronen. Die

neuronalen Übererregung wiederum vermittelt dann die Freisetzung von präsynaptischen und pro-tumören Proteinen wie BDNF oder NLGN3, die Invasion und Synaptogenese und damit auch Malignität der Gliome fördern. Publiziert in *Radin et al.* in International Journal of Molecular Sciences. Es wurden keine Veränderungen vorgenommen und der Artikel ist lizenziert unter CC BY 4.0. Modifiziert nach Radin and Tsirka, 2020 in International Journal of Molecular Science.

4.2.2.2 Die Rolle der Mikroglia in der Tumormediation

Die komplexe und bis dato größtenteils unverstandene Funktionsweise der Mikroglia ist zwar nicht Schwerpunkt dieser Arbeit, darf aber hinsichtlich der Entstehung und Progression von primären Hirntumoren nicht unerwähnt bleiben. Um die potenziellen Prinzipien der Interaktion zwischen Tumornetzwerk und neuronalem Gewebe und damit auch den Grund der AIS-Verlängerung unter Tumorbedingungen besser verstehen zu können, wird die Rolle der Mikroglia hier kurz diskutiert.

Diese Zellgruppe scheint eine elementare Rolle in der Interaktion zwischen Tumorzellen und anderen Bestandteilen des ZNS einzunehmen (Hambardzumyan et al., 2016; Hoelzinger et al., 2007). So unterstützen sie u.a. die Synapsenbildung, die zur beschriebenen Übererregbarkeit im Patienten und damit zur Entwicklung verschiedenster Komorbiditäten führen kann (Radin and Tsirka, 2020). Auch die Frage, durch welche Mechanismen die erhöhte Sekretion von proangiogenetischen Faktoren wie bspw. VEGF und PDGF vermittelt wird, wäre von besonderem Interesse (Hanahan and Coussens, 2012; Monje et al., 2020). Denn Tumorgenese und der große Umsatz von Neurotransmittern und Stoffwechselsubstraten erfordert eine gute Mikrozirkulation, sodass sich auch in diesem Bereich Interaktionen zwischen Tumor und Nervensystem potenziell therapeutisch verhindern ließen.

Die Mehrzahl der zuvor genannten nicht-neoplastischen Zellen innerhalb der Gliome stellen neben der Mikroglia die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) entweder aus der Peripherie oder der hirneigene Mikroglia dar (Chadwick et al., 2015; Yang and Bennett, 2021). Mit einem gesteigerten Anteil in Abhängigkeit der Hirnregion zwischen 35-50% aller Zellen in Gliomen im Vergleich zu 10-15% Makrophagen in gesunden Gehirnen wird deren Bedeutung unterstützt (Simmons et al., 2011). Insbesondere die Abhängigkeit des Zellanteils zur Malignität und das umgekehrte Verhältnis zwischen Rezidivfreiheit und Anteil der Makrophagen im Tumor unterstreichen deren Einfluss weiterhin, zumal die Tumorproliferation experimentell unter Mikroglia-depletion verringert war (Bettinger et al., 2002; Dagainakatte et al., 2008; Komohara et al., 2008). TAMs werden in die Tumorumgebung rekrutiert, haben dort verschiedene

Immunfunktionen und unterstützen die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die insgesamt die Tumorprogression und v.a. die Tumormigration über verschiedenste Wege fördern (Hambardzumyan et al., 2016; Hoelzinger et al., 2007)(s. Einleitung 1.1.3). Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass in OTC, aus denen mit Hilfe des Toxins Clodronat die Mikroglia entfernt wurde, das Tumorwachstum deutlich verlangsamt ablief (Markovic et al., 2005).

Einen relevanter Hinweis für den tatsächlichen Einfluss dieser Zelltypen auf den Erregungszustand liefern die Erkenntnisse über den Zusammenhang von Mikroglia und zwischen Übererregbarkeit in Form von Epilepsie. So bestehen Hinweise, dass Mikroglia in Abhängigkeit des Inputs Synapsenbildung fördert oder hemmen kann (Radin and Tsirka, 2020).

Trotz aller Unklarheiten im Detail liefern viele gewonnene Daten wertvolle Hinweise auf eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur. Somit würden sich hieraus für die Zukunft interessante Forschungsansätze ergeben. In OTC mit verlängerten AIS unter Tumorwachstum könnte gemessen werden, ob sich Microglia und TAMs im Vergleich zu nicht-neoplastischem Gewebe qualitativ und quantitativ anders verhalten. An dieser Stelle lässt sich verknüpfen, dass diese beiden zuvor beschriebenen Zusammenhänge zwischen Tumorzellnetzwerk und aktivitätsabhängiger Mikroumgebung einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenität von primären Hirntumoren zu haben scheinen. Dabei sticht die dysregulierte Rolle der Mikroglia und TAMs, deren Aktivität wiederum von NLGN3 und damit neuronaler Aktivität abhängig ist und somit zu anhaltender NGS-Bildung in Gliomen führt, heraus (Radin and Tsirka, 2020; Venkataramani et al., 2019; Venkatesh et al., 2019a; Venkatesh et al., 2017). Bei diesem Thema gibt es neben den hier diskutierten Einflussfaktoren noch viele weitere potenzielle Ziel- und Regulationsmoleküle, die wiederum Teil eines variabel regulierten Systems sind und Aktivität und Homöostase im Netzwerk beeinflussen.

4.3 Auswirkung des Glioblastoms auf elektrophysiologische Eigenschaften

4.3.1 Erhöhte Epileptogenität als klinisches Korrelat der Übererregbarkeit

Krampfanfälle als klinisches Zeichen erhöhter Erregbarkeit neuronaler Netzwerke stellen eine charakteristische Komorbidität des Glioblastoms dar (Armstrong et al.,

2016; Buckingham et al., 2011). Dies erscheint nicht verwunderlich, da eine dysregulierte Gliafunktion im Sinne von chronisch aktivierten Astrozyten und Mikroglia die Epileptogenese maßgeblich fördert (Wetherington et al., 2008). Mehr als 30% der Gliompatienten erleiden während des Krankheitsverlaufs Krampfanfälle (Kerkhof and Vecht, 2013).

Darauf aufbauend erwarteten wir in unseren elektrophysiologischen Messungen Zustände erhöhter Erregbarkeit, die das elektrophysiologische Korrelat zu Krampfanfällen abbildet (s. Abschnitt 1.1.3). Es zeigte sich jedoch ein etwas paradoxes Bild (s. Abschnitt 3.4). Wir konnten kein konsistentes Bild von intrazellulären Erregungszuständen ableiten, sondern bemerkten eine heterogene Verteilung der elektrophysiologischen Parameter (Abb. 25 + 26). Auch wenn beispielsweise in den Tumor-OTC eine niedrigere (auch wenn nicht signifikant) Stromschwelle gemessen wurde, zeigten sich im Großen und Ganzen keine eindeutigen Effekte. Im folgenden Abschnitt soll deshalb diskutiert werden, weshalb sich dieses paradoxe Bild zeigen könnte und von welcher Vielzahl von Einflüssen elektrophysiologische Eigenschaften einzelner Zellen innerhalb eines funktionellen Netzwerks abhängen.

Neben der massiven Sekretion von Glutamat weisen neueste Erkenntnisse darauf hin, dass Neurone direkte Synapsen (NGS) mit Gliomzellen ausbilden und so deren Proliferation und Ausbreitung mittels glutamaterger Wirkung fördern (s. Abschnitt 1.1.3). Die abnorme Glutamatfreisetzung wird wohl in erster Instanz durch den xCT-Glutamat/Cystein-Antiporter vermittelt, der wiederum zu großen Anteilen von EGFR, einem der pro-onkogenen Wachstumsfaktoren abhängt (Buckingham et al., 2011; Savaskan et al., 2011, 2023; Ye and Sontheimer, 1999). In ausführlichen Studien wurden in den letzten Jahren die biophysikalischen Eigenschaften der pro-onkogenen Interaktionen zwischen Gliomen und peritumoralem Netzwerk studiert (Johung and Monje, 2017; Jung et al., 2020; Venkataramani et al., 2022; Venkatesh et al., 2015; Venkatesh et al., 2019a). Das erweiterte Verständnis über Wechselwirkungen wie z.B. die Aktivierung von Glutamatrezeptoren vom AMPA- und NMDA-Typ auf Gliomzellen war u.a. Grundlage für die elektrophysiologischen Fragestellungen dieser Arbeit. Der über diesen *de novo* Input erzeugte Kalziumstrom (s. Abschnitt 1.1.3.) breitet sich im Gliomnetzwerk über die TMs aus und führt so vermutlich zur kalziumabhängigen Zunahme der Invasivität und Progression (Osswald et al., 2015; Osswald et al., 2016; Venkatesh et al., 2019a).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass die Aktivierung der AMPA- und NMDA-Rezeptoren auf Neuronen exzitoxisch wirkt, wohingegen sie auf der Membran von Gliomzellen die Proliferation und Invasion unterstützen (van Vuurden et al., 2009). Die Literatur deutet darauf hin, dass Gliomzellen diese Rezeptoren einerseits herunterregulieren um die Vitalität in glutamatreichem Gewebe zu garantieren, andererseits im Bereich der Zonen 2 und 3 eine hohe Expression aufweisen (Cancer Genome Atlas Research, 2008; Cancer Genome Atlas Research et al., 2015; van Vuurden et al., 2009). Diese dynamische Regulation der Rezeptorexpression könnte somit einen entscheidenden Hinweis darauf liefern, weshalb diese ubiquitären Rezeptortypen einerseits per Exzitoxizität zu erhöhter Epileptogenität führen und andererseits ein Malignitätsfaktor der Gliome sein könnten. Während unserer Einzelzell-Ableitungen war nicht feststellbar welche Rolle, diese einzelne Zelle innerhalb der Regulationsmechanismen innerhalb des Netzwerks spielt. Auch deshalb ist eine Interpretation der heterogenen Messungen äußerst schwierig. Parallel zu den Hinweisen auf aberrante glutamaterge Signalübertragungen hinsichtlich erhöhter Epileptogenität im peritumoralen Netzwerk, wurde die Aufmerksamkeit ebenso auf die dysregulierte GABAerge Signalübertragung gerichtet. Die Literatur berichtet darüber, dass in peritumoralen Neuronen veränderte Expressionsmuster von Na-K-Cl-1 (NKCC1) und Cl-K-Symporter 5 (KCC2) auffielen, die spezifisch für Neurone sind und konsekutiv eine veränderte intrazelluläre Chloridkonzentration messbar war, sodass ein direkter Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit gezeigt werden konnte (Campbell et al., 2012; Conti et al., 2011). In Summe ergibt die GABA-Signalübertragung ein paradox Bild. Einerseits scheint die Proliferation und Invasion des Glioblastoms GABAerg unterdrückt zu werden, andererseits werden peritumorale Neurone funktionell erregt. Dadurch wiederum wird die Entstehung von epileptischen Anfällen als Folge erhöhte Netzwerkaktivität gefördert und somit ein tumoröser Wachstumsreiz gesetzt (Radin and Tsirka, 2020). Mechanistisch scheint dies möglich zu sein, indem die GABA-Aktivierung per Chlorid-Efflux depolarisierend wirkt (Pallud et al., 2014). Die GABA-Applikation nach einer Glutamat-Exposition depolarisiert Neurone und NMDA wirkt antagonistisch, sodass die funktionelle GABAerge Erregung gehemmt wird (Lee et al., 2011). Damit besteht das Paradoxon darin, dass GABA genauso wie NMDA in Abhängigkeit der individuellen Konstellation der GABA-Rezeptorexpression und des Konzentrationsverhältnisses sowohl hemmend, als auch erregend wirken kann. Unter

hohen Glutamatkonzentrationen in der peritumoralen Umgebung können dadurch die KCC2-Spiegel so herabgesenkt werden, dass GABA von einem hemmenden zum funktionell erregenden Neurotransmitter wird (Lee et al., 2011; Radin and Tsirka, 2020). Bis dato gibt es relativ wenige Studien, welche die Folgen GABAerger Wirkmechanismen im peritumoralen Netzwerk sowohl auf das Gliom-, als auch das neuronale Netzwerk erklären. Es scheint aber so zu sein, dass GABA hauptsächlich auf GSC ähnlichen Gliazellen wirkt und der Einfluss von Glutamat auf differenziertere Tumorzellen überwiegt (Radin and Tsirka, 2020; Venkataramani et al., 2019; Venkatesh and Monje, 2017). Die Einflüsse auf die GABAergen Synapsen werden darüber hinaus noch interessanter, da sie als axo-axonische Modulationen auch direkt am AIS Einfluss auf die Erregbarkeit des Netzwerks nehmen können (Wefelmeyer et al., 2015; Wefelmeyer et al., 2016). Auch wenn bis dato die Beweise für einen Zusammenhang zwischen epileptischen Phänotypen und einer AIS-Dysfunktion noch weitgehend indirekt sind, wäre es lohnenswert den Zusammenhang zwischen AIS-Funktion und Epileptogenese zu untersuchen (Harty et al., 2013). Insbesondere, da in unseren Versuchsreihen die eindrucklichen morphologischen Ergebnisse nicht elektrophysiologisch bestätigt werden konnten.

4.3.2 Die Rolle von Cx43 als Mediator modulierter Netzwerkaktivität

In unserem Versuch wurden Cx43-Cluster quantitativ gemessen. Dementsprechend ging es um die Frage der Über- oder Unterregulation von Cx43-Clustern im Vergleich zwischen Tumor-OTC und Kontroll-OTC. Wie in 4.2.2 ausführlich diskutiert, scheint eine große Abhängigkeit der Gliomzellen zur Mikroumgebung des ZNS zu bestehen. Dabei ist bisher allerdings noch nicht klar, welche Rolle Connexine bei der Interaktion zwischen Gliazellen und Neuronen spielen. Wie nachfolgend erklärt wird, ist die Bedeutung der Connexine bei der Differenzierung und Entwicklung der Tumore mittlerweile viel deutlicher.

