



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Zoologie

Transkriptionales und posttranskriptionales Profiling neuronaler muriner Primärzellen nach Frequenz- und intensitätsabhängiger elektromagnetischer Exposition

Martin T. Stock

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen P. Geist

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Ralph Kühn
2. Prof. Dr. Michael W. Pfaffl

Die Dissertation wurde am 01.06.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.09.2017 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungen.....	XII
Vorwort – Danksagung.....	XIII
Zusammenfassung.....	XV
Abstract.....	XVIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Elektromagnetische Exposition neuronaler Netzwerke	1
1.2 Kortikale Feldeinkopplung repetitiver Magnetstimulation	4
1.3 Elektrodynamik.....	6
1.4 Kohärenz neuronaler Zellen	9
1.4.1 Neuronale Morphologie	9
1.4.2 Neuronale Kompartimente.....	15
1.4.3 Funktionsspezifische Adaptionen	19
1.4.4 Membran Habitus – Neuronale Exzitation	21
1.4.5 Nervale Signaltransduktion.....	24
1.5 Zellanalytik mit Multielektroden-Array – MEA.....	27
1.5.1 Mikrotechnologische Entwicklung.....	28
1.5.2 Neuronales Gewebe auf MEA	30
1.5.3 Analyse der Signalaktivität.....	32
1.6 Gene Expression Profiling neuronaler Netzwerke	34
1.6.1 Single RT-qPCR	35
1.6.2 RT-qPCR-Arrays.....	37
1.6.3 Microarray.....	37
1.6.4 RNA-Sequenzierung.....	39
1.6.5 Posttranskriptionales Gen-Silencing – nicht kodierende RNA	40
2. Zielsetzung der Arbeit.....	44
3. Material und Methoden	46
3.1 Zellkultur.....	46
3.1.1 Vorbereitungen zur Zellpräparation	46
3.1.2 Präparation und Akkommodation der Zellkulturen.....	49

3.1.3	Aufsetzen einer Zellkultur – Zellmonitoring	52
3.2	Parametrierung des elektromagnetischen Feldes	53
3.2.1	Genese und Applikationsform des elektromagnetischen Feldes	53
3.2.2	Konfiguration der elektromagnetischen Befeldung	56
3.3	Morphologische Charakterisierung	58
3.3.1	Vitalitätskontrolle durch inverse Phasenkontrastmikroskopie	58
3.3.2	Calcium-Oszillation	60
3.4	Elektrophysiologische Signalerfassung	61
3.4.1	Hard- und Software zur Messung neuronaler Signalaktivität	61
3.4.2	Elektrophysiologische Aktivitätsmuster – Burst und Spike	63
3.5	Genexpressionsanalytik	64
3.5.1	RNA-Extraktion	64
3.5.2	Transkriptom-Analysen mit Affymetrix GeneChip® for Mouse	65
3.5.3	RT-qPCR-Arrays	66
3.5.4	Einzel-RT-qPCR	68
3.5.5	MicroRNA-Expression	71
3.6	Bioinformatische Auswertung der Transkriptionsergebnisse	73
3.6.1	Statistische Auswertung der Daten in R	74
3.6.2	Funktionale Interpretation der Microarray-Daten	79
3.6.3	Molekulare Interaktionen, Reaktionen und Relationen	81
3.6.4	Klassifizierung der annotierten Gene	84
4.	Ergebnisse	87
4.1	Morphologie	87
4.2	Burst und Spikes	90
4.3	Genexpression	93
4.3.1	Microarray – Ontology und Pathway	93
4.3.2	RT-qPCR-Arrays – Alzheimer und Neurodegeneration	111
4.3.3	Validierung selektierter Gene mittels RT-qPCR	111
4.3.4	Micro-RNA-Profilung	113
4.3.5	Integrative Analyse – Target Gene Interaction	115
5.	Diskussion	120
5.1	Einzelgenexpressionsanalytik	120
5.2	Stoffwechselforgänge, Signalinteraktionen sowie Pathologien	120
5.3	Pathologie-korrelierende MicroRNA-Regulationen	122

5.4	Integrative Analyse.....	126
6.	Schlussfolgerungen.....	128
7.	Literatur.....	130
8.	Wissenschaftliche Mitteilungen.....	152
9.	Anhang.....	155
9.1	Protokoll zur experimentellen Vorgehensweise mit neuronalen Zellkulturen auf MEA im Neuroversuchstand des Neurolabors, IMETUM, Garching.....	155
9.2	Statistische Analyse der Microarray Daten - Programmierung in R.....	160
9.3	Programmablauf und Struktur der Microarray-Daten der verwendeten Microarrays Affymetrix Mouse GeneChip® 1.0 ST in DAVID – Funktionelle Annotation.....	170
9.4	Genexpressionsdaten.....	174
9.4.1	Genexpressionsregulationen der miRNA für vierfach-A Stimulation im Vergleich zur Referenzgruppe.....	174
9.4.2	Genexpressionsregulationen der miRNA für vierfach-B Stimulation im Vergleich zur Referenzgruppe.....	174
9.4.3	Genexpressionsregulationen der miRNA für vierfach-B Stimulation im Vergleich zu vierfach-A Stimulation.....	175
9.4.4	Targetgenvalidierung nach Stimulation A (einfach).....	176
9.4.5	Genexpression der Microarrays Alzheimer Disease 96 StellARay™ und Neurodegeneration 96 StellARay™.....	176
9.5	Acknowledgement.....	178

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Das magnetische Feld aufgrund des elektrischen Stromflusses in der Spule induziert ein elektrisches Feld im humanen neuronalen Gewebe (Cerebrum). (modifiziert nach Kienle *et al.*, 2006) 5
- Abb. 2: Partizipation der Mikrovesikel bei der Interzell-Kommunikation und Regulation des neuronalen Zellgewebes. Neuronale Zellen setzen verschiedene Arten von Mikrovesikel bekannter oder vermuteter Funktionen frei, wobei hierdurch die synaptische Plastizität exosomal beeinflusst wird. Die Neurotransmission wird auf dem Wege der Ablösung von Mikrovesikeln moduliert. Von Astrozyten abgeleitete Exosomen tragen Neuroprotektiva zum Neuron und assistieren somit neuronale Viabilität. Neuronale Signale lösen ein Emittieren von Exosomen der Oligodendrozyten durch intrazellulären CA^{2+} -Anstieg aus. Nach neuronaler Rezeption ist eine exosome axonale Assistenz realisierbar. Die Mikroglia absorbiert oligodendriale Exosomen und degradiert diese, ohne ihre inflammatorischen Eigenschaften zu verändern. Unter pathologischen Bedingungen können diese Exosomen-Antigene in die Mikroglia oder andere Antigen präsentierende Zellen (APC) transferieren und inflammatorische Prozesse induzieren; Multivesikuläres Körperchen (MVB). (modifiziert nach Frühbeis *et al.*, 2012) 13
- Abb. 3: Neuronales Netzwerk des Frontalen Cortex DIV 21 auf Cover Slip, aufgenommen im inversen Phasenkontrastverfahren, Neurolabor IMETUM, Garching. 18
- Abb. 4: Destinationsspezifische Variation der neuronalen Zellen im peripheren und zentralen Nervensystem. (modifiziert nach Kandel ER, Schwartz JH, New York, Elsevier 1985:23)..... 19
- Abb. 5: Zusammenhang zwischen der Membran-Stromdichte und der Membranspannung in Abhängigkeit von Zeit und dem aktuellen Membranpotential, dargestellt als Ersatzschaltbild im Hodgkin & Huxley Modell. (modifiziert nach Hodgkin & Huxley, 1952 b)..... 22
- Abb. 6: Darstellung des Spannungsverlaufs eines Membran-Aktionspotentials mit dem MRP von -65 mV bei einer maximalen Amplitude von 90 mV und den Öffnungszuständen der transmembranösen Na^{+} - und K^{+} -Kanäle. (modifiziert nach Hodgkin & Huxley, 1952 b)..... 23
- Abb. 7: Elektrische Erregungsleitung myelinisierter (A) und nicht myelinisierter Axone (B); A: Saltatorische Erregungsleitung mit sprunghafter Depolarisierung an den Ranvierschen Schnürringen in Richtung distal des Perikaryons; B: Im Bereich des Axon Hillock (a) beginnt eine Depolarisationszone (b) distal zu wandern, die proximal eine Refraktärzone (c) und anschließend eine Repolarisation (d) zum ursprünglichen Ruhezustand nach sich zieht. (mod. nach Pearson Education Inc. © 2011) 25
- Abb. 8: A: Beheizbare Doppelkammer des CNNS, Denton, Texas, mit vergrößerter Elektroden-Matrix; B: Multielektroden Array mit 30 der insgesamt 64 Elektroden sowie Zuleitungen, überwachsen mit neuronaler Zellkultur DIV 42, aufgenommen mit Eclipse TE 2000-W, Nikon, Japan, im IMETUM, Garching; C, D: Tiefenscharfe

Elektrodendarstellung der Oberflächentopografie in 3D eines MEA des CNNS durch Schichtaufnahmen (z-Stapel der Fokusebenen) mit anschließender Zusammenführung (Berechnung), angefertigt mit Auflichtmikroskop VHX-5000, Keyence, Japan, IMETUM, Garching. 29

Abb. 9: Spatiotemporale Aufzeichnung der nativen Spontanaktivität unterschiedlichen murinen cerebralen Gewebes von 20 Einzelneuronen (vertikal) über 45 sec. (horizontal) (Gross G. W., CNNS, Texas, USA); A: Auditorischer Cortex; B: Frontaler Cortex; C: *Substantia Nigra*; D: *Medulla Spinalis*. 34

Abb. 10: Therapeutische Modulation der miRNA-Aktivität. miRNA Mimics sind Moleküle, die zur Überexpression der miRNA genutzt werden können (1). Sie enthalten modifizierte Cyclopentyl-Guanin-Basen, die eine Assoziation des RNA-induced Silencing Complex (RISC) innerhalb des Zytoplasmas zur Inhibition der mRNA-Translation ermöglichen. Überexpression der Pri-miRNAs und Pre-miRNAs durch Plasmide führt durch endogene Enzyme zu herangereifter mRNA (2). Inhibitorisch agieren 2'-O-Methyl-AntagomiRs (Antagonist + miRNA) und Locked nucleic Acids (LNAs) bei der miRNA-Bindungsfunktion zu gereifter mRNA und verhindern dadurch die Interaktion mit Ziel-mRNA (3). Kontinuierliche miRNA-Inhibition durch Plasmid-Kodierung eines miRNA-Schwamm-Transkripts, das Iterationen der Komplementärsequenzen (rote Regionen des Transkripts) zur Ziel-miRNA enthält (4). Exosomen vermitteln miRNA-Mimics oder Inhibitoren zur Modulation der miRNA-Aktivität. (mod. n. Bhalala *et al.*, 2013)..... 41

Abb. 11: Sektion muriner Embryos zur Gewinnung neuronaler Stammzellen unter Zeiss Stemi 2000-C; A: Dekapitation muriner DIV 21 Embryos; B: Murine embryonale *Cerebra* in D1SGH-Lösung; C: Gewebeschnitte zur Zellgewinnung des Frontalen Cortex (FC) (mod. nach Smeyne & Smeyne 2002); D: Extraktion der *Medulla Spinalis* (SC) 51

Abb. 12: Prinzipschaltbild (A) eines Magnetstimulators mit angeschlossener Spule; äquivalentes elektrisches Ersatzschaltbild (B). (modifiziert nach Kienle *et al.*, 2006)54

Abb. 13: A: Parabol-förmige Stimulationsspule in 3D-Ansicht; B: Feldverlauf der Stimulationsspule MMC-140 in Abhängigkeit des radialen Abstandes vom Zentrum bei konkaver Applikation (Stock *et al.*, 2006)..... 55

Abb. 14: Versuchsaufbau zur Ermittlung der magnetischen Flussdichte auf Zellebene in der 6-Well-Platte bzw. auf dem MEA in der Petrischale; A: Sicht von oben auf die parabol-förmige Spule (PC) mit eingebrachter 6-Well-Platte zur Abstandsermittlung in konkaver Applikation; B: Gesamtansicht der flach geformten flüssig gekühlten Spule (FC) MCF 125; C: Kompletter Versuchsaufbau mit Magnetstimulator (1), Spule (2), Halterung (3) und Flussdichte-Messgerät (4); D: Messsonde unter der parabol-förmigen Magnetspule auf Zellniveau..... 55

Abb. 15: A: Neuroversuchstand mit 64-Kanal-Analyse-Hardware der Fa. Plexon Inc., Dallas, USA, zur elektrischen Ableitung der neuronalen Signalaktivität, sowie Phasenkontrastmikroskopie zur Kontrolle der Morphologie und Viabilität der neuronalen Zellkulturen; B: Plexon Vorverstärkerplatine mit Datenübertragungs-Flachbandkabel, Heizungs- und Versorgungsleitungen sowie Erdungsklemmen..... 60

Abb. 16: Calcium-Oszillation von Nervenzellen des Frontalen Cortex auf Deckglas. Die Lebendzellfärbung wurde mittels Fluo-4 FL4 (Invitrogen, Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mikroskopisch (Axiovert 200, Zeiss, Oberkochen) bei einer Wellenlänge im Bereich von 550–560 nm.	61
Abb. 17: Workflow in HTqPCR zur Analyse von qPCR-Daten; links: Anweisungsfunktionen (R-Commands) zur Visualisierung; Mitte: Programmschritte als Workflow anhand typischer qPCR-Analyse; rechts: Anweisungskommandos (R-Commands) der einzelnen Rechenschritte zur Datenanalyse. (modifiziert nach Dvinge, 2015)	76
Abb. 18: Schematische Darstellung der essentiellen Hauptkomponenten jeder LIMMA-Analyse. Für jedes Gen g gibt es einen Vektor der Genexpressionswerte y_g und eine Design-Matrix X , die diese Werte zu den Koeffizienten β_g korreliert. (modifiziert nach Ritchie <i>et al.</i> , 2015)	77
Abb. 19: Basisdaten-Eingabe und Datenanalyse mittels WebArrayDB. (modifiziert nach http://www.webarraydb.org/webarray/index.html)	80
Abb. 20: Humanpathologie – Pathway-Map für 'non-small cell lung cancer' (nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom; hsa05223) mit markierten (rot) pathologiebedingten genetischen Alterationen. Die pharmakologischen Ansatzpunkten der Wirkstoffe Gefitinib und Erlotinib für EGFR und Crizotinib für ALK sind farblich (lila) hervorgehoben (modifiziert nach Kanehisa <i>et al.</i> , 2017).....	82
Abb. 21: Baumdiagramm zur Onthologie 'biological process'. (modifiziert nach http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/pics/tree_example.png).....	86
Abb. 22: Mikroskopische Kontrolle der neuronalen Zellkulturen auf MEAs der Versuchsreihe CRAMS V; A: MEA 90909 Tag 1 10x; B: MEA 90911 Tag 3 10x; C: MEA 90916 Tag 8 10x; D: MEA 90916 Tag 8 20x; E: MEA 90922 Tag 14 10x; F: MEA 90922 Tag 14 20x; G: MEA 90930 Tag 21 10x; H: MEA 90930 Tag 21 20x....	88
Abb. 23: Mikroskopische Kontrolle der neuronalen Zellkulturen auf Deckglas und 6-Well-Platte der Versuchsreihe CRAMS V; A: Deckglas, DIV 21, 10-fach; B: Deckglas, DIV 21, 20-fach; C: 6-Well-Platte, DIV 21, 10-fach; D: 6-Well-Platte, DIV 21, 20-fach.	89
Abb. 24: Ableitungssignale kortikaler neuronaler Zellkultur mittels Plexon-Software (CRAMS V); A: Vier aktive Neurone auf einer ausgewählten Elektrode; B: 64-Elektroden-Matrix des MEA MMEP-4 in Online-Darstellung mit chronologisch kumulierten Signalen einer oder mehrerer Neurone (Waveforms) C: Einzeldarstellung aller aktiven Neurone des MEA in zeitlicher Reihenfolge (ca. 20 sec.; Timestamps).	91
Abb. 25: Bursts als Rasterplot (Timestamps) von 37 aktiven Neuronen des Frontalen Cortex über eine Dauer von 360 sec (CRAMS V).	92
Abb. 26: Verhältnis der positiv (A) und negativ (B) regulierten Gene, erfasst durch Microarray-Analyse (Mouse Gene 1.0 ST, Affymetrix), zur Anzahl aller annotierten Gene in der ersten hierarchischen Gruppe der jeweiligen Ontology-Klassen	

'biological process', 'cellular component' und 'molecular function' gemäß AmiGo-Datenbank (Stock <i>et al.</i> , <i>in praep. a</i>).	94
Abb. 27: Verhältnis der dominierenden positiv und negativ regulierten Gene, erfasst durch Microarray-Analyse (Mouse Gene 1.0 ST, Affymetrix) zur Anzahl aller annotierten Gene in den jeweiligen Unterklassifizierungen der Gene Ontology gemäß AmiGo-Datenbank. Die gestrichelten Linien bezeichnen die Schwellenwerte bei doppelter Präsenz der auf- und abregulierten Gene.....	95
Abb. 28: Positiv regulierte (A) und negativ regulierte (B) Gene in der Onthologie 'molecular function' der enriched GO-terms in GOrilla.....	98
Abb. 29 Positiv regulierte (A) und negativ regulierte (B) Gene in der Onthologie 'biological process' der enriched GO-terms in GOrilla.	100
Abb. 30: Alzheimer-Erkrankung: Visualisierung der KEGG-Pathway-Analyse in der Untergruppierung Human Diseases / Neurodegenerative Diseases / Alzheimer's Disease mit farblich hervorgehobenen regulierenden Genen der Micro-Array-Daten der Versuchsreihe CRAMS V.	104
Abb. 31: Corea Huntington: KEGG-Pathway-Analyse in der Untergruppierung Human Diseases / Neurodegenerative Diseases / Huntington's Disease mit farblich hervorgehobenen regulierenden Genen der Micro-Array-Daten der Versuchsreihe CRAMS V.	105
Abb. 32: Parkinson-Erkrankung: Visualisierung der KEGG-Pathway-Analyse in der Untergruppierung Human Diseases / Neurodegenerative Diseases / Parkinson's Disease mit farblich hervorgehobenen regulierenden Genen der Micro-Array-Daten der Versuchsreihe CRAMS V.	106
Abb. 33: Vaskuläre glatte Muskelzellen-Kontraktion: KEGG-Pathway-Analyse in der Untergruppierung Organismal Systems / Circulatory System / Vascular Smooth Muscle Contraction mit farblich hervorgehobenen regulierenden Genen der Micro-Array-Daten der Versuchsreihe CRAMS V.	108
Abb. 34: Arachidonsäure-Metabolismus: Graphische Darstellung der KEGG-Pathway-Analyse in der Untergruppierung Metabolism / Lipid Metabolism / Arachidonic Acid Metabolism mit farblich hervorgehobenen regulierenden Genen der Micro-Array-Daten der Versuchsreihe CRAMS V.	110
Abb. 35: Genexpressionsänderungen der Kandidatengene nach verschiedenen Behandlungsmustern im Verhältnis zur Referenzgruppe nach $\Delta\Delta$ Cq-Normalisierung. Sternchen zeigen signifikante Expressionsunterschiede ($p < 0,5$; t-Test) zwischen Behandlung und Referenz (Stock <i>et al.</i> , 2012).	112
Abb. 36: Fold Change der Kandidatengene in Gegenüberstellung von vierfach-A vs. vierfach-B-Behandlung. Die Sternchen markieren die unterschiedlich signifikant exprimierten Gene nach $\Delta\Delta$ C _q -Normalisierung zwischen vierfach-A und B Behandlung ($p < 0,5$; t-Test) (Stock <i>et al.</i> , 2012).	113

Abb. 37: Genexpressionsregulationen der miRNA für vierfach-B und vierfach-A-Stimulation im Vergleich zur Referenzgruppe (*' signifikante Änderung) (Stock *et al.*, *in praep.* b). 114

Abb. 38: Genexpressionsregulationen der miRNA für vierfach-B-Stimulation im Vergleich zu vierfach-A-Stimulation (*' signifikante Änderung)..... 115

Abb. 39: Heatmap der miRNA-Zielgen-Interaktion in Relation der analysierten Pathways (Stock *et al.*, *in praep.* b). 117

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Physikalische Symbole und Bedeutung sowie die entsprechenden SI-Einheiten unter Verwendung in den Maxwell-Gleichungen.....	6
Tab. 2: Gemessene magnetische Flussdichte im Abstand von 20,2 mm im Zentrum des jeweiligen Spulentyps unter Verwendung einer Hallsonde mit einem Teslameter FM 210, Projekt Elektronik GmbH, Berlin.	56
Tab. 3: Applizierte spezifische Stimulationsspulen in den Versuchsreihen CRAMS V und X mit den entsprechenden Intensitäts- und Frequenzeinstellungen	57
Tab. 4: Temperaturprotokoll und Mastermix für Synthesis Kit Maxima™First Strand.	67
Tab. 5: Temperaturprotokoll und Mastermix der qPCR-Arrays unter Verwendung von Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	67
Tab. 6: Temperaturprotokoll und Mastermix für SuperScript® VILO™	68
Tab. 7: Zusammenstellung aller Primer zur Targetgen-Validierung mit Beschreibung der Kandidatengene, Abürzung, NCBI Gene-Bank Accession Number, Forward (F) und Reverse (R) Primersequenz, Annealing Temperatur (Ann.Temp.), Annealing Position des Primer auf der Gensequenz (Start(bp)) und Amplicon Length (Ampl.Length) (Stock <i>et al.</i> , 2012).	70
Tab. 8: Temperaturprotokoll und Mastermix für TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit.....	72
Tab. 9: Temperaturprotokoll und Mastermix für TaqMan® MicroRNA Assays Kit mit TaqMan® Fast Advanced Master Mix	72
Tab. 10: Aufstellung der untersuchten miRNAs mit Mature Accession Number, Bezeichnung und Mature miRNA Sequenz.	73
Tab. 11: Die Mittelwerte der Spikes pro Minute (SR) und Bursts pro Minute (BR) jeweils dreier randomisierter Zellkulturen des Frontalen Cortex auf MEA der zwei Versuchsreihen CRAMS V und X als Qualitätskriterium für homogene spatiotemporale Netzwerkaktivität.	92
Tab. 12: Funktionelle Klassifizierung der signifikanten Gene unterschiedlicher Expression nach Behandlung A versus Kontrolle (CRAMS V) entsprechend der Gen-Orthologie der AmiGo-Datenbank basierend auf der Microarray Analyse (Mouse Gene 1.0 ST, Affymterix). Die einzelnen Gene können in mehr als einer Untergruppierung erscheinen.	95
Tab. 13: Funktionelle Klassifizierung der signifikanten Gene unterschiedlicher Expression nach Behandlung A versus Kontrolle (CRAMS V) entsprechend der Gene Enrichment Analytik für die Orthologie 'molecular function' in GOrilla basierend auf der Microarray Analyse (Mouse Gene 1.0 ST, Affymterix).....	98

Tab. 14: Funktionelle Klassifizierung der signifikanten Gene unterschiedlicher Expression nach Behandlung A versus Kontrolle (CRAMS V) entsprechend der Gene Enrichment Analytik für die Onthologie 'biological process' in GOrilla basierend auf der Microarray Analyse (Mouse Gene 1.0 ST, Affymterix)..... 101

Tab. 16: microRNA/Pathway Cluster Alzheimer's Disease (hsa05010)..... 116

Tab. 16: Integrative Analyse aller ausgewählten microRNAs korreliert mit den Target Genen aus 4.3.3 in DIANA-mirPath v3.0 118

Tab. 17: Integrative Analyse der Target Gene mit den selektierten miRNAs in miRWalk 2.0 119

Abkürzungen

cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cq	Quantifizierungszyklus
DIV	Tag <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
HTqPCR	High-throughput quantitative Polymerase
MEA	Mikroelektroden-Array
MEM	Minimum Essential Medium
miRNA	mikro Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNS	peripheres Nervensystem
QI	Qualitätsindex
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RIN	Integritätszahl der Ribonukleinsäure
rMS	repetitive Magnetstimulation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rTMS	repetitive transkraniale Magnetstimulation
RT-qPCR	reverse Transkriptase quantitative Polymerasekettenreaktion
siRNA	kurze interferierende Ribonukleinsäure
ZNS	zentrales Nervensystem

Vorwort – Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit entstand während meiner Forschungstätigkeit am Lehrstuhl für Zoologie – Arbeitsgruppe Molekulare Zoologie, Weihenstephan, im Labor für molekulare Physiologie – Lehrstuhl für Physiologie, Weihenstephan, im Neurolabor des Zentralinstituts für Medizintechnik (IMETUM), Garching und im Center for Network Neuroscience (CNNS) – University of North Texas (UNT), Dallas.

An dieser Stelle möchte ich allen Dank sagen, die ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Ralph Kühn danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Molekulare Zoologie unter seiner Leitung.

Weiterhin bedanke ich mich bei dem Vorsitzenden der Prüfungskommission, Prof. Dr. Jürgen P. Geist und bei Prof. Dr. Michael W. Pfaffl, für die Übernahme des Koreferates und die Unterstützung bei den Experimenten und der Anfertigung der Dissertation.

Herzlichst danken möchte ich Dipl.-Ing. Dieter Waibler für seine Fachkompetenz und die Inspiration zum Thema der neuronalen Rehabilitation. Seine erklärende Art und immer wiederkehrende, auf das wesentliche zurückführende Denkweise, waren für mich richtungsweisend.

Prof. Dr. Arndt Bode danke ich für sein stetiges Interesse an unserem Projekt und die vielseitige Unterstützung, die er uns hierbei zukommen ließ.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Bernhard Wolf und Prof. Dr. Axel Haase für die Möglichkeit der Durchführung der Experimente im Neurolabor und der Nutzung des Arbeitsplatzes im IMETUM.

Danken möchte ich auch Prof. Günter Gross für die Möglichkeit der Durchführung der praktischen und theoretischen Arbeit mit neuronalen Zellkulturen in seinem Labor in Dallas, Texas.

Natürlich möchte ich mich auch für die Mithilfe zahlreicher Doktoranden, Absolventen und Laborassistenten wie Helmut Bayerl, Benedikt Kirchner, Miranda Roßmann, Christine Seidel, Elke Siegl, Gaby Schwabedissen, Jens-Eike Täubert und Marc Young bedanken.

Ferner danke ich herzlichst Nina Lamprecht für die Bereitschaft der Übernahme des Korrektorats.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, Rosi und Herbert, die immer an mich geglaubt und mich bestärkt haben im Fortkommen meiner Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner lieben Frau Petra und meinen Kindern Jakob, Franziska, Ludwig und Monika. Ohne deren Rückhalt, Verständnis und Liebe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zusammenfassung

Neuronale Zellen generieren, leiten und empfangen bioelektrische Signale und Muster, durch die Informationen via Leitungsbahnen (Dendriten, Axone) kommuniziert werden. Hierbei ist eine elektrische Einflussnahme durch elektromagnetische Exposition der leitenden Kompartimente physikalisch bedingt, die intra- und extrazelluläre Kommunikation wird verändert oder es entsteht Signalgeneration mit der Konsequenz neuronaler Genese oder Degeneration.

Die vorliegende Arbeit zeigt anhand eines Transkriptom- und miRNA-Profilings die transkriptionalen und posttranskriptionalen Gen-Regulationen neuronaler muriner Primärzellen nach frequenz- und intensitätsabhängiger elektromagnetischer Exposition und erschließt in einer integrativen Analyse die transkriptionalen und posttranskriptionalen Interaktionen sowie die damit verbundenen möglichen pathologierelevanten Zusammenhänge.

Es soll die Frage beantwortet werden, welche Gene neuronaler muriner Zellverbände durch elektromagnetische Exposition unterschiedlicher Frequenzen und Intensitäten auf welche Art und Weise regulierend beeinflusst werden. Weiterhin soll ein Profiling selektierter pathologierelevanter miRNAs erfolgen. Methodisch bieten die Verwendung der Signalanalyse auf MEAs zur elektrophysikalischen Aktivitätskontrolle sowie die Transkriptionsanalyse des Genoms zur Erfassung aller Genregulationen hierfür eine optimale Basis.

Neuronale murine Primärzellkulturen wurden nach morphologischer und elektrophysiologischer Kontrolle für die Untersuchungen der Wirkung von elektromagnetischer Befeldung mittels repetitiver Magnetstimulation verwendet. Die standardisierten Nervenzellkulturen des Frontalen Cortex embryonaler Mäusegehirne wurden unterschiedlichen Stimulationsmustern exponiert und die transkriptionale Zellantwort zunächst semiquantitativ mittels Microarrays durchgeführt, um beeinflusste Gene ohne Vorselektion zu detektieren. Anschließend wurde die Genexpressionsanalyse mit RT-qPCR-Arrays (*Morbus Alzheimer* und Neurodegeneration) erfasst und die Ergebnisse in Einzel-RT-qPCR selektierter Gene validiert. Ergänzend zur RNA-Expression er-

folgte ein Profiling selektierter miRNAs auch unter dem Aspekt der Zielgeninaktivierung oder Aktivierung durch entsprechende miRNAs.

Grundsätzlich wurden zwei in Frequenz, Muster und Intensität differente Expositionsformen angewendet. Stimulation A beinhaltete 70 Hz und Stimulation B 30 Hz Impulswiederholffrequenz. Die Analytik der Microarrays wurde nach Befeldung durch Stimulationsmuster A und die der RT-qPCR-Arrays, der Einzelgene und der miRNAs nach Mehrfachstimulation durch Muster A und B durchgeführt.

Zur Erfassung des gesamten Transkriptoms der Maus wurden Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST-Microarrays mit 28.853 Genen verwendet. Hierbei zeigten sich 1808 Gene mit signifikanter Expression ($P < 0.05$, Bayes moderated t-test). Der größte Einfluss der Regulationen in beiden Richtungen durch Magnetstimulation mit Stimulationsmuster A (70 Hz) war deutlich erkennbar im Bereich der biologischen Prozesse. Gene-Enrichment-Analytik ergab hierbei mit 35% der positiv regulierenden Gene bei Stimulation A den überwiegenden Anteil. Nach Pathway-orientierter bioinformatischer Auswertung (KEGG-Pathway) zeigten sich signifikante Einflüsse der magnetischen Befeldung auf die Transkription relevanter Gene in den Pathways *Morbus Alzheimer* (AD), *Chorea Huntington* (HD), *Morbus Parkinson* (PD), Vaskuläre glatte Muskelkontraktion und Arachidonsäure-Metabolismus.

Die Genexpressionsanalyse mit RT-qPCR-Arrays (Alzheimer und Neurodegeneration) selektierte 16 Kandidatengene, die in Einzel-RT-qPCR validiert wurden. Weiterhin wurden 22 pathologierelevante miRNAs analysiert, bei denen vier miRNAs signifikante Expressionsänderungen für beide Stimulationsarten, drei miRNAs nur nach Stimulationsart A und fünf nur nach Stimulationsart B zeigten.

Für die hier untersuchten neuronalen Zellverbände zeigte sich, dass die sukzessive Methodik von der Zellkultivierung über die neurophysiologische (Bursts und Spikes) und zellbiologische (Morphologie) Kontrolle der Vitalitätsparameter bis hin zur Genexpressionsanalytik geeignet ist. Die Ergebnisse der Expressionsregulationen und Gen-Interaktionen bestätigen eine Beeinflussung selektierter Gene und miRNAs.

Aufgrund der elektrophysiologischen Erfahrungen auf MEAs kann zukünftig eine Vorselektion neuer Stimulationsmuster durch Variation der Frequenz, der Pausenzeiten sowie der Amplitude der Spulenstromstärke durch Analyse der elektrophysiologischen Parameter getroffen werden. Die Analyse der Genexpression in Verbindung mit der Beeinflussung neuronaler Zellverbände nach elektromagnetischer Exposition unter Anwendung der Mess- und Vergleichsmethode der Erfassung von Bursts und Spikes stellt eine aussagekräftige Analytik im Bereich der molekularen Neurobiologie dar.

Abstract

Neural cells generate, transmit and receive bioelectric signals and patterns communicated from the neural pathways (dendrites, axones). Hereby, an electrical influence per electromagnetic exposure of the conducting compartments is physically affected, intra- and extracellular communication is changed or it results in unintentional generation of signals of a neural genesis or degeneration.

This manuscript, based on transcription and miRNA profiling, shows the transcriptional and post-transcriptional gene regulations of neural murine primary cells after a frequency and intensity dependent electromagnetical exposure and concludes in an integrated analysis of the transcriptional and post-transcriptional interactions, as well as the therewith relevant possible pathological aspects.

To be answered is the question of which genes in a neural murine cell cluster can regulatedly be influenced in which way and matter per electromagnetical exposure of various frequencies and intensities. Furthermore, a profiling of selected pathologically relevant miRNAs is to follow. Methodically, the use of the signal analysis of MEAs for the electrophysical activity controls, as well as the transcription analysis of genomes to record all gene regulations, offers the best basis.

Primarily, after a morphological and electrophysiological inspection, murine neural cell cultures were used for the observation of the influence of electromagnetic fields per repetitive magnetic stimulation. Standardized cell cultures of the frontal cortex of embryo mice brains were subjected to various stimulation patterns and the transcriptional cell answer carried out, at first, semi-quantatively per micro arrays in order to detect influenced genes prior to preselection. Following, the gene expression analysis with RT-qPCR arrays (*Morbus Alzheimer* and neurodegeneration) was recorded and the results validated in Single-RT-qPCR selected genes. In addition to the RNA expression, a profiling of selected miRNAs followed, also under the aspect of target gene inactivation or activation per respective miRNAs.

Principally, two differential exposition forms were used, differentiating in frequency, pattern and intensity. Stimulation A consisted of 70 Hz and stimulation B of 30 Hz pulse repetition frequencies. The analytic of the microarrays were carried out after exposure per stimulation with pattern A and those of the RT-qPCR arrays, the single genes and the miRNAs after multiple stimulations according to patterns A and B.

For the recording of the entire mouse transcription, the Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST microarrays with 28,853 genes were applied. Hereby, 1808 genes showed a significant expression ($P < 0.05$, Bayes moderated t-test). The greatest regulation influence in both directions per magnetic stimulation having the stimulation pattern A (70 Hz) was significantly recognizable in the group of the biological processes. Gene Enrichment Analytic resulted in the majority portion, having 35% of the positive regulating genes per stimulation A. According to a pathway-orientated bio-informatical analysis (KEGG-pathway) significant influences of the magnetic exposure showed themselves by the transcription of relevant genes in the pathways *Morbus Alzheimer* (AD), *Chorea Huntington* (HD), *Morbus Parkinson* (PD), vascular smooth muscle contraction, and arachidonic acid metabolism.

The gene expression analysis with RT-qPCR arrays (Alzheimer and neurodegeneration) selected 16 candidate genes, which were validated with the Single-RT-qPCR. Furthermore, 22 pathologically relevant miRNAs were analyzed, showing four miRNAs with significant expression modifications for both stimulation types and three miRNAs only for stimulation A and five only for stimulation B.

By these here researched neural cell clusters, it shows that the successive methods of the cell cultivation over the neuro-physiological (bursts und spikes) and cell biological (morphology) monitoring of the vitality parameters, up to the gene expression analysis, are totally suitable. The results of the expression regulations and the gene interactions confirm the capability of influencing selective genes and miRNAs.

Because of the electro-physiological experiences with MEAs, a pre-selection of new stimulation patterns per variations in frequencies, interval timing, as well as amplitudes of the coil current intensity by means of analysis of the electro-physiological parameters, can now be made. The analysis of the gene expression in connection

with the influencing of neural cell clusters, after an electro-magnetic exposure, using the measuring and comparison methods for the recording of bursts and spikes, represents a meaningful analytic in the area of the molecular neurobiology.

1. Einleitung

1.1 Elektromagnetische Exposition neuronaler Netzwerke

Elektromagnetische Wechselfelder (EMF) sind in der heutigen Zeit ein physikalisch-technisches Basiselement der multimedialen Telekommunikation moderner elektronischer Systeme aller Art. Die Belastung in Form von nicht ionisierender Strahlung aufgrund EMF mit niedrigem Energieniveau – Elektrosmog – ist ein hochaktuelles Problem, dem alle biologischen Organismen, auch bedrohte Spezies, zwangsläufig exponiert sind (Genuis 2008; Balmori 2014; Havas 2017). Die biologischen Beeinflussungen von Lebewesen durch EMF bis auf Zellebene können jedoch auch therapeutische und diagnostische Nutzung erfahren, wie es evident exemplarisch die repetitive Magnetstimulation (rMS) zeigt. Mittlerweile ist die Applikation der rMS zu einem eigenständigen komplexen medizintechnischen Forschungsbereich in Diagnostik und Therapie herangewachsen.

In den letzten 30 Jahren, zu Beginn der 80er Jahre erstmals durch Barker *et al.* (1985) durchgeführt, fand die transkranielle Magnetstimulation (TMS) in der experimentellen Neurophysiologie, der klinischen Diagnostik und der Therapie zentralnervöser Erkrankungen eine immer stärker werdende Applikation bis hin zur aktuellen Etablierung internationaler Leitlinien der therapeutischen Anwendung durch internationale Expertengremien (Wassermann *et al.*, 2001; Ridding *et al.*, 2007; Lefaucheur *et al.*, 2014; Rossini *et al.*, 2015). Jedoch bedarf empirisch durchgeführte Rekonvaleszenz an Patienten differenter pathologischer Erscheinungsformen nach wie vor tieferer elektrophysiologischer und neurologischer Studien sowie Validierungen am Zentralen und Peripheren Nervensystems (Hoogendam *et al.*, 2010). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind die zellulären und molekularen Mechanismen der rMS nicht vollkommen evident. Dies erschwert das Verständnis und die Entwicklung therapeutischer Ansätze durch rMS (Rothwell *et al.*, 2012; Dayan *et al.*, 2013).

Repetitive Transkranielle Magnetstimulation (rTMS) in vivo

Transkranielle Magnetstimulation (TMS) als ein nichtinvasives Werkzeug der elektromagnetischen Stimulation des neuronalen Gewebes, wird als Einzel-, Vielfach- oder repetitiver Impuls, sowie in Form von Impulsmustern oder auch als Theta-Burst-Stimulation in der Neurologie seit mehr als 15 Jahren erfolgreich angewendet (Hoo-

gendam *et al.*, 2010; Dayan *et al.*, 2013) und stellt heutzutage einen festen Bestandteil der routinierten klinischen Diagnostik dar (Chen *et al.*, 2008; Vucic *et al.*, 2013). Großes therapeutisches Potential der rTMS besteht bei Patienten, die an neurologischen, HNO oder psychischen Erkrankungen leiden (Medina und Túnez, 2013; Lefacheur *et al.*, 2014). Die klinischen und therapeutischen Erfolge sind vielversprechend bei den unterschiedlichsten neuropathologischen Krankheitsbildern des Zentralen Nervensystems wie *Morbus Alzheimer* (Rabey *et al.*, 2013), *Morbus Parkinson* (Torres *et al.*, 2015), Motoneuronenerkrankungen (Zanette *et al.*, 2008), Migräne (Lipton *et al.*, 2010), Tinnitus (Kleinjung *et al.*, 2005), Hemiplegie (Khedr *et al.*, 2010), Angst und schwere Depression (Georges *et al.*, 2010; Mantovani *et al.*, 2010, Leuchter *et al.*, 2015) sowie vielen weiteren.

Im Bereich der Depressionsbehandlung liegt jedoch die größte Erfahrung und Praxis der therapeutischen Applikation der rTMS (Gross *et al.*, 2007; Fitzgerald *et al.*, 2012; Carpenter *et al.*, 2012; Conolly *et al.*, 2012; Rossini *et al.*, 2015; Leuchter *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2017). Hierbei spielt die hochfrequente (>1 Hz) rTMS des linken Präfrontalen Cortex eine wichtige Rolle (Gershon *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2012), wobei der Therapieschwerpunkt bei der Mehrzahl der Patienten auf einer 10 Hz Stimulation des linksseitigen dorsolateralen Präfrontalen Cortex repräsentiert ist (Taylor *et al.*, 2017). Höchstwahrscheinlich werden hierbei nicht die gestörten Funktionen synaptischer Verbindungen wiederhergestellt, da vermutlich die Fokalität der rTMS zu unspezifisch auf die neuronalen Netze wirkt (Ridding & Rothwell 2007), sondern vielmehr kommt durch rTMS ein erhöhter Blutfluss, ein erhöhter Glukosemetabolismus sowie eine Anhebung des Neurotransmitterspiegels, Dopamin und Glutamat (Keck *et al.*, 2002; Luborzewski *et al.*, 2007) zustande. Nach diesem Modell verstärkt die rTMS die kompensatorische Fähigkeit des Gehirns (Ridding & Rothwell 2007). Neuere Studien belegen zusätzlich eine Neurogenese zu den antidepressiven Effekten bei kortikaler rTMS (Ueyama *et al.*, 2011). Eine mögliche Beeinflussung der assoziativen und der homöostatischen zerebralen Plastizität, die begleitend einhergehen nach Verletzung und chronischer Krankheit, durch rTMS ist wahrscheinlich. Eine funktionelle und strukturelle Änderung der Plastizität konnte an exzitatorischen postsynaptischen Endungen muriner Hirnschnitte nachgewiesen werden (Vlachos *et al.*, 2012; Lenz *et al.*, 2015). Weitaus bedeutungsvoller ist jedoch die Plastizitätsänderung nach rTMS mit 10 Hz im Bereich der dendritischen inhibierenden Synapsen für die Balance der inhibierenden und exzitatorischen Synapsen (Lenz *et al.*, 2016). Die

Sensitivität und Modulation neuronaler Netze *in vivo* wird durch multiple Faktoren wie die Spulenform, die applizierte Frequenz, die Impulsdauer, die Sequenz, die Signalform und vor allem die Intensität (Amplitude) der rTMS bestimmt (Hoogendam *et al.*, 2010).

Repetitive Magnetstimulation (rMS) in vitro

Die neuronale Signalanalytik vor und nach rMS wird in verschiedensten *in vitro*-Präparaten, wie Gewebeschnitten oder Zellkulturen, routiniert angewendet (Spira *et al.*, 2013).

Zur *in vitro*-Analytik neuronaler Mikro-Schaltkreise, der Physiologie und Pathologie sowie der simultanen Aufzeichnung verschiedenster neuronaler Aktivitätspotentiale und deren Vernetzung, speziell über eine längere Zeitdauer, haben sich MEAs als primäre Methodik bewährt (Stock *et al.*, 2012; Spira *et al.*, 2013). Untersuchungen durch Meyer *et al.*, (2009) zeigten während und im Anschluss an rMS Veränderungen der neuronalen Spontanaktivität in spatio-temporaler Aufzeichnung. Mithilfe einer entwickelten Miniaturspule wurden Änderungen der Aktivität (Bursts, Spikes) neuronaler Monolayer-Zellverbände auf MEA-Technologie induziert und abgeleitet. Es wurden Zellkulturen des Frontalen Cortex und des Rückenmarks durch rechteckförmige Frequenzmuster von 3 bis 100 Hz stimuliert und verglichen. Eine Vitalitätskontrolle perfundierter, neuronaler muriner Zellen auf MEA vor rMS mit anschließender Genexpressionsanalyse fand durch Stock *et al.* (2012) statt. Auch Rotem & Moses (2008) analysierten den Einfluss der elektromagnetischen Stimulation *in vitro* auf periphere Nerven (2006) und auf neuronale Zellkulturen, wobei hier die veränderte zelluläre Aktivität qualitativ über spannungssensitive Ca^{2+} -Färbung erfolgte.

Untersuchungen an Gewebeschnitten werden vor und nach Stimulation zum Großteil mit Messelektrode (z.B. Glas- oder Patchpipette) auf Mikromanipulator zur Erfassung intrazellulärer Signale auf Zellebene durchgeführt. Dies ermöglicht einerseits die Erfassung nahezu aller physiologischen Parameter wie EPSP, IPSP, unterschwellige Potentiale, Membranoszillationen und APs, aber andererseits ist die Aufnahmedauer sehr limitiert und die invasive Mikroelektroden-Technologie negativ zellmanipulierend (Tokay *et al.*, 2009; Vlachos *et al.*, 2012; Spira *et al.*, 2013; Lenz *et al.*, 2015, 2016). Tang und Kollegen (2016) zeigten erstmals eine funktionelle Konnektivitätsstärke (FCS) in neuronalen Hirnschnitten *in vitro* auf MEA. Die FCS des gesamten Netzwerkes im Kurz- sowie im Langzeitbereich stieg bei niederfrequenter rMS (1 Hz) an, fiel

hingegen im hochfrequenten rMS-Bereich (20 Hz) signifikant ab. Jedoch induzierte die 20 Hz-Stimulation Exzitation und die 1 Hz-Stimulation Kurzzeitinhibition. Die Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen der Frequenzabhängigkeit neuronaler Netze nach rMS. Hochfrequente rTMS (> 5 Hz) erhöht über einen kurzen Zeitraum die kortikale neuronale Exzitabilität (Fitzgerald *et al.*, 2006; Leuchter *et al.*, 2015), *vice versa* führt niederfrequente Stimulation (≤ 1 Hz) zu Inhibition (Olivieri *et al.*, 2005; Fierro *et al.*, 2007).

Genexpression nach rTMS

Bis heute ist nur wenig bekannt über die Zellantwort magnetstimulierter neuronaler Zellen, sowohl auf der Ebene der Genexpression als auch auf der Ebene der Signaltransduktion (Stock *et al.*, 2012; Medina und Túnez, 2013; Nardone *et al.*, 2015). Die zerebrale Plastizität steht eng im Zusammenhang mit der Plastizität der Neurone auf Genexpressionsebene. Auf elektromagnetisch evozierte Potentiale generieren im weiteren Neuronen nicht nur electrophysiologische Antworten, sondern sie reagieren mit Veränderungen im Transkriptom (Herdegen & Leah 1998). Immunhistologisch-neurophysiologische Studien zeigten Änderungen der Genexpression einiger ausgewählter Gene wie BDNF-Polymorphismen, c-Fos und zif268 nach rTMS (Mueller *et al.*, 2000, Hausmann *et al.*, 2000, Kudo *et al.*, 2005, Feng *et al.*, 2008) sowie hierbei auch Ähnlichkeiten der rTMS mit elektrokonvulsiver Stimulation (Fujiki & Seward 1997; Lisanby & Belmarker 2000; Cheeran *et al.*, 2008). Hellmann und Kollegen (2012) zeigten eine Aktivierung des cAMP/CREB-Pathways durch rMS mit einer Frequenz von 5 Hz an Neuroblastoma Zellkulturen. Hierbei konnte ein Anstieg des cAMP festgestellt werden, das durch Präinjektion von Ketamin erhöht und durch Lithium reduziert reguliert werden konnte. Sowohl Microarray- als auch qPCR-Analysen wurden bisher zur Darstellung des hochkomplexen Netzwerkes der neuronalen Genexpression sowie zur Quantifizierung ausgewählter Gene (Cooper-Knock *et al.*, 2012) nach Unfällen und neurodegenerativen Krankheiten eingesetzt (Herdegen & Leah 1999, Bolstad *et al.*, 2004, Müller 2008), fanden aber noch keine Applikation zum Evidenz basierten tieferen Verständnis der Zellantwort nach rTMS.

1.2 Kortikale Feldeinkopplung repetitiver Magnetstimulation

Transkranielle repetitive Magnetstimulation (rTMS) ist eine Methode zur schmerzfreien fokalen Gehirnstimulation, die auf Grundlage der induktiven

(elektromagneto-elektrischen) Nervenstimulation basiert. Die hochenergetische Generierung des übertragenden magnetischen Feldes durch das Stimulationsgerät (Magnetstimulator), das kurzzeitige Spannungen und Ströme im Bereich mehrerer Kilovolt und Kiloampere erzeugt, ist einzigartig in seiner Leistungsfähigkeit (Cohen *et al.*, 1990; Jalinous 1991).

Ein Magnetstimulator mit angeschlossener Spule erzeugt ein schnell wechselndes hochenergetisches extrakranielles Magnetfeld, das wiederum im leitenden humanen Gewebe kleine elektrische Ströme induziert. Dieses von der Spule erzeugte Magnetfeld durchdringt hoch resistente Strukturen wie Knochen, Haut und Fett nahezu verlustfrei und ohne zu schädigen. Das induzierte elektrische Feld ist dem Spulenstrom entgegengerichtet und wirkt membranpolarisierend oder depolarisierend auf die darunter befindlichen kortikalen Neuronen (s. Abb. 1). Die Gradientenkomponenten des elektrischen Feldes sind die physikalische Ursache der auftretenden Ströme in den parallel verlaufenden Nervenfasern des Cerebellums (Roth *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu elektrokonvulsiver Stimulation, bei der elektrischer Strom von der Anode zur Kathode fließt, ist die vorherrschende Richtung des Stromes hier radial (Abb. 1). Der höchste Strom tritt hierbei in den parallelen Nervenbahnen auf, in denen die Intensität direkt mit dem Spulenabstand korreliert, und ist dem Gradienten entsprechend bei gekrümmten Bahnen geringer (Hallet *et al.* 2007).

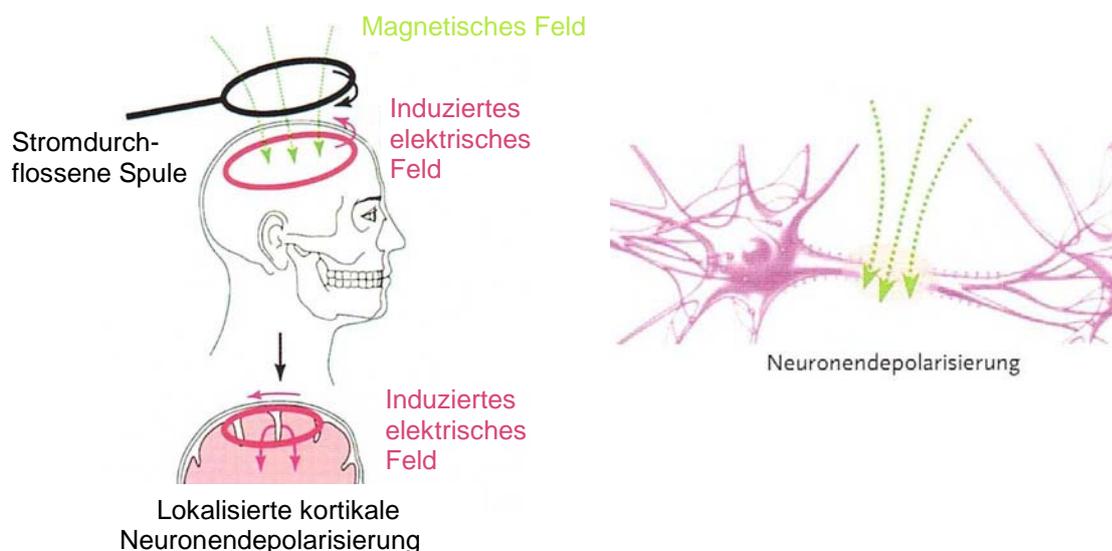


Abb. 1: Das magnetische Feld aufgrund des elektrischen Stromflusses in der Spule induziert ein elektrisches Feld im humanen neuronalen Gewebe (Cerebrum). (modifiziert nach Kienle *et al.*, 2006)

Die physiologische Basis der exzitatorischen und inhibitorischen Phänomene der transkraniellen Magnetstimulation des humanen Motorcortex mit ihren evozierten differentiellen de- und aszendierenden Aktivitätspotentialen sind in Abhängigkeit der Art, der Intensität und Loci messtechnisch erfasst und detailliert beschrieben (Amassian *et al.*, 1987; Di Lazzaro *et al.*, 2004). Die fundamentale neurologische Diagnostik, durchgeführt mit der TMS, sind hierbei die kortikale Stimulation (evozierte Potentiale) und das Erfassen des deszendierenden peripheren Signals mit vorhandener muskulärer Antwort in Form der Elektromyografie (EMG) und physiologisch bedingter temporärer Latenz (Hallet *et al.*, 2007).

1.3 Elektrodynamik

Die Basis der elektromagnetischen Feldeinkopplung in leitendem Gewebe sowie der Berechnung der magnetischen Flussdichte auf Niveau des neuronalen Netzwerkes im Kulturmedium bilden die nachfolgenden Maxwell- und Materialgleichungen.

Grundlage für das Verständnis des Elektromagnetismus stellen die vier Maxwell-Gleichungen, benannt nach dem schottischen Physiker James Clerk Maxwell, dar. Sie beschreiben die klassische Elektrodynamik und bilden die Grundlage der theoretischen Elektrotechnik. Die konsistente Beschreibung des Zusammenhangs zwischen elektrischem und magnetischem Feld liegt in der Kombination und Erweiterung von Durchflutungsgesetz (Ampèresches Gesetz) und Gaußschem Gesetz mit dem Induktionsgesetz (Faraday) sowie der Einführung des nach Maxwell benannten Verschiebungsstromes (Roth *et al.*, 1990; Pendry *et al.*, 2006; Baker 2016).

Die verwendeten Formelzeichen sind zum besseren Verständnis in nachfolgender Tab. 1 zusammengefasst dargestellt.

Tab. 1: Physikalische Symbole und Bedeutung sowie die entsprechenden SI-Einheiten unter Verwendung in den Maxwell-Gleichungen.