Zahlreiche Studien liefern, wie im Abschnitt 1.1.3.3 beschrieben, deutliche Hinweise darauf, dass NGS, TMs und damit auch die interzelluläre Verbindung mittels Gap Junctions wesentliche Einflussfaktoren der Proliferation und Invasion von Gliomen darstellen (Osswald et al., 2015; Venkatesh et al., 2019a). Dabei wird der Cx43-Regulation eine entscheidende Rolle auf die Chemotherapieresistenz mit Temozolomid und die damit verbundene Modulation von Bcl-2 und Bax2 in der mitochondrialen Apoptoseregulation zugesprochen (Cottin et al., 2011; Gielen et al.,

2013). Des Weiteren wird darüber diskutiert, ob Gliomzellen per Cx43 Gap Junctions miRNA an Astrozyten weitergeben können und dadurch die Invasivität von Gliomen erhöhen könnten (Guan et al., 2018). Über Cx43 erfolgt außerdem der Austausch von Stoffwechselmetaboliten zwischen Astrozyten und Gliomzellen, sodass der Tumorstoffwechsel aufrechterhalten werden kann (Crivii et al., 2022). Scheinbar korreliert die Expression von Cx43 umgekehrt mit dem Tumorgrad, sodass davon ausgegangen wird, dass bei Glioblastomen die geringste Expression herrscht (Soroceanu et al., 2001). Mechanistisch erklärbarer wird dies mit der dafür erhöhten EGFR Sekretion und der damit einhergehenden Phosphorylierung der Cx43 Gap Junctions (Lund-Johansen et al., 1990). Es ergab sich eine Hochregulation von Cx43 in Glioblastomen (Gielen et al., 2013), was sich mit anderen Beobachtungen aus humanen Proben deckt (Cottin et al., 2011). Andere Autoren zeigten wiederum, dass in hochmalignen Gliomen eine Herabregulation der Cx43-vermittelten Zellkontakte zu beobachten war (Naus et al., 2016; Sin et al., 2012). Konsens ist aktuell die Hypothese, dass eine Überexpression von Cx43 die Invasion und Progression von Glioblastomen fördert und bei endgradig, ausdifferenzierten Glioblastomen die Expressionsrate sinkt (Aasen et al., 2017; Naus et al., 2016; Sin et al., 2012). Dies erhärtet den Verdacht, dass Cx43 vor allem für die maligne Transformation der Astrozyten verantwortlich ist und somit per Modulation der Mikroumgebung die Tumorprogression unterstützt (Aasen et al., 2017; Gielen et al., 2013; Naus et al., 2016; Sin et al., 2012). Dennoch sind TMs über zahlreiche Cx43 elektrisch miteinander verbunden, sodass davon ausgegangen wird, dass ICWs von Tumorzelle zur Tumorzelle weitergeleitet werden können (Osswald et al., 2015; Radin and Tsirka, 2020; Venkatesh et al., 2019a).

In diesem Zusammenhang führten wir, wie in Abschnitt 3.3.4 dargestellt wurde, eine Cx43-Dichtemessung am AIS durch. Wir konnten dabei einen Rückgang der Cx43-Colokalisationen am AIS im Zeitverlauf bei länger werdenden AIS verglichen zur Kontrolle feststellen (Abb. 23 + 24). Somit scheinen AIS-Länge und Anzahl der Cx43-Kolokalisationen in unserem Versuch umgekehrt miteinander zusammenzuhängen, auch wenn statistisch kein linearer Zusammenhang festgestellt werden konnte (s. Abschnitt 3.3.4).

Ob diese Interaktion mit ggf. elektrischer Ankopplung von Astrozyten direkt ans AIS eine elektrophysiologische Relevanz auf die Erregbarkeit dieses Neurons hat, könnte nur durch entsprechende Patch-Clamp Aufnahmen dieser Zellen beantwortet werden. Bemerkenswerterweise wurde in einem Review der Einfluss der Cx43-Expression auf

die Anfallsanfälligkeit bei Gliompatienten untersucht. Es zeigte sich, dass periläsional die Zunahme der Cx43-Expression auch mit einer Zunahme der Epileptogenität und damit der neuronalen Erregbarkeit einherging (Dong et al., 2017).

Vor diesem Hintergrund gewinnt die pharmakologische Cx43-Inhibition mit Substraten, die die Blut-Hirn-Schranke passieren können, eine immer größere Bedeutung in der Gliomtherapie. Bisher konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass dadurch die Sensibilität für einen TMZ-vermittelten Zelltod erhöht wird (Potthoff et al., 2019; Weil et al., 2017). Außerdem könnte diese Art von Therapie vor allem für niedriggradige Gliome zur Progressionsinhibition von großer Bedeutung sein. Um diesen Ansatz weiter zu validieren, braucht es allerdings noch weitere Forschungsanstrengungen, vor allem da bisher zu diesem Ansatz noch keine klinischen Studien vorliegen.

4.4 FAZIT

Die Erforschung vom Zusammenhang zwischen neuronaler Erregbarkeit und der Tumorprogression stehen sicher erst an ihrem Beginn, vor allem auf Ebene einzelner Neurone und deren Parameter.

In der Summe dieser Beobachtungen über die durchaus komplexen Regulationsweisen von Tumor- und Nervenzellnetzwerk könnten bereits elementare Hinweis liegen, wieso in unseren Versuchen die Effekte auf elektrophysiologischer Ebene nicht messbar waren. In Anbetracht dessen erscheint logisch, dass nicht im gesamten Netzwerk (selbst innerhalb eines sehr dicht konnektierten Netzwerks wie dem Hippocampus) alle Zellen den gleichen Einflüssen und Regulationsmechanismen unterliegen. Außerdem kennen wir in OTC noch kein Korrelat zur Einteilung in verschiedenen aktive Zonen während der Gliominvasion und konnten daher nicht beurteilen in welcher Regulationsphase sich das interkonnektierende Netzwerk befindet. Diese hochdynamischen Prozesse zwischen Aktivitätssteigerung mittels ICWs einerseits und Exzitoxizität des neuronalen Netzwerks andererseits macht die Ableitung allgemeiner Prinzipien sehr komplex. Elektrophysiologisch sind die deutlichen morphologischen Veränderungen der Plastizität nicht valide messbar und nachvollziehbar gewesen. Die Daten der morphologischen Messungen profitieren von einer sehr viel umfangreicheren Stichprobe, wohingegen die deutlich aufwändigeren Patch-Clamp-Messungen nur gezielte Stichproben von kleinem Umfang waren. Mehrere Erklärungsansätze resultieren daraus. Der aktivitätsmodulierende Einfluss

des Tumornetzwerks betrifft nur Neurone, die unmittelbarer, vielleicht sogar in funktioneller, direkter Verbindung mit den TMs stehen oder wir konnten schlichtweg durch mangelnde Stichprobengröße die Effekte statistisch nicht darstellen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Gliome sind die häufigsten primären Hirntumoren. Darüber hinaus zählt das Glioblastom als Astrozytom WHO Grad IV zu den Hauptursachen hirntumorbedingter Todesfälle in allen Altersgruppen. Die Mehrheit der Patienten stirbt innerhalb von 15-18 Monaten nach der Diagnose, wobei weniger als 5 % länger als fünf Jahre leben. Das Glioblastom ist eine Erkrankung des gesamten Gehirns, meist ohne Metastasierung, aber mit einer variablen fokalen Proliferationszunahme, die eine Tumormasse erzeugt, die häufig symptomatisch wird, sodass erst hierdurch eine Diagnosestellung erfolgt. Zusätzlich bildet es einen weitgehend unsichtbaren, diffus infiltrierenden Teil, der aus einem funktionellen Netzwerk von Glioblastom- und anderen Zellen der peritumoralen Mikroumgebung besteht. Tumorzellen sind dabei durch lange interkonnektierende Tumormicrotubes (Tumor-Nanoröhrchen, TM) verbunden. In der Interaktion zwischen Tumorzellen und der Mikroumgebung wird die bedeutendste Ursache der ausgeprägten Chemo- und Strahlentherapieresistenz gesehen.

Mittlerweile ist bekannt, dass die Entwicklung der primären Hirntumore maßgeblich von der aktivitätsgesteuerten Sekretion von Neurotransmittern und Neurotrophen als Differenzierungsregulatoren der gesamten zellulären Mikroumgebung abhängt. Neben bereits einigen bekannten aktivitätsregulierenden Molekülen wie BDNF, EGFR und NLGN3 setzte sich außerdem bereits die Erkenntnis durch, dass die Übererregbarkeit neuronaler Schaltkreise, unter anderem durch erhöhte Glutamat-Ausschüttung und Expression von NMDA- und AMPA-Rezeptoren, ein weiterer elementarer Progressions- und damit Malignitätsfaktor der Glioblastome darstellt. Insbesondere der Nachweis von direkten neuroglialen Synapsen (neuron-glia Synapse, NGS), dem Vorkommen von Connexin 43 (Cx43) und die dadurch einhergehende direkte elektrische Verbindung mittels intrazellulärer Kalziumwellen (ICW) zwischen Neuronen und Glioblastomzellen, führte zu der Hypothese, dass die elektrische Aktivität von Neuronen ein direktes Wachstumssignal des Tumors darstellt.

Neurone werden morphologisch in eine somatodendritische Domäne, die eingehende Informationen empfängt und integriert sowie in eine axonale Domäne, die entscheidend für die Initiierung der Aktionspotenziale (APs) ist und damit eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Erregbarkeit einnimmt, eingeteilt. Mittlerweile ist bekannt, dass das Axoninitialsegment (AIS) und seine morphologischen Parameter

sowohl unter physiologischen, als auch pathologischen Bedingungen ein entscheidender Regulator neuronaler Erregbarkeit darstellt. Aus dieser Struktur-Funktionsbeziehung ergibt sich die Hypothese, dass die Länge des AIS ein Indikator für den individuellen Erregungszustand sowie die Erregbarkeit einzelner Neurone darstellt: Auf gesteigerte Netzwerkaktivität reagieren Neurone mit einer AIS Verkürzung, was wiederum zu einer Reduktion zellulärer Erregbarkeit führt. Umgekehrt werden im aktivitätsdeprivierten Netzwerk die AIS der betroffenen Neurone länger und die Zellen damit erregbarer. Dies könnte direkten Einfluss auf die Tumorprogression und -Invasivität haben.

Aufgrund der Beobachtung, dass in humanen Glioblastom-OP-Resektaten keine replizierbaren und kontrollierten Bedingungen vorherrschen, wurde die Methode der organotypischen Kulturen (OTC) etabliert. Damit sollte der Frage auf den Grund gegangen werden, inwiefern Tumorwachstum Einfluss auf die neuronale Aktivität hat. Bei OTC handelt es sich um Schnittkulturen von Maushirnen, bei denen die organotypische Zytoarchitektur und Gewebsintegrität über mehrere Wochen erhalten bleibt. Dadurch stellen sie ein gut replizierbares, tierschonendes und vor allem modulierbares Modell zur Untersuchung vieler Fragestellungen am Gehirn dar. Die Herausforderungen bei der Etablierung dieses Modells waren die Vitalität und Integrität des Gewebes und Tumorerkrankung bei erhaltener 3D Zytoarchitektur sicherzustellen und diese Strukturen zuverlässig elektrophysiologisch untersuchen und immunzytochemisch anfärben zu können.

Mit Hilfe einer Kombination aus Immunfluoreszenzfärbungen, konfokaler Mikroskopie, 3D-Rekonstruktion und elektrophysiologischen Ganzzell-Ableitungen wurde ein breites Spektrum anatomischer und funktioneller Parameter abgebildet, die die Effekte von Interkonnektivität beleuchten sollten. Nach Etablierung der OTC gelang es, replizierbare Gliomzell-Nester auf vitalem Hippocampusgewebe zu kultivieren und so gesunde Hirnkulturen mit tumorbehafteten Kulturen zu vergleichen. Hierzu wurden sowohl morphologische Kriterien am AIS und funktionelle Kriterien per elektrophysiologischer Ableitungen verglichen. In mehreren Versuchen wurden die AIS-Längen innerhalb der CA-Region des Hippocampus analysiert. Im ersten Schritt wurde die grundsätzliche Entwicklung der AIS-Länge im Hippocampus untersucht, bevor dann in Kontrollen und Tumor-OTC eine umfangreiche morphometrische Analyse angeschlossen wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass Schnitte der Tumor-

OTC deutlich längere AIS besitzen. Um verschiedene verzerrende Faktoren auszuschließen, untersuchten wir AIS sowohl zu unterschiedlichen Zeitpunkten *in vitro* (DIV), als auch unterschiedlicher Präparationsalter der Mäuse.

Mehrere Mechanismen könnten zur Verlängerung der AIS beitragen. Veränderung der synaptischen Übertragung und der Ionenkanalexpression verschiedenster Neurotransmitter und Ionen könnten bei übererregbarer Mikroumgebung zur erhöhten Erregbarkeit einzelner Neurone führen. Denn es gilt als gesichert, dass eine gesteigerte neuronale Erregung das Tumorwachstum fördert und die Mechanismen der parakrinen und autokrinen Sekretion verschiedenster Neurometabolite die Erregbarkeit der Mikroumgebung erhöhen. Es gibt eine Vielzahl möglicher Mechanismen, nicht zuletzt GABAerg und glutamaterg vermittelt, die den Effekt einer erhöhten Erregbarkeit trotz übererregter Mikroumgebung erklärbar machen.

Wir konnten, vermutlich methodisch bedingt, keine veränderten Feuereigenschaften aus den elektrophysiologischen Messungen mit den Ergebnissen der morphologischen Messungen korrelieren. Aufgrund der kleineren Probengröße gehen wir davon aus, dass die elektrophysiologischen Ergebnisse nicht repräsentativ waren, sodass weitere Untersuchungen für eine Korrelation notwendig sind.

Es erscheint ebenso möglich, dass die Effekte einer invasions- und progressionsfördernden Neurotransmitter- und Neurotrophinsekretion sich weniger auf einzelne Zellen, als auf die ganze Mikroumgebung beziehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem nachgewiesen werden, dass auch in OTC direkte Zellkontakte zwischen Tumor- und Nervenzellen mittels Cx43, u.a. auch am AIS auftreten und die Anzahl der Kollokalisierungen umgekehrt proportional mit der AIS-Länge korreliert. Diese direkten elektrischen Kontaktstellen könnten Veränderungen der Langlebigkeit per direktem Molekül- und Ladungsaustausch erklären.