Symbol	Physikalische Bedeutung	Int. SI-Einheit
<i>B</i>	Magnetische Flussdichte oder Induktion	T (Tesla) [= Wb/m ² = Vs/m ²]
<i>H</i>	Magnetische Feldstärke	A/m
<i>Φ</i>	Magnetischer Fluss oder Induktionsfluss	Wb (Weber) [= Vs]
<i>μ₀</i>	Permeabilität	Vs/Am
<i>D</i>	Elektrische Flussdichte oder Verschiebungsstrom	C/m ² [= As/m ²]
<i>E</i>	Elektrische Feldstärke	V/m

Q, Ψ	Elektrische Ladung, elektrischer Fluss	C (Coulomb) [= As]
ϵ	Permittivität	C/Vm
j, \mathbf{J}	Stromdichte	A/m ²
ρ	Ladungsdichte	C/m ³
s, A, V	Weg, Fläche, Volumen	m, m ² , m ³

Durchflutungsgesetz - Ampèresches Gesetz

Das Ampèresche Durchflutungsgesetz besagt, dass die magnetische Zirkulation auf einem geschlossenen Weg einer umgrenzten Fläche der Summe aus Verschiebungsfluss und zeitlicher Änderung des elektrischen Flusses durch diese Fläche entspricht.

$$\oint_{dA} \vec{H} \cdot d\vec{s} = \iint_A \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} d\vec{A} + \iint_A \vec{j} d\vec{A} \quad (\text{Integralform})$$

Hieraus postuliert sich die Definition einer Verschiebungsstromdichte D für den Verschiebungsstrom J_V analog dem Betrag der Stromdichte J_I des tatsächlichen Stromes I .

$$\vec{J}_V = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}$$

$$\text{rot } \vec{B} = \mu_0 (J_I + J_V) \quad \text{mit } \vec{H} = \frac{1}{\mu_0} \vec{B} \quad \text{folgt}$$

$$\text{rot } \vec{H} = \vec{j} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (\text{Differentialform})$$

Gaußsches Gesetz

Die Korrelation zwischen Divergenz eines Vektorfeldes und dem durch dieses Feld vorgegebenen elektrischen Flusses D bzw. magnetischen Flusses B durch eine geschlossene Oberfläche ∂V bezeichnet man als Gaußsches Gesetz. Für den Fall der Divergenz gleich Null bezeichnet man das Feld als quellenfrei, für den Fall größer Null existieren Quellen, für den Fall kleiner Null Senken, wobei das physikalische Symbol ρ für die Ladungsdichte steht.

Beim elektrischen \vec{D} -Feld ist der Divergent positiv, somit handelt es sich um ein Quellenfeld. Die elektrische Flussdichte D durch die Oberfläche ∂V eines Volumens V entspricht der elektrischen Ladung im Inneren.

$$\operatorname{div} \vec{D} = \rho \quad \text{oder} \quad \vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \rho \quad (\text{Differentialform})$$

$$\oint_{\partial V} \vec{D} \cdot d\vec{A} = \int_V \rho dV \quad (\text{Integralform})$$

Hingegen ist das magnetische \vec{B} -Feld quellenfrei, da die magnetische Flussdichte B durch die Oberfläche ∂V eines Volumens V der magnetischen Ladung im Inneren entspricht.

$$\operatorname{div} \vec{B} = 0 \quad \text{oder} \quad \vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (\text{Differentialform})$$

$$\oint_{\partial V} \vec{B} \cdot d\vec{A} = 0 \quad (\text{Integralform})$$

Faradaysches Induktionsgesetz

Ein sich änderndes Magnetfeld der magnetischen Flussdichte B (Induktion) bewirkt ein elektrisches Feld E . Diesen Vorgang bezeichnet man als elektromagnetische Induktion oder Faradaysche Induktion.

Die somit entstandene elektrische Spannung wird als Umlaufspannung oder Induktionsspannung bezeichnet und ist dadurch gekennzeichnet, dass geschlossene elektrische Feldlinien in einem sogenannten Wirbelfeld auftreten. Diese Wirbel des elektrischen Feldes ($\operatorname{rot} \vec{E}$) sind direkt von der zeitlichen Änderung der magnetischen Flussdichte B (Induktion) abhängig.

$$\operatorname{rot} \vec{E} + \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} = 0 \quad (\text{Differentialform})$$

$$\vec{\Delta} \times \vec{E} + \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} = 0$$

Die negative zeitliche Änderung des magnetischen Flusses Φ durch eine Fläche A entspricht der elektrischen Zirkulation über dem Rand ∂A einer Fläche A .

$$\oint_{\partial A} \vec{E} \cdot d\vec{s} = - \frac{d}{dt} \int_A \vec{B} \cdot d\vec{A} \quad (\text{Integralform})$$

Materialgleichungen

Die Auswirkungen äußerer elektromagnetischer Felder auf Materie werden durch Verknüpfung der mikroskopischen (Ladungen und Ströme) und makroskopischen

(Mittelung über Ort und Zeit) Maxwell-Gleichungen beschrieben. Es werden die komplexen Zusammenhänge in skalarer Darstellung für isotrope, lineare sowie räumlich und zeitlich homogene Medien, zwischen der elektrischen Flussdichte D und der elektrischen Feldstärke E , der magnetischen Feldstärke H und der magnetischen Flussdichte B sowie der Stromdichte J und der elektrischen Feldstärke E hergestellt. Unter Einbezug der physikalischen Größen wie der Permittivität ϵ , der Permeabilität μ und der elektrischen Leitfähigkeit σ , werden die Materialeigenschaften beschrieben. Diese Größen haben neben der Frequenz-Dispersion (Funktionen der Frequenz der entsprechenden elektromagnetischen Felder) in nicht isotropen Medien eine Tensorfunktion.

Die Ladungen einer Materie werden aufgrund des elektrischen Feldes E in die jeweils entgegengesetzten Ladungen gegeneinander verschoben, wodurch das Feld polarisiert wird. Die Permittivität ϵ beschreibt die Materialabhängigkeit der Polarisation P .

$$\vec{D} = \epsilon_0 \cdot \vec{E} + \vec{P}$$

Die Kraft des elektrischen Feldes bewirkt in elektrischen Leitern einen Fluss von freien Ladungsträgern und somit den Strom I . Hierbei ist die Stromdichte J durch den Leitwert σ als Materialeigenschaft definiert.

$$\vec{J} = \sigma \cdot \vec{E}$$

Die Magnetisierung einer Materie, die aufgrund der Existenz magnetischer Momente magnetisierbar ist, erfolgt durch die äußere magnetische Induktion B in Form der Ausrichtung dieser magnetischen Momente. Die Materialabhängigkeit der Magnetisierung M wird durch die Permeabilität μ festgelegt.

$$\vec{B} = \mu_0(\vec{H} + \vec{M})$$

1.4 Kohärenz neuronaler Zellen

1.4.1 Neuronale Morphologie

Im zentralen sowie im peripheren Nervensystem stellen die Nervenzellen, die Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und Ependymzellen) (Abb. 2) und die

vaskulären Zellen (Endothelzellen und Perizyten), die drei elementaren Zelltypen dar (Allen *et al.*, 2009; Molofsky *et al.*, 2012). Sie unterscheiden sich in ihrem Entwicklungsprozess, Metabolismus, Signalverhalten und der Funktion. Eine ZNS-zellartspezifische Transkriptom-Datenbank wurde mittels RNA-Sequenzierung durch Zhang *et al.*, (2014) (http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html) erstellt.

Nervenzellen

Das Nervensystem besteht aus Milliarden von Nervenzellen (Neuronen) in tausenden unterschiedlichen Variationen und einer Vielzahl von spezifischen Funktionen. Die Differenzierung dieser neuronalen Zellheterogenität stellt heutzutage eine große Herausforderung dar, die möglicherweise mithilfe des 'Single Cell Gene Expression Profiling' (Einzelzell-Genexpression-Analytik) bewältigt werden kann (Poulin *et al.*, 2016).

Tasic *et al.* (2016) klassifizierte mehr als 1600 verschiedene Zellen alleine im Bereich des visuellen primären Cortex adulter Mäuse. Weiterhin wurden 42 verschiedene neuronale Zelltypen, wovon 23 exzitatorische (glutaminerge) und 19 inhibitorische (GABAerge; Gamma-Aminobuttersäure) Zellen waren, identifiziert. Im zerebralen Cortex finden sich überwiegend Pyramidenzellen, die charakteristisch an ihrem pyramidenförmigen Soma sowie den distal verlaufenden basalen und apikalen Dendriten zu erkennen sind (Spruston, 2008).

Nervenzellen stellen die Grundelemente des zentralen (ZNS), aber auch des peripheren Nervensystems (PNS) dar. Ihre außergewöhnlichen Eigenschaften, wie die Fähigkeit der Erzeugung elektrischer Signalmuster und deren Fortleitung oder auch die Weiterleitung eingehender Signale, sind in Betracht anderer Zellarten im humanen Organismus außergewöhnlich. Neuronale Zellen des ZNS verhalten sich jedoch gegenläufig zu denen des PNS. Eine spontane Axonregeneration, wie bei dorsalen Wurzelganglien durch Abrufen eines verletzungsinduzierten transkriptionalen Programmes mit hunderten regenerationsassoziierten Genen ermöglicht, ist *in vivo* im ZNS nicht gegeben. Dulin *et al.* (2015) zeigte jedoch im experimentellen Versuch *in vitro* das kortikospinale Neurone durchaus in der Lage sind, sich zu regenerieren und synaptische Verbindungen auszubilden. Dieses intrinsische Wachstumsprogramm gilt es nun in weiterführenden Studien zu charakterisieren und die Signalpathways zu identifizieren um eine potentielle Regeneration zu amplifizieren.

Murine neuronale Stammzellen (NSCs), als Vorläufer von Nervenzellen, kommen nicht nur im sich entwickelnden Nervensystem, sondern auch in dem des Adulten vor. Die Differenzierung von der totipotenten (nicht selbsterneuernd) über die pluripotente (embryonal, selbsterneuernd) Stammzelle bis hin zum gehirnspezifischen Neuron oder der Gliazelle läuft in Migration hierarchisch ab. Die neuronale Stammzelle kann hierbei neuronales Gewebe generieren, kann Potential zur Selbsterneuerung enthalten oder durch asymmetrische Teilung in die neurogene oder gliogene Phase konvertieren (Gage, 2000; Breunig *et al.*, 2011; Mertens *et al.*, 2016).

Gliazellen

Gliazellen sind kleiner als Nervenzellen und kommen bis zu 10-mal häufiger im Nervengewebe vor. Sie geben den Nervenzellen strukturellen Halt, können ihnen metabolische Substrate liefern, trennen Gruppen von Neuronen und bilden die Myelinscheide bei markhaltigen Nerven (Liu *et al.*, 2015). Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird unter drei wesentlichen Gliatypen, den Mikrogliazellen, den Oligodendrozyten und den Astrozyten, unterschieden (Kettenmann *et al.*, 2016). Es zeigte sich bei neuesten Untersuchungen durch Elsayed *et al.* (2015) eine direkte Korrelation zwischen anormalen Gliazellen aller drei Hauptgruppen und psychischen Gesundheitsstörungen (Mental Disorders) *post mortem*. Cullen (2016) erweitert die Glia um zwei weitere Subkategorien, die adulten neuronalen Stammzellen, die für Lernen und Gedächtnis notwendige juvenile Neurone generieren, sowie die Oligodendrozyten-Progenitorzellen, die für Proliferation und Genese neuer Oligodendrozyten sorgen.

Mikrogliazellen sind Abkömmlinge der Vorläuferzellen (Blutmonozyten), die während der Embryonalentwicklung in das zentrale Nervensystem einwandern. Sie sind morphologisch definitiv terminierbare Zellen, die nach mechanischer, chemischer oder immunologischer Läsion aktiviert werden, eine erhöhte Phagozytoseaktivität aufweisen und eine Vielzahl vasoaktiver bzw. neuroaktiver Zytokine produzieren und ausschütten. Auf diese Weise sind die Mikrogliazellen bei mikroglialer Aktivierung an einer ganzen Reihe von immunologischen Prozessen beteiligt, die aufgrund einer Programmierung eine Umwandlung von der ramifizierten in eine amöboide Form der Zellen sowie einer Erhöhung der Proliferationsrate bewirken (Kettenmann *et al.*, 2016). Diese mikrogliale Migration spielt im Zusammenhang mit dem Komplex der Alzheimer-Demenz-Erkrankung eine gravierende Rolle. Im Tierversuch mit an Alzheimer erkrankten Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei fehlender notwendiger

Mikroglia diese durch periphere einwandernde Makrophagen ersetzt werden. Jedoch zeigten diese Mikroglia ähnlichen Zellen keine erhöhte Aktivität an den Amyloid- β -Zellen (Prokop *et al.*, 2015). Ein weiterer mikroglialer Zusammenhang stellte sich zwischen der Darmflora und dem immunologischen Zustand des ZNS heraus. Kurzkettige Fettsäuren, die bei der bakteriellen Verwertung im Darm entstehen, dienen hierfür als notwendige Botenstoffe, die über das Blut letztendlich ins Gehirn gelangen und dort zusammen mit der Mikroglia inflammatorische Prozesse bekämpfen (Erny *et al.*, 2015).

Die Schwann-Zellen, als klassische neuronale subsidiäre Zellen, unterstützen im peripheren Nervensystem die Bildung der Myelinscheiden (Liu *et al.*, 2015), hingegen übernehmen die Oligodendrozyten im Zentralnervensystem die Markscheidenbildung. Eine Schwann-Zelle ist immer nur einem einzigen Axon zugeordnet, ein Oligodendrozyt hingegen übernimmt die Myelinisierung mehrerer benachbarter Axone (Arancibia-Carcamo *et al.*, 2014). Die Bildung von Myelin durch Oligodendrozyten beinhaltet den Einbau von zwei Hauptproteinen – das basische Myelinprotein sowie ein Proteolipid-Protein – in ausgewählte Bereiche der Plasmamembran. Der genaue Mechanismus dieses Einbaus ist bis heute unklar. Erkrankungen, die mit einer Entmyelinisierung einhergehen, werden häufig mit einem Verlust von Oligodendrozyten assoziiert, so z.B. in späten Stadien der Multiplen Sklerose (Friese *et al.*, 2014). Bei Patienten mit multipler Systematrophie (z. B. olivopontozerebellare Atrophie sowie das Shy-Drager-Syndrom) werden argyrophile zytoplasmatische Einschlüsse in den Oligodendrozyten beschrieben. Eine elektromagnetische Befeldung mit einer Frequenz von 50 Hz zeigte einen Anstieg der Proliferation und der neurotrophischen Genexpression von Schwann-Zellen (Liu *et al.*, 2015).

Der dritte Typ von Gliazellen, die Astrozyten, stellen mit ca. 80 % den größten Anteil der Glia und erscheinen als eine sehr heterogene Population von Zellen, die eine Art Skelett-, Stoffwechsel- und Informationsfunktion für die Neurone besitzen. Die Astrozyten sind aktiv am neuronalen Stoffwechsel beteiligt, insbesondere am Kohlenhydratstoffwechsel, nehmen teil an der Aufnahme ausgeschütteter Neurotransmitter, beteiligen sich an der Bildung, an der Regulation und an der Regeneration der Blut-Hirn-Schranke sowie an der Modulation einer Vielzahl von lokalen Immunreaktionen (Haim *et al.*, 2017). Neuere Untersuchungen deuten auf eine rezeptorabhängige Neuron-Gliakommunikation hin, die auf neuronale Signalkommunikation reagiert und diese unterstützt (Kettenmann *et al.*, 2011, 2016; Cullen *et al.*, 2016). Hierbei spielen

Mikrovesikel (Abb. 2) vermutlich eine gravierende Rolle bei der Interzell-Kommunikation und Regulation des kompletten neuronalen Zellgewebes (Frühbeis *et al.*, 2012). Neuronale Zellen setzen verschiedene Arten von Mikrovesikeln bekannter oder vermuteter Funktionen frei und beeinflussen somit exosomal die synaptische Plastizität.

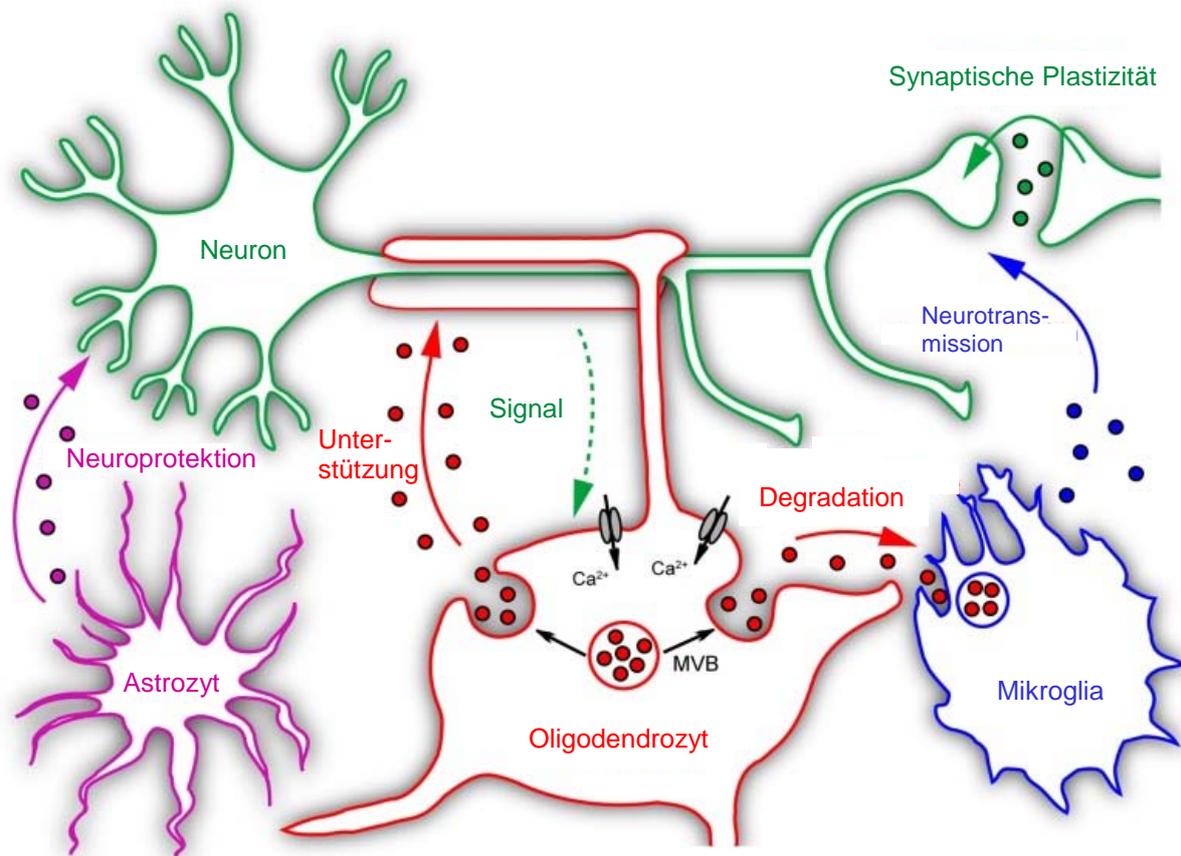


Abb. 2: Partizipation der Mikrovesikel bei der Interzell-Kommunikation und Regulation des neuronalen Zellgewebes. Neuronale Zellen setzen verschiedene Arten von Mikrovesikeln bekannter oder vermuteter Funktionen frei, wobei hierdurch die synaptische Plastizität exosomal beeinflusst wird. Die Neurotransmission wird auf dem Wege der Ablösung von Mikrovesikeln moduliert. Von Astrozyten abgeleitete Exosomen tragen Neuroprotektiva zum Neuron und assistieren somit neuronale Viabilität. Neuronale Signale lösen ein Emittieren von Exosomen der Oligodendrozyten durch intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg aus. Nach neuronaler Rezeption ist eine exosome axonale Assistenz realisierbar. Die Mikroglia absorbiert oligodendriale Exosomen und degradiert diese, ohne ihre inflammatorischen Eigenschaften zu verändern. Unter pathologischen Bedingungen können diese Exosomen-Antigene in die Mikroglia oder andere Antigen präsentierende Zellen (APC) transferieren und inflammatorische Prozesse induzieren; Multivesikuläres Körperchen (MVB). (modifiziert nach Frühbeis *et al.*, 2012)

Die Neurotransmission wird auf dem Wege der Ablösung von Mikrovesikeln moduliert. Von Astrozyten abgeleitete Exosomen tragen Neuroprotektiva zum Neuron und

assistieren somit neuronale Viabilität. Neuronale Signale lösen ein Emittieren von Exosomen der Oligodendrozyten durch intrazellulären CA^{2+} -Anstieg aus. Nach neuronaler Rezeption ist eine exosome axonale Assistenz realisierbar. Die Mikroglia absorbiert oligodendriale Exosomen und degradiert diese ohne ihre inflammatorischen Eigenschaften zu ändern. Unter pathologischen Bedingungen können diese Exosomen Antigene in die Mikroglia oder andere Antigen präsentierende Zellen (APC) transferieren und inflammatorische Prozesse induzieren (Frühbeis *et al.*, 2012). Erstmals wurde von Zhang *et al.* (2016) ein zellartspezifisches molekulares Profiling von Astrozyten des gesunden und pathologischen Cerebrums erstellt und mit Neuronen, Oligodendrozyten, Mikroglia und Ependyzellen verglichen und somit eine transkriptomweite Transformation zwischen Astrozyten-Precursor-Zellen und postmitotischen Astrozyten entdeckt.

Eine fehlerhafte Überreaktion der Mikroglia, wie es bei gleichzeitigem Auftreten von Lipopolysacharid (LPS) und Interferon-Gamma (IFN- γ) im zerebralen Liquor der Fall sein kann, bedeutet durch übernatürlich erhöhtes Freisetzen von Abwehr- und Entzündungsstoffen ein Abtöten benachbarter Nervenzellen. Dies kann möglicherweise mit neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS, wie *Morbus Alzheimer* (AD) oder Multiple Sklerose (MS), assoziiert werden und neue rehabilitative Einflussmöglichkeiten erschließen (Papageorgiou *et al.*, 2016).

Viele Substanzen, die die Kapillaren im Körper verlassen, um in das umliegende Gewebe zu gelangen, sind nicht in der Lage, die Kapillaren des Zentralnervensystems zu durchdringen. Diese "Barriere", Blut-Hirn-Schranke (BBB) genannt, die Separation zwischen ZNS und residualem Korpus, kann jedoch von Sauerstoff, Kohlendioxid, Aminosäuren, selektierten Kohlenhydraten und vielen lipidlöslichen Substanzen, wie gebräuchlichen Anästhetika, überwunden werden. Dagegen sind die meisten höher molekularen Substanzen, die meisten Kohlenhydrate und die meisten an Proteine gebundenen Substanzen hierzu nicht in der Lage. Die pseudopodienartigen Fortsätze der Astrozyten bilden eine äußere Wand, die die Kapillaren umgeben und einhüllen, so dass sie wirksam abgedichtet sind. Weiterhin bilden die Endothelien der Kapillaren im ZNS, im Gegensatz zu allen anderen Kapillaren des Blutgefäßsystems, zwischen den einzelnen Zellen Verschlusskontakte (Tight Junctions) aus (Gertz *et al.*, 2003; Kettenmann *et al.*, 2011, 2016). Die Gliazellen kommunizieren durch parakrine Signale mit den Endothelzellen, treten in physikalische Interaktion und bilden gemeinsam die neurovaskuläre Einheit (Price *et al.*, 2016).

Postnatale Astrozyten bestimmter Gehirnareale können sich aufgrund einer Art Stammzellfunktion bei Bedarf zu Neuronen umwandeln. Diese Differenzierung konnte experimentell *in vitro* bei Astrozytenkulturen nachvollzogen werden. Eine Reprogrammierung der Astrozyten durch Transkriptionsfaktoren (TFs) wie 'mammalian achaete-scute homolog 1' (MASH1), 'LIM homeobox TF 1' (LMX1), 'distal-less homeobox 2' (DLX2) und 'nuclear receptor related 1 protein' (NURR1) führte zu Neuronen, die biochemische und elektrophysiologische Charakteristika, analog dopaminergischer Neuronen des Mittelhirns, aufwiesen. Dies wurde evident an den typisch spontanen synaptischen Strömen mit verlangsamter Signalabfallszeit bereits nach kurzer Zeitdauer visualisiert. Glutaminerge Neurone konnten im Gegenzug durch das Protein Neurogenin 2 (NEUROG2) gesteuert werden. Diese 'Reprogrammierung' stellt einen hoffnungsvollen Versuch zur Rehabilitation nach zerebralem Insult in Opposition zur Zelltransplantation und der Rekrutierung neuronaler Stammzellen aus neurogenen Regionen des adulten Gehirns dar (Chouchane & Costa 2012; Heinrich *et al.*, 2014; Zhida *et al.*, 2014).

Hauptaufgabe der letzten glialen Zellart, den Ependymzellen, ist die Separation des Liquors vom Hirngewebe sowie Generierung der inneren strukturellen Oberfläche des Spinalkanals, des Rückenmarks und der Ventrikel. Aufgrund der auf ihrer Oberfläche existierenden Cilia (Kinozilien) für den Liquortransport sowie zahlreicher Mikrovilli, besitzen sie ein starkes Sekretions- und Absorptionsvermögen (Gertz *et al.*, 2003). Die Kinozilien sind in hochorganisierten Gruppierungen in der Lage einen kontrollierten zerebrospinalen Liquorfluss (CSF) in Form komplexer Strömungsverläufe periodisch zu provozieren um Substanzen und Signalfaktoren gezielt intrakortikal zu distribuieren (Faubel *et al.*, 2016). Dieser durch ciliares 'Klopfen' hervorgerufene ependymiale CSF der multiziliaren Ependymzellen (E1) ist essentiell für die zerebrale Homöostase (Ohata *et al.*, 2016).

1.4.2 Neuronale Kompartimente

Das Neuron besteht funktionell und anatomisch aus drei grundlegenden Einheiten, dem Zellkörper (Soma oder Perikaryon), dem Axon (Neurit) und den Dendriten (Abb. 3).

Im **Soma** befindet sich das Neuroplasma (Zytoplasma der Neurone) mit dem Zellkern (Nukleus), in dem sich das Kernkörperchen, der Nucleolus, befindet. In ihm wird

die Synthese spezifischer Proteine kontrolliert, wobei seine Bestandteile hauptsächlich RNA und Protein sind. Weiterhin sind im Neuroplasma Mitochondrien enthalten, die für den aeroben Metabolismus zuständig sind und als Speicher für Kalziumionen dienen. Die Nissl-Schollen sind eine Ansammlung von rauem (rER) und glattem (sER) endoplasmatischem Retikulum und Polyribosomen. Ebenso sind der Golgi-Apparat, der Proteine enthält, und Lysosomen mit hydrolytischen Enzymen sowie Mikrotubuli, Neuro- und Mikrofilamente vorhanden.