Die vorliegende Arbeit liefert somit einen deutlichen Hinweis darauf, dass Tumorwachstum im Gehirn einen erheblichen Einfluss auf die AIS-Länge individueller Neurone sowie das Expressionsprofil von Cx43 nimmt und damit indirekt neuronale Erregungsmuster beeinflussen kann. Die hier gewonnenen Daten liefern einen weiteren wichtigen Hinweis darauf, dass Veränderungen neuronaler Aktivitätsmuster einen Einfluss auf die Progression, Invasion und damit die Malignität von Glioblastomen nehmen können und diese Veränderungen nicht nur von Neuron-Glia-Synapsen (NGS) ausgehen müssen. Glioblastomen scheint es zu gelingen, ihre Mikroumgebung

über mehrere Zelltypen hinweg der eigenen Progression dienlich zu modulieren, sodass in diesen Modulationsmechanismen auf mehreren Ebenen pharmakologische Interventionsmöglichkeiten bestehen könnten. In Bezug auf viele dieser Mechanismen sind klinische Studien bereits in Entwicklung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aasen, T., Mesnil, M., Naus, C.C., Lampe, P.D. und Laird, D.W. (2017). Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. *Nat Rev Cancer* 17, 74. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.142>
- Akin, E.J., Sole, L., Dib-Hajj, S.D., Waxman, S.G. und Tamkun, M.M. (2015). Preferential targeting of Nav1.6 voltage-gated Na⁺ Channels to the axon initial segment during development. *PLoS One* 10, e0124397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124397>
- Alfonso, J., Le Magueresse, C., Zuccotti, A., Khodosevich, K. und Monyer, H. (2012). Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell Stem Cell* 10, 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.11.011>
- Alfonso, J.C.L., Talkenberger, K., Seifert, M., Klink, B., Hawkins-Daarud, A., Swanson, K.R., Hatzikirou, H. und Deutsch, A. (2017). The biology and mathematical modelling of glioma invasion: a review. *J R Soc Interface* 14. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0490>
- Alifieris, C. und Trafalis, D.T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther* 152, 63-82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.005>
- Alvarez-Buylla, A., Kohwi, M., Nguyen, T.M. und Merkle, F.T. (2008). The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 357-365. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.019>
- Amaral, D.G., Scharfman, H.E. und Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163, 3-22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Amaral, D.G. und Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
- Armstrong, T.S., Grant, R., Gilbert, M.R., Lee, J.W. und Norden, A.D. (2016). Epilepsy in glioma patients: mechanisms, management, and impact of anticonvulsant therapy. *Neuro Oncol* 18, 779-789. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov269>
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. und Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8, 963-970. <https://doi.org/10.1038/nm747>
- Baalman, K.L., Cotton, R.J., Rasband, S.N. und Rasband, M.N. (2013). Blast wave exposure impairs memory and decreases axon initial segment length. *J Neurotrauma* 30, 741-751. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2478>
- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T. und Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal* 18, 59. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0530-4>
- Bahner, F., Weiss, E.K., Birke, G., Maier, N., Schmitz, D., Rudolph, U., Frotscher, M., Traub, R.D., Both, M. und Draguhn, A. (2011). Cellular correlate of assembly formation in oscillating hippocampal networks in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E607-616. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103546108>
- Bahr, B.A. (1995). Long-term hippocampal slices: a model system for investigating synaptic mechanisms and pathologic processes. *J Neurosci Res* 42, 294-305. <https://doi.org/10.1002/jnr.490420303>
- Bahr, B.A., Kessler, M., Rivera, S., Vanderklish, P.W., Hall, R.A., Mutneja, M.S., Gall, C. und Hoffman, K.B. (1995). Stable maintenance of glutamate receptors and other synaptic components in long-term hippocampal slices. *Hippocampus* 5, 425-439. <https://doi.org/10.1002/hipo.450050505>

- Bai, Y., Liao, H., Liu, T., Zeng, X., Xiao, F., Luo, L., Guo, H. und Guo, L. (2013). MiR-296-3p regulates cell growth and multi-drug resistance of human glioblastoma by targeting ether-a-go-go (EAG1). *Eur J Cancer* 49, 710-724. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.08.020>
- Barchana, M., Margalot, M. und Liphshitz, I. (2012). Changes in brain glioma incidence and laterality correlates with use of mobile phones--a nationwide population based study in Israel. *Asian Pac J Cancer Prev* 13, 5857-5863. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.11.5857>
- Bender, K.J. und Trussell, L.O. (2012). The physiology of the axon initial segment. *Annu Rev Neurosci* 35, 249-265. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150339>
- Bennett, V. und Chen, L. (2001). Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol* 13, 61-67. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00175-7](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00175-7)
- Berger, T. und Frotscher, M. (1994). Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: an immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. *J Neurocytol* 23, 61-74. <https://doi.org/10.1007/BF01189817>
- Berghs, S., Aggujaro, D., Dirkx, R., Jr., Maksimova, E., Stabach, P., Hermel, J.M., Zhang, J.P., Philbrick, W., Slepnev, V., Ort, T., *et al.* (2000). betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* 151, 985-1002. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.5.985>
- Bettinger, I., Thanos, S. und Paulus, W. (2002). Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathol* 103, 351-355. <https://doi.org/10.1007/s00401-001-0472-x>
- Bi, C., Wu, J., Jiang, T., Liu, Q., Cai, W., Yu, P., Cai, T., Zhao, M., Jiang, Y.H. und Sun, Z.S. (2012). Mutations of ANK3 identified by exome sequencing are associated with autism susceptibility. *Hum Mutat* 33, 1635-1638. <https://doi.org/10.1002/humu.22174>
- Bliss, T.V. und Gardner-Medwin, A.R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 357-374. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010274>
- Bliss, T.V. und Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Bonde, C., Sarup, A., Schousboe, A., Gegelashvili, G., Zimmer, J. und Noraberg, J. (2003). Neurotoxic and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzoyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem Int* 43, 371-380. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(03\)00024-x](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(03)00024-x)
- Bondy, M.L., Scheurer, M.E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J.S., Davis, F.G., Il'yasova, D., Kruchko, C., McCarthy, B.J., Rajaraman, P., Schwartzbaum, J.A., *et al.* (2008). Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 113, 1953-1968. <https://doi.org/10.1002/cncr.23741>
- Booker, S.A. und Vida, I. (2018). Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. *Cell Tissue Res* 373, 619-641. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2882-2>
- Brazel, C.Y., Nunez, J.L., Yang, Z. und Levison, S.W. (2005). Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience* 131, 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.10.038>
- Buckingham, S.C., Campbell, S.L., Haas, B.R., Montana, V., Robel, S., Ogunrinu, T. und Sontheimer, H. (2011). Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. *Nat Med* 17, 1269-1274. <https://doi.org/10.1038/nm.2453>
- Buffington, S.A. und Rasband, M.N. (2011). The axon initial segment in nervous system disease and injury. *Eur J Neurosci* 34, 1609-1619. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07875.x>

- Buonfiglioli, A. und Hambardzumyan, D. (2021). Macrophages and microglia: the cerberus of glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun* 9, 54. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01156-z>
- Cameron, H.A., Hazel, T.G. und McKay, R.D. (1998). Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol* 36, 287-306.
- Campbell, S.L., Buckingham, S.C. und Sontheimer, H. (2012). Human glioma cells induce hyperexcitability in cortical networks. *Epilepsia* 53, 1360-1370. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03557.x>
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>
- Cancer Genome Atlas Research, N., Brat, D.J., Verhaak, R.G., Aldape, K.D., Yung, W.K., Salama, S.R., Cooper, L.A., Rheinbay, E., Miller, C.R., Vitucci, M., *et al.* (2015). Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 372, 2481-2498. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402121>
- Cazares-Ordóñez, V. und Pardo, L.A. (2017). Kv10.1 potassium channel: from the brain to the tumors. *Biochem Cell Biol* 95, 531-536. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0062>
- Chadwick, E.J., Yang, D.P., Filbin, M.G., Mazzola, E., Sun, Y., Behar, O., Pazyra-Murphy, M.F., Goumnerova, L., Ligon, K.L., Stiles, C.D., *et al.* (2015). A Brain Tumor/Organotypic Slice Co-culture System for Studying Tumor Microenvironment and Targeted Drug Therapies. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e53304. <https://doi.org/10.3791/53304>
- Cheng, B. und Mattson, M.P. (1994). NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res* 640, 56-67. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91857-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91857-0)
- Child, N.D. und Benarroch, E.E. (2014). Differential distribution of voltage-gated ion channels in cortical neurons: implications for epilepsy. *Neurology* 82, 989-999. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000228>
- Colbert, C.M. und Pan, E. (2002). Ion channel properties underlying axonal action potential initiation in pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 5, 533-538. <https://doi.org/10.1038/nn0602-857>
- Colman, H., Zhang, L., Sulman, E.P., McDonald, J.M., Shooshtari, N.L., Rivera, A., Popoff, S., Nutt, C.L., Louis, D.N., Cairncross, J.G., *et al.* (2010). A multigene predictor of outcome in glioblastoma. *Neuro Oncol* 12, 49-57. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop007>
- Conti, L., Palma, E., Roseti, C., Lauro, C., Cipriani, R., de Groot, M., Aronica, E. und Limatola, C. (2011). Anomalous levels of Cl⁻ transporters cause a decrease of GABAergic inhibition in human peritumoral epileptic cortex. *Epilepsia* 52, 1635-1644. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03111.x>
- Corcoran, A., De Ridder, L.I., Del Duca, D., Kalala, O.J., Lah, T., Pilkington, G.J. und Del Maestro, R.F. (2003). Evolution of the brain tumour spheroid model: transcending current model limitations. *Acta neurochirurgica* 145, 819-824. <https://doi.org/10.1007/s00701-003-0096-0>
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S. und Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247, 470-473. <https://doi.org/10.1126/science.1967852>
- Corsi, L., Mescola, A. und Alessandrini, A. (2019). Glutamate Receptors and Glioblastoma Multiforme: An Old "Route" for New Perspectives. *International journal of molecular sciences* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20071796>
- Cotrina, M.L., Lin, J.H. und Nedergaard, M. (2008). Adhesive properties of connexin hemichannels. *Glia* 56, 1791-1798. <https://doi.org/10.1002/glia.20728>

- Cottin, S., Gould, P.V., Cantin, L. und Caruso, M. (2011). Gap junctions in human glioblastomas: implications for suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther* 18, 674-681. <https://doi.org/10.1038/cgt.2011.38>
- Crivii, C.B., Bosca, A.B., Melincovici, C.S., Constantin, A.M., Marginean, M., Dronca, E., Sufletel, R., Gonciar, D., Bungardean, M. und Sovrea, A. (2022). Glioblastoma Microenvironment and Cellular Interactions. *Cancers (Basel)* 14. <https://doi.org/10.3390/cancers14041092>
- Crocetti, E., Trama, A., Stiller, C., Caldarella, A., Soffietti, R., Jaal, J., Weber, D.C., Ricardi, U., Slowinski, J., Brandes, A., *et al.* (2012). Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer* 48, 1532-1542. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.12.013>
- Cuddapah, V.A., Robel, S., Watkins, S. und Sontheimer, H. (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci* 15, 455-465. <https://doi.org/10.1038/nrn3765>
- D'Este, E., Kamin, D., Gottfert, F., El-Hady, A. und Hell, S.W. (2015). STED nanoscopy reveals the ubiquity of subcortical cytoskeleton periodicity in living neurons. *Cell Rep* 10, 1246-1251. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.007>
- Daginakatte, G.C., Gianino, S.M., Zhao, N.W., Parsadarian, A.S. und Gutmann, D.H. (2008). Increased c-Jun-NH2-kinase signaling in neurofibromatosis-1 heterozygous microglia drives microglia activation and promotes optic glioma proliferation. *Cancer Res* 68, 10358-10366. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2506>
- de Andrade, M., Barnholtz, J.S., Amos, C.I., Adatto, P., Spencer, C. und Bondy, M.L. (2001). Segregation analysis of cancer in families of glioma patients. *Genet Epidemiol* 20, 258-270. [https://doi.org/10.1002/1098-2272\(200102\)20:2<258::AID-GEPI8>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1098-2272(200102)20:2<258::AID-GEPI8>3.0.CO;2-N)
- de Groot, J. und Sontheimer, H. (2011). Glutamate and the biology of gliomas. *Glia* 59, 1181-1189. <https://doi.org/10.1002/glia.21113>
- De Paola, V., Arber, S. und Caroni, P. (2003). AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks. *Nat Neurosci* 6, 491-500. <https://doi.org/10.1038/nn1046>
- De Simoni, A., Griesinger, C.B. und Edwards, F.A. (2003). Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J Physiol* 550, 135-147. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.039099>
- Debanne, D., Gähwiler, B.H. und Thompson, S.M. (1996). Cooperative interactions in the induction of long-term potentiation and depression of synaptic excitation between hippocampal CA3-CA1 cell pairs in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11225-11230. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11225>
- Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T.D. und Malenka, R.C. (2004). Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42, 535-552. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00266-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00266-1)
- Del Turco, D. und Deller, T. (2007). Organotypic entorhino-hippocampal slice cultures--a tool to study the molecular and cellular regulation of axonal regeneration and collateral sprouting in vitro. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 399, 55-66. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-504-6_5
- Deltour, I., Auvinen, A., Feychting, M., Johansen, C., Klæboe, L., Sankila, R. und Schuz, J. (2012). Mobile phone use and incidence of glioma in the Nordic countries 1979-2008: consistency check. *Epidemiology* 23, 301-307. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182448295>
- Derouiche, A., Heimrich, B. und Frotscher, M. (1993). Loss of layer-specific astrocytic glutamine synthetase immunoreactivity in slice cultures of hippocampus. *Eur J Neurosci* 5, 122-127. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00477.x>
- Devoto, S.H. (1990). Neuronal growth cone migration. *Experientia* 46, 916-922. <https://doi.org/10.1007/BF01939384>

- Dong, H., Zhou, X.W., Wang, X., Yang, Y., Luo, J.W., Liu, Y.H. und Mao, Q. (2017). Complex role of connexin 43 in astrocytic tumors and possible promotion of glioma-associated epileptic discharge (Review). *Mol Med Rep* 16, 7890-7900. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7618>
- Dudok, B., Szoboszlay, M., Paul, A., Klein, P.M., Liao, Z., Hwaun, E., Szabo, G.G., Geiller, T., Vancura, B., Wang, B.S., et al. (2021). Recruitment and inhibitory action of hippocampal axo-axonic cells during behavior. *Neuron* 109, 3838-3850 e3838. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.09.033>
- Duflocq, A., Chareyre, F., Giovannini, M., Couraud, F. und Davenne, M. (2011). Characterization of the axon initial segment (AIS) of motor neurons and identification of a para-AIS and a juxtapara-AIS, organized by protein 4.1B. *BMC Biol* 9, 66. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-66>
- Dyhrfeld-Johnsen, J., Berdichevsky, Y., Swiercz, W., Sabolek, H. und Staley, K.J. (2010). Interictal spikes precede ictal discharges in an organotypic hippocampal slice culture model of epileptogenesis. *J Clin Neurophysiol* 27, 418-424. <https://doi.org/10.1097/WNP.0b013e3181fe0709>
- Eisemann, T., Costa, B., Strelau, J., Mittelbronn, M., Angel, P. und Peterziel, H. (2018). An advanced glioma cell invasion assay based on organotypic brain slice cultures. *BMC cancer* 18, 103. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4007-4>
- Engelhardt, M., Jamann, N. und Wefelmeyer, W. (2019). Small domain, large consequences: the axon initial segment as a key player in neuronal excitability. *Neuroforum* 25, 49-60. <https://doi.org/10.1515/nf-2018-0023>
- Engelhardt, M., Vorwald, S., Sobotzik, J.M., Bennett, V. und Schultz, C. (2013). Ankyrin-B structurally defines terminal microdomains of peripheral somatosensory axons. *Brain Struct Funct* 218, 1005-1016. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0443-0>
- Evans, M.D., Sammons, R.P., Lebron, S., Dumitrescu, A.S., Watkins, T.B., Uebele, V.N., Renger, J.J. und Grubb, M.S. (2013). Calcineurin signaling mediates activity-dependent relocation of the axon initial segment. *J Neurosci* 33, 6950-6963. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0277-13.2013>
- Eyupoglu, I.Y., Hahnen, E., Heckel, A., Siebzehnrubl, F.A., Buslei, R., Fahlbusch, R. und Blumcke, I. (2005). Malignant glioma-induced neuronal cell death in an organotypic glioma invasion model. Technical note. *J Neurosurg* 102, 738-744. <https://doi.org/10.3171/jns.2005.102.4.0738>
- Felipe, A., Bielanska, J., Comes, N., Vallejo, A., Roig, S., Ramon, Y.C.S., Condom, E., Hernandez-Losa, J. und Ferreres, J.C. (2012). Targeting the voltage-dependent K(+) channels Kv1.3 and Kv1.5 as tumor biomarkers for cancer detection and prevention. *Current medicinal chemistry* 19, 661-674. <https://doi.org/10.2174/092986712798992048>
- Furukawa, K., Smith-Swintosky, V.L. und Mattson, M.P. (1995). Evidence that actin depolymerization protects hippocampal neurons against excitotoxicity by stabilizing [Ca²⁺]_i. *Experimental neurology* 133, 153-163. <https://doi.org/10.1006/exnr.1995.1018>
- Gahwiler, B.H. (1984). Slice cultures of cerebellar, hippocampal and hypothalamic tissue. *Experientia* 40, 235-243. <https://doi.org/10.1007/BF01947561>
- Gahwiler, B.H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R.A. und Thompson, S.M. (1997). Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20, 471-477.
- Gahwiler, B.H., Thompson, S.M. und Muller, D. (2001). Preparation and maintenance of organotypic slice cultures of CNS tissue. *Curr Protoc Neurosci Chapter 6, Unit 6 11*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0611s09>
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F. und Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64, 7011-7021. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1364>

- Gallo, V., Zhou, J.M., McBain, C.J., Wright, P., Knutson, P.L. und Armstrong, R.C. (1996). Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block. *J Neurosci* 16, 2659-2670.
- Gerfin-Moser, A. und Monyer, H. (2002). In situ hybridization on organotypic slice cultures. *Int Rev Neurobiol* 47, 125-134. [https://doi.org/10.1016/s0074-7742\(02\)47058-4](https://doi.org/10.1016/s0074-7742(02)47058-4)
- Gibson, E.M., Purger, D., Mount, C.W., Goldstein, A.K., Lin, G.L., Wood, L.S., Inema, I., Miller, S.E., Bieri, G., Zuchero, J.B., *et al.* (2014). Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science* 344, 1252304. <https://doi.org/10.1126/science.1252304>
- Gielen, P.R., Aftab, Q., Ma, N., Chen, V.C., Hong, X., Lozinsky, S., Naus, C.C. und Sin, W.C. (2013). Connexin43 confers Temozolomide resistance in human glioma cells by modulating the mitochondrial apoptosis pathway. *Neuropharmacology* 75, 539-548. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.002>
- Gillespie, S. und Monje, M. (2018). An active role for neurons in glioma progression: making sense of Scherer's structures. *Neuro Oncol* 20, 1292-1299. <https://doi.org/10.1093/neuonc/ny083>
- Goethals, S. und Brette, R. (2020). Theoretical relation between axon initial segment geometry and excitability. *Elife* 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.53432>
- Goldberg, E.M., Clark, B.D., Zagha, E., Nahmani, M., Erisir, A. und Rudy, B. (2008). K⁺ channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *Neuron* 58, 387-400. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.003>
- Goodenberger, M.L. und Jenkins, R.B. (2012). Genetics of adult glioma. *Cancer Genet* 205, 613-621. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2012.10.009>
- Goodman, C.S. und Shatz, C.J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 *Suppl*, 77-98. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(05\)80030-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80030-3)
- Grabiec, U., Hohmann, T., Hammer, N. und Dehghani, F. (2017). Organotypic Hippocampal Slice Cultures As a Model to Study Neuroprotection and Invasiveness of Tumor Cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*. <https://doi.org/10.3791/55359>
- Gray, E.G. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 93, 420-433.
- Grubb, M.S. und Burrone, J. (2010). Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature* 465, 1070-1074. <https://doi.org/10.1038/nature09160>
- Guan, X., Hasan, M.N., Maniar, S., Jia, W. und Sun, D. (2018). Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme. *Mol Neurobiol* 55, 6927-6938. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0880-8>
- Gulledge, A.T. und Bravo, J.J. (2016). Neuron Morphology Influences Axon Initial Segment Plasticity. *eNeuro* 3. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0085-15.2016>
- Guo, Y., Su, Z.J., Chen, Y.K. und Chai, Z. (2017). Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 regulate axon initial segment location and affect neuronal excitability in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 142, 260-271. <https://doi.org/10.1111/jnc.14050>
- Guo, Z.H. und Mattson, M.P. (2000). Neurotrophic factors protect cortical synaptic terminals against amyloid and oxidative stress-induced impairment of glucose transport, glutamate transport and mitochondrial function. *Cereb Cortex* 10, 50-57. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.1.50>
- Gusel'nikova, V.V. und Korzhevskiy, D.E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* 7, 42-47.

- Gutzmann, A., Ergul, N., Grossmann, R., Schultz, C., Wahle, P. und Engelhardt, M. (2014). A period of structural plasticity at the axon initial segment in developing visual cortex. *Front Neuroanat* 8, 11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00011>
- Halliwell, J.V. und Adams, P.R. (1982). Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 250, 71-92. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90954-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90954-4)
- Hamada, M.S., Goethals, S., de Vries, S.I., Brette, R. und Kole, M.H. (2016). Covariation of axon initial segment location and dendritic tree normalizes the somatic action potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 14841-14846. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607548113>
- Hamada, M.S. und Kole, M.H. (2015). Myelin loss and axonal ion channel adaptations associated with gray matter neuronal hyperexcitability. *J Neurosci* 35, 7272-7286. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4747-14.2015>
- Hambardzumyan, D., Gutmann, D.H. und Kettenmann, H. (2016). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci* 19, 20-27. <https://doi.org/10.1038/nn.4185>
- Hanahan, D. und Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21, 309-322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- Harris, K.M. und Teyler, T.J. (1984). Developmental onset of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampus. *J Physiol* 346, 27-48. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015005>
- Harris, K.M. und Weinberg, R.J. (2012). Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005587>
- Harrison, P.J. (2016). Molecular neurobiological clues to the pathogenesis of bipolar disorder. *Curr Opin Neurobiol* 36, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.07.002>
- Harty, R.C., Kim, T.H., Thomas, E.A., Cardamone, L., Jones, N.C., Petrou, S. und Wimmer, V.C. (2013). Axon initial segment structural plasticity in animal models of genetic and acquired epilepsy. *Epilepsy Res* 105, 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2013.03.004>
- Hazell, A.S. (2007). Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int* 50, 941-953. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.04.026>
- Hedstrom, K.L., Ogawa, Y. und Rasband, M.N. (2008). AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol* 183, 635-640. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806112>
- Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., Hamou, M.F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., *et al.* (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997-1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Hess, K.R., Broglio, K.R. und Bondy, M.L. (2004). Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000. *Cancer* 101, 2293-2299. <https://doi.org/10.1002/cncr.20621>
- Hoelzinger, D.B., Demuth, T. und Berens, M.E. (2007). Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 99, 1583-1593. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm187>
- Hofflin, F., Jack, A., Riedel, C., Mack-Bucher, J., Roos, J., Corcelli, C., Schultz, C., Wahle, P. und Engelhardt, M. (2017). Heterogeneity of the Axon Initial Segment in Interneurons and Pyramidal Cells of Rodent Visual Cortex. *Front Cell Neurosci* 11, 332. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00332>
- Hollmann, M., Hartley, M. und Heinemann, S. (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252, 851-853. <https://doi.org/10.1126/science.1709304>

- Hong, X., Sin, W.C., Harris, A.L. und Naus, C.C. (2015). Gap junctions modulate glioma invasion by direct transfer of microRNA. *Oncotarget* 6, 15566-15577. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3904>
- Hu, W., Tian, C., Li, T., Yang, M., Hou, H. und Shu, Y. (2009). Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* 12, 996-1002. <https://doi.org/10.1038/nn.2359>
- Huang, C.Y. und Rasband, M.N. (2018). Axon initial segments: structure, function, and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1420, 46-61. <https://doi.org/10.1111/nyas.13718>
- Huang, L., Li, B., Li, W., Guo, H. und Zou, F. (2009). ATP-sensitive potassium channels control glioma cells proliferation by regulating ERK activity. *Carcinogenesis* 30, 737-744. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp034>
- Humpel, C. (2015). Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience* 305, 86-98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.086>
- Inan, M. und Anderson, S.A. (2014). The chandelier cell, form and function. *Curr Opin Neurobiol* 26, 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.01.009>
- Ishiyuchi, S., Tsuzuki, K., Yoshida, Y., Yamada, N., Hagimura, N., Okado, H., Miwa, A., Kurihara, H., Nakazato, Y., Tamura, M., *et al.* (2002). Blockage of Ca(2+)-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nat Med* 8, 971-978. <https://doi.org/10.1038/nm746>
- Jamann, N., Jordan, M. und Engelhardt, M. (2018). Activity-dependent axonal plasticity in sensory systems. *Neuroscience* 368, 268-282. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.035>
- Jamann, N. und Kole, M.H.P. (2022). Connecting axons and dendrites: An oblique view. *Neuron* 110, 1438-1440. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.04.014>
- Jansson, L.C. und Akerman, K.E. (2014). The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. *J Neural Transm (Vienna)* 121, 819-836. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1174-6>
- Jenkins, P.M., Kim, N., Jones, S.L., Tseng, W.C., Svitkina, T.M., Yin, H.H. und Bennett, V. (2015). Giant ankyrin-G: a critical innovation in vertebrate evolution of fast and integrated neuronal signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 957-964. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416544112>
- Jenkins, S.M. und Bennett, V. (2001). Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol* 155, 739-746. <https://doi.org/10.1083/jcb.200109026>
- Johung, T. und Monje, M. (2017). Neuronal activity in the glioma microenvironment. *Curr Opin Neurobiol* 47, 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.009>
- Jung, E., Alfonso, J., Monyer, H., Wick, W. und Winkler, F. (2020). Neuronal signatures in cancer. *Int J Cancer* 147, 3281-3291. <https://doi.org/10.1002/ijc.33138>
- Jung, E., Alfonso, J., Osswald, M., Monyer, H., Wick, W. und Winkler, F. (2019). Emerging intersections between neuroscience and glioma biology. *Nat Neurosci* 22, 1951-1960. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0540-y>
- Katz, E., Stoler, O., Scheller, A., Khrapunsky, Y., Goebbels, S., Kirchhoff, F., Gutnick, M.J., Wolf, F. und Fleidervish, I.A. (2018). Role of sodium channel subtype in action potential generation by neocortical pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E7184-E7192. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720493115>
- Kaur, S., Singh, G. und Kaur, K. (2014). Cancer stem cells: an insight and future perspective. *J Cancer Res Ther* 10, 846-852. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139264>

- Kerkhof, M. und Vecht, C.J. (2013). Seizure characteristics and prognostic factors of gliomas. *Epilepsia* 54 Suppl 9, 12-17. <https://doi.org/10.1111/epi.12437>
- Khosla, K., Naus, C.C. und Sin, W.C. (2020). Cx43 in Neural Progenitors Promotes Glioma Invasion in a 3D Culture System. *International journal of molecular sciences* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21155216>
- Kim, E.J., Feng, C., Santamaria, F. und Kim, J.H. (2019). Impact of Auditory Experience on the Structural Plasticity of the AIS in the Mouse Brainstem Throughout the Lifespan. *Front Cell Neurosci* 13, 456. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00456>
- Kim, H., Kim, E., Park, M., Lee, E. und Namkoong, K. (2013). Organotypic hippocampal slice culture from the adult mouse brain: a versatile tool for translational neuropsychopharmacology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 41, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.11.004>
- Kirichenko, E.Y., Savchenko, A.F., Kozachenko, D.V., Akimenko, M.A., Filippova, S.Y., Matsionis, A.E. und Povilaitite, P.E. (2017). [Connexin 43 expression in human brain glial tumors]. *Arkh Patol* 79, 3-9. <https://doi.org/10.17116/patol20177923-9>
- Kole, M.H. und Brette, R. (2018). The electrical significance of axon location diversity. *Curr Opin Neurobiol* 51, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.016>
- Kole, M.H., Ilschner, S.U., Kampa, B.M., Williams, S.R., Ruben, P.C. und Stuart, G.J. (2008). Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci* 11, 178-186. <https://doi.org/10.1038/nn2040>
- Kole, M.H., Letzkus, J.J. und Stuart, G.J. (2007). Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron* 55, 633-647. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.031>
- Kole, M.H. und Stuart, G.J. (2012). Signal processing in the axon initial segment. *Neuron* 73, 235-247. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.007>
- Komada, M. und Soriano, P. (2002). [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol* 156, 337-348. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110003>
- Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J. und Takeya, M. (2008). Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* 216, 15-24. <https://doi.org/10.1002/path.2370>
- Kordeli, E., Lambert, S. und Bennett, V. (1995). AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J Biol Chem* 270, 2352-2359. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.5.2352>
- Korja, M., Raj, R., Seppa, K., Luostarinen, T., Malila, N., Seppala, M., Maenpaa, H. und Pitkaniemi, J. (2019). Glioblastoma survival is improving despite increasing incidence rates: a nationwide study between 2000 and 2013 in Finland. *Neuro Oncol* 21, 370-379. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy164>
- Kreuzberg, M., Kanov, E., Timofeev, O., Schwaninger, M., Monyer, H. und Khodosevich, K. (2010). Increased subventricular zone-derived cortical neurogenesis after ischemic lesion. *Experimental neurology* 226, 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.08.006>
- Kuba, H. und Ohmori, H. (2009). Roles of axonal sodium channels in precise auditory time coding at nucleus magnocellularis of the chick. *J Physiol* 587, 87-100. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.162651>
- Kuba, H., Oichi, Y. und Ohmori, H. (2010). Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. *Nature* 465, 1075-1078. <https://doi.org/10.1038/nature09087>