Das **Axon** (Neurit) ist klassischerweise ein neuronaler Fortsatz, der die bioelektrische, biochemische und genetische Information bidirektional zwischen dem Soma und den präsynaptischen Axonenden und somit zu den postsynaptischen Dendriten eines weiteren Neurons leitet. Axone, speziell die des ZNS, sind hochverzweigt und können mehrere hundert Zielneurone kontaktieren. Ein neuronaler Impuls wird im axonalen Initiierungssegment (AIS) (Abb. 7 B, b) im Bereich des Axolemm (Biomembran) des Axon Hillock initiiert und breitet sich Richtung Neurotransmittersynapse aus (Debanne *et al.*, 2011). Untersuchungen durch Ford *et al.* (2015) widerlegen die Annahme, dass Axone gleicher Funktion auch gleicher Struktur sind. Am Beispiel von Axonen der auditorischen Bahnen zeigten sich bei gleicher Neuronenart unterschiedliche Proportionalität der Internodien und damit der Übertragungsgeschwindigkeit, in Abhängigkeit der zu übertragenden Frequenz und dem entsprechendem Zielschaltkreis.

Die **Dendriten** nehmen elektrische Signale auf und leiten in Richtung Soma weiter. Es können sich jedoch Aktionspotentiale im Dendriten grundsätzlich in beide Richtungen extendieren. Bei der Depolarisation einer Nervenzelle breitet sich die elektrische Erregung nicht nur im Axon, sondern als rücklaufendes Aktionspotential auch in den Dendriten aus. Diese Rückkopplung verändert die Empfangseigenschaften der Dendriten und wirkt sich auf das danach eintreffende synaptische Signal aus. Sie führt zu einer stärkeren Kopplung beider Nervenzellen. Ein temporär vor dem synaptischen Signal ausgelöster Impuls führt hingegen zu einer Schwächung der Nervenverbindung. Dieser Mechanismus hat Bedeutung für die neuronale Plastizität.

Dendriten können in vielseitiger Länge und Verzweigung auftreten. Bei Pyramidenzellen sind die Dendriten baumartig verzweigt (Abb. 4) und in relativ kurze basale und längere apikale Dendriten differenziert. Ein längerer apikaler Dendrit, vom Soma distal verlaufend, zeigt nach einer gewissen Distanz eine distale Bifurkation mit büschelartigen Axonenden. Aufgrund der Länge der Dendriten erfolgt eine positive Ska-

lierung der Signalaktivität der Synapsen, was zu lokalen dendritischen Spikes führen kann. Bei gleichzeitigem Auftreten mehrerer Spikes aus den Verzweigungen kann dies zu größeren Spikes führen, die kausal im Soma ein axonales Aktionspotential hervorrufen können (Spruston *et al.*, 2008).

Exzitatorische Präsynaptische Potentiale (EPSP) oder Inhibitorische Postsynaptische Potentiale (IPSP) sind elektrische unterschwellige Potentiale, prä- und postsynaptisch lokalisiert, die bei verschiedensten Konstellationen zwischen Soma, Axon, Dendriten und Dornen (z.B. axo-somatisch, axo-dendritisch, axo-axonal, axo-dornal) auftreten können (Kubota *et al.*, 2016). EPSPs, durch Depolarisation der postsynaptischen Membran ausgelöst, sind einzeln immer unterschwellig und können nur durch Summation mehrerer EPSPs ein Aktionspotential erreichen. IPSPs hingegen hyperpolarisieren die postsynaptische Membran und verhindern dadurch das Auslösen eines Aktionspotentials. Dies kann durch Membran-Hyperpolarisierung oder durch Nebenwiderstand-Kurzschlussstrom postsynaptisch erfolgen (Ferster *et al.*, 1992). Sanchez-Vives *et al.* (2000) beschreiben bei Auftreten von Spontanaktivität depolarisierende exzitatorische Zustände durch pyramidale Zellen des Layer 5, initiiert im Neocortex, und Regulation durch inhibierende Netzwerke in lokalen kortikalen Schaltkreisen.

Im synaptischen Spalt, der **Synapse**, wird die Information über die chemischen Stoffgruppen Neuropeptide, biogene Amine, Aminosäuren und lösliche Gase übertragen. Hierbei spielen Neurotransmitter wie Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin, Gamma-Aminobuttersäure (GABA), Glutamat und Stickoxid (NO) eine gravierende Rolle. In Synapsen der pyramidalen Neurone finden sich hauptsächlich die biogenen Amide Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin (Spruston *et al.*, 2008). Weiterhin wirken viele Neuropeptide als Transmittersubstanz in hemmenden (inhibitorischen) und erregenden (exzitatorischen) Synapsen.

Die kortikal inhibierenden Synapsen der nicht-pyramidalen Interneurone haben größere Strukturvielfalt und Loci als Exzitatorische. Sie unterscheiden sich hierbei durch ihre unabhängige Inhibitionsfunktion und komplexes angepasstes Aktivitätsverhalten auf kortikaler Ebene (Kubota *et al.*, 2016).

Die Erscheinung des Transmitter-Switching, bei dem eine wechselseitige Änderung des exzitatorischen zum inhibitorischen Transmitter oder *vice versa* möglich ist, trat bei Spitzer und Kollegen nicht nur im Entwicklungsstadium, sondern auch im adulten Stadium aufgrund aktivitätsabhängiger Regulation der Transmitterspezifikation oder

neurologischer Pathologie auf. Dies scheint auf den Homöostase-Kreislauf zurückzuführen zu sein, bei dem exzitatorische Stimuli zu Inhibition oder Reduktion der Exzitation führen, während Inhibitorische zu Exzitation und Reduktion der Inhibition führten (Borodinsky *et al.*, 2004; Dulcis *et al.*, 2008, 2009; Spitzer, 2015).

Auf den dendritischen Dornen befinden sich Synapsen (bis zu tausend Synapsen pro Nervenzelle) über die der interzelluläre Informationsaustausch der Nervenzellen erfolgt (Kandel *et al.*, 2014). Die Regulation des Dendritenwachstums und der Reifung der Dorne (Spines) scheint über das Ube3a-Transkript zu erfolgen, wobei diese Regulation vor allem bei der neuronalen Entwicklung sowie bei bestimmten Pathologien (Autismus) eine gravierende Rolle spielt (Valluy *et al.*, 2015). Die Lebenszyklus der Synapsen (ca. 30 Tage) auf dendritischen Dornen im Hippocampus der Maus besteht etwa so lange, wie es dauert, die Information vom Kurzzeitgedächtnis ins Langzeitgedächtnis zu verschieben (Attardo *et al.*, 2015).

In Experimenten mit Mäusen zeigten Chen *et al.* (2015), dass Lernen die Kodierung im Signalfluss zwischen den intrakortikalen Arealen verstärkt. Es erfolgte eine intrakortikale Anpassung und Intensivierung der geforderten Signalwege von S 1 (kortikal somato-sensorisch) auf S 2 (sekundär somato-sensorisch) oder M 2 (primär-motorisch). Dies indiziert die Plastizität des sensorischen und motorischen Cortex durch Lernen.

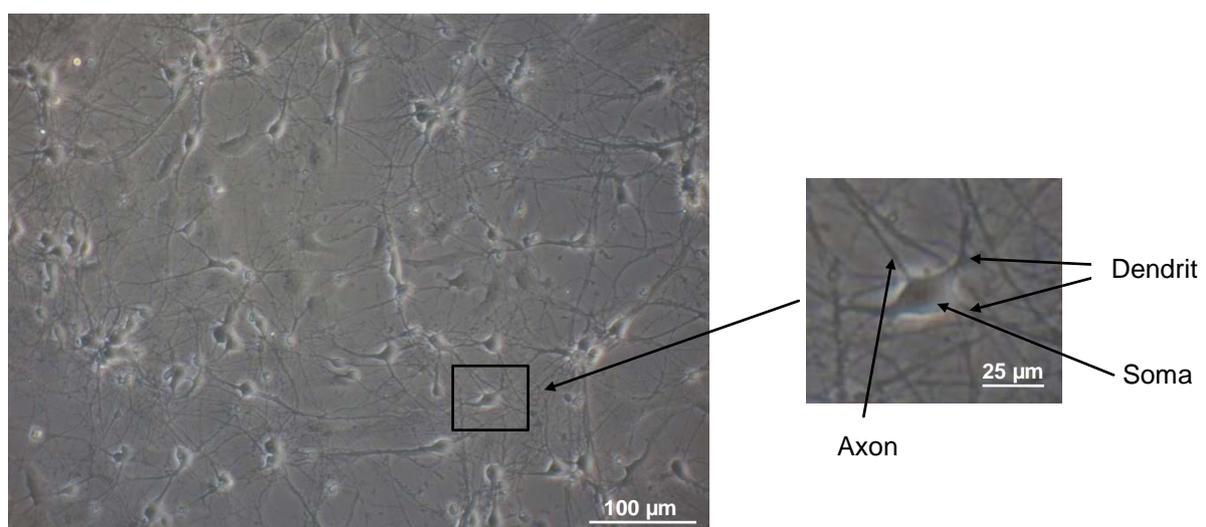


Abb. 3: Neuronales Netzwerk des Frontalen Cortex DIV 21 auf Cover Slip, aufgenommen im inversen Phasenkontrastverfahren, Neurolabor IMETUM, Garching.

1.4.3 Funktionsspezifische Adaptionen

Organ- und destinationsspezifische Aufgaben erfordern adäquate Konstitution und Signalgeneration der Neurone. Exemplarisch, entsprechend ihrer Destination im zentralen, peripheren und vegetativen Nervensystem, sind die Hauptkategorien neuronaler Präsenz als Übersicht in Abb. 4 dargestellt. Es existieren multipolare Neurone, wie das Motoneuron, das neurosekretorische Neuron oder die Pyramidenzellen, die aufgrund ihrer physiologischen Notwendigkeit mehrere Soma-Fortsätze besitzen. Letztere bilden zu 85 % den Neocortex und die Amygdala (Spruston *et al.*, 2008), die residualen 15 % repräsentieren stellare Interneurone (Sternzellen).

Bipolare Zellen hingegen haben zwei Fortsätze des Somas (McCormick *et al.*, 1985), wie die der Retina, die durch ihre Lage in der Retina aufgrund der Informationskodierung und Weiterleitung von den lichtempfindlichen Fotorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) zu den Ganglienzellen notwendig sind. Ein Beispiel für unipolare Neurone stellen die sensorischen Neurone dar, bei denen die Signale an den Dendriten in der Peripherie erfasst und über präsynaptische Axon-Endigungen an das ZNS weitergeleitet werden. Sie besitzen eine notwendige hohe Nervenleitgeschwindigkeit aufgrund ihrer ausgeprägten isolierenden Myelinscheide.

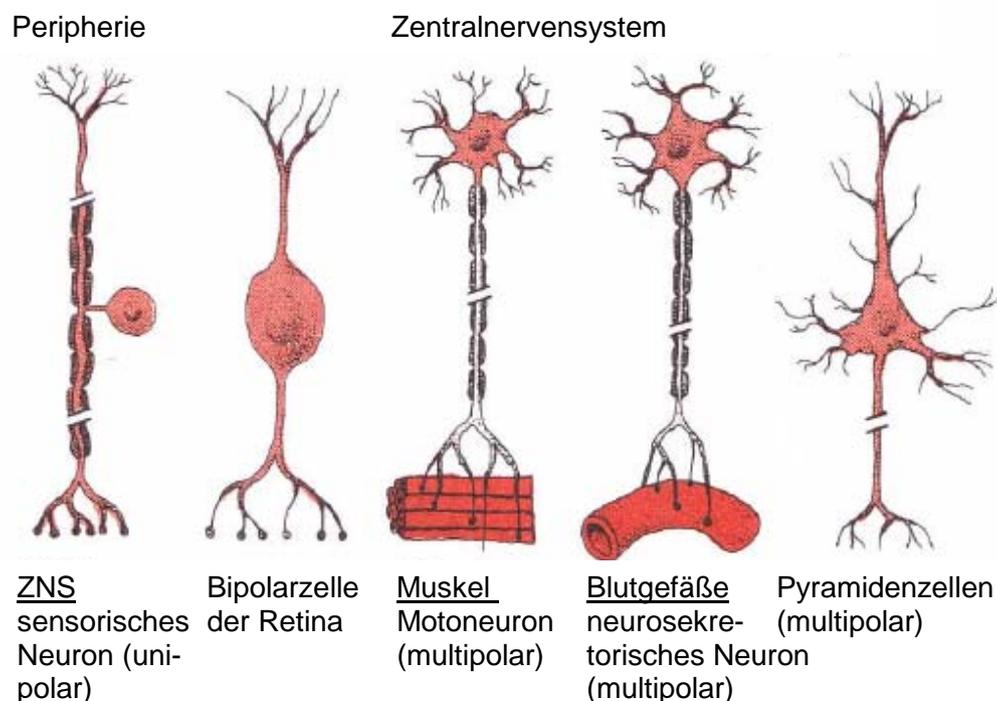


Abb. 4: Destinationsspezifische Variation der neuronalen Zellen im peripheren und zentralen Nervensystem. (modifiziert nach Kandel ER, Schwartz JH, New York, Elsevier 1985:23)

Untersuchungen durch Falkner *et al.* (2016) konnten am Mausmodell nach Transplantation neuronaler Stammzellen aus der Großhirnrinde in adulte neuronale Netzwerke von Pyramidenzellen *in vivo* zeigen, dass die untergegangenen Zellen und deren Funktionen exakt substituiert werden können. Dies impliziert einerseits die Möglichkeit einer zellartspezifischen Genese und andererseits die der adulten Zellregeneration nach neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson als therapeutischer Ansatz.

Die Komplexität und Adaptionfähigkeit des Netzwerkes neuronaler Zellen zeigt sich am deutlichsten an der Fähigkeit des Lernens und des Gedächtnisses. Eric Kandel (Kandel *et al.*, 2014) beschreibt die 'Fähigkeit des Lernens als biologischen Prozess des Aneignens von neuem Wissen über die Umwelt und das Gedächtnis als Prozess des Beibehaltens und der Rekonstruktion dieses erworbenen Wissens im Laufe der Zeit'. Der Lernprozess und das Gedächtnis modulieren und modifizieren einzelne Neurone und molekulare Signalwege in Anatomie und Funktion (neuronale Plastizität). Langzeitspeicherung von Information beinhaltet Transkription im Nukleus und strukturelle Änderungen in den Synapsen (Alberini *et al.*, 2014; Kandel *et al.*, 2014; Bailey *et al.*, 2015). Spruston und Kollegen (2008) beschreiben die synaptische Plastizität durch Modulatoren auf dendritischen Synapsen neokortikaler pyramidaler Neurone. Die Addition von EPSP und Aktionspotential erzeugt Potenzierung der Synapsen auf proximalen basalen Dendriten. Diese Konvention wird als Spike-Zeit-abhängige Plastizität (STDP), eine Form der Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD), bezeichnet.

Puthanveetil und Kollegen (2008) definieren die langanhaltende synaptische Plastizität als programmierte Lernantwort, bei der hochregulierte Transkription sowie lokale Proteinsynthese und ein molekularer Transport die wesentlichen Elemente darstellen. Hochreguliertes Kinesin transportiert Proteinladungen in prä- und postsynaptische Neuronen und dient initiiierend für LTP und LTD, während für die Kontinuität RNA-Ladungen verwendet werden (Puthanveetil *et al.*, 2008; Bailey *et al.*, 2015).

Epigenetische Regulationen, wie diverse Arten von Chromatin-Änderungen und das Hinzufügen oder Reduzieren von Acetylgruppen zu Histonen mittels Histon-Acetyltransferase (HAT) oder Histon-Deacetylase (HDAC), sind kausal für die Histonwindung um die DNA verantwortlich, die die Genexpression direkt manipulieren (Alberini *et al.*, 2014).

Transkriptionsfaktoren wie 'cAMP response element binding protein' (CREB) (Hellmann *et al.*, 2012), 'CCAAT enhancer binding protein' (C/EBP), 'early growth response factor' (Egr), 'activating protein 1' (AP-1) und 'Rel/nuclear factor kB' (Rel/NF-kB) sind die wesentlichen Elemente der hochregulativen Prozesse synaptischer Plastizität und Gedächtnisbildung (Alberini, 2009).

1.4.4 Membran Habitus – Neuronale Exzitation

Membran-Ruhepotential

Die neuronale Membran besteht aus einer Doppelschicht von Phospholipiden und separiert hierdurch den intrazellulären vom extrazellulären Bereich. In der Membran eingelagert befinden sich unter anderem selektive spannungsgesteuerte Ionenkanäle (Voltage gated Ion Channels) und Na⁺/K⁺-Pumpen über die Großteils der Ladungsaustausch durch die isolierende Lipiddoppelschicht ermöglicht wird. Die Verteilung der freien Ionen wie Na⁺, K⁺, Cl⁻ im Intra- und Extrazellulärraum erfolgt anhand des Konzentrationsgradienten (Diffusionspotential) und des elektrostatischen Gradienten (elektrisches Potential). Im Intrazellulärraum befinden sich hauptsächlich Kaliumionen K⁺ und organische Anionen (Aminosäuren) A⁻ hingegen im Extrazellulärraum Na⁺- und Cl⁻-Ionen. Die Steuerung der selektiv permeablen Ionenkanäle, die entweder offen, geschlossen oder dauer geöffnet sind, erfolgt chemisch, mechanisch oder spannungsabhängig. Aufgrund der ungleichmäßigen Ladungsverteilung an den Oberflächen der Membran-Innen- und Außenseite sowie einer erhöhten Permeabilität für Kaliumionen K⁺ im Ruhezustand, entsteht eine Potentialdifferenz, das sogenannte Ruhemembran-Potential (RMP). In Abhängigkeit des Nervenzelltyps schwankt dieses RMP zwischen -60 mV bis -90 mV. Im Gesamtsystem sind die Ionenkonzentrationen im RMP intra- sowie extrazellulär gleich. Das Gleichgewichtspotential für eine bestimmte Ionensorte ist durch das Gleichgewicht zwischen elektrischem Gradienten und Konzentrationsgradienten in Form der *Nernst-Gleichung* nach Hodgkin & Huxley (1952 a) wie folgt definiert.

$$E_m (mV) = -61 \log \frac{c_i}{c_o} \quad \text{mit } E_m = \text{transmembranöses elektrisches Potential;}$$

$c_{i/o}$ = intra-/extrazelläre Konzentration

Erregungsvorgänge in der Nervenmembran werden durch Änderungen in der Membranleitfähigkeit für spezifische Ionen hervorgerufen. Da die Membran für Natrium- und Kalziumionen permeabel ist, liegt das Membranpotential zwischen den beiden Gleichgewichtspotentialen (Na^+ und K^+), und der Wert hängt von den relativen Permeabilitäten für Na^+ und K^+ ab. Somit wird das RMP unter diesen Voraussetzungen durch die nachfolgende *Goldmann-Gleichung* beschrieben (Hodgkin & Huxley, 1952 a).

$$E_m \text{ (mV)} = -61 \log \frac{P_K \cdot K_i + P_{Na} \cdot Na_i}{P_K \cdot K_o + P_{Na} \cdot Na_o} \quad \text{mit } P_{K/Na} = \text{Permeabilitätskonstante für } \text{K}^+/\text{Na}^+$$

Da die Zellmembran die elektrischen Eigenschaften, wie das Speichern elektrischer Ladung, eines Kondensators besitzt, kann sie in einem elektrischen Ersatzschaltbild vereinfacht als Kapazität C_M dargestellt werden. Die Ionenkanäle begrenzen durch Ihre Größe und Ladung die Ionenbewegung und bilden somit die elektrischen Widerstände R_{Na} , R_K und R_L und die Ladungsspeicher U_{Na} , U_K und U_L . Der Natrium- und Kaliumzweig ist in Abhängigkeit vom Membranpotential und der Zeit repräsentiert durch seinen veränderlichen Widerstand in Serie zu einem ionenspezifischen Nernst-Gleichgewichtspotential (Spannungsquelle). Die Na^+ - und K^+ -Ionenpumpen (I_{Na} , I_K), die ionenspezifischen Leckströme I_{LNa} und I_{LK} (Ruhemembran-Kanäle) sowie der Chlorid-Ionenkanal sind ersatzweise zu dem Widerstand R_L und der Spannungsquelle U_L zusammengefasst (Hodgkin & Huxley, 1952 b).

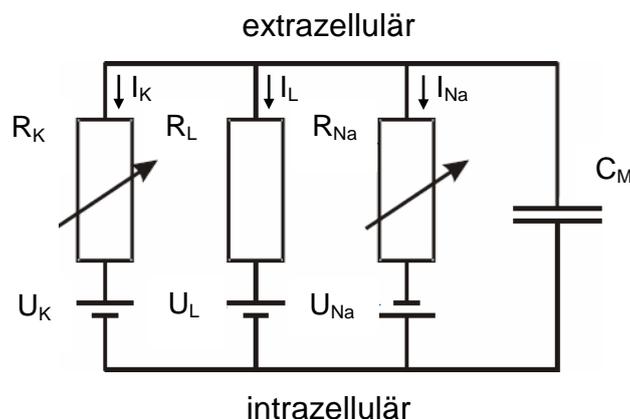


Abb. 5: Zusammenhang zwischen der Membran-Stromdichte und der Membranspannung in Abhängigkeit von Zeit und dem aktuellen Membranpotential, dargestellt als Ersatzschaltbild im Hodgkin & Huxley Modell. (modifiziert nach Hodgkin & Huxley, 1952 b)

Dieser Zusammenhang zwischen der Membran-Stromdichte und der Membranspannung wird im Hodgkin-Huxley Modell (Abb. 5) als aktives Ersatzschaltbild dargestellt. In Abhängigkeit vom momentanen Membranpotential und der Zeit öffnen sich die spannungsabhängigen Ionenkanäle für Na^+ und K^+ . Sie sind dominant, da durch ihr Öffnen jeweils ein zusätzliches Nernst-Potential aktiv wird.

Aktionspotential

Als Aktionspotential wird ein kurzzeitiges Anheben des Ruhemembran-Potentials in positiver Richtung (Depolarisation) mit Überschreiten der Membranschwelle, das zu einer schlagartigen weiteren Depolarisation, die den Nullwert des Membranpotentials übersteigt und innerhalb kürzester Zeitdauer revidiert, bezeichnet.

Diese Depolarisation initiiert kaskadenartig Öffnungs- und Schließungsvorgänge von spannungssensitiven Ionenkanälen, die sich distal des Somas konstant fortpflanzen und somit einen transmembranösen Ionenstrom hervorrufen. Ein depolarisierender Reiz kann nur entstehen, wenn nach dem digitalen Prinzip die Reizschwelle überschritten wird. Bleibt ein Reiz unterschwellig, kommt es zu keiner fortlaufenden Ausbreitung. Hierbei ist die Höhe der Überschreitung des überschwelligen Reizes nicht von Bedeutung und es kommt zu einem gleichförmigen Aktionspotential.

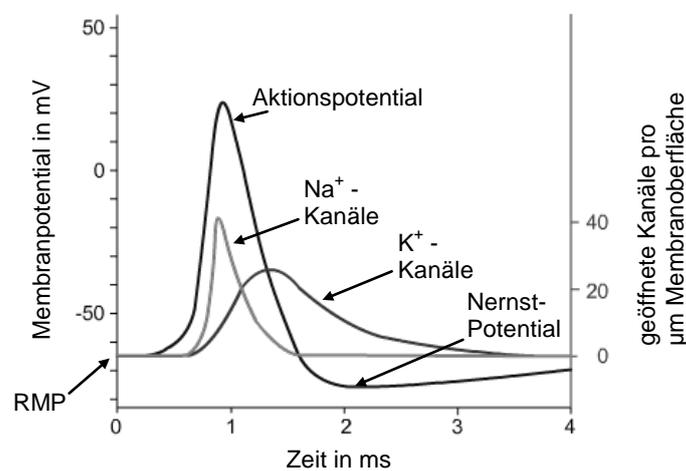


Abb. 6: Darstellung des Spannungsverlaufs eines Membran-Aktionspotentials mit dem MRP von -65 mV bei einer maximalen Amplitude von 90 mV und den Öffnungszuständen der transmembranösen Na^+ - und K^+ -Kanäle. (modifiziert nach Hodgkin & Huxley, 1952 b)

In der ersten der vier Phasen des Aktionspotentials, der Initiationsphase (0,3 bis 0,6 ms), wird das Membranpotential durch einen Reiz bis zum Schwellenpotential angehoben. Dieser Reiz kann durch elektrotone Weiterleitung eines fortlaufenden Aktionspotentials eines benachbarten Membranabschnittes, durch ein angelegtes elek-

tromagnetisches Feld (singuläre oder repetitive Magnetstimulation) oder durch postsynaptische Öffnung von Ionenkanälen aufgrund der elektrochemischen synaptischen Neurotransmission entstehen. In der Depolarisationsphase steigt das Potential bis in den positiven Bereich der Membranspannung zum Maximalwert und es kommt zur Reizweiterleitung. Die Repolarisationsphase (1 bis 1,5 ms) beginnt mit dem Abfallen des Potentials in Richtung Ruhepotential. Die letzte Phase wird als Hyperpolarisationsphase (ab ca. 1,5 ms) bezeichnet. Sie beginnt mit Unterschreiten der Membranspannung nach der Repolarisierung unter das Ruhemembranpotential (RMP) bis zu dem Zeitpunkt, an dem das RMP wieder erreicht wird (Abb. 6).

Die Anstiegsphase des Aktionspotentials kommt physiologisch hauptsächlich durch den Einstrom von schnellen Na^+ -Ionen zustande, während die Repolarisation hauptsächlich durch den langsameren K^+ -Ionenausstrom verursacht wird. In Abbildung 6 sind ein temporärer Unterschied der maximalen Öffnungszeitpunkte sowie die unterschiedlichen Spannungsamplituden der Ionenkanäle ersichtlich. Dies bewiesen Hodgkin und Huxley (1952) in pharmakologischen und kinetischen Experimenten, die unterschiedliche Na^+ - und K^+ -Membrankanäle nachwies. Nachdem Schließen der Na^+ -Kanäle bleiben diese noch für eine kurze Zeit von 0,5 bis 1 ms, die sogenannte absolute Refraktärzeit oder Refraktärperiode, inaktiviert und es können keine weiteren Aktionspotentiale innerhalb dieser Zeitspanne ausgelöst werden. Anschließend ist grundsätzlich wieder die Möglichkeit gegeben ein Aktionspotential zu generieren, das jedoch in einem Zeitintervall von 0,5 bis 2 ms (relative Refraktärperiode) nur eine submaximale Amplitude aufweisen kann. Somit begrenzt die absolute Refraktärzeit die mögliche Frequenz der Aktionspotentiale über ein Axon auf 500 bis 1000 Potentiale pro Sekunde. Ein Aktionspotential wird auch als Spike bezeichnet.

Neurone des zentralen Nervensystems weisen häufig kein konstantes RMP auf, sondern generieren spontan Aktionspotentiale zweierlei unterschiedlicher Muster. Dies kann eine regelmäßige Aktivität oder eine unregelmäßige sogenannte gruppierte Bursting-Aktivität, bei der schnell aufeinander mehrere Spikes folgen, sein.