- Kuba, H., Yamada, R., Ishiguro, G. und Adachi, R. (2015). Redistribution of Kv1 and Kv7 enhances neuronal excitability during structural axon initial segment plasticity. *Nat Commun* 6, 8815. <https://doi.org/10.1038/ncomms9815>
- Labrakakis, C., Patt, S., Hartmann, J. und Kettenmann, H. (1998a). Functional GABA(A) receptors on human glioma cells. *Eur J Neurosci* 10, 231-238. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00036.x>
- Labrakakis, C., Patt, S., Hartmann, J. und Kettenmann, H. (1998b). Glutamate receptor activation can trigger electrical activity in human glioma cells. *Eur J Neurosci* 10, 2153-2162. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00226.x>
- Larjavaara, S., Mantyla, R., Salminen, T., Haapasalo, H., Raitanen, J., Jaaskelainen, J. und Auvinen, A. (2007). Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol* 9, 319-325. <https://doi.org/10.1215/15228517-2007-016>
- Larson, V.A., Mironova, Y., Vanderpool, K.G., Waisman, A., Rash, J.E., Agarwal, A. und Bergles, D.E. (2018). Oligodendrocytes control potassium accumulation in white matter and seizure susceptibility. *Elife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.34829>
- LaVail, J.H. und Wolf, M.K. (1973). Postnatal development of the mouse dentate gyrus in organotypic cultures of the hippocampal formation. *Am J Anat* 137, 47-65. <https://doi.org/10.1002/aja.1001370105>
- Lazarov, O. und Hollands, C. (2016). Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. *Prog Neurobiol* 138-140, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.006>
- Leal, G., Comprido, D. und Duarte, C.B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76 Pt C, 639-656. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.005>
- Lee, H.H., Deeb, T.Z., Walker, J.A., Davies, P.A. und Moss, S.J. (2011). NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABAA receptor-mediated currents. *Nat Neurosci* 14, 736-743. <https://doi.org/10.1038/nn.2806>
- Lee, J.H., Lee, J.E., Kahng, J.Y., Kim, S.H., Park, J.S., Yoon, S.J., Um, J.Y., Kim, W.K., Lee, J.K., Park, J., *et al.* (2018). Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* 560, 243-247. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0389-3>
- Leterrier, C. (2018). The Axon Initial Segment: An Updated Viewpoint. *J Neurosci* 38, 2135-2145. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1922-17.2018>
- Leterrier, C. und Dargent, B. (2014). No Pasaran! Role of the axon initial segment in the regulation of protein transport and the maintenance of axonal identity. *Semin Cell Dev Biol* 27, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.11.001>
- Leterrier, C., Dubey, P. und Roy, S. (2017). The nano-architecture of the axonal cytoskeleton. *Nat Rev Neurosci* 18, 713-726. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.129>
- Li, Y., Jia, Y.C., Cui, K., Li, N., Zheng, Z.Y., Wang, Y.Z. und Yuan, X.B. (2005). Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 434, 894-898. <https://doi.org/10.1038/nature03477>
- Lim, D.A. und Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018820>
- Linos, E., Raine, T., Alonso, A. und Michaud, D. (2007). Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 99, 1544-1550. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm170>
- Lisman, J. (2003). Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 829-842. <https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1242>

- Little, M.P., Rajaraman, P., Curtis, R.E., Devesa, S.S., Inskip, P.D., Check, D.P. und Linet, M.S. (2012). Mobile phone use and glioma risk: comparison of epidemiological study results with incidence trends in the United States. *BMJ* *344*, e1147. <https://doi.org/10.1136/bmj.e1147>
- Liu, H., Dong, P., Ioannou, M.S., Li, L., Shea, J., Pasolli, H.A., Grimm, J.B., Rivlin, P.K., Lavis, L.D., Koyama, M., *et al.* (2018). Visualizing long-term single-molecule dynamics in vivo by stochastic protein labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *115*, 343-348. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713895115>
- Liu, J., Qu, C., Han, C., Chen, M.M., An, L.J. und Zou, W. (2019). Potassium channels and their role in glioma: A mini review. *Mol Membr Biol* *35*, 76-85. <https://doi.org/10.1080/09687688.2020.1729428>
- Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F. und Bordey, A. (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* *8*, 1179-1187. <https://doi.org/10.1038/nn1522>
- Lorincz, A. und Nusser, Z. (2008). Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci* *28*, 14329-14340. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4833-08.2008>
- Lossi, L., Gambino, G., Salio, C. und Merighi, A. (2010). Autophagy regulates the post-translational cleavage of BCL-2 and promotes neuronal survival. *ScientificWorldJournal* *10*, 924-929. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.82>
- LoTurco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B. und Kriegstein, A.R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* *15*, 1287-1298. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90008-x](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90008-x)
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P. und Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* *131*, 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Ludwig, K. und Kornblum, H.I. (2017). Molecular markers in glioma. *J Neurooncol* *134*, 505-512. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2379-y>
- Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R., Humphrey, P.A., Bigner, S.H., Bigner, D.D. und Laerum, O.D. (1990). Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Res* *50*, 6039-6044.
- Ma, J., Chen, C.C. und Li, M. (2021). Macrophages/Microglia in the Glioblastoma Tumor Microenvironment. *International journal of molecular sciences* *22*. <https://doi.org/10.3390/ijms22115775>
- Marin, O., Valiente, M., Ge, X. und Tsai, L.H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a001834. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001834>
- Marini, A.M., Rabin, S.J., Lipsky, R.H. und Mocchetti, I. (1998). Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate. *J Biol Chem* *273*, 29394-29399. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29394>
- Markovic, D.S., Glass, R., Synowitz, M., Rooijen, N. und Kettenmann, H. (2005). Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J Neuropathol Exp Neurol* *64*, 754-762. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000178445.33972.a9>
- Martin, S.J., de Hoz, L. und Morris, R.G. (2005). Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* *43*, 609-624. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2004.07.007>
- Massey, P.V. und Bashir, Z.I. (2007). Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci* *30*, 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.02.005>

- Mattson, M.P. (2003). Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 3, 65-94. <https://doi.org/10.1385/NMM:3:2:65>
- Mattson, M.P. (2007). Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6, 337-350. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00275.x>
- Mattson, M.P. (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144, 97-112. <https://doi.org/10.1196/annals.1418.005>
- Mattson, M.P. und Meffert, M.K. (2006). Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 13, 852-860. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401837>
- Melgarejo da Rosa, M. (2020). Communication of Glioma cells with neuronal plasticity: What is the underlying mechanism? *Neurochem Int* 141, 104879. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104879>
- Meza, R.C., Lopez-Jury, L., Canavier, C.C. und Henny, P. (2018). Role of the Axon Initial Segment in the Control of Spontaneous Frequency of Nigral Dopaminergic Neurons In Vivo. *J Neurosci* 38, 733-744. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1432-17.2017>
- Mohler, P.J., Gramolini, A.O. und Bennett, V. (2002). Ankyrins. *J Cell Sci* 115, 1565-1566.
- Monje, M., Borniger, J.C., D'Silva, N.J., Deneen, B., Dirks, P.B., Fattahi, F., Frenette, P.S., Garzia, L., Gutmann, D.H., Hanahan, D., *et al.* (2020). Roadmap for the Emerging Field of Cancer Neuroscience. *Cell* 181, 219-222. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.034>
- Moots, P.L., Maciunas, R.J., Eisert, D.R., Parker, R.A., Laporte, K. und Abou-Khalil, B. (1995). The course of seizure disorders in patients with malignant gliomas. *Arch Neurol* 52, 717-724. <https://doi.org/10.1001/archneur.1995.00540310091021>
- Morris, R.G. (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 9, 3040-3057.
- Mullen, R.J., Buck, C.R. und Smith, A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211. <https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>
- Muller Bark, J., Kulasinghe, A., Chua, B., Day, B.W. und Punyadeera, C. (2020). Circulating biomarkers in patients with glioblastoma. *Br J Cancer* 122, 295-305. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0603-6>
- Naus, C.C., Aftab, Q. und Sin, W.C. (2016). Common mechanisms linking connexin43 to neural progenitor cell migration and glioma invasion. *Semin Cell Dev Biol* 50, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.12.008>
- Nelson, A.D. und Jenkins, P.M. (2017). Axonal Membranes and Their Domains: Assembly and Function of the Axon Initial Segment and Node of Ranvier. *Front Cell Neurosci* 11, 136. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00136>
- Neumann, M. und Gabel, D. (2002). Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 50, 437-439. <https://doi.org/10.1177/002215540205000315>
- Neves, G., Cooke, S.F. und Bliss, T.V. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9, 65-75. <https://doi.org/10.1038/nrn2303>
- Nguyen, L., Malgrange, B., Breuskin, I., Bettendorff, L., Moonen, G., Belachew, S. und Rigo, J.M. (2003). Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J Neurosci* 23, 3278-3294.
- Noraberg, J., Kristensen, B.W. und Zimmer, J. (1999). Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain research Brain research protocols* 3, 278-290.

- Noraberg, J., Poulsen, F.R., Blaabjerg, M., Kristensen, B.W., Bonde, C., Montero, M., Meyer, M., Gramsbergen, J.B. und Zimmer, J. (2005). Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 4, 435-452.
- Ohgaki, H. und Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19, 764-772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
- Omuro, A. und DeAngelis, L.M. (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA* 310, 1842-1850. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>
- Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., *et al.* (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* 528, 93-98. <https://doi.org/10.1038/nature16071>
- Osswald, M., Solecki, G., Wick, W. und Winkler, F. (2016). A malignant cellular network in gliomas: potential clinical implications. *Neuro Oncol* 18, 479-485. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now014>
- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., *et al.* (2014). The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol* 16, 896-913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>
- Ostrom, Q.T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C. und Barnholtz-Sloan, J.S. (2020). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol* 22, iv1-iv96. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa200>
- Pallud, J., Le Van Quyen, M., Bielle, F., Pellegrino, C., Varlet, P., Cresto, N., Baulac, M., Duyckaerts, C., Kourdougli, N., Chazal, G., *et al.* (2014). Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci Transl Med* 6, 244ra289. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008065>
- Pan, Z., Kao, T., Horvath, Z., Lemos, J., Sul, J.Y., Cranstoun, S.D., Bennett, V., Scherer, S.S. und Cooper, E.C. (2006). A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 26, 2599-2613. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4314-05.2006>
- Pan-Vazquez, A., Wefelmeyer, W., Gonzalez Sabater, V., Neves, G. und Burrone, J. (2020). Activity-Dependent Plasticity of Axo-axonic Synapses at the Axon Initial Segment. *Neuron* 106, 265-276 e266. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.037>
- Pappas, I.S. und Parnavelas, J.G. (1997). Neurotrophins and basic fibroblast growth factor induce the differentiation of calbindin-containing neurons in the cerebral cortex. *Experimental neurology* 144, 302-314. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6411>
- Parent, J.M., Valentin, V.V. und Lowenstein, D.H. (2002). Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. *J Neurosci* 22, 3174-3188. <https://doi.org/20026296>
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A.A. und Sacktor, T.C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313, 1141-1144. <https://doi.org/10.1126/science.1128657>
- Paton, J.A. und Nottebohm, F.N. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225, 1046-1048. <https://doi.org/10.1126/science.6474166>
- Patt, S., Preussat, K., Beetz, C., Kraft, R., Schrey, M., Kalff, R., Schonherr, K. und Heinemann, S.H. (2004). Expression of ether a-go-go potassium channels in human gliomas. *Neurosci Lett* 368, 249-253. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.07.001>

- Peinado, A. (2001). Immature neocortical neurons exist as extensive syncytial networks linked by dendrodendritic electrical connections. *J Neurophysiol* 85, 620-629. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.2.620>
- Petersen, A.V., Cotel, F. und Perrier, J.F. (2017). Plasticity of the Axon Initial Segment: Fast and Slow Processes with Multiple Functional Roles. *Neuroscientist* 23, 364-373. <https://doi.org/10.1177/1073858416648311>
- Pinton, L., Masetto, E., Vettore, M., Solito, S., Magri, S., D'Andolfi, M., Del Bianco, P., Lollo, G., Benoit, J.P., Okada, H., *et al.* (2019). The immune suppressive microenvironment of human gliomas depends on the accumulation of bone marrow-derived macrophages in the center of the lesion. *J Immunother Cancer* 7, 58. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0536-x>
- Platel, J.C., Stamboulian, S., Nguyen, I. und Bordey, A. (2010). Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Res Rev* 63, 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.004>
- Potthoff, A.L., Heiland, D.H., Evert, B.O., Almeida, F.R., Behringer, S.P., Dolf, A., Guresir, A., Guresir, E., Joseph, K., Pietsch, T., *et al.* (2019). Inhibition of Gap Junctions Sensitizes Primary Glioblastoma Cells for Temozolomide. *Cancers (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11060858>
- Prestigio, C., Ferrante, D., Valente, P., Casagrande, S., Albanesi, E., Yanagawa, Y., Benfenati, F. und Baldelli, P. (2019). Spike-Related Electrophysiological Identification of Cultured Hippocampal Excitatory and Inhibitory Neurons. *Mol Neurobiol* 56, 6276-6292. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1506-5>
- Quail, D.F. und Joyce, J.A. (2017). The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* 31, 326-341. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.009>
- Radin, D.P. und Tsirka, S.E. (2020). Interactions between Tumor Cells, Neurons, and Microglia in the Glioma Microenvironment. *International journal of molecular sciences* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21228476>
- Rao, V.R. und Finkbeiner, S. (2007). NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends Neurosci* 30, 284-291. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.012>
- Rasband, M.N. (2010). The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11, 552-562. <https://doi.org/10.1038/nrn2852>
- Robert, S.M. und Sontheimer, H. (2014). Glutamate transporters in the biology of malignant gliomas. *Cell Mol Life Sci* 71, 1839-1854. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1521-z>
- Rotheneichner, P., Belles, M., Benedetti, B., Konig, R., Dannehl, D., Kreutzer, C., Zaunmair, P., Engelhardt, M., Aigner, L., Nacher, J., *et al.* (2018). Cellular Plasticity in the Adult Murine Piriform Cortex: Continuous Maturation of Dormant Precursors Into Excitatory Neurons. *Cereb Cortex* 28, 2610-2621. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy087>
- Rzeski, W., Ikonomidou, C. und Turski, L. (2002). Glutamate antagonists limit tumor growth. *Biochem Pharmacol* 64, 1195-1200. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01218-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01218-2)
- Savaskan, N.E., Seufert, S., Hauke, J., Trankle, C., Eyupoglu, I.Y. und Hahnen, E. (2011). Dissection of mitogenic and neurodegenerative actions of cystine and glutamate in malignant gliomas. *Oncogene* 30, 43-53. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.391>
- Savaskan, N.E., Seufert, S., Hauke, J., Trankle, C., Eyupoglu, I.Y. und Hahnen, E. (2023). Correction: Dissection of mitogenic and neurodegenerative actions of cystine and glutamate in malignant gliomas. *Oncogene* 42, 1048. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02634-5>
- Savtchouk, I. und Volterra, A. (2018). Gliotransmission: Beyond Black-and-White. *J Neurosci* 38, 14-25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017>
- Scherer, H.J. (1938). Structural Development in Gliomas. *The American Journal of Cancer* 34. <https://doi.org/10.1158/ajc.1938.333>

- Schluter, A., Del Turco, D., Deller, T., Gutzmann, A., Schultz, C. und Engelhardt, M. (2017). Structural Plasticity of Synaptopodin in the Axon Initial Segment during Visual Cortex Development. *Cereb Cortex* 27, 4662-4675. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx208>
- Schmitz, D., Schuchmann, S., Fisahn, A., Draguhn, A., Buhl, E.H., Petrasch-Parwez, E., Dermietzel, R., Heinemann, U. und Traub, R.D. (2001). Axo-axonal coupling. a novel mechanism for ultrafast neuronal communication. *Neuron* 31, 831-840. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00410-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00410-x)
- Schultz, C. und Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci* 34, 6-17. <https://doi.org/10.1159/000360925>
- Schulze, T.G., Detera-Wadleigh, S.D., Akula, N., Gupta, A., Kassem, L., Steele, J., Pearl, J., Strohmaier, J., Breuer, R., Schwarz, M., *et al.* (2009). Two variants in Ankyrin 3 (ANK3) are independent genetic risk factors for bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 14, 487-491. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.134>
- Schwartzbaum, J.A., Xiao, Y., Liu, Y., Tsavachidis, S., Berger, M.S., Bondy, M.L., Chang, J.S., Chang, S.M., Decker, P.A., Ding, B., *et al.* (2010). Inherited variation in immune genes and pathways and glioblastoma risk. *Carcinogenesis* 31, 1770-1777. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq152>
- Scoville, W.B. und Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20, 11-21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>
- Senft, C., Bink, A., Franz, K., Vatter, H., Gasser, T. und Seifert, V. (2011). Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* 12, 997-1003. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70196-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70196-6)
- Shete, S., Hosking, F.J., Robertson, L.B., Dobbins, S.E., Sanson, M., Malmer, B., Simon, M., Marie, Y., Boisselier, B., Delattre, J.Y., *et al.* (2009). Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet* 41, 899-904. <https://doi.org/10.1038/ng.407>
- Shu, Y., Yu, Y., Yang, J. und McCormick, D.A. (2007). Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K⁺ current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11453-11458. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702041104>
- Simmons, G.W., Pong, W.W., Emnett, R.J., White, C.R., Gianino, S.M., Rodriguez, F.J. und Gutmann, D.H. (2011). Neurofibromatosis-1 heterozygosity increases microglia in a spatially and temporally restricted pattern relevant to mouse optic glioma formation and growth. *J Neuropathol Exp Neurol* 70, 51-62. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182032d37>
- Sin, W.C., Crespin, S. und Mesnil, M. (2012). Opposing roles of connexin43 in glioma progression. *Biochim Biophys Acta* 1818, 2058-2067. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2011.10.022>
- Smits, A., Jin, Z., Elsir, T., Pedder, H., Nister, M., Alafuzoff, I., Dimberg, A., Edqvist, P.H., Ponten, F., Aronica, E., *et al.* (2012). GABA-A channel subunit expression in human glioma correlates with tumor histology and clinical outcome. *PLoS One* 7, e37041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037041>
- Sobotzik, J.M., Sie, J.M., Politi, C., Del Turco, D., Bennett, V., Deller, T. und Schultz, C. (2009). AnkyrinG is required to maintain axo-dendritic polarity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17564-17569. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909267106>
- Sommer, B., Kohler, M., Sprengel, R. und Seeburg, P.H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11-19. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90568-j](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90568-j)
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M.A., Sun, G.J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z.J., Ge, S., Enikolopov, G., *et al.* (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489, 150-154. <https://doi.org/10.1038/nature11306>
- Soomro, S.H., Ting, L.R., Qing, Y.Y. und Ren, M. (2017). Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. *J Pak Med Assoc* 67, 1410-1414.

- Soroceanu, L., Manning, T.J., Jr. und Sontheimer, H. (2001). Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 33, 107-117. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(200102\)33:2<107::aid-glia1010>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/1098-1136(200102)33:2<107::aid-glia1010>3.0.co;2-4)
- Squire, L.R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron* 61, 6-9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.023>
- Squire, L.R. und Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science* 253, 1380-1386. <https://doi.org/10.1126/science.1896849>
- Staudacher, I., Jehle, J., Staudacher, K., Pledl, H.W., Lemke, D., Schweizer, P.A., Becker, R., Katus, H.A. und Thomas, D. (2014). HERG K⁺ channel-dependent apoptosis and cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *PLoS One* 9, e88164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088164>
- Stoppini, L., Buchs, P.A. und Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods* 37, 173-182.
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.J. und Group, A.L.-G.S. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 7, 392-401. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70665-9)
- Stupp, R., Tonn, J.C., Brada, M., Pentheroudakis, G. und Group, E.G.W. (2010). High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5, v190-193. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq187>
- Sudhof, T.C. (2008). Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455, 903-911. <https://doi.org/10.1038/nature07456>
- Sun, G., Wang, X., Shi, L., Yue, X., Fu, L., Chen, C., Li, Z., Pan, T. und Wan, Z. (2013). Association between polymorphisms in interleukin-4Ralpha and interleukin-13 and glioma risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol* 37, 306-310. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2013.01.003>
- Sun, X., Vengoechea, J., Elston, R., Chen, Y., Amos, C.I., Armstrong, G., Bernstein, J.L., Claus, E., Davis, F., Houlston, R.S., *et al.* (2012). A variable age of onset segregation model for linkage analysis, with correction for ascertainment, applied to glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21, 2242-2251. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0703>
- Suzuki, M., Nelson, A.D., Eickstaedt, J.B., Wallace, K., Wright, L.S. und Svendsen, C.N. (2006). Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci* 24, 645-653. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04957.x>
- Taberner, A., Gangoso, E., Jaraiz-Rodriguez, M. und Medina, J.M. (2016). The role of connexin43-*Src* interaction in astrocytomas: A molecular puzzle. *Neuroscience* 323, 183-194. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.029>
- Thome, C., Janssen, J.M., Karabulut, S., Acuna, C., D'Este, E., Soyka, S.J., Baum, K., Bock, M., Lehmann, N., Hasegawa, M., *et al.* (2023). Live imaging of excitable axonal microdomains in ankyrin-G-GFP mice (eLife Sciences Publications, Ltd).
- Thome, C., Kelly, T., Yanez, A., Schultz, C., Engelhardt, M., Cambridge, S.B., Both, M., Draguhn, A., Beck, H. und Egorov, A.V. (2014). Axon-carrying dendrites convey privileged synaptic input in hippocampal neurons. *Neuron* 83, 1418-1430. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.013>
- Traub, R.D., Whittington, M.A., Gutierrez, R. und Draguhn, A. (2018). Electrical coupling between hippocampal neurons: contrasting roles of principal cell gap junctions and interneuron gap junctions. *Cell Tissue Res* 373, 671-691. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2881-3>
- Tseng, W.C., Jenkins, P.M., Tanaka, M., Mooney, R. und Bennett, V. (2015). Giant ankyrin-G stabilizes somatodendritic GABAergic synapses through opposing endocytosis of GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 1214-1219. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417989112>

- Valente, C.A., Meda, F.J., Carvalho, M. und Sebastiao, A.M. (2021). A Model of Epileptogenesis in Rhinal Cortex-Hippocampus Organotypic Slice Cultures. *Journal of visualized experiments : JoVE*. <https://doi.org/10.3791/61330>
- van Schaijik, B., Wickremesekera, A.C., Mantamadiotis, T., Kaye, A.H., Tan, S.T., Stylli, S.S. und Itinteang, T. (2019). Circulating tumor stem cells and glioblastoma: A review. *J Clin Neurosci* 61, 5-9. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.12.019>
- van Vuurden, D.G., Yazdani, M., Bosma, I., Broekhuizen, A.J., Postma, T.J., Heimans, J.J., van der Valk, P., Aronica, E., Tannous, B.A., Wurdinger, T., *et al.* (2009). Attenuated AMPA receptor expression allows glioblastoma cell survival in glutamate-rich environment. *PLoS One* 4, e5953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005953>
- Van Wart, A., Trimmer, J.S. und Matthews, G. (2007). Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 500, 339-352. <https://doi.org/10.1002/cne.21173>
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R.L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Sudhof, T.C. und Brose, N. (2006). Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 51, 741-754. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.003>
- Venkataramani, V., Tanev, D.I., Strahle, C., Studier-Fischer, A., Fankhauser, L., Kessler, T., Korber, C., Kardorff, M., Ratliff, M., Xie, R., *et al.* (2019). Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature* 573, 532-538. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1564-x>
- Venkataramani, V., Yang, Y., Schubert, M.C., Reyhan, E., Tetzlaff, S.K., Wissmann, N., Botz, M., Soyka, S.J., Beretta, C.A., Pramatarov, R.L., *et al.* (2022). Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. *Cell* 185, 2899-2917 e2831. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.054>
- Venkatesh, H. und Monje, M. (2017). Neuronal Activity in Ontogeny and Oncology. *Trends Cancer* 3, 89-112. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.12.008>
- Venkatesh, H.S., Johung, T.B., Caretti, V., Noll, A., Tang, Y., Nagaraja, S., Gibson, E.M., Mount, C.W., Polepalli, J., Mitra, S.S., *et al.* (2015). Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell* 161, 803-816. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.012>
- Venkatesh, H.S., Morishita, W., Geraghty, A.C., Silverbush, D., Gillespie, S.M., Arzt, M., Tam, L.T., Espenel, C., Ponnuswami, A., Ni, L., *et al.* (2019a). Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature* 573, 539-545. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1563-y>
- Venkatesh, H.S., Morishita, W., Geraghty, A.C., Silverbush, D., Gillespie, S.M., Arzt, M., Tam, L.T., Espenel, C., Ponnuswami, A., Ni, L., *et al.* (2019b). Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1563-y>
- Venkatesh, H.S., Tam, L.T., Woo, P.J., Lennon, J., Nagaraja, S., Gillespie, S.M., Ni, J., Dubeau, D.Y., Morris, P.J., Zhao, J.J., *et al.* (2017). Targeting neuronal activity-regulated neuroligin-3 dependency in high-grade glioma. *Nature* 549, 533-537. <https://doi.org/10.1038/nature24014>
- Wefelmeyer, W., Cattaert, D. und Burrone, J. (2015). Activity-dependent mismatch between axo-axonic synapses and the axon initial segment controls neuronal output. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 9757-9762. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502902112>
- Wefelmeyer, W., Puhl, C.J. und Burrone, J. (2016). Homeostatic Plasticity of Subcellular Neuronal Structures: From Inputs to Outputs. *Trends Neurosci* 39, 656-667. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.08.004>
- Weil, S., Osswald, M., Solecki, G., Grosch, J., Jung, E., Lemke, D., Ratliff, M., Hanggi, D., Wick, W. und Winkler, F. (2017). Tumor microtubules convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas. *Neuro Oncol* 19, 1316-1326. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox070>

- Weller, M., van den Bent, M., Tonn, J.C., Stupp, R., Preusser, M., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Henriksson, R., Le Rhun, E., Balana, C., Chinot, O., *et al.* (2017). European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol* 18, e315-e329. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30194-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30194-8)
- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S.M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P.Y., Stupp, R., *et al.* (2015). Glioma. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15017. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.17>
- Wetherington, J., Serrano, G. und Dingledine, R. (2008). Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* 58, 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.002>
- Wick, W., Gorlia, T., Bendszus, M., Taphoorn, M., Sahm, F., Harting, I., Brandes, A.A., Taal, W., Domont, J., Idbaih, A., *et al.* (2017). Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med* 377, 1954-1963. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707358>
- Wick, W., Osswald, M., Wick, A. und Winkler, F. (2018). Treatment of glioblastoma in adults. *Ther Adv Neurol Disord* 11, 1756286418790452. <https://doi.org/10.1177/1756286418790452>
- Wiemels, J.L., Wilson, D., Patil, C., Patoka, J., McCoy, L., Rice, T., Schwartzbaum, J., Heimberger, A., Sampson, J.H., Chang, S., *et al.* (2009). IgE, allergy, and risk of glioma: update from the San Francisco Bay Area Adult Glioma Study in the temozolomide era. *Int J Cancer* 125, 680-687. <https://doi.org/10.1002/ijc.24369>
- Wiltgen, B.J., Royle, G.A., Gray, E.E., Abdipranoto, A., Thangthaeng, N., Jacobs, N., Saab, F., Tonegawa, S., Heinemann, S.F., O'Dell, T.J., *et al.* (2010). A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012818>
- Wimmer, V.C., Reid, C.A., Mitchell, S., Richards, K.L., Scaf, B.B., Leaw, B.T., Hill, E.L., Royeck, M., Horstmann, M.T., Cromer, B.A., *et al.* (2010). Axon initial segment dysfunction in a mouse model of genetic epilepsy with febrile seizures plus. *J Clin Invest* 120, 2661-2671. <https://doi.org/10.1172/JCI42219>
- Wirsching, H.G. und Weller, M. (2020). Does Neuronal Activity Promote Glioma Progression? *Trends Cancer* 6, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.11.002>
- Witter, M.P., Wouterlood, F.G., Naber, P.A. und Van Haefen, T. (2000). Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* 911, 1-24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06716.x>
- Wohrer, A., Waldhor, T., Heinzl, H., Hackl, M., Feichtinger, J., Gruber-Mosenbacher, U., Kiefer, A., Maier, H., Motz, R., Reiner-Concin, A., *et al.* (2009). The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry. *J Neurooncol* 95, 401-411. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-9938-9>
- Wolf, S.A., Boddeke, H.W. und Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* 79, 619-643. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>
- Woodruff, A.R., Anderson, S.A. und Yuste, R. (2010). The enigmatic function of chandelier cells. *Front Neurosci* 4, 201. <https://doi.org/10.3389/fnins.2010.00201>
- Woodruff, A.R., McGarry, L.M., Vogels, T.P., Inan, M., Anderson, S.A. und Yuste, R. (2011). State-dependent function of neocortical chandelier cells. *J Neurosci* 31, 17872-17886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3894-11.2011>
- Xu, K., Zhong, G. und Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* 339, 452-456. <https://doi.org/10.1126/science.1232251>
- Yamada, R. und Kuba, H. (2016). Structural and Functional Plasticity at the Axon Initial Segment. *Front Cell Neurosci* 10, 250. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00250>