1.4.5 Nervale Signaltransduktion

Die Axone des sensorischen, motorischen oder neurosekretorischen Neuron (Abb. 4) sind von einer lipidhaltigen weißen Substanz umgeben, der Myelinschicht (Abb. 7 A).

Diese wird, wie bereits zuvor erwähnt, im ZNS von Oligodendrozyten gebildet und im PNS von Schwann-Zellen übernommen (Simons *et al.*, 2015).

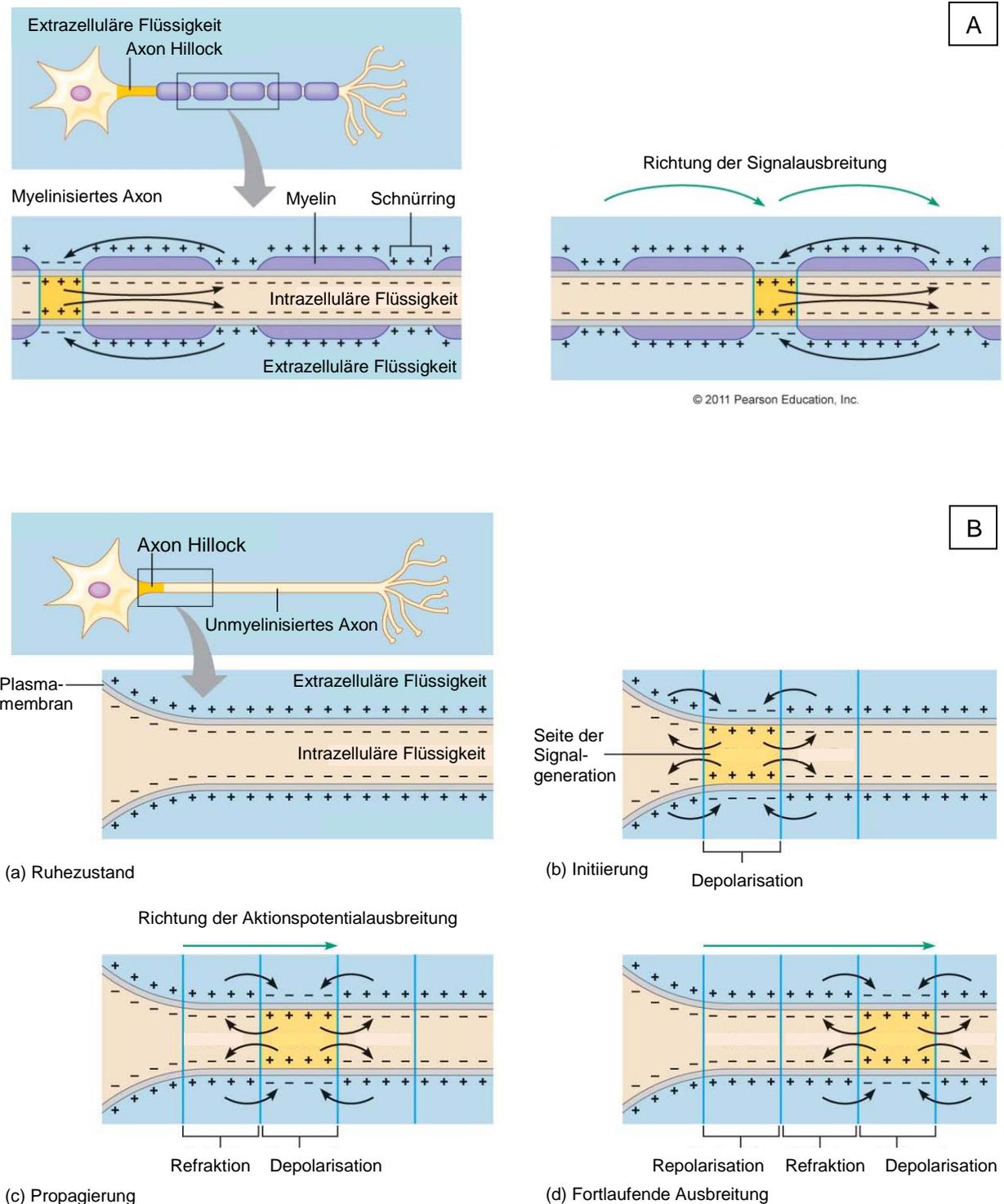


Abb. 7: Elektrische Erregungsleitung myelinisierter (A) und nicht myelinisierter Axone (B); A: Saltatorische Erregungsleitung mit sprunghafter Depolarisierung an den Ranvierschen Schnürringen in Richtung distal des Perikaryons; B: Im Bereich des Axon Hillock (a) beginnt eine Depolarisationszone (b) distal zu wandern, die proximal eine Refraktärzone (c) und an-

schließlich eine Repolarisation (d) zum ursprünglichen Ruhezustand nach sich zieht. (mod. nach Pearson Education Inc. © 2011)

Jede Schwann-Zelle ist mit einem Axon verbunden und umhüllt dieses als singuläres Myelinsegment mit einer maximalen Länge bis zu einem Millimeter. Mehrere Segmente aneinander gereiht isolieren die Schwann-Zellen den 'elektrischen Leiter', das Axon, das selbst eine Länge von weniger als einem Millimeter bis zu einem Meter, je nach Lokus und Funktion, erreichen kann (Debanne *et al.*, 2011).

Zwischen den einzelnen Schwann-Zellen (Internodien) befinden sich die Ranvierschen Schnürringe (Abb. 7 A), die das Axon direkt mit dem Extrazellulär-Raum in Kontakt treten lassen. Es erfolgt im Falle des Auslösens eines Aktionspotentials in der Nervenzelle (AIS) ein sprunghaftes Depolarisieren (saltatorische Erregungsleitung) von einem Ranvierschen Schnürring zum nächsten. Die Schnelligkeit der Fortleitung eines Nervenimpulses ist abhängig von der Schichtdicke dieser Myelinschicht. Das bedeutet, je stärker diese ist, umso höher ist ihre Nervenleitgeschwindigkeit. Im ZNS wird die Funktion der Myelinscheide durch die Oligodendrozyten übernommen. Ein Oligodendrozyt kann das Myelin für mehrere zentrale Axone bilden (Arancibia-Carcamo *et al.*, 2014).

Im Gegensatz hierzu sind die marklosen Axone (ohne Myelinschicht) (Abb. 7 B), wie es bei den Pyramidenzellen des ZNS oder den Zellen der Retina der Fall ist, daher besonders langsam leitend, da ihnen die dicke, elektrisch isolierende Myelinschicht fehlt und sie nur von einer dünnen Glia-schicht umhüllt sind. Es beginnt ausgehend vom Soma im Bereich des Axon Hillock eine Depolarisationszone, die AIS, distal zu wandern, die proximal eine Refraktärzone und anschließend eine Repolarisation zum ursprünglichen Ruhezustand nach sich zieht (Abb. 7 B). Die Länge und Position der AIS im Abstand zum Soma sind veränderbar und werden als homöostatische axonale Plastizität beschrieben (Debanne *et al.*, 2011).

Die Dendriten enden in den Synapsen, die das Übertragungselement zum Soma, Dendrit oder Axon anderer Neurone darstellen. Hierbei sind deren Ausprägung (Verfeinerung) abhängig von der Aktivität (assoziative Plastizität) und deren multiples Erscheinungsbild von der synaptischen Stärke (homöostatische Plastizität). Diese grundlegenden Mechanismen sind repräsentativ für neuronale Netzwerkfunktion und adaptives Verhaltens (Kuhn *et al.*, 2016).

1.5 Zellanalytik mit Multielektroden-Array – MEA

Das Verständnis neuronaler Netzwerke im gesunden und pathologischen Organismus erfordert eine kontinuierliche und simultane Aufnahme möglichst vieler neuronaler Aktionspotentiale. Dieses Erfassen der physiologischen und funktionalen Konnektivität stellt eine große Herausforderung in der Entwicklung der Neurotechnologie dar (Ito *et al.*, 2014; Maccione *et al.*, 2015).

MEAs werden zur Messung und Stimulation der neuronalen Aktivität *in vivo* und *in vitro* eingesetzt. Sie dienen der Grundlagenforschung (Johnstone *et al.*, 2010), den Neurowissenschaften (Akhtar *et al.*, 2016) und Neurotechnologien (Odawara *et al.*, 2016) der Kardiologie (Hernández *et al.*, 2016; Takasuna *et al.*, 2017), der Implantologie (Obien *et al.*, 2015; Fekete & Pongrácz, 2017) der Pharmakologie (Mathur *et al.*, 2015) und zunehmend dem Bereich der industriellen Forschung (Shaban *et al.*, 2017).

Vielversprechendes Potential bei der Beobachtung oder Stimulation des humanen Gehirns *in vivo* stellen implantierbare MEAs dar. Hierbei werden MEAs in entsprechende Hirnregionen implantiert und dienen der Überwachung, Stimulation und Interaktion neuronaler Aktivität. Aber auch die Implantation als Schnittstelle zwischen Mensch und Maschine bei Lähmungen oder Amputationen eröffnet ein weitreichendes Spektrum in der Rehabilitation (Obien *et al.*, 2015).

Der Schwerpunkt der MEA-Anwendung liegt jedoch *in vitro*. Alternativ werden Zellkulturen oder Gewebeschnitte bezüglich ihres Signalverhaltens mit oder ohne elektrische oder chemische Stimulation untersucht (Spira *et al.*, 2012). Neuronale Signalaktivität auf MEAs *in vitro* wird äußerst schonend ohne Perturbation durch Afferenz oder Efferenz des umgebenden Organismus *in vivo* erfasst (Bikbaev *et al.*, 2015; Matsuura *et al.*, 2016).

Die Verwendung von MEAs als Bio- oder Forschungssensor zum Screening verschiedener pharmakologischer und toxikologischer Substanzen anhand evaluierten neuronalen Signalverhaltens eröffnet eine weit verbreitete validierte Analysemethodik und Applikation (Gross *et al.*, 1997 und 1995; Selinger *et al.*, 2003; Johnstone *et al.*, 2010; Odawara *et al.*, 2014). Odawara *et al.* (2016) gelangen es, Spontanaktivität und pharmakologische Antwort bei iPSC abgeleiteten Neuronen auf MEA nach über einem Jahr Kulturzeit zu erhalten. Vor allem in der Pharmaindustrie hat dieser 'low cost'- und 'high contact'-Charakter zu pathologischen und patientenspezifischen MEA-Zellkulturen (High-Throughput Plattformen) als kostensenkende Testsysteme

geführt (Johnstone *et al.* 2010; Mathur *et al.*, 2015). Aber auch im Bereich der Lebensmittelindustrie zur Untersuchung neuer neuroaktiver Substrate, wie die Hormone Ghrelin und Leptin, als Appetitmodulatoren, die im Bereich des Hypothalamus, Hippocampus und der Amygdala vorkommen, finden MEAs Verwendung (Shaban *et al.*, 2017).

1.5.1 Mikrotechnologische Entwicklung

Seit den ersten Arbeiten *in vitro* mit planaren Elektroden von Thomas *et al.* (1972) und den ersten erfolgreichen 'recordings' neuronaler Spontanaktivität von Rückenmarkszellen auf Mikroelektroden-Chips durch Gross *et al.* (1977 und 1982), hat die technologische Entwicklung einen Punkt erreicht, an dem die standardisierte elektro-physiologische Beobachtung der inter- und intrazellulären Vorgänge neuronaler Netzwerke bei Säuger-Nervenzellen routiniert möglich ist (Johnstone *et al.*, 2010; Massobrio *et al.*, 2015). In fortlaufenden Weiterentwicklungen haben sich kommerziell erhältliche Indium-Titanoxid (ITO) oder goldbeschichtete Glasträger (Goldschicht zur Impedanzreduktion), wie beispielsweise im Center for Network Neuroscience (CNNS, Dallas, USA) gefertigt, bewährt. Diese MEAs werden standardisiert photolithographisch strukturiert, mit Polysiloxan elektrisch und chemisch isoliert, und anschließend mittels eines Laserstrahls die Isolation über den Elektroden wieder geöffnet und die freiliegenden ITO-Elektroden-Spots goldbeschichtet (Abb. 8 C u. D) (Gross *et al.*, 1982, 1985; Huang & O'Mahony 2009). In der Basisausführung mit 64 Elektroden ist das CNNS-System mit Einfach- oder Doppelkammer in der Lage, 256 Neuronen simultan aufzunehmen und mittels MEA-Software (Plexon Inc., Dallas, Texas) darzustellen, sowie Online zu verarbeiten. Eine kontrollierte Perfusion der beheizbaren Kammern auf MEA zur Langzeitkultivierung ist gegeben, sowie Injektionsadapter zur Substanzzugabe vorhanden (Abb. 8 A) (Gross & Schwalm 1994; Massobrio *et al.*, 2015). Die Alternative, einzelne MEA Elektroden als Stimulationselektroden zu verwenden, um so evozierte Potentiale lokal zu generieren und Gewebereaktionen, wie mögliche synaptische Plastizität, zu registrieren und zu analysieren, ist gegeben (Gross *et al.*, 1993; Odawara *et al.*, 2014; Massobrio *et al.*, 2015). Eine visuelle Kontrolle und Beobachtung des Zellverhaltens durch Phasenkontrast- oder Differenzmikroskopie zur Darstellung der Zellstrukturen und Vernetzungen ist anwendbar, da die Glasträger mit transparentem Lack überzogen optisch durchgängig

sind (Gross *et al.*, 1994; Abb. 8 B). Diese Technologie der extrazellulären Ableitelektroden, die sich außerhalb der Zellen auf Glaträgern (Abb. 8 A) befinden und die neuronale Spike und Burst Aktivität (Potentialänderungen) mit einem hohen Grad an spatialer und temporaler Auflösung registrieren, findet auch bei anderen MEA-System-Herstellern wie Multichannel, Reutlingen, Deutschland (Mahmud & Vassanelli, 2016), oder Alpha MED Scientific, Osaka, Japan (Odawara *et al.*, 2016), und weiteren Verwendung.

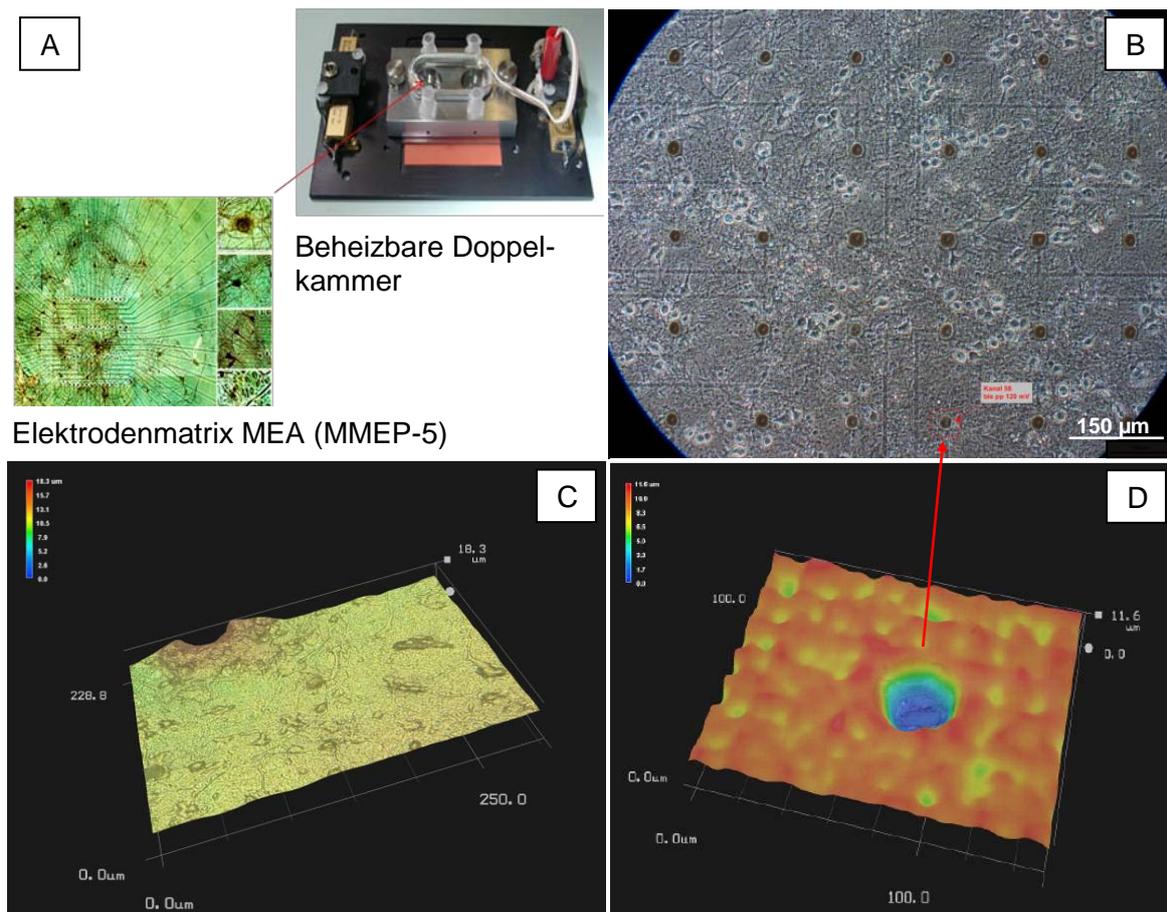


Abb. 8: A: Beheizbare Doppelkammer des CNNS, Denton, Texas, mit vergrößerter Elektroden-Matrix; B: Multielektroden Array mit 30 der insgesamt 64 Elektroden sowie Zuleitungen, überwachsen mit neuronaler Zellkultur DIV 42, aufgenommen mit Eclipse TE 2000-W, Nikon, Japan, im IMETUM, Garching; C, D: Tiefenscharfe Elektrodendarstellung der Oberflächentopografie in 3D eines MEA des CNNS durch Schichtaufnahmen (z-Stapel der Fokusebenen) mit anschließender Zusammenführung (Berechnung), angefertigt mit Auflichtmikroskop VHX-5000, Keyence, Japan, IMETUM, Garching.

Eine Weiterentwicklung der 64- oder 128-Kanal-MEAs zeigten Litke *et al.* (2004), basierend auf der Entwicklung von Silikon Streifenleitung (Microstrip) Detektoren, mit einem 512-Kanal MEA und simultaner Signalverstärkung. Ein Large-Scale-Array-

Recording-Chip mit 4096 simultanen Elektroden ermöglicht unter Erfassung spatialer und temporaler Signalaktivität neuronaler Netze ein High-Resolution electrophysiological Imaging. Planare Netzwerk-Signalausbreitung koordinierter Spontanaktivität kann hierbei erfasst und als funktionales Imaging visualisiert werden (Ferrea *et al.*, 2012; Maccione *et al.*, 2015). Neueste hochauflösende MEAs (HDMEAs) mit über 25.000 Aufnahme- und Stimulationselektroden sind in spezieller CMOS-Technologie erhältlich und eröffnen so neue Möglichkeiten, die Komplexität neuronaler Netzwerke von subzellulärer Ebene (Mikronagelektroden) bis auf Netzwerkebene zu entschlüsseln (Huys *et al.*, 2012; Obien *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2015).

Im Kontrast zur MEA-Technologie fokussiert sich die Technik der Mikromanipulatoren mit Sharp- oder Patch-Mikroelektroden alternativ auf die Untersuchung von Ionenkanälen, Membranpotentialen und selektierten Aktionspotentialen auf zellulärer Ebene (intrazellulär) neuronaler Netzwerke. Diese invasive Applikation wird durch mechanische und biophysikalische Instabilitäten und besonders temporale Faktoren limitiert (Spira *et al.*, 2013). Es bedeutet erhöhten Stress für die injizierte Nervenzelle und das umliegende Netzwerk sowie Zerstörung der neuronalen Strukturen durch invasives Penetrieren der Zellmembran mittels einer oder mehrerer Glasmikroelektroden.

1.5.2 Neuronales Gewebe auf MEA

Neuronale Zellkulturen

In den letzten drei Jahrzehnten stieg die Zahl der Studien neuronaler Zellen, die erfolgreich als Monolayer-Kulturen *in vitro* wachsen, stetig (Spira *et al.*, 2013). In solchen Kulturen reifen die dissoziierten Zellen auf MEA in einer Kulturschale heran, bilden Ausläufer mit Synapsen und erzeugen auf diese Weise neuronale Netzwerke, ohne der permanenten reziproken Beeinflussung des Organismus *in vivo* zu unterliegen (Bikbaev *et al.*, 2015; Matsumura *et al.*, 2016).

Das Wachstum muriner neuronaler Netzwerke auf Trägern mit dicht gepackten Mikroelektroden-Arrays (MEA-Neurochips, Abb. 8 B) liefert Zellkulturen, die kontinuierliche und Langzeit-Aufzeichnungen bis maximal acht Monate (Gross *et al.*, 1993) *in vitro* liefern und explizite interzelluläre und indirekte intrazelluläre Beobachtung (Spira *et al.*, 2013) der Signalkommunikation neuronaler Zellen Gehirnregion-spezifischer neuronaler Netzwerke ermöglichen. Zur Erhöhung der aufgenommenen Signalamplitude neuronaler Netzwerke konnte durch eine elektrisch isolierende Zellschicht aus

Gliazellen direkt auf dem MEA, wie in unseren Versuchen bereits angewendet, eine bis zu 6-fache Erhöhung nachgewiesen werden (Matsumura *et al.*, 2016).

Alternativ zu murinen neuronalen Zellen bietet sich die Möglichkeit, aus humanen pluripotenten Stammzellen (hiPSCs), genetisch pathologiemiodeliert gewonnene Neurone auf MEAs zu kultivieren und die neuronale Aktivität zu registrieren (Kraushaar *et al.*, 2017). Von der Einzelzelle bis zum neuronalen Netzwerk können so vom gesunden zum pathologischen Modellorganismus, basierend auf patienteneigenem Zellmaterial, analysiert und mögliche Therapieschemata erschlossen werden (Mertens *et al.*, 2016; Tidball & Parent, 2016). Untersuchungen an kultivierten Cardiozyten (hiPSCs) zur Reaktion nach Medikamentengabe stellen hier einen großen Forschungsschwerpunkt dar (Mathur *et al.*, 2015). Eine elektrisch über MEA-Elektroden gesteuerte kardiale Differentiation der hiPSCs auf MEA in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie ist erstmals durch Hernández *et al.* (2016) gezeigt worden.

Neuronale Monolayer-Kulturen *in vitro* erfahren zunehmend Akzeptanz, als „Tool“ zur experimentellen Untersuchung der funktionellen Antworten von neuronalen Netzwerken auf chemische Substanzen. Aufgrund der pharmakologischen und gewebespezifischen Rezeptorausstattung, der kultivierten neuronalen Netzwerke, wird so die Lücke zwischen High-Throughput-Ansätzen, Genomik und Proteomik auf der einen und Tiermodellen auf der anderen Seite geschlossen und stellt eine High-Throughput- und Rapid-Screening-Methode für Toxizitätstests dar (Johnstone *et al.*, 2010). Explizite Untersuchungen von dosierten Substanzzugaben in neuronalen Netzwerken auf MEAs, die evident an exzitatorischen, inhibitorischen und modulierenden Rezeptorsystemen, wie Glutamat (NMDA, AMPA, Kainate), Acetylcholin (nikotinisch und muskarinisch), Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, GABA-A, GABA-B und Glycin andocken, lieferten genaue Daten über den physiologischen Wirkmechanismus dieser Substanzen am Rezeptorsystem (Gramowski *et al.*, 2004, 2006; Wu *et al.*, 2014; Hamilton *et al.*, 2017).

Gewebeschnitte

Die MEA-Technologie wird seit vielen Jahren in multiplen Bereichen des Gehirns, der Retina, des Herzens und der glatten Muskulatur in Form von Gewebeschnitten appliziert (Liu *et al.*, 2012). In Vergleichen der Spontanaktivität (Hz) neuronaler Hirnschnitte von *Mustela putorius furo* (<1 Hz) *in vitro* auf MEA mit anästhesierten *Felis silvestris catus* (schlafähnlicher Zustand; 0,1 - 0,5 Hz) *in vivo* zeigten sich keine signifikan-

ten Unterschiede (Sanchez-Vives *et al.*, 2000). Dies indiziert eine similäre Vitalitätssituation und Vergleichbarkeit der Kulturen auf MEA mit derer *in vivo*. Eine wesentliche Rolle der Extrazellulären Matrix (ECM) in Korrelation zur Signalaktivität, nicht nur im Entwicklungsstadium, sondern auch im adulten Stadium neuronaler Netzwerke, zeigten Bikbaev *et al.* (2015). Die Dichte der ECM hippocampaler neuronaler Netzwerke korreliert zur neuronalen Spontanaktivität. Durch enzymatisches Entfernen der ECM wurde die neuronale Aktivität erhöht, jedoch ohne zur Hyperexzitabilität, wie bei Vergleichskulturen der Fall, zu führen. Die bestehenden neuronalen Verbindungen wurden durch Glutamateinlagerungen stabilisiert (Bikbaev *et al.*, 2015). Nagarah *et al.* (2015) steigerten zur Verbesserung der Aufnahmesignalqualität den Kontakt der Elektroden zum Gewebeschnitt mittels Saugelektroden und die Gewebevitalität durch Erhöhung der Perfusion mit oxygeniertem Medium.

1.5.3 Analyse der Signalaktivität

Die Aufnahme der Signalaktivität neuronaler Netzwerke und einzelner Neuronen ist mit dem heutigen Stand der Technik nur entweder extrazellulär *oder* intrazellulär möglich. Ein optimales System könnte die elektrophysiologischen Parameter wie Aktionspotentiale (APs), unter-schwellige Exzitatorische und vor allem Inhibitorische Postsynaptische Signale (EPSPs/IPSPs), dornale Potentiale sowie unter-schwellige Membranoszillationen simultan erfassen. MEAs registrieren die Aktionspotentiale extrazellulär und ermöglichen via Elektroden die Stimulation selektiver Areale. Diese gemessenen extrazellulären Potentiale zeigen spatio-temporal die Aktivität einzelner Neurone oder die Superposition schneller APs, synaptischer und langsamer glialer Potentiale (Spira *et al.*, 2013).