- Yang, R. und Bennett, V. (2021). Use of Primary Cultured Hippocampal Neurons to Study the Assembly of Axon Initial Segments. *Journal of visualized experiments : JoVE*. <https://doi.org/10.3791/61411>
- Yang, Y., Ogawa, Y., Hedstrom, K.L. und Rasband, M.N. (2007). betaIV spectrin is recruited to axon initial segments and nodes of Ranvier by ankyrinG. *J Cell Biol* 176, 509-519. <https://doi.org/10.1083/jcb.200610128>
- Ye, Z.C. und Sontheimer, H. (1999). Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 59, 4383-4391.
- Yoshimura, T. und Rasband, M.N. (2014). Axon initial segments: diverse and dynamic neuronal compartments. *Curr Opin Neurobiol* 27, 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.004>
- Zeng, Q., Michael, I.P., Zhang, P., Saghafinia, S., Knott, G., Jiao, W., McCabe, B.D., Galvan, J.A., Robinson, H.P.C., Zlobec, I., *et al.* (2019). Synaptic proximity enables NMDAR signalling to promote brain metastasis. *Nature* 573, 526-531. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1576-6>
- Zhang, Y., Tzingounis, A.V. und Lykotrafitis, G. (2019). Modeling of the axon plasma membrane structure and its effects on protein diffusion. *PLoS Comput Biol* 15, e1007003. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007003>
- Zimmer, J. und Gähwiler, B.H. (1984). Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. *J Comp Neurol* 228, 432-446. <https://doi.org/10.1002/cne.902280310>
- Ziobro, J.M., Deshpande, L.S. und Delorenzo, R.J. (2011). An organotypic hippocampal slice culture model of excitotoxic injury induced spontaneous recurrent epileptiform discharges. *Brain Res* 1371, 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.065>
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Alvarez-Royo, P. und Clower, R.P. (1991). Independence of memory functions and emotional behavior: separate contributions of the hippocampal formation and the amygdala. *Hippocampus* 1, 207-220. <https://doi.org/10.1002/hipo.450010208>

7 ANHANG

7.1 Equipment

Tab. 7: Equipment für Färbungen und Mikroskopie

Equipment	Name/Version	Quelle
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager® Rhodamine und FITC Filter	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Konfokales Mikroskop 1	Digital Eclipse C2 plus <u>Laser:</u> 488nm, 548nm, 642nm Objektiv: Nikon Plan Apo VC 20x NA 0.75 Nikon Plan Apo VC 60x NA 1.4 oil immersion	Nikon Instruments Europe, Düsseldorf, Germany
Konfokales Mikroskop 2	Leica VT1200S Sp5 <u>Laser:</u> 488 nm/ 20 mW 514 nm / 20 mW, DPSS 561 nm/ 20 mW HeNe 633 nm /10 mW Objektiv: VC 63x NA 1.3	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kryostat	Microm HM550	Thermo Scientific, Waltham, USA
Glas-slides	SuperFrost® plus slides	Thermo Scientific, Waltham, USA

Tab. 8: Equipment für OTC-Präparation

Equipment	Name/Version	Quelle
Transwell-Filter	Cell inserts 0.4 pores, Durchmesser 30mm	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Binokular		
Costar-Platten		
Vibratom	VT 1200 S	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Vibratomkühlung		Thermo Scientific, Waltham, USA
Inkubator		

Tab. 9: Equipment für Elektrophysiologie

Equipment	Name/Version	Quelle
Temperaturkontrollsystem	npi TC-20	Scientifica LLC., Clarksburg, USA
Puller	Flaming/Brown P-97	Sutter instruments
Verstärker	EPC 10 USB	HEKA Electronics GmbH, Lambrecht/Pfalz, Germany
Amplifier software	PatchMaster 2x90	
Pipetten Puller	P-97 Flaming/ Brown micropipette puller	Sutter Instruments, Novato, USA
Vibrator	VT 1200 S	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	ECLIPSE FN1 Auflichtmikroskop, IR-DIC 10x Objektive Wasserimmersion NA 0.10, WD 3.5 mm 40x Objektive, Wasserimmersion, NA 0.80, WD 3.5mm	Nikon Instruments Europe, Düsseldorf, Deutschland
Kamera	OrcaFLash 4.0 LT, Scientific CMOS Microscopy Camera FL400-Sensor mit 4.0 MP	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan
Lichtquelle	Photofluor LM-75	89 North, Williston, USA
Mikromanipulator	Sensapex piezo-driven micromanipulator, SMX series	Sensapex, Oulu, Finnland
XY Mikroskopbühne	MT-10001	Sutter Instruments, Novato, USA
Peristaltikpumpe	Reglo analog	Ismatec, Wertheim, Germany
Flüssigkeitskammer	RC-27, rektangulär geöffnete Badkammer	Warner Instruments, Hamden, USA
Glaskapillare	GB 150F-10 0.86x1.50x100 mm Borosilikatglas mit Filament	Science products, Hofheim, Deutschland
Harfe	HSG-5F Harfengitter	ALA Scientific Instruments, New York, USA

7.2 Software

Tab. 10: Software

Anwendung	Programm	Quelle
AIS Längenanalyse	AlSuite	Roos, Engelhardt et al., unpubliziert
Bildverarbeitung	Adobe Photoshop CS4, V 2020	Adobe Inc., San José, USA
AIS Messungen und Bildverarbeitung	ImageJ 1.51, FIJI	Wayne Rasband, NIH, USA
Elektrophysiologie	FitMaster 2x90	HEKA electronics GmbH, Lambrecht/Pfalz, Deutschland
	AxoGraph 1.7.2	OriginLab, Northhamptom, USA AxoGraph Scientific, John Clemets, USA
Statistische Analyse	SigmaPlot 12.5	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
Graphen	GraphPad Prism 8.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Illustration	BioRender	BioRender, Toronto, Kanada
	Adobe Illustrator CS4, V 2020	Adobe Inc., San José, USA
Zitationen	EndNote X9	Clarivate Analytics, Jersey, USA
Textverarbeitung	Microsoft Word for Mac, Version 16.45	Microsoft Cooperation, Redmont, USA
Bilddekonvolution	Autoquant X3	Media Cybernetics, Rockville, USA
Bildrekonstruktion	IMARIS V9.0	Bitplane, Zürich, Schweiz

7.3 Individuelle statistische Resultate

Tab.11: humane Tumorsektate: Individuelle Ergebnisse der AIS-Längenmessung

Gruppe	n	mittlere Länge (µm)	SD	min. Länge (µm)	max. Länge (µm)
Cortex	100	25,28	5,626	14,29	43,92
Glioblastom Tumormasse	60	24,4	5,462	15,74	44,33

Tab.12: Entwicklungsreihe in OTC. Ergebnisse der einzelnen Längenmessungen, n=5 OTC/Reifungsstufe

Gruppe	Anz. AIS	n	mittlere Länge (µm)	SD	min. Länge (µm)	max. Länge (µm)
DIV 3	158	5	30,93	2,691	27,22	34,52
DIV 7	221	5	30,61	1,514	29,33	33,08
DIV 10	350	5	27,48	1,02	26,27	29,03
DIV 14	467	5	27,86	0,494	27,43	28,62
DIV 21	233	5	24,91	1,373	23,41	26,72
	1429					

Tab.13: Entwicklungsreihe in OTC: p-Werte des mehrfachen Vergleichs der AIS-Längenentwicklung während in vitro Entwicklung zwischen DIV 3 und DIV 21. *P<0,05, **P<0,01, *P<0,001, ****P<0,0001**

vs.	DIV 3	DIV 7	DIV 10	DIV 14	DIV 21
DIV 3					
DIV 7	0,9976				
DIV 10	*	*			
DIV 14	*	0,0842	0,9956		
DIV 21	****	***	0,1164	0,0569	

Tab. 14: AIS-Längen der Entwicklungsreihe in OTC in Prozent. Herangezogen wurden die Mittelwerte der jeweiligen Reifungsstufen.

DIV	Längenentwicklung in % ausgehend von 100
3	100
7	98,997
10	88,903
14	90,1
21	80,362

Tab.15: AIS-Längenentwicklung in OTC. Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom. Ergebnisse der einzelnen Längenmessungen, n= 5 OTC/Reifungsstufe

Altersstufe	Gruppe	Anz. AIS	n	mittlere Länge (µm)	SD	min. Länge (µm)	max. Länge (µm)
DIV 3	Ctl.	63	5	36,85	2,039	33,89	39,26
	Glio	174	5	36,56	1,132	36,15	39,28
DIV 7	Ctl.	59	5	38,27	2,703	34,95	42,11
	Glio	117	3	30,92	0,9061	30,19	31,94
DIV 10	Ctl.	201	5	31,83	0,9721	30,62	33,3
	Glio	134	5	33,72	2,465	29,89	38,1
DIV 14	Ctl.	89	5	31,8	2,769	28,85	35,79
	Glio	193	5	32,2	3,055	27,52	35,97
DIV 21	Ctl.	137	5	28,09	1,208	26,68	29,16
	Ctl.	83	5	29,07	2,163	26,07	31,6
		1250					

Tab.16: AIS-Längenentwicklung in OTC. Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom: P-Werte des mehrfachen Vergleichs der AIS-Längenentwicklung während in vitro Entwicklung zwischen DIV 3 und DIV 21. *P<0,05, **P<0,01, *P<0,001, ****P<0,0001**

Kontrolle

vs.	DIV 3	DIV 7	DIV 10	DIV 14	DIV 21
DIV 3					
DIV 7	0,812				
DIV 10	**	***			
DIV 14	**	***	0,999		
DIV 21	****	****	0,0672	0,0703	

Glioblastom

vs.	DIV 3	DIV 7	DIV 10	DIV 14	DIV 21
DIV 3					
DIV 7	**				
DIV 10	0,0831	0,4356			
DIV 14	**	0,9292	0,8074		
DIV 21	****	0,7757	*	0,2065	

Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom

vs.	DIV 3 Ctl	DIV 7 Ctl	DIV 10 Ctl	DIV 14 Ctl	DIV 21 Ctl
DIV 3 Glio	0,999	0,999	**	**	****
DIV 7 Glio	*	**	0,9999	0,9999	0,6408
DIV 10 Glio	0,4126	0,0535	0,9205	0,9134	**
DIV 14 Glio	*	**	0,999	0,9999	0,1116
DIV 21 Glio	****	****	0,5839	0,5984	0,9992

Tab. 17: AIS-Längenentwicklung in OTC in Prozent. Herangezogen wurden die Mittelwerte der jeweiligen Reifungsstufen.

Kontrolle

DIV	Längenentwicklung in % ausgehend von 100
3	100
7	104,09
10	86,5
14	86,79
21	76,32

Glio

DIV	Längenentwicklung in % ausgehend von 100
3	100
7	82,29
10	89,74
14	85,74
21	77,28

Tab.18: AIS-Länge OTC. Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom. Ergebnisse der einzelnen Längenmessungen, n= 5 OTC/Kondition

Altersstufe	Gruppe	Anzahl der zugrundeliegenden AIS	n*	mittlere Länge (µm)	SD	min. Länge (µm)	max. Länge (µm)
DIV14	Ctl	2393	5	28,82	2,882	24,48	31,87
	Glio	2058	7	33,06	1,931	30,63	35,61
DIV 21	Ctl	1996	6	27,02	3,394	21,87	30,46
	Glio	1649	5	30,96	1,654	28,59	32,54

* Anzahl der Würfe, aus denen der jeweilige Mittelwert aller AIS ermittelt wurde

Tab. 19: AIS-Längenfrequenzverteilung. Ergebnisse der einzelnen Längenmessungen, n=AIS, Kolmogorov-Smirnov-Test, *P<0,05, **P<0,01, *<P0,001, ****P<0,0001**

Vergleich	P-Wert
DIV 14 Ctl vs. DIV 14 Glio	****
DIV 21 Ctl vs. DIV 21 Glio	****

Tab. 20: AIS-Länge in OTC nach Präparationsalter aufgeteilt. Ergebnisse der einzelnen Längenmessungen, n ≥ 5 OTC/Kondition

Präpalter	Altersstufe	Gruppe	Anzahl AIS	n*	mittlere Länge (µm)	SD	min. Länge (µm)	max. Länge (µm)		
P5	DIV 14	Ctl	919	10	29,82	2,528	27,17	35,27		
P6	DIV 14	Ctl	671	10	29,86	1,734	26,67	32,31		
P7	DIV 14	Ctl	480	5	28,01	3,309	22,3	30,72		
P8	DIV 14	Ctl	416	10	25,99	3,24	22,71	23,72		
P5	DIV 21	Ctl	724	10	28,28	3,084	23,42	32,68		
P6	DIV 21	Ctl	734	10	28,78	3,843	24,66	37,34		
P7	DIV 21	Ctl	380	5	29,17	2,753	26,45	32,97		
P8	DIV 21	Ctl	300	10	24,91	3,332	20,31	28,77		
P5	DIV 14	Glio	522	15	33,99	2,508	28,94	37,73		
P6	DIV 14	Glio	497	5	31,31	2,851	27,38	33,84		
P7	DIV 14	Glio	356	10	33,39	1,08	32,04	35,34		
P8	DIV 14	Glio	442	10	31,35	2,369	27,81	35,17		
P5	DIV 21	Glio	802	15	31,62	1,768	29,31	34,78		
P6	DIV 21	Glio	431	5	28,6	0,6806	27,72	29,38		
P7	DIV 21	Glio	334	10	32,43	1,23	30,23	34,29		
P8	DIV 21	Glio	83	5	28,99	2,006	26,07	30,94		
			8091							

* Anzahl der OTC

Tab. 21: AIS-Länge in OTC nach Präparationsalter aufgeteilt. P-Werte des Mehrfachvergleichs zwischen verschiedenen Altersstufen, n ≥ 5 OTC/Kondition, Einweg-ANOVA, *P<0,05, **P<0,01, *<P0,001, ****P<0,0001**