Zellartspezifische Spontanaktivität

Zellkulturen aus dem Bereich des Frontalen Cortex, der hauptsächlich aus Pyramidenzellen besteht (McCormick *et al.*, 1985), zeigen ein für diese Gehirnregion spezifisches koordiniertes Haupt-Aktivitätsmuster (Abb. 9 B) (Gross *et al.*, 1994), Zellen der *Medulla Spinalis* hingegen ein koordiniertes Hauptmuster mit mehreren koordinierten Untermustern (in Abhängigkeit von der Burststärke) mit Interburstspikes (Abb. 9 D) (Gramowski *et al.*, 2004). In Bereichen des Mesencephalons, der *Substantia Nigra Pars Compacta*, mit der höchsten Dichte an dopaminergen Neuronen des ge-

samen Cerebrums, ist die Aktivität nahezu ohne erkennbare Burstaktivität und es ist kein koordiniertes Feuern der Neuronen erkennbar, sondern variable intensive Spikeaktivität mit gelegentlichen Bursts (Abb. 9 C). Die charakteristische reguläre Aktivität neuronaler Zellen des Auditorischen Cortex, *Gyrus temporalis superior*, ist in Abb. 9 A referenziert (Gopal *et al.*, 1996). Ito *et al.* (2014) zeigten eine deutliche Unterscheidungsmöglichkeit der funktionellen Konnektivität zwischen Hippocampus und Cortex-Gewebeschnitten auf MEA anhand der Frequenzbänder der Spontanaktivität. Mittels mathematischer Rechenoperationen (Kreuzkorrelation mit anschließender Wavelet-Transformation) konnten unterschiedliche Frequenz-Intensitäten in den vier Frequenzbändern Theta (4–12 Hz), Beta (12–30 Hz), Gamma (30–80 Hz) und Hochfrequenz (100–1000 Hz) festgestellt werden, wobei die deutlichsten Unterschiede im Hochfrequenzbereich evident waren.

Spike-Train-Analyse

Die elektrophysiologische Aktivität (Spontanaktivität, s. 1.4.2 und 1.4.4) der neuronalen Zellkulturen *in vitro* beginnt ca. 3–4 Tage nach Aussaat in Form von unkoordinierten Salven von Aktionspotenzialen, die sich nach DIV 21 zu einem synchronisierten Aktivitätsmuster je nach Zelltyp und Verhältnis von exzitatorisch zu inhibitorisch stabilisieren. Das spontane Auftreten der Spikes der einzelnen Neurone wird temporär erfasst und als "Spike Train" bezeichnet und im spatiotemporären Verlauf dargestellt (s. Abb. 9). Bursting im Vergleich zu 'regular spiking' und 'fast spiking' ist die Fähigkeit, ab einem gewissen Schwellenwert (Threshold) eine Reihe von 3-5 dicht aufeinander folgenden Spikes zu generieren (McCormick *et al.*, 1985).

Die Neuro-Monitoring-Software (z.B. Plexon Inc., Dallas, Texas) verarbeitet parallel die Aktivitäten (Spikes, Bursts) von bis zu maximal 256 unterschiedlichen Nervenzellen über einen längeren vordefinierten Zeitraum. Dies entspricht einer Anzahl von 64 Elektroden mit einer überlagerten Signaldarstellung von optimalerweise maximal vier Neuronen eines neuronalen Netzwerkes simultan. Zur Auswertung der Aktivitätsmuster der neuronalen Netzwerke kann das Verfahren der Spike Train Analyse angewendet werden. Mithilfe eines Analyse-Programmes (z.B. Neuroexplorer NEX, Plexon Inc., Dallas, Texas) können mehr als 200 verschiedene Spike Train Parameter berechnet werden.

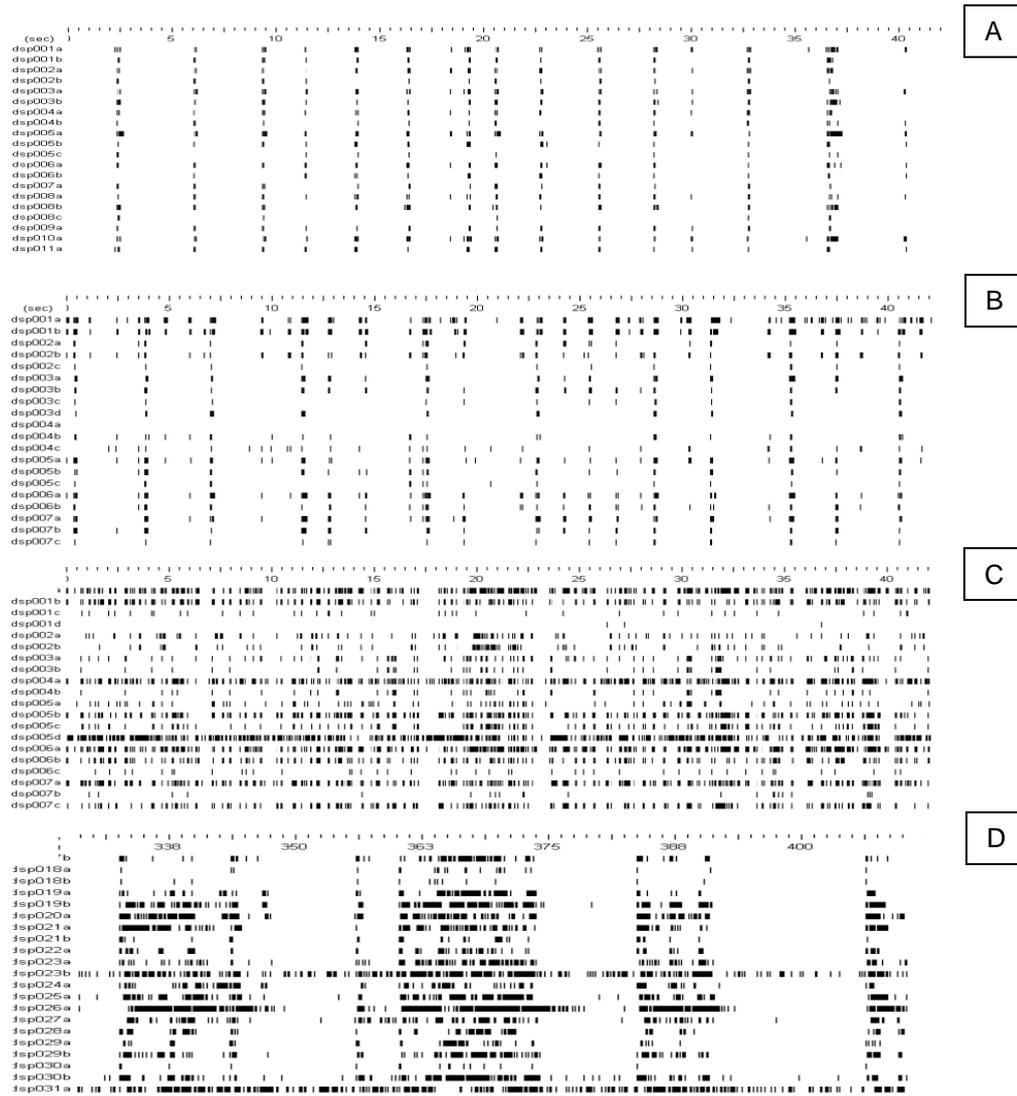


Abb. 9: Spatiotemporale Aufzeichnung der nativen Spontanaktivität unterschiedlichen murinen cerebralen Gewebes von 20 Einzelneuronen (vertikal) über 45 sec. (horizontal) (Gross G. W., CNNS, Texas, USA); A: Auditorischer Cortex; B: Frontaler Cortex; C: *Substantia Nigra*; D: *Medulla Spinalis*.

Es werden hierbei fünf Kategorien der Charakteristika neuronaler Zellen wie die allgemeine Aktivität, die allgemeine Aktivität in den Bursts, die Synchronität, die Oszillationen sowie die innere Struktur der Bursts und die Burst-Form beschrieben (Gramowski *et al.*, 2006).

1.6 Gene Expression Profiling neuronaler Netzwerke

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist in seiner Komplexität außergewöhnlich in Hinblick auf Komposition, Vernetzung und Funktion der multiplen Zellarten (Cao *et al.*, 2006). Im ZNS exprimieren 80 % aller proteinkodierenden Gene des humanen Ge-

noms, was einer bei weitem höheren Expression aller anderen Organe entspricht (Lein *et al.*, 2007; Tasic *et al.*, 2016). Es besteht neben den Neuronen aus einer Vielzahl differenter Nervenzellsubtypen, Gliazellarten wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia, sowie Endothelzellen und Perizyten, die alle ebenso eine gewichtige Rolle im neuronalen Netzwerk spielen. Ein Gene Expression Profiling stellt aufgrund dieser zellulären Heterogenität eine große Herausforderung dar (Dong *et al.*, 2016). Zum Verständnis des ZNS auf molekularer und funktionaler Ebene sind Studien des Transkriptoms, wie die Level der Genregulationen sowie die Genstruktur muriner neuronaler Netzwerke, notwendig. Die mittels Expression Profiling generierten Daten sind in der Regel aus undifferenzierten Arealen des Cerebellums als Zellpool gewonnen. Neuere Expressionsanalytik spezialisiert sich neben Pathologie-Assoziation auch auf einzelne Zelltypen, wie die kortikale Mikroglia, die existentiellen neuronalen Einfluss hat. Hierbei steht das Verständnis der pathologischen Vorgänge und deren Genese im Vordergrund (Wes *et al.*, 2016).

Die Genexpression stellt einen Schlüssel in der sich entwickelnden Biologie dar. Die Relation von Morphologie und dynamischen Mustern durch den Einfluss der Genexpression ist evident an vitalen Organismen erforscht. Diese Zusammenhänge wurden erstmalig mittels Pearson-Korrelation durch Arbeiten von de Arruda (2015, 2016) mathematisch erfolgreich erfasst und korreliert.

Aufgrund der raschen Entwicklung der Array-Technologie und der RNA-Sequenzierung im Transkriptom-Profilings wächst das molekulare Verständnis der neurodegenerativen Pathologien wie *Morbus Alzheimer* (AD), *Morbus Parkinson* (PD) und *Morbus Huntington* (HD) exponentiell an. Es zeigt sich hierdurch die Wichtigkeit und Notwendigkeit des Transkriptom-Profilings zur diagnostischen Analytik der pathologischen Kausalität, aber auch bei der Entdeckung und Entwicklung neuer Medikamente zur therapeutischen Applikation (Courtney *et al.*, 2010) in der Humanmedizin.

1.6.1 Single RT-qPCR

Seit Einführung der DNA-Sequenzierung durch Kettenabbruch-Synthese (Didesoxymethode) durch Sanger *et al.*, (1977) und der Entdeckung der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) vor mehr als 30 Jahren im Jahre 1983 durch Kary Mullis findet die PCR in verschiedensten molekularbiologischen Applikationen erfolgreich Anwen-

dung (Saiki *et al.*, 1985). Die PCR wird als einfache, sensitive und schnell durchzuführende Analysetechnik beschrieben, bei der Oligonukleotid-Primer, phosphorisierte Nukleoside (Desoxyribonukleosidtriphosphate, dNTPs) und thermostabile Taq-Polymerase (DNA Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*) zur Amplifizierung der DNA genutzt werden (Pfaffl, 2010).

Die Genexpressionsanalyse hat sich durch Reverse-Transkription-qPCR als Schlüsseltechnologie in der Post-Genom-Ära erwiesen. Weiterentwickelt wird speziell die Echtzeit-qPCR (rt-qPCR) in der Genanalytik routiniert eingesetzt und stellt ein solides Verfahren bei der Validierung von Microarray-Experimenten und evidenzbasierten Biomarkern dar (Van Guilder *et al.*, 2008).

Die 'Reverse-Transcriptase-quantitative-Polymerase-Chain-Reaction' (RT-qPCR) beinhaltet das Amplifizieren eines einzel- oder doppelstrangigen RNA-Moleküls, die 'real-time-Polymerase-Chain-Reaction' (rt-PCR) hingegen die Entstehung der PCR-Produkte mit der Möglichkeit in Echtzeit den Fortschritt mittels Fluoreszenz zu visualisieren.

Diese molekularbiologischen Analysemethoden, 'real-time-PCR' (rt-qPCR) und 'Reverse Transcription' (RT-qPCR), partizipieren in einem Assortiment von Publikationen multipler Bereiche, wie der 'life sciences', klinischen Diagnostik, Biotechnologie, Forensik und der Agronomie unter strikter Einhaltung technischer und analytischer Kriterien repräsentativ. Mittlerweile wird die qPCR als Meilenstein oder Goldstandard für präzise, sensitive und schnelle Messungen in der Genexpressionsanalytik angesehen. Die weitere Standardisierung der Qualitätssicherung und der Qualitätskontrolle im Bereich des RT-qPCR-Workflow, vom experimentellen Design zur statistischen Datenanalyse, ist in den Richtlinien für ein 'Mindestmaß an Information zur Veröffentlichung von quantitativen Echtzeit PCR-Experimenten' (MIQE, Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) festgehalten (Pfaffl, 2010; Bustin *et al.*, 2009, 2016). Im Falle der Nicht-Anwendung der MIQE-Richtlinien legten zwei umfangreiche Validierungen einen Mangel in Bezug auf Transparenz und Zusammenfassung der essentiellen technischen Methoden offen (Bustin *et al.*, 2013). Die Beurteilung der RNA-Integrität der zu untersuchenden Proben ist ein wichtiger und existenzieller erster Schritt zum Erhalt verifizierter Genexpressionsdaten. Hierbei ist die Reinheit (purity), ermittelt über Ultraviolett-Spektralphotometrie (z.B. Thermo Scientific Nanodrop-1000), sowie die Konzentration (Gesamt-RNA in ug/ml)

als RIN-Wert (RNA-Integritätszahl) durch Elektrophorese (z.B. Agilent 2100 Bioanalyzer) das gravierende Kriterium (Fleige *et al.*, 2006).

1.6.2 RT-qPCR-Arrays

Selektierte pathologieorientierte Gene, die auf einem Array zusammengestellt sind, können auf ein mögliches therapeutisches Verhalten hin untersucht werden (Warburton *et al.*, 2015). Das fokussierte Genexpression-Profilung mittels RT-qPCR-Arrays bietet den Vorteil, parallel molekularbiologische Analysen kostengünstig und mit geringer cDNA-Menge aus einem zusammengestellten Pool von relevanten Genen (Stock *et al.*, 2012), basierend auf der polymerasen Kettenreaktion (qPCR), eine komparative Expressionsanalytik einer Vielzahl von Genen zu erhalten. Die RT-qPCR-Arrays bestehen aus 96-, 384- oder 1536-Well-Platten mit Labor validierten zusammengestellten spezifischen Gen-Primer-Sets. Die Expression von mindestens 84 bis über 1000 Genen, die pathologie- oder pathwayorientiert sind, zuzüglich mehrerer Referenzgene, werden zeitgleich molekularbiologisch erfasst. DNA-Verunreinigungen ('DNA carry-over control'), RNA-Qualität sowie das PCR-Verhalten ('positive PCR controls') sind mehrfachen Kontrollen auf den Arrays unterworfen (www.gene-quantification.de/qpcr-array.html). Die Auswahl der Primer erfolgt mit Fokus auf geforderte selektierte biologische Prozesse. Somit können pathwayspezifische Gene in ihrem Netzwerkverhalten analysiert und aufgrund dieser Erkenntnisse gezielt beeinflusst werden.

1.6.3 Microarray

Seit der Einführung des cDNA-Microarrays im Jahre 1995 (Schena *et al.*, 1995) ist es möglich das gesamte Transkriptom simultan zu untersuchen, um den biologischen Kontext in Salubrität und Pathologie festzuhalten (Cooper-Knock *et al.*, 2012). Als vorrangige hybridisierungsbasierte Methode, speziell bei der Erfassung der Genexpression des Zentralen Nervensystems (ZNS), eignen sich Microarrays zur genomweiten Analyse eines Organismus und bieten eine Möglichkeit, sich der großen Herausforderung zum Verständnis der zellulären Heterogenität zu stellen. Die Analyse der Expressionslevel und der Genstrukturen in Transkriptomstudien bilden die Basis zur Interpretation der funktionellen Elemente sowie dem Verständnis der molekularen Struktur des ZNS (Dong *et al.*, 2016).

Kommerziell erhältliche cDNA-Mikroarrays sind mittlerweile in der Lage, das Gesamttranskript der mRNA sowie der langen intergenetischen nicht kodierenden RNA (lincRNA) zu erkennen. Das Mouse GeneChip® Gene 2.0 ST Array System von Affymetrix kann beispielsweise mehr als 28.000 kodierende Transkripte und 7.000 nicht kodierende, einschließlich ungefähr 2000 lincRNA Transkripte, erfassen. Zur maximalen Exon-Abdeckung werden alternative Splicing-Ereignisse und Transkriptvarianten mittels designter Proben gemessen.

Neben miRNA-Microarrays, die kurze nicht kodierende RNAs gleicher Länge analysieren lassen sich beispielsweise Neuro-ncRNA-Mikroarrays nach experimentellem Interesse zusammenstellen (Wang *et al.*, 2009). Gstir *et al.* (2014) stellten hierzu 1472 ncRNAs neuronalen Gewebes auf einem Mikroarray zusammen, der sich aus kleinen nukleolären RNAs (snoRNA, 11%), Mikro-RNAs (miRNA, 14 %) und unklassifizierten nicht kodierenden RNAs (ncRNA, 75 %) zusammensetzte.

Die Verwendung von Microarrays in der präklinischen Frühdiagnostik verschiedener Pathologien wächst ständig an. Mehrere Biomarker, wie Beta-Amyloid, Tauprotein und Tauphosphor bei Alzheimer-Erkrankung (AD), werden gleichzeitig auf einem einzigen Mikroarray erfasst. Zur sicheren Diagnostik in allen pathologischen Stadien werden neuere blutzirkulierende Biomarker, zirkulierende miRNA (Liquor) und inflammatorische Biomarker, derzeit durch Forschungsgemeinschaften entwickelt (Cooper-Knock *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2016).

Aufgrund der rasanten Entwicklung der Array-Genexpressionsanalytik und RNA-Sequenzierung im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen, wie AD, Parkinson (PD) und Corea Huntington (HD), erschließen Pathologie assoziierte Pathways, potenzielle Therapieziele und Biomarker. Die involvierten Mechanismen der Pathogenese werden auch im pathologischen Frühstadium erfasst und das Pathologie-Verständnis wird exponentiell erweitert. Humangenetische Microarray-Expressionsstudien bei verschiedenen Patientengruppen (Alter, Geschlecht, Pathologievariation) und Krankheitsstadien konnten in AD und PD bei genetischen Fehlregulationen der Neuroinflammation sowie der mitochondrialen Dysfunktion nachweisen. Die Pathogenese der PD zeigte sich kausal auf der Dysregulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems beruhend, hingegen AD als Dysregulation des intrazellulären Signalpathways evident (Courtney *et al.*, 2010; Cooper-Knock *et al.*, 2012).

1.6.4 RNA-Sequenzierung

Die Summe aller Transkripte einer Zelle in ihren spezifischen Entwicklungsstufen oder ihrem physischen Zustand bilden das Transkriptom. Das Verständnis dessen ist Voraussetzung zur Interpretation der funktionellen Bestandteile des Genoms und zur Enthüllung der molekularen Bausteine von Zelle und Gewebe (Wang *et al.*, 2009). Die Erfassung der Genexpression zu einem terminierten Zeitpunkt ist eine der grundlegenden Fragen in der Biologie. Die molekularen Unterschiede sind vielschichtig in der Genregulation als Genomvariation, Genexpression, Proteintranslation und post-translationalen Modifikation sichtbar (Kumar *et al.*, 2016).

Die parallele cDNA-Sequenzierung oder RNA-Sequenzierung minimalen Zellmaterials eines Organismus hat sich mittlerweile zu einer der prädestinierten Methoden bei der Quantifizierung und Charakterisierung des Transkriptoms entwickelt (Ozsolak *et al.*, 2011). Durch das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA-Fragmente mit anschließender Transkriptom-Sequenzierung, RNA Sequencing oder Next-Generation Sequencing (NGS) des mRNA-Niveaus hat sich die RNA-Sequenzierung als Mittel der ersten Wahl der genomweiten Sequenzierung herauskristallisiert (Quinn *et al.*, 2015). Im Vergleich zu hybridisierungsbasierten Microarrays arbeitet die RNA-Sequenzierung (Neukleotidabfolge der RNA) als sequenzbasierte Methode mit geringerem Hintergrundrauschen, höherer Genauigkeit, höheren Reproduktionsraten und direkter Bestimmung der DNA-Sequenz (Wang *et al.*, 2009). Mit der RNA-Sequenz können Vorgänge wie das alternative Spleißen (differentielles oder gewebespezifisches Spleißen), bei dem eine prä-mRNA verschiedene maturierte mRNAs bilden kann, Gen-Fusion, bestehend aus Fusionsgenen oder Hybridgenen, sowie differentielle Genexpression untersucht werden (Park *et al.*, 2016).

RNA Sequencing als eine der innovativen NGS-Sequenzierungstechnologien eröffnet neue Möglichkeiten in der Humangenetik seit Einrichtung des Human Genome Project (HGP) im Jahre 1988 durch das National Institute of Health (NIH) und das Department of Energy (DOE). Jedoch besteht dadurch auch die Notwendigkeit der Entwicklung bioinformatischer Datenverarbeitungssoftware aufgrund der extremen Hochdurchsatz (High-Throughput)-Sequenzierungs-Datenflut in einer neuen Ära der Genomforschung (Collins *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2016).

Eine ähnlich rasante Entwicklung zeigt sich im Bereich der digitalen PCR (dPCR), bei der DNA Moleküle durch Grenzverdünnung vereinzelt werden und somit eine Mengenbestimmung einzelner DNA-Sequenzen nach nur einem Amplifikationszyklus

stattfindet. Applikationsschwerpunkt sind hier die virale und die pathologische Diagnostik, die Entdeckung von Genmutationen und der Mengenvergleich der Expression (Cao *et al.*, 2016; Vynck *et al.*, 2016).

1.6.5 Posttranskriptionales Gen-Silencing – nicht kodierende RNA

Die Entdeckung kurzer (<200 nt) und langer (>200 nt) nicht kodierender RNAs (ncRNAs) hat in der molekularen Biologie zu einem Paradigmenwechsel geführt (Cao *et al.*, 2006; Qureshi *et al.*, 2012; Morris *et al.*, 2014; Spurlock *et al.*, 2016). Das Verständnis der Genom-Architektur, der Genregulation und der transkriptionalen Ergebnisse wurde parallel zu den Entwicklungen in der Sequenzierungstechnologie, der Bioinformatik und der Systembiologie grundlegend verändert (Qureshi *et al.*, 2012). Die vor kurzer Zeit noch als transkriptionales Beiprodukt angesehenen ncRNAs stehen nach heutigen Erkenntnissen wesentlich in Interaktion mit DNA, RNA und Proteinmolekülen (Ponomarev *et al.*, 2013; Bali *et al.*, 2014). Sie treten beeinflussend bei diversen strukturellen, funktionellen und regulatorischen Vorgängen auf und spielen eine entscheidende Rolle in der nukleären Organisation sowie transkriptionalen, post-transkriptionalen und epigenetischen Prozessen, die Differentiation und Evolution kontrollieren (Qureshi *et al.*, 2012; Morris *et al.*, 2014). Es zeigt sich der dringende Verdacht, dass mehr Gene die regulierenden RNAs kodieren, als kodierende Proteine im menschlichen Genom existieren, und somit die Menge und Art der Genregulation in komplexen Organismen in den letzten 50 Jahren im Wesentlichen falsch verstanden wurde (Morris *et al.*, 2014). Mit der Komplementierung des Humanen Genom Projektes wird geschätzt, dass nur 2-3% der Genomcodes für proteinkodierende Gene verwendet werden und dass sich die Masse der transkribierten Genome auf Ebene der nicht kodierenden RNA-Gene befindet (Spurlock *et al.*, 2016). Nicht kodierende RNA-Moleküle können in Form von kleiner nukleärer RNA (snRNA), kleiner nukleolärer RNA (snoRNA), Transkription-Initiation-RNA (tiRNA; 17-18 nt), Spleiß-Stelle-RNA (spliRNA; 17-18 nt), microRNA (miRNA; \cong 22 nt), kleiner eingreifender RNA (siRNA), Piwi ('P-element induced wimpy testis'; piRNA; 26-30 nt) und langer nicht kodierender RNA (lncRNA) auftreten (Morris *et al.*, 2014).

MicroRNAs, ein Cluster von kleinen nicht kodierenden RNA Molekülen von \cong 22 Nucleotid-Längen, sind auf post-transkriptionalem Niveau wesentlich an der Genexpressionsregulation in Form von Degradation oder Inhibition der Translation von Target mRNA (Ziel-mRNA) beteiligt (Pfaffl *et al.*, 2010; Pritchard *et al.*, 2012; Morris *et al.*,

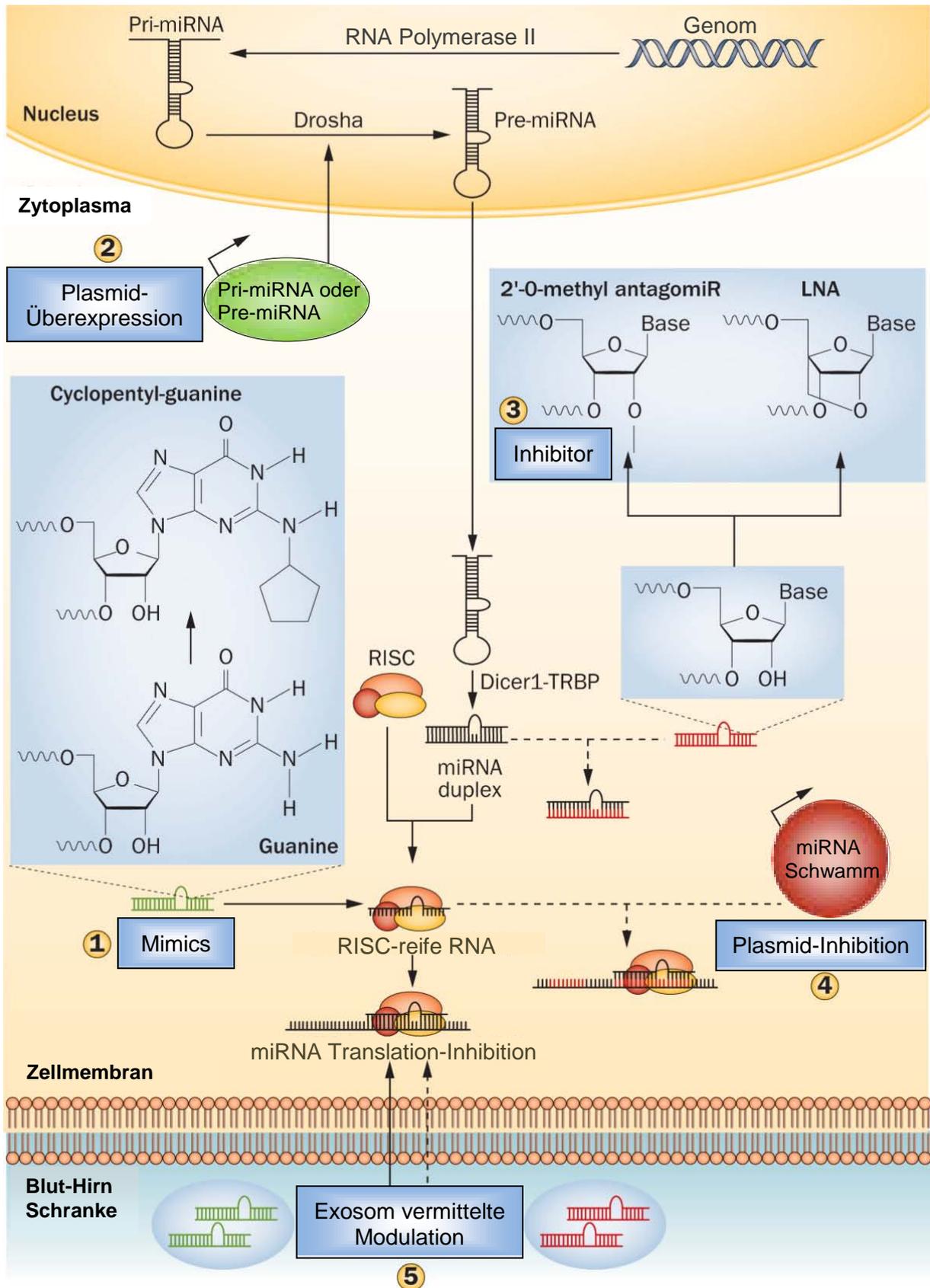


Abb. 10: Therapeutische Modulation der miRNA-Aktivität. miRNA Mimics sind Moleküle, die zur Überexpression der miRNA genutzt werden können (1). Sie enthalten modifizierte Cyclopentyl-Guanin-Basen, die eine Assoziation des RNA-induced Silencing Complex (RISC) innerhalb des Zytoplasmas zur Inhibition der mRNA-Translation ermöglichen. Überexpression der Pri-miRNAs und Pre-miRNAs durch Plasmide führt durch endogene Enzyme zu herange-

reifer mRNA (2). Inhibitorisch agieren 2'-O-Methyl-AntagomiRs (Antagonist + miRNA) und Locked nucleic Acids (LNAs) bei der miRNA-Bindungsfunktion zu gereifter mRNA und verhindern dadurch die Interaktion mit Ziel-mRNA (3). Kontinuierliche miRNA-Inhibition durch Plasmid-Kodierung eines miRNA-Schwamm-Transkripts, das Iterationen der Komplementärsequenzen (rote Regionen des Transkripts) zur Ziel-miRNA enthält (4). Exosomen vermitteln miRNA-Mimics oder Inhibitoren zur Modulation der miRNA-Aktivität. (mod. n. Bhalala *et al.*, 2013)

2014; Godard *et al.*, 2015). Anfang der 90er-Jahre wurden miRNAs erstmalig als kontrollierende Moleküle bei der Entwicklung von Nematoden entdeckt (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993), jedoch gerieten sie erst durch Auftreten der RNA-Interferenz (RNAi) Anfang der Jahrtausendwende erneut in den Fokus der molekularen Biologie. Es wird geschätzt, dass bis zu 90 % der menschlichen Gene durch die miRNAs reguliert werden und somit eine gravierende Rolle bei der Zellproliferation, Differentiation sowie Pathologien neurologischer Kausalität spielen (Ponomarev *et al.*, 2013). Die Aktivität der miRNA findet meistens durch Anbindung an der 3' Untranslated Region (UTR) der Target-mRNA statt (Pritchard *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Jedoch beeinflussen nicht nur miRNAs Target-Gene, sondern auch findet reziprok eine Beeinflussung des Niveaus und der Funktion der miRNA durch Target-Gene statt. Diese Interpendenz beinhaltet ein komplexes Verständnis speziell bei der Applikation von miRNAs als therapeutische Medikation (Pasquinelli, 2012). Die Anwendung des miRNA-vermittelten Gen-Silencing zur Kontrolle der Genexpression stellt einen pathologiebezogenen Therapieansatz dar (Basak *et al.*, 2016). Laut Zhang *et al.* (2013) lassen sich die Therapieansätze im Bereich der micro RNA in drei Bereiche gliedern. Die chemische Modifikation in Abhängigkeit des Expressionslevels der miRNA durch miRNA-Inhibition bei Überexpression oder miRNA-Ersatz bei supprimierter Expression verspricht großes therapeutisches Potential, wobei hier primär die Problematik der Überwindung physiologischer Barrieren (z.B. Blut-Hirnschranke) durch die chemischen Substanzen besteht.

Ein weiterer Bereich ist die miRNA-Inhibitionstherapie, bei der eine oder mehrere supra-exprimierte miRNAs zu pathologischen Genesen führen. Hier kann die Inhibitionstherapie zu einer Suppression der pathologischen miRNA-bedingten Repression der Proteinexpression eingesetzt werden (Junn *et al.*, 2012; Basak *et al.*, 2016). Anti-miRNA-Oligonukleotide (AMOs) inhibieren die Interaktionen von miRISC-Proteinen (mature RISC, Abb. 10) und der entsprechenden miRNA. Die letzte Therapievariation stellt die miRNA-Ersatztherapie dar, bei der miRNA-Mimics in Ersatzfunktion, in den Organismus eingebracht werden (Zhang *et al.*, 2013).

Raju *et al.* (2016) validierte anhand ncRNA Pathway Analytik Protein-Protein-Interaktionen und somit die Assoziation bei nicht kodierenden RNAs und proteinkodierenden Genen. Weitere Verbindungen wurden gefunden, die bereits in AD, PD und HD untersucht wurden, und zeigte damit die Wichtigkeit der Wiederverwendung bzw. Aufarbeitung von Microarraydaten durch Meta-Analysen. Es bedarf jedoch weiterer Erläuterungen und Erklärungen der direkten, indirekten und intermediären Mechanismen und Vernetzungen um lncRNA-Regulationsmechanismen zu verstehen. Lange nicht kodierende RNAs (lncRNAs) sind unter anderem auch an verschiedenen Entwicklungs- und Tumorentstehungsprozessen beteiligt. Xing *et al.* (2014) und Moorfield (2015) belegten diese Pathologierelevanz exemplarisch an lncRNA und BCAR4 (Brustkrebs Antiöstrogenresistenz 4) als einerseits direkt koordinierte Proteinrekrutierung und andererseits als indirekte Regulation des Transkriptionsfaktors und Aktivierung des Zellmigration-Pathway. Eine onkogene Stimulation des P53-Pathway durch lncRNA NEAT1 (Nukleolär angereichertes Abundant Transkript 1) konnte durch Adrians *et al.* (2016) nachgewiesen werden. Kanzerogene Zellen während Chemo- und Reaktivierungstherapie könnten somit durch die lncRNA NEAT1 beeinflusst werden. Die zytoplasmatische lncRNA LINK-A (lange intergenetische nicht kodierende RNA zur Kinase-Aktivierung) ist bei der zytoplasmatischen Signalübertragung größtenteils unerforscht. Lin *et al.* (2016) zeigten erstmals die Größe und Diversität der zytoplasmatischen lncRNA in der Signalübertragung und der Onkologie.

2. Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Validierung und Evaluierung des beeinflussten Transkriptoms neuronaler muriner Zellen des zentralen Nervensystems nach extrinsischer elektromagnetischer Exposition unterschiedlicher Frequenzmuster und Intensitäten.

Murine embryonale neuronale Stammzellen eignen sich aufgrund der hohen homologischen Übereinstimmung des humanen und des murinen Genoms (DeBry & Seldrin 1996) hervorragend zur experimentellen Untersuchung der neuronalen Zellantwort nach Magnetstimulation. Die Sequenz des Mausgenoms ist ein Werkzeug als Schlüsselinformation zum Verständnis des menschlichen Genoms und ein Schlüssel als experimentelles Werkzeug für die biomedizinische Forschung (Mouse Genome Sequencing Consortium 2002).

Die Genexpressionsanalytik bietet die Möglichkeit effizient und komplex die direkte Korrelation der rMS *in vitro* und der rehabilitativen zellulären und metabolischen Beeinflussung humanen Gewebes *in vivo* auf molekularer Ebene zu erstellen. Die Komplexität und Interaktivität der Genexpression des Transkriptoms sowie die extreme Informationsdichte erfordern eine vergleichende bioinformatische Analytik unter Verwendung fundierter wissenschaftlich relevanter Datenbanken der Gene Ontology, der Pathway Analytik und Gene-miRNA integrativer Analyse, die eine hierarchische biologische Gruppierung in Haupt- und Subklassen ermöglichen, die Kausalität und Relation der Genese der Humanpathologie biochemisch erfassen und darstellen sowie mögliche miRNA-Zielgen-Interaktionen herausstellen. Diese direkte aber auch reziproke Korrelation der mRNA und der miRNA stellt eine sensitive Möglichkeit und großes Potential bei der Erforschung der Beeinflussung neuronalen Gewebes durch repetitive Magnetstimulation dar.

Die Forschungsergebnisse können zum tieferen Verständnis der Vorgänge auf zellulärer Ebene nach Magnetstimulation und der damit verbundenen vielfältigen Regenerations- und Rehabilitationsmöglichkeit führen. Empirische Therapieerfolge und Methoden basierend auf der Abfolge verschiedener Stimulationsmuster (Waibler *et al.*, 2007, 2009, 2014) mit verschiedenen Frequenzen sowie Intensitäten, angewandt bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie beispielsweise Depression, Parkinson, Alzheimer oder *Chorea Huntington*, können hier Einflußmöglichkeiten darstellen,

wissenschaftliche Erklärung finden sowie weiterführende Forschungsansätze eröffnen.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Die standardisierte Gewinnung neuronaler Zellen des Cortex und Rückenmarks muriner E 16 Embryonen (Balb-c Mäuse, Harlan, Niederlande) erfolgte nach Ransom *et al.* (1977). Die embryonalen Zellen zeigten jeweils das typische Wachstumsverhalten neuronaler Zellen zu einem komplexen neuronalen Netzwerk bei einem gewünschten Glia- zu Neuronenverhältnis von 4:1 (Gross *et al.*, 1997). Es wurden die zellartspezifischen Signalaktivitäten des Frontalen Cortex (*Cortex cerebri*), des Auditorischen Cortex (*Cortex cerebri*), der *Substantia nigra* (*Tardus cerebri*) und der *Medulla spinalis* (*Spina dorsa*) als Timestamps (Kapitel 3.4.1) abgeleitet und zur Validierung verglichen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach Brewer *et al.* (1993) über Aliquotierung auf MEAs (Microelectrode Array), Glasträgern und Zellkulturplatten (6-Well-Platten), wodurch Spontanaktivitätsableitungen, Online-Vitalitätskontrolle, Transkriptionsanalysen und morphologische Charakterisierungen des Zellgewebes ermöglicht wurden. Antimykotika und Antibiotika (Ampicillin, Gentamicin) wurden nicht verwendet, da diese die Vitalität und Signalaktivität der neuronalen Zellen perturbieren (Potter *et al.*, 2001).

Exemplarisch an neuronalen Zellen des Frontalen Cortex (FC) sowie des Rückenmarks (SC) wird das schrittweise Prozedere der Zellgewinnung und -kultivierung auf unterschiedlichen Trägermaterialien für die verschiedenen Experimente im Nachfolgenden dargestellt.

3.1.1 Vorbereitungen zur Zellpräparation

Die für eine Präparation und anschließende Zellkultur auf MEAs, Glasplättchen und Wellplatten notwendigen Reagenzien und Bearbeitungsschritte sind nachfolgend als Vorbereitung näher erläutert.

Wachstumsmedien

Die unterschiedlichen Zellarten benötigen aufgrund ihrer differentiellen neurobiologischen Eigenschaften und Destinationen unterschiedliche Kulturmedien und unterschiedliche Zellkultivierung. Die Rückenmarkszellkultur (SC) benötigt MEM (Minimum

Essential Medium), die des Frontalen Cortex (FC) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). DMEM enthält Glycin, welches die Entwicklung von Rückenmarkszellen negativ beeinflusst, da diese Zellen schon eine signifikante Anzahl an glycinergen Neuronen haben. FC-Zellkulturen hingegen entwickeln sich weniger stabil in Aminosäure-armem MEM, das nur die Hälfte an Aminosäure-Konzentration beinhaltet.

MEM und DMEM werden beide mit Natriumbicarbonat (23 mM) gepuffert und sollten bei ca. 5% CO₂ verwendet werden, um einen pH-Wert von 7,4 beizubehalten. Beide Medien enthalten zwischen 10 mM und 16 mM D-Glukose. DMEM 5/5 beinhaltet DMEM additiv 5 % FBS (Fetal Bovine Serum) und 5 % HS (Horse Serum), MEM 10/10 enthält MEM additiv 10 % FBS und 10 % HS.

Nachdem das Stockmedium gemischt und die Osmolarität überprüft wurde (320 milliosmol/kg), wird das Medium durch einen 0,2 µm Membranfilter steril filtriert. Alle nachträglichen additiven Komponenten sollten steril sein (z.B. Seren).

Pferdeserum (HS) ist notwendig, um die Gesundheit/Viabilität der Gliazellen zu erhalten. Fetales Kälberserum (FBS) ist Bestandteil des Einsaat-Mediums, muss aber spätestens nach 5 Tagen *in vitro* (DIV 5), aufgrund der toxischen Wirkung auf die Neuronen, entfernt werden. Seren sollten bei 56 °C für 30 Minuten hitze-inaktiviert werden, außer das Serum ist zuvor vom Hersteller bereits hitze-inaktiviert vorbehandelt. Anschließend erfolgt 10 ml Aliquotierung des Serums.

Die Kulturen benötigen additiv 2 % Brewer's-27 als Supplement, da es eine Mischung aus Antioxidantien enthält, die als Additiv für die Anwendung in Neurogrundmedien entwickelt wurde. Die Viabilität der FC-Zellen wird durch Zugabe von B-27 deutlich verbessert.

Präparations-Puffer

Die Präparation wird in D1SGH-Lösung durchgeführt. D1SGH-Lösung ist eine Kombination aus physiologischer Salin-Lösung, Zucker und HEPES-Puffer. Die Saccharose trägt zum osmotischen Gleichgewicht der Zellen bei, wobei Glucose den Zellstoffwechsel aufrecht erhält, bis das Gewebe in das Wachstumsmedium überführt wird. HEPES wird anstelle von Natriumbicarbonat verwendet, da die Gewebe während der Präparation für längere Zeit der Luft ausgesetzt sind. Die Konzentration der HEPES-Stocklösung beträgt 246 mM, bei 100 ml Reinstwasser 58,5 g HEPES. Die Konzentration der Glucose/Saccharose-Stocklösung liegt bei 694 mM/175 mM, entsprechend bei 1000 ml Reinstwasser 125 g D-Glycose und 60 g Saccharose. Die 20-

Salin-Lösung besteht aus NaCl/KCl/Na₂HPO₄/KH₂PO₄ bei einer Konzentration von 2,7 M/107 mM/12,7 mM/4 mM. Die Einwaage ist hierbei mit 1000 ml Reinstwasser 160 g/8 g/1,8 g/0,6 g. Für die D1SGH-Lösung werden nun 50 ml HEPES Stocklösung, 50 ml Glc./Sacch. Stocklösung, 50 ml 20-Salin-Stocklösung mit 850 ml Reinstwasser eingewogen.

Adhäsionsmoleküle

Die Adhäsion der Zellen bzw. des Zellrasens (Lehle *et al.*, 2008; Dryia *et al.*, 2008) speziell bei neuronalen Zellverbänden auf MEAs, Deckgläsern und 6-Wellplatten hat sich als außerordentlich anspruchsvoll herausgestellt. Die Beschichtung der Silikonisolierung der MMEPs, der Glasoberfläche der Deckgläser sowie der Oberfläche der 6-Wellplatten erfolgte mit Poly-D-Lysin (PDL) und anschließend mit Laminin, um die Adhäsion der Zellen zu steigern (Lucas *et al.*, 1986).

Es wurde PDL (Roche 644 587, 30-70 K MW) gelöst in Reinstwasser mit einer Gesamtmenge von 5 µl auf die Elektrodenmatrix, 10–15 µl auf Deckgläser und ca. 50 µl auf ein Well einer 6-Wellplatte am Tag vor der Präparation aufgetragen. Die so behandelten Oberflächen der Zellträger standen zum Ablüften über Nacht unter der Sterilbank.

Am Tag der Präparation wird mindestens 45 Minuten vor dieser eine Lamininlösung aus 80 µl Lamininlösung (Roche 1 243 217) und 2 ml MEM auf die Objektträger aufgebracht und anschließend im Inkubator bis zum entsprechenden Präparations-schritt inkubiert. Hierbei wurden für die MEAs je 60 µl, für die Deckgläser je 120–180 µl und die Wells ca. 700 µl aufpipetiert.

Enzym

Das Verdauungsenzym dient dazu, das myelinisierte Rückenmarksgewebe mit den SC-Zellen loszulösen, bevor es mechanisch getrennt wird, andernfalls ist die Anzahl der überlebenden Zellen sehr gering. Für die Aufspaltung des FC sind digestive Enzyme nicht zwingend erforderlich, sie erhöhen aber den Ertrag vitaler Zellen.

Das verwendete Enzym, Papain (60 Units Papain in 3 ml D1SGH), sollte bei SC 20–25 min und bei FC 10–15 min bei 37 °C mit 10% CO₂ einwirken. Danach wird serumhaltiges Medium (5/5 für FC, 10/10 für SC) zugegeben und zentrifugiert. Bei diesem Bearbeitungsschritt wird eine geringe Anzahl von Zellen zerstört und es entsteht dadurch freie DNA in der Suspension, die klebrig ist und Zellen verklumpt.

Die Menge an freier DNA wird durch Zugabe von DNase-Lösung (100 µl DNase-Lösung auf 10 ml Medium) bestehend aus DNase I (Roche 104159, Grade II, 100 mg) und PBS (25 ml) reduziert. Die Konsistenz von PBS ist H₂O/NaCl/KCl/Na₂HPO₄/KH₂PO₄ der relativ entsprechenden Mengen 200 ml/1,6 g/0,04 g/0,43 g/0,04 g.

Silikonringe und MEAs

Um Kulturmedium auf den MEAs zu halten wird ein ovaler Ring aus Silikon um die Elektrodenstruktur in einem definierten Abstand aufgebracht. Die Adhäsion des Ringes auf dem MEA ermöglicht zuvor minimal aufgetragenes Silikonfett im Bereich der Kontaktfläche. Die Silikonringe der MEAs werden vor Aufbringen der Kulturkammer oder nach Versuchsbeendigung vorsichtig mechanisch von Silikonfett befreit und anschließend für 24 bis 48 Stunden in ein Oberflächendesinfektionsbad eingelegt (z.B. 4% NaOCl, 2% Barizidal, Mukozit). Anschließend werden sie für 24 Stunden in *Aqua bidest* einlegt und in einem weiteren Arbeitsgang mehrmals mit *Aqua bidest* gespült. Die Silikonringe werden abschließend in Autoklavierbeutel für 20 Minuten bei einer Temperatur von 120 °C und einem Bar Überdruck im Autoklaven sterilisiert.

Die MEAs werden äquivalent den Silikonringen behandelt, jedoch mit der Ausnahme, dass sie nicht dem Desinfektionsmittel ausgesetzt werden dürfen, da dieses die Silikonbeschichtung und die freiliegenden Elektroden beschädigen würde. Die sterilen MEA-Chips werden auf einen Metallblock gelegt und mit einer Metalllochblende versehen, die den Elektrodenbereich freigibt, um nun mittels einer Hochtemperaturflamme (Butanbrenner) durch zweimaliges Vorbeiziehen eine hydrophile Oberfläche zu erhalten. Gleiches Prozedere wird mit den Glaschips durchgeführt, wobei hier die Metalllochblende entfällt, da keine zu schützende Silikonoberfläche vorhanden ist.

3.1.2 Präparation und Akkommodation der Zellkulturen

Präparation

Der komplette Präparationsbereich wurde vor der Präparation mit Ethanol (EtOH) desinfiziert und die Präparations-Abzugshaube mit den vorbereiteten autoklavierten Instrumenten und Materialien für 30 min mit UV- Licht bestrahlt.

Die ersten Schritte für SC- und FC-Präparation sind identisch. Sektion der Mäuse und Embryonen erfolgte am Tag 16 im Embryonalstadium (E16) der BALB/c-Linie (Harlan, Indianapolis, USA), da erfahrungsgemäß neuronale Zellen von Föten abwei-

chenden Alters dazu neigen, weniger gute Oberflächenadhäsion sowie Zellwachstum zu zeigen. Die Tierpräparationen wurden unter Beachtung der ethischen Verpflichtungen des Menschen, ohne Schmerzen der Tiere, durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das trächtige Muttertier zur Betäubung für 30 Sekunden in einen mit Chloroform gefüllten Exsikkator gelegt. Die Zeit muss exakt eingehalten werden, da andernfalls das Nervengewebe der Embryonen geschädigt wird. Die anästhesierte Maus wird ausgestreckt auf die chirurgische Matte gelegt, das stumpfe Ende einer Pinzette kaudal am Cranium angesetzt und fixiert. Anschließend wird der Schwanz an der Wurzel gegriffen und kaudal gezogen, bis ein 'Knacken' des Halswirbels zu spüren ist und die Maus durch Genickbruch getötet wurde. Im nächsten Arbeitsschritt wird der Bauchraum rasiert und mit Alkohol oder Bleichmittel besprüht. Mit einer sterilen Pinzette wird nun die Haut des unteren Abdomens erfasst und mit einer Schere vorsichtig durch die Haut geschnitten. Jetzt werden die Bauchmuskeln mit einer Pinzette von den Organen gelöst und der Bauchraum eröffnet. Die Schere und die Pinzette werden mit Alkohol desinfiziert. Anschließend wird das kraniale Ende des Uterus mit einer Pinzette angehoben, das Bindegewebe und die Blutgefäße längs der dorsalen Seite weggeschnitten, um das Horn von der Bauchhöhle zu befreien. Nun wird der freigelegte Uterus mit kaltem D1SGH über der Petrischale abgewaschen und in eine weitere mit D1SGH gefüllte Petrischale eingelegt. Jetzt wird der Uterus unter den Präparationsabzug gebracht und unter dem Mikroskop die Plazenta des Embryos lokalisiert. Mit einer Pinzette wird die Uteruswand durchtrennt, bis die Plazenta freigelegt ist und die Embryos einschließlich des Amnionsacks unter leichtem Druck aus dem Uterus herauslösen. Der Amnionsack wird wiederum mit einer Pinzette von dem Embryo gelöst und die Nabelschnur durchtrennt. Die Embryos werden zur weiteren Präparation in eine Petrischale überführt.

Frontaler Cortex

Unmittelbar nach Dekapitation der Embryos (Abb. 11 A) werden die Schädel in eine neue Petrischale überführt und die weitere Präparation unter dem Präparationsmikroskop Stemi 2000-C (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Beginnend wird die Haut lateral entfernt und dann der knorpelige Teil des Schädels abgezogen. Der Kopf wird mit einer Pinzette fixiert und die Spitzen einer zweiten Pinzette unter die olfaktorischen Bulbi geschoben. Das Cerebrum wird aus dem Schädel gehoben, indem man die Pinzettenspitzen kaudal darunter schiebt und es danach auf eine frische Petri-

schale setzt. Lateral, von der Sagittallinie ausgehend, werden nun die Hirnhäute abgezogen. Der Riechkolben (Abb. 11 C) wird mit der Pinzette entfernt, anschließend wird auf halbem Weg durch die dorsale Grenze des Cortex, annähernd 1/3 vom rostralen zum kaudalen Rand, sowie den dorsalen Rand des Cortex geschnitten. Von diesem Schnitt zum Loch der entfernten olfaktorischen Bulbi wird weiterführend entlang des dorsalen Randes geschnitten. Jetzt wird der erste Schnitt ventral zur caudato-pallialen Kante, der Linie, an der sich der Cortex und der *Nucleus Caudatus* treffen, weitergeführt. Rostral entlang dieser Linie wird nun der letzte Schnitt bis zum Loch der Riechkolben ausgeführt. Das durch diese drei Schnitte abgegrenzte Gewebe ist der experimentelle Frontale Cortex, der dann auf eine kleine Petrischale transferiert wird.

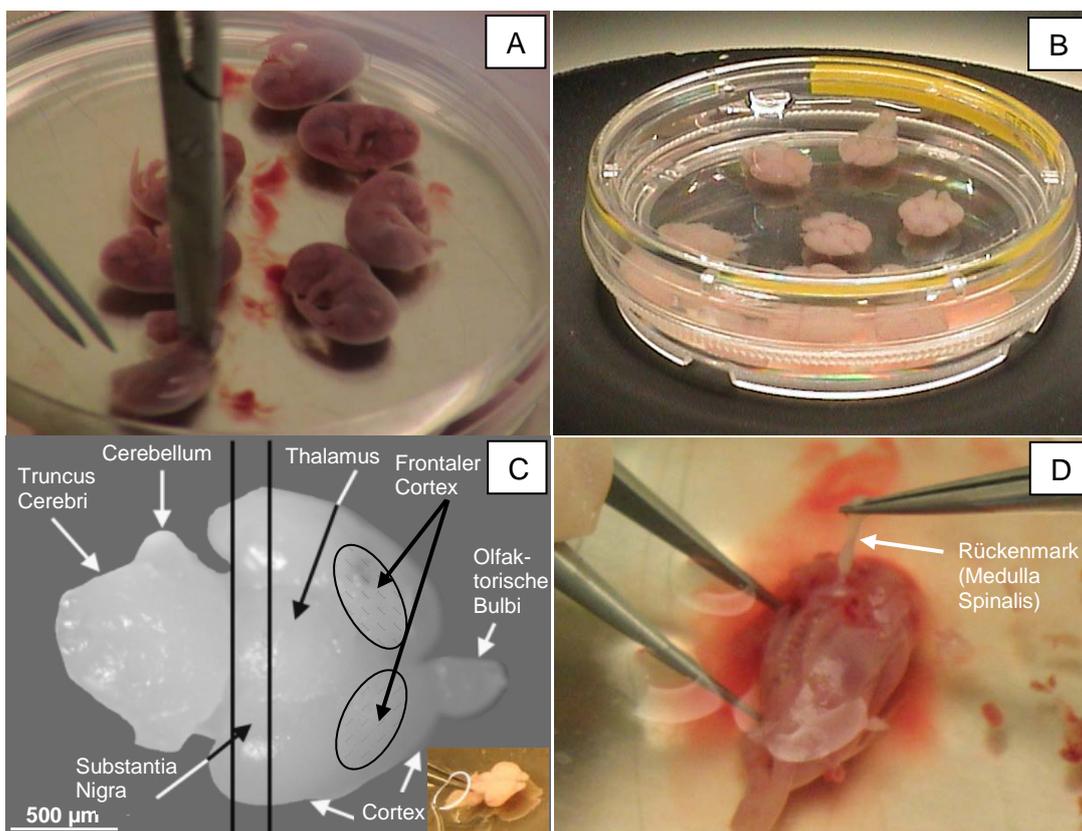


Abb. 11: Sektion muriner Embryos zur Gewinnung neuronaler Stammzellen unter Zeiss Ste-mi 2000-C; A: Dekapitation muriner DIV 21 Embryos; B: Murine embryonale *Cerebra* in D1SGH-Lösung; C: Gewebeschnitte zur Zellgewinnung des Frontalen Cortex (FC) (mod. nach Smeyne & Smeyne 2002); D: Extraktion der *Medulla Spinalis* (SC)

Rückenmark

Der dekapierte Embryo wird auf dem Bauch liegend mit einer Pinzette fixiert. Mit einer zweiten Pinzette wird vorsichtig die Oberhaut dorsal abgezogen, so dass die knorpelige Wirbelsäule freiliegt. Nun wird mit der Pinzette die Wirbelsäule ähnlich einem Reißverschluss vorsichtig geöffnet. Das Rückenmark ist jetzt gut sichtbar als weißer Faden (Abb. 11 D), der mit einer Pinzette vom kaudalen Ende her herausgenommen und in eine mit D1SGH gefüllte Petrischale überführt wird. Letztlich werden die Rückenmarkshäute vom kranialen zum kaudalen Ende hin abgerollt, entfernt und das Rückenmark in eine weitere mit D1SGH gefüllte Petrischale überführt.