Kontrolle

	vs.	DIV 14				DIV 21			
		P5	P6	P7	P8	P5	P6	P7	P8
DIV 14	P5								
	P6	0,9999							
	P7	0,9566	0,9523						
	P8	0,1085	0,1026	0,925					
DIV 21	P5	0,9958	0,9397	0,9999	0,6978				
	P6	0,9942	0,993	0,9998	0,4553	0,999			
	P7	0,9999	0,999	0,9987	0,5514	0,9994	0,9999		
	P8	*	*	0,5792	0,9926	0,2224	0,1006	0,1908	

Glioblastom

	vs.	DIV 14				DIV 21			
		P5	P6	P7	P8	P5	P6	P7	P8
DIV 14	P5								
	P6	0,1576							
	P7	0,9948	0,5337						
	P8	*	0,9999	0,2985					
DIV 21	P5	*	0,9999	0,3582	0,9999				
	P6	***	0,37	***	0,1856	0,072			
	P7	0,5255	0,9654	0,9574	0,919	0,9696	*		
	P8	***	0,5737	**	0,3636	0,1755	0,9999		*

Gruppe	Vergleich	P-Wert
DIV 14	P5 Ctl vs. P5 Glio	***
	P6 Ctl vs. P5 Glio	0,94
	P7 Ctl vs. P5 Glio	**
	P8 Ctl vs. P5 Glio	****
DIV 21	P5 Ctl vs. P5 Glio	*
	P6 Ctl vs. P5 Glio	0,9999
	P7 Ctl vs. P5 Glio	0,15
	P8 Ctl vs. P5 Glio	*

Tab.22: AIS-Länge in OTC. Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom. Ergebnisse der einzelnen Längenmessungen, n= 4 OTC/Kondition

Altersstufe	Gruppe	Anzahl der AIS	n*	mittlere Länge (µm)	SD	min. Länge (µm)	max. Länge (µm)
DIV 7	Ctl	106	4	28,34	1,825	25,61	29,49
	Glio	98	4	35,54	2,188	32,9	38,04
DIV 14	Ctl	100	4	28,22	1,305	26,83	29,95
	Glio	96	4	36,63	3,274	34,05	41,41

* Anzahl der Würfe, aus denen der jeweilige Mittelwert aller AIS ermittelt wurde

Tab. 23: AIS-Längenfrequenzverteilung. Ergebnisse der einzelnen Längenmessungen, n=AIS, Kolmogorov-Smirnov-Test, *P<0,05, **P<0,01, *P<0,001, ****P<0,0001**

Vergleich	P-Wert
DIV 7 Ctl vs. DIV 7 Glio	****
DIV 14 Ctl vs. DIV 14 Glio	****

Tab.24: AIS-Länge in OTC. Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom: P-Werte des mehrfachen Vergleichs der AIS-Länge zwischen DIV 7 und DIV 14. *P<0,05, **P<0,01, *P<0,001, ****P<0,0001**

Vergleich	P-Wert
DIV 7 Ctl vs. DIV 7 Glio	**
DIV 7 Ctl vs. DIV 14 Ctl	0,9999
DIV 7 Glio vs. DIV 14 Glio	0,9431
DIV 14 Ctl vs. DIV 14 Glio	***

Tab.25: Anzahl der Cx43-Kolokalisationen an AnkG in OTC. Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom. Ergebnisse der einzelnen Messungen, n=25 AIS/Kondition

Altersstufe	Gruppe	n = Anz. AIS	mittlere Anz. Colokalisationen/µm AIS	SD	min. Anzahl	max. Anzahl
DIV 7	Ctl	25	1,081	0,4367	0,4273	2,116
	Glio	25	0,5708	0,1596	0,3208	0,9948
DIV 14	Ctl	25	0,7409	0,3818	0,3735	1,63
	Glio	25	0,6623	0,4836	0,2732	2,79

Tab.26: Anzahl der Cx43-Kolokalisationen an AnkG in OTC. Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom. P-Werte des mehrfachen Vergleichs, Zweiweg-ANOVA, n=25 AIS/Kondition, *P<0,05, **P<0,01, *<P0,001, ****P<0,0001**

Vergleich	P-Wert
DIV 7 Ctl vs. DIV 7 Glio	****
DIV 7 Ctl vs. DIV 14 Ctl	*
DIV 7 Ctl vs. DIV 14 Glio	**
DIV 7 Glio vs. DIV 14 Ctl	0,418
DIV 7 Glio vs. DIV 14 Glio	0,8402
DIV 14 Ctl vs. DIV 14 Glio	0,8918

Tab. 27: Aktive und Passive AP-Eigenschaften der Ganzzell-Patch-Clamp Aufnahmen

DIV 7	Gruppe	Kontrolle					Tumor					t-Test
		Mittelwert	SD	Min	Max	n	Mittelwert	SD	Min	Max	n	
	RMP (mV)	-67,84	7,34	-81,73	-58,75	12	-67,03	2,372	-71,02	-64,13	10	0,7273
	Rm (M Ω)	165,3	67,51	80,79	257,2	12	167,5	58,27	114,6	307,7	10	0,9351
	Rs (M Ω)	18,36	11,73	9,837	52,71	12	26,53	10,55	10,87	40,99	10	0,1013
	AP-Amplitude (mV)	97,04	16,48	64,27	122,1	12	104,7	12,11	80,39	118	10	0,2225
	AP-Halbwertsbreite (ms)	1,867	0,8825	1,25	4,4	12	1,58	1,01719	1,3	1,85	10	0,2927
	Stromschwelle (pA)	179,9	137,2	30,97	374	12	96,71	61,16	41,03	81,53	10	0,0776
	Spannungsschwelle (mV)	-48,17	2,449	-51,36	-44,14	12	-51,17	4,33	-57,67	-45,34	10	0,0724
	AIS-Spitze (V/s)	138,5	59,8	59,35	213,7	12	154,2	31,02	127,5	217,4	10	0,4381
	Soma-Spitze (V/s)	339,7	152,4	73,72	591,6	12	399,5	88,59	24,9	501,7	10	0,2662
	DIV 14											
	Gruppe	Kontrolle					Tumor					t-Test
		Mittelwert	SD	Min	Max	n	Mittelwert	SD	Min	Max	n	
	RMP (mV)	-72,31	13,68	-93,03	-56,05	13	-68,21	8,09	-77,97	-55,09	9	0,3897
	Rm (M Ω)	181,3	62,08	82,53	305,7	13	173,1	142,2	51,03	532,1	9	0,8743
	Rs (M Ω)	19,68	6,283	11,72	32,52	13	25,42	18,22	9,957	71,68	9	0,3867
	AP-Amplitude (mV)	109,6	12,8	92,02	132,9	13	105,5	32,64	37,32	155,6	9	0,7248
	AP-Halbwertsbreite (ms)	1,258	0,3564	0,75	1,8	13	1,35	0,6447	0,6	2,85	9	0,9999
	Stromschwelle	193,4	121,9	31,01	384,1	13	132,1	79,89	21,05	273,6	9	0,1695
	Spannungsschwelle (mV)	-46,19	7,45	-66,58	-37,64	13	-44,58	10,61	-57,8	-25,4	9	0,6996
	AIS-Spitze (V/s)	142	52,06	38,73	229,3	13	141,1	51,03	47,48	210,5	9	0,9688
	Soma-Spitze (V/s)	422,9	115,9	273,6	648,5	13	476,2	239,3	76,84	842,2	9	0,5486

Tab. 28: p-Werte multipler Vergleiche der Einfang-Frequenz Kurve im Vergleich Kontrolle vs. Glio, Zweifache-ANOVA, *P<0,05, **P<0,01, *<P0,001, ****P<0,0001**

Stromstufe (pA)	DIV 7	DIV 14
0	>0,9999	>0,9999
50	0,9979	>0,9999
100	0,713	>0,9999
150	0,8621	>0,9999
200	0,8858	>0,9999
250	>0,9999	>0,9999
300	>0,9999	>0,9999
350	>0,9999	>0,9999
400	>0,9999	>0,9999
450	>0,9999	0,9781
500	>0,9999	0,9961
550	0,9982	0,9417
600	>0,9999	0,804
650	>0,9999	0,3982
700	0,9556	0,3744
750	0,9982	0,2934
800	0,8596	0,1554
850	0,9969	0,1273

Tab. 29: AIS-Länge gepatchter OTC. Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom. Ergebnisse der einzelnen Längenmessungen, n= ca.50 AIS/Kondition

Altersstufe	Gruppe	n*	mittlere Länge (µm)	SD	min. Länge (µm)	max. Länge (µm)
DIV 7	Ctl	50	30,03	10,62	13,56	48,47
	Glio	34	31,64	7,67	16,43	45,79
DIV 14	Ctl	50	30,82	9	10,68	55,32
	Glio	56	38,38	8,78	17,55	65,24

* Anzahl der gemessenen AIS

Tab. 30: AIS-Länge in OTC. Vergleich Kontrolle vs. Glioblastom: P-Werte des mehrfachen Vergleichs der AIS-Länge zwischen DIV 7 und DIV 14. n= ca. 50 AIS/Kondition, Einweg-ANOVA, *P<0,05, **P<0,01, *P<0,001, ****P<0,0001**

Vergleich	P-Wert
DIV 7 Ctl vs. DIV 7 Glio	ns
DIV 14 Ctl vs. DIV 14 Glio	***

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Bock, Michael

Geburtsdatum: 13.10.1995

Geburtsort: Boppard, Deutschland

Familienstand: verheiratet

Vater: Valentin Bock

Mutter: Petra Bock

SCHULISCHER WERDEGANG

08/2002 – 07/2006 Grundschule Bad Salzig

09/2007 – 03/2015 Kant-Gymnasium Boppard
Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,3 (mit Ehrungen)

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

10/2015 – 12/2022 Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
Studium Humanmedizin

12/2022 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung & Approbation

04/2021 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

09/2017 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

STIPENDIEN

05/2019 – 04/2020 Promotionsstipendium der Universität Heidelberg

9 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich natürlich bei dir, Maren, herzlichst bedanken. Nicht nur dafür, dass du mir eine treue, geduldige Betreuerin und Mentorin warst, sondern auch dafür, dass du mir dieses komplexe Thema anvertraut hast. Deine Beharrlichkeit, deine Mühen, dein Ehrgeiz und genauso dein trockener Humor haben mich immer inspiriert und nicht aufgeben lassen. Du hattest für die meisten Probleme eine Lösung parat, hast ermutigt dranzubleiben und Enttäuschungen zum Vorteil zu nutzen. Du warst immer ehrlich zu deinen Doktoranden, aber nie zu hart, sondern immer wertschätzend. Danke, dass du immer motiviert warst uns die „wahre Welt der Wissenschaft“ ein wenig näherzubringen. Sicherlich waren die Besuche der verschiedenen Kongresse ein absolutes Highlight. Ich schätze die Arbeit und deine Zeit, die du nicht nur in die Betreuung meiner Arbeit, sondern auch in mich investiert hast sehr. Diese Zeit war wirklich eine absolute Bereicherung für mich, mein wissenschaftliches Verständnis und meine Ausbildung.

Vielen Dank auch dir, Miriam, für deine Inspiration von einem klinischen Blickwinkel auf die Fragestellung zu schauen und vor allem die Bereitstellung der Tumorzellen. Es war immer sehr spannend die Operationen mitzuerleben, von deren Resektaten wir Versuche ableiteten. Vielen Dank für diese klinischen Einblicke und deine Ideen zur Unterstützung unseres Projektes.

Außerdem möchte ich mich auch bei Prof. Dr. med. Christian Schultz für die Bereitstellung des Labors und die Möglichkeit bedanken alle Experimente durchzuführen und an diesem Projekt zu arbeiten. Daneben auch dir, Kitty, vielen Dank für deine Zuverlässigkeit und Hilfestellung in allen organisatorischen Angelegenheiten. Der Medizinischen Fakultät Mannheim danke ich für das Promotionsstipendium, das mir die Möglichkeit gegeben hat, mich intensiv und zwei Freisemestern mit dieser Dissertation zu beschäftigen.

Danke auch an Silke, Corinna und Elena für eure unglaubliche wertvolle Unterstützung im Labor. Danke, dass ihr euch Zeit genommen habt, mich einzuarbeiten, zu unterstützen, zu vertreten und euch um Tiere, Färbungen und Mikroskopieaufnahmen zu kümmern, wenn ich verhindert war. Ohne euch hätte vermutlich keines unserer Experimente funktioniert.

Nadja, ganz lieber Dank gebührt auch dir. Danke für einen Input in dieser Arbeit und deine unschätzbare Hilfe bei den Patch-Clamp-Aufnahmen. Durch deine Mithilfe ist

das Projekt erst zu dem geworden, was es ist. Sich mit dir auszutauschen war sowohl fachlich, als auch zwischenmenschlich immer eine Bereicherung.

Jonathan, auch dir als meinem Projektpartner und Leidensgenossen gebührt größter Dank. Mit guten Freunden zusammenzuarbeiten ist in guten Zeiten wirklich doppelte Freude und in schwierigen Zeiten nur halb so viel Mühsal. Davon abgesehen, dass fraglich ist, ob ich ohne dich dieses Projekt überhaupt begonnen hätte, bin ich sehr froh darüber, mit dir immer einen Austauschpartner und „Mitdenker“ zu haben. Danke für deinen Input, deine Verlässlichkeit und deine Bereitschaft selbstlos anzupacken. Die endlosen Stunden zum Präparieren der OTC bei Wind und Wetter werde ich sicherlich nicht so schnell vergessen.

Dank aller Mitstudierender im Labor war es wirklich eine Ehre, Teil dieser Laborgruppe zu sein. Ich bin begeistert darüber, wie sich immer aller unterstützten und ihre Expertisen weitergaben. Danke Dominik für all deine „Allrounder-Tipps. Danke Nora und Merryn für eure Hilfe beim Patch-Clamp-Setup. Johannes, danke für das Entwickeln der AISuite, die uns allen so tolle Dienste leistet. Danke Caro und Lavinia, dass wir uns immerwieder gegenseitig motivieren konnten und eine Menge Spaß dabei hatten.

Anna, vielen Dank, dass du immer da warst, ein offenes Ohr hast und mir so oft den Rücken gestärkt hast. Unzählige Stunden musstest du mich ans Labor und die Dissertation ausleihen und warst immer unterstützend darin. Ich bin wirklich sehr gespannt, wo unser gemeinsamer Weg hinführt.

Vor allem möchte ich nun auch meinen Eltern, Petra und Valentin, für ihre auf allen Ebenen großzügige Unterstützung während der 7 Jahre des Studiums bedanken. Ihr habt meine Entscheidungen immer unterstützt und respektiert. Auch ihr musstet immer wieder meinen Frust und Stress ertragen und wart dennoch jederzeit sanftmütig und wohlwollend. Ihr habt großen Anteil an dieser Arbeit.