Zerreibung des Gewebes, Einsaat und Kultivierung

Nachdem das gewünschte Gewebe nun isoliert wurde, müssen die Zellen getrennt werden um neue Netzwerke zu bilden. Hierfür wird das Gewebe mechanisch mit zwei Skalpellern 'zerrieben', wobei manche Zellen aufgebrochen, zerstört und deren DNA freigesetzt wird. Um diese DNA-Verklumpung der intakten Zellen aufzulösen, wird bei beiden Gewebearten DNase I zugegeben. Die noch verbleibenden Zellverbindungen werden im weiteren Schritt durch die Zugabe von Papain (Gibco Invitrogen, USA) zu den zerriebenen Zellen getrennt und anschließend für 10-15 Minuten inkubiert. Letztlich werden die Zellen in DMEM (FC) oder MEM (SC) mit DNase resuspendiert und in ihrer entsprechenden Konzentration auf MEAs, Glas-Chips oder Wellplatten pipettiert. Die Zelldichte variiert zwischen 3×10^5 und 5×10^5 Zellen/ml je nach Destination. Nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit, die die Zellen zum sedieren und adhären benötigen, wird das entsprechende Medium aufgefüllt. Einen Tag nach Kultivierung wird das Medium vollständig gewechselt, um überschüssiges Zelldebris und DNase zu entfernen. An DIV 4 wird erneut das Kulturmedium zur Entfernung des FCS gewechselt. Im weiteren Verlauf erfolgt nun wöchentlich zweimal ein nur teilweiser Mediumwechsel um Botenstoffe zu erhalten.

3.1.3 Aufsetzen einer Zellkultur – Zellmonitoring

Zur extrazellulären Aufnahme der Spontanaktivität werden die MEAs mit einer sterilen Beobachtungskammer auf der Vorverstärkerplatine des Neuronen-Versuchsstandes bei konstant 37 °C befestigt (Gross 1994). Eine kontinuierliche 8 % CO₂-Begasung der Kammer bei einem H₂O-Volumenstrom von ca. 200 µl/min dient

der Erhaltung des pH-Wertes von 7,4. Die gesteuerte Perfusion mit Reinstwasser hält die Osmolarität konstant bei 320 mOsmol/kg. Die Signalaufnahme erfolgt mit einem 64-Kanal Recording System der Fa. Plexon Inc., Dallas, USA.

Die herausragenden Merkmale der Netzwerkaktivität werden durch Spike, Spike Trains und Bursts repräsentiert und sind ein grundlegender Teil des so genannten-Neuronalen Codes, der jede Zellart spezifisch charakterisiert (Gross 1994; Johnstone *et al.*, 2010). Die quantitative Beschreibung der Bursts erfolgt durch direkte Spike-Train-Analyse mit der Software NeuroExplorer (Plexon Inc., Dallas, USA).

Die detaillierte Vorgehensweise von der Abholung der Kulturen aus dem Reinraum-Neurobiologie über das 'Aufsetzen' einer MEA Zellkultur auf dem Neuroversuchstand im Neurolabor bis hin zum Abbau des Versuchsaufbaus ist protokollarisch im Anhang (9.1) zu finden.

3.2 Parametrierung des elektromagnetischen Feldes

3.2.1 Genese und Applikationsform des elektromagnetischen Feldes

Das System 'Magnetstimulator' besteht aus einem Ladekreis mit Stromversorgung und Leistungskondensator, der auf etwa 300 Joule aufgeladen wird, sowie einem Ausgangskreis mit Schalter und Applikationsspule (Abb. 12). Durch Schließen des Schalters (Thyristor) im Ausgangskreis kann aufgrund des resultierenden biphasischen Stromes ein maximales Magnetfeld B im Bereich von 3,4 bis 4,1 Tesla, je nach Spulentyp, im Zentrum der angeschlossenen Spule erzeugt werden. Dies sind kurzzeitige maximale magnetische Flussdichten, wie sie in modernen Magnetresonanztomographen (MRT) zur Darstellung von Struktur und Funktion der Gewebe und Organe realisiert werden. Unter Reduktion der Ausgangsleistung und Beachtung der Erwärmung der Applikationsspule sind kommerzielle Stimulatoren heutzutage in der Lage Frequenzen bis zu 100 Hz zu generieren.

Für die applizierte Stimulationsart A wurde in den Versuchsreihen CRAMS der modifizierte Magnetstimulator X-100 (MagVenture, Farum, Dänemark) und die für klinische Anwendung und Muskelstimulation entworfene Parabolspule MMC-140 verwendet. Die für höhere thermische Stabilität bei Dauerleistungen ausgelegte flache flüssiggekühlte Spule MCF-125 wurde in der Stimulationsart B angewendet. Die gewählten Intensitäts- und Frequenzeinstellungen bei der Stimulationsart A am Magnetstimulator lagen bei 25 A/ μ s (17 % Stromsteilheit) und 70 Hz Wiederholfrequenz

(rMS) mit einer Impulszahl von 8 Impulsen bei Verwendung der parabolförmigen Spule (MMC-140). Bei Stimulationsart B wurden 84 A/us (60 % Stromsteilheit) und

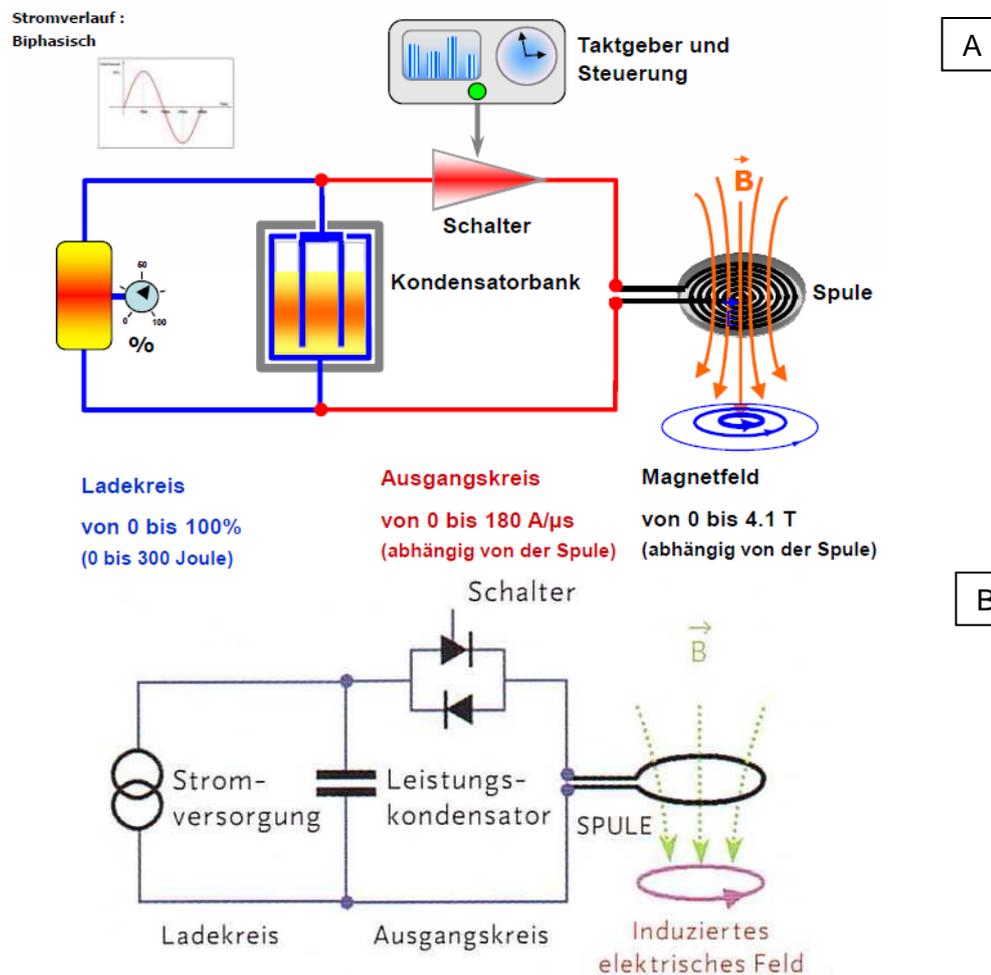


Abb. 12: Prinzipschaltbild (A) eines Magnetstimulators mit angeschlossener Spule; äquivalentes elektrisches Ersatzschaltbild (B). (modifiziert nach Kienle *et al.*, 2006)

30 Hz Wiederholfrequenz (rMS) bei einer Impulszahl von 20 Impulsen unter Verwendung der flach geformten flüssiggekühlten Spule (MCF-125) reguliert. Bei konkaver Nutzung der parabolförmigen Spule ergibt sich eine relativ intensive homogene Feldverteilung, wie in Abb. 13 ersichtlich ist, die sich zur Stimulation der neuronalen Kulturen auf MEAs, 6-Wellplatten und Glaträgern optimal eignet. Es ist ein maximaler magnetischer Gradient von 33 kT/s im Zentrum der konkaven Oberfläche bei Verwendung dieser Spule möglich. Der Verlauf der Feldverteilung der flach geformten Spule ist deutlich inhomogener. Speziell im Zentrum ist der Bereich des Maximums axial sehr klein und fällt radial schnell ab.

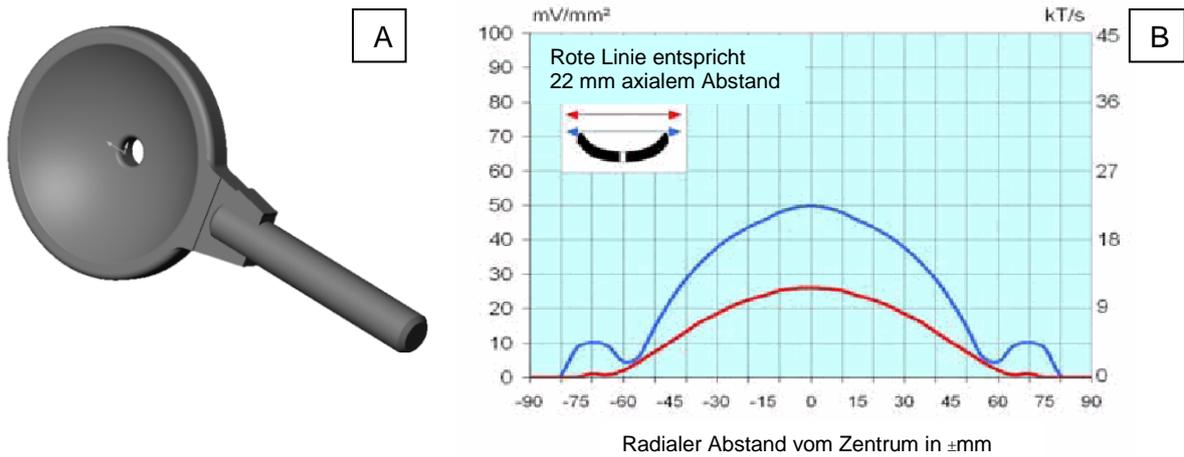


Abb. 13: A: Parabolförmige Stimulationspule in 3D-Ansicht; B: Feldverlauf der Stimulationspule MMC-140 in Abhängigkeit des radialen Abstandes vom Zentrum bei konkaver Applikation (Stock *et al.*, 2006).

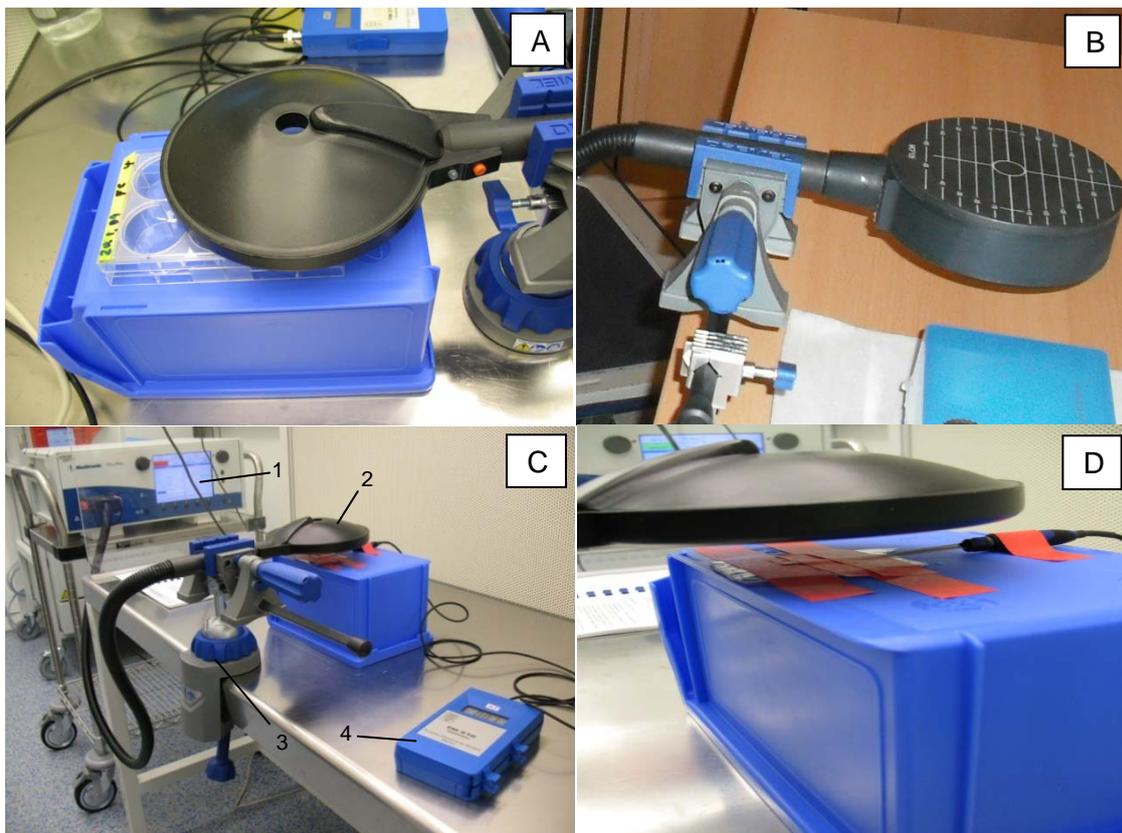


Abb. 14: Versuchsaufbau zur Ermittlung der magnetischen Flussdichte auf Zellebene in der 6-Well-Platte bzw. auf dem MEA in der Petrischale; A: Sicht von oben auf die parabolförmige Spule (PC) mit eingebrachter 6-Well-Platte zur Abstandsermittlung in konkaver Applikation; B: Gesamtansicht der flach geförmten flüssig gekühlten Spule (FC) MCF 125; C: Kompletter Versuchsaufbau mit Magnetstimulator (1), Spule (2), Halterung (3) und Flussdichtemessgerät (4); D: Messsonde unter der parabolförmigen Magnetspule auf Zellebene.

Zur Ermittlung der letztlich auf die neuronale Zellebene wirkenden magnetischen Flussdichte (Induktion) wurden Messungen mit einem Teslameter (Projekt Elektronik GmbH, Berlin, FM 210) im simulierten Versuchstand mit verschiedensten Intensitäten und Frequenzen an unterschiedlichen Spulen durchgeführt (Abb. 14).

Die magnetische Induktion bei den verschiedenen Stimulationsarten und Spulen mit eingestellten Intensitäten, in einem Abstand von 20,2 mm gemessenen, wie in Abb. 14 (D) exemplarisch dargestellt, sind in nachfolgender Tab. 2 ersichtlich.

Tab. 2: Gemessene magnetische Flussdichte im Abstand von 20,2 mm im Zentrum des jeweiligen Spulentyps unter Verwendung einer Hallsonde mit einem Teslameter FM 210, Projekt Elektronik GmbH, Berlin.

Intensitäts- und Frequenzeinstellung am Magnetstimulator	Parabolförmige Spule PC - gemessene magnetische Flussdichte	Flache, flüssigkeitsgekühlte Spule (MCF 125, MagVenture, Dänemark) gemessene magnetische Flussdichte
<i>25 A/μs (17%) 70 Hz und 8 Impulse</i>	70,8 mT	133,7 mT
<i>25 A/μs (17%) 10 Hz und 19 Impulse</i>	73,6 mT	133,0 mT
<i>31 A/μs (20%) 70 Hz und 8 Impulse</i>	87,3 mT	158,1 mT
<i>31 A/μs (20%) 10 Hz und 19 Impulse</i>	90,0 mT	159,3 mT
<i>141 A/μs (100%) 1/9 Hz und 8 Impulse</i>	1746 mT	1502 mT

3.2.2 Konfiguration der elektromagnetischen Befeldung

Die definierte Stimulation der Nervenzellen bei gleichbleibenden Randparametern, wie biphasische Impulsform, Spulentemperatur, Zellpositionierung und Abstand, erfolgte mit einem modifizierten Magnetstimulator X 100, MagVenture, Dänemark, unter Verwendung der für die Versuche repräsentativen parabolisch geformten Rundspule (konkave Seite, Abb. 14 A) sowie der flachen flüssig gekühlten Spule (Abb. 14 B). Hierbei wurden die Intensitäten wie die Änderung der Frequenz oder der Amplitudenstärke, in verschiedenen Versuchsreihen variiert. Aufgrund der Erfahrungen aus der therapeutischen Praxis von Waibler *et al.*, (2009) wurden abweichend zur Arbeit von Meyer *et al.*, (2009) biphasische sinusförmige Signalformen unterschiedlicher

Frequenz und Intertrain-Intervalle gewählt. Die Pulslänge lag bei 280 μs bei einer variablen Frequenz von 1 bis 100 Hz.

Die neuronalen Zellkulturen (FC) aus CRAMS V wurden an DIV 21 nach elektrophysiologischer Qualitätskontrolle einfach mit dem Stimulationsmuster A magnetisch stimuliert (Tab. 3).

In der Versuchsreihe CRAMS X wurden die neuronalen Zellkulturen (FC) ab Tag 21 nach qualitativer Kontrolle mit zwei unterschiedlichen Stimulationsmustern (A, B) wiederholt (doppelt, vierfach) magnetisch stimuliert. Die doppelte Stimulation wurde an DIV 21, die vierfache Wiederholung an DIV 23 je zweimal täglich mit einem Zeitabstand von 120 min durchgeführt.

Die Spule wurde bei Verwendung der parabolförmigen Spule mit der konkaven Seite durch eine nicht-magnetische Halterung in einem Abstand von 22 mm über der Zellkultur befestigt. Bei Verwendung der flach geformten flüssig gekühlten Spule (MCF 125, MagVenture, Dänemark) erfolgte die Fixierung ebenfalls mit einem Abstand von 22 mm über der Zellkultur durch eine nicht magnetische Halterung. Die Behandlungen erfolgten bei Raumtemperatur (23 °C) bei einer zu erwartenden Spulentemperatur von 23 °C bis 28 °C.

Die Stimulationsmuster mit den eingestellten Frequenzen, Impulsanzahlen, Pausenzeiten und Intensitäten entsprechend den Sequenzintervallen (Trains) und Blöcken in den Experimenten CRAMS V und X sind übersichtlich in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Applizierte spezifische Stimulationsspulen in den Versuchsreihen CRAMS V und X mit den entsprechenden Intensitäts- und Frequenzeinstellungen.

Stimulationsart	Spulenart	Einstellungen
A (CRAMS V und X)	Parabol geformte Spule PC	70 Hz Impulsfrequenz mit 8 Impulsen 4 sec. Sequenzintervall (=Train) 8 Trains (= Block) 8 Blöcke mit 60 sec. Blockintervall 25 A/ μs (17 %)
B (CRAMS X)	Flach geformte flüssigkeitsgekühlte Spule FC (MCF 125, MagVenture, Dänemark)	30 Hz Impulsfrequenz mit 20 Impulsen 4 sec. Sequenzintervall (=Train) 8 Trains (= Block) 8 Blöcke mit 60 sec. Blockintervall 84 A/ μs (60 %)

Die magnetstimulierten Kulturen wurden post Stimulation für eine Zeitdauer von 30 Minuten inkubiert und anschließend nach vollständigem Absaugen des Mediums bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

Die Referenzkulturen für die Genexpressionsanalyse wurden nicht magnetstimuliert, durchliefen jedoch ansonsten das gleiche Prozedere wie die stimulierten Proben. Sie wurden für den gleichen Zeitraum unter die abgeschaltete Spule (simulierte Magnetstimulation, Sham-Stimulation) im Stimulationsversuchsstand positioniert, anschließend für den gleichen Zeitraum inkubiert und abschließend, äquivalent den stimulierten Kulturen, tiefgefroren.

3.3 Morphologische Charakterisierung

3.3.1 Vitalitätskontrolle durch inverse Phasenkontrastmikroskopie

Der vorhandene Neuroversuchsstand im IMETUM (Abb. 15), Garching, wurde modifiziert und an die stimulationsbedingten Erfordernisse angepasst. Ein selbst entwickelter und gefertigter Faradayischer Käfig mit sternpunktförmiger Erdung schirmt den kompletten Versuchsaufbau vor elektromagnetischen Störfeldern und Elektrosmog ab. Diese Maßnahme ist erforderlich um die schwachen neuronalen Signale im Mikrovoltbereich ungestört aufnehmen und über den Vorverstärker MEAP/64 preamp (Abb. 15 B) und Hauptverstärker AMP/62sp+2 Post Amp (Plexon Inc., Dallas, USA) amplifizieren zu können. Im oberen Bereich ist die Laminarflow SPETEC[®] Laminar-Flow Box FBS (Spetec, Erding) mit Hepa-Filter zur Reinhaltung der Luft sowie eine integrierte UV-Bestrahlung zur Flächendesinfektion im gesamten Versuchsstand installiert. Der Volumenstrom der CO_2 - und medizinischen Luftbegasung der geschlossenen Kulturkammer lässt sich jeweils über einen Volumenstrom-Messregler exakt justieren. Mittels der Perfusionspumpe Syringe Pump 55-2222 (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) wird die Osmolarität in der Kammer aufrechterhalten um optimale zelluläre Membranverhältnisse zu schaffen, sowie eine Perfusion mit Reinstwasser zu gewährleisten. Die Messung der Osmolarität erfolgte mit dem Mikro-Osmometer VAPRO 5520 (Wescor, Logan, Utah, USA). Die Temperatur in der Kammer lässt sich über eine Steuer- und Regeleinheit, die ein an der Kammer angebrachtes Heizelement (beides Conrad Electronic, Hirschau) ansteuert, bis in den Zehntel-Grad-Bereich anwählen. Für Langzeitversuche kann eine variable Mikrozirkulation

über eine Regelung mit angeschlossener Zirkulationspumpe MS-CA 2/820 (ISMATEC/Cole-Parmer GmbH, Wertheim) erreicht werden. Zur akustischen Kontrolle der neuronalen Aktivitätsmuster (Spikes and Bursts) wurde eine 16-Kanal-Verstärkeranlage mit Vorverstärker und Filter sowie ausgangsseitigen Lautsprechern (Conrad Electronic, Hirschau) entwickelt und gefertigt. Mit der Fluoreszenzkamera Till Photonics und der dazugehörigen Leistungseinheit (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) lassen sich nach Fluoreszenzfärbung des Gewebes die Zellbestandteile, unter Verwendung der entsprechenden optischen Filter (Polychrome IV), in lichtmikroskopischen Aufnahmen darstellen. Die Zellkultur (Abb. 15 B) auf MEA mit Vorverstärker, elektrischen Zuleitungen und Perfusionsschläuchen befindet sich im Versuchstand auf dem Verschiebetisch des inversen Phasenkontrast-Mikroskops Nikon Eclipse TE 2000-E (Nikon, Tokyo, Japan).

Die Phasenkontrastmikroskopie bietet die Möglichkeit, ohne die Notwendigkeit der Verwendung der Färbemethode, durch die Phasenverschiebung des Strahlenganges aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes, biologisches Zellgewebe kontrastreich zu visualisieren. Der Mikroskopiertisch (Nikon, Tokyo, Japan) ist über eine Steuer- und Kontrolleinheit in x-y-z-Richtung mikrometerweise elektronisch steuerbar. Zur Visualisierung der Signalaktivität, elektronischer Störsignale sowie zur Signalverfolgung sind die hochauflösenden digitalen Oszilloskope HM 507 und R&S[®]RTO1012 (Rohde & Schwarz, München), ein Spektrumanalysator R&S[®]FSG8 (Rohde & Schwarz, München) sowie, zur Signalerzeugung und Stimulation über MEA-Elektroden, ein Frequenz- und Arbiträrsignalgenerator R&S[®]AFGU (Rohde & Schwarz, München) vorhanden. Die Signalerfassung und Weiterverarbeitung der neuronalen Spontanaktivität erfolgt durch ein angeschlossenes Mehrkanal-Aufzeichnungssystem MEA-Workstation MEA-WS/64 (Plexon Inc., Dallas, USA) mit PC-gesteuertem 64-Kanal Verstärkersystem (Plexon Inc., Dallas, USA).

Die Zellkulturen wurden im Neuroversuchstand (IMETUM, Garching) fortlaufend mittels inversen Phasenkontrastmikroskops Nikon Eclipse TE 2000-E (Nikon, Tokyo, Japan) sowie im Reinraum-Neurolabor (IMETUM, Garching) mittels Axiovert 40 CFL und Axiovert 200 (beide Zeiss, Oberkochen) morphologisch kontrolliert. Eine homologe Zellverteilung mit einem annähernden Verhältnis von 4:1 der Glia:Neuronen (Gross *et al.*, 1997) sowie geringer Zellmigration und ausgeprägter Netzwerk- und Synapsenbildung stellen die visuellen Qualifikationskriterien dar. Zellkulturen, die Verunreinigungen, Verpilzung oder anormale Entwicklung zeigten, wurden verworfen.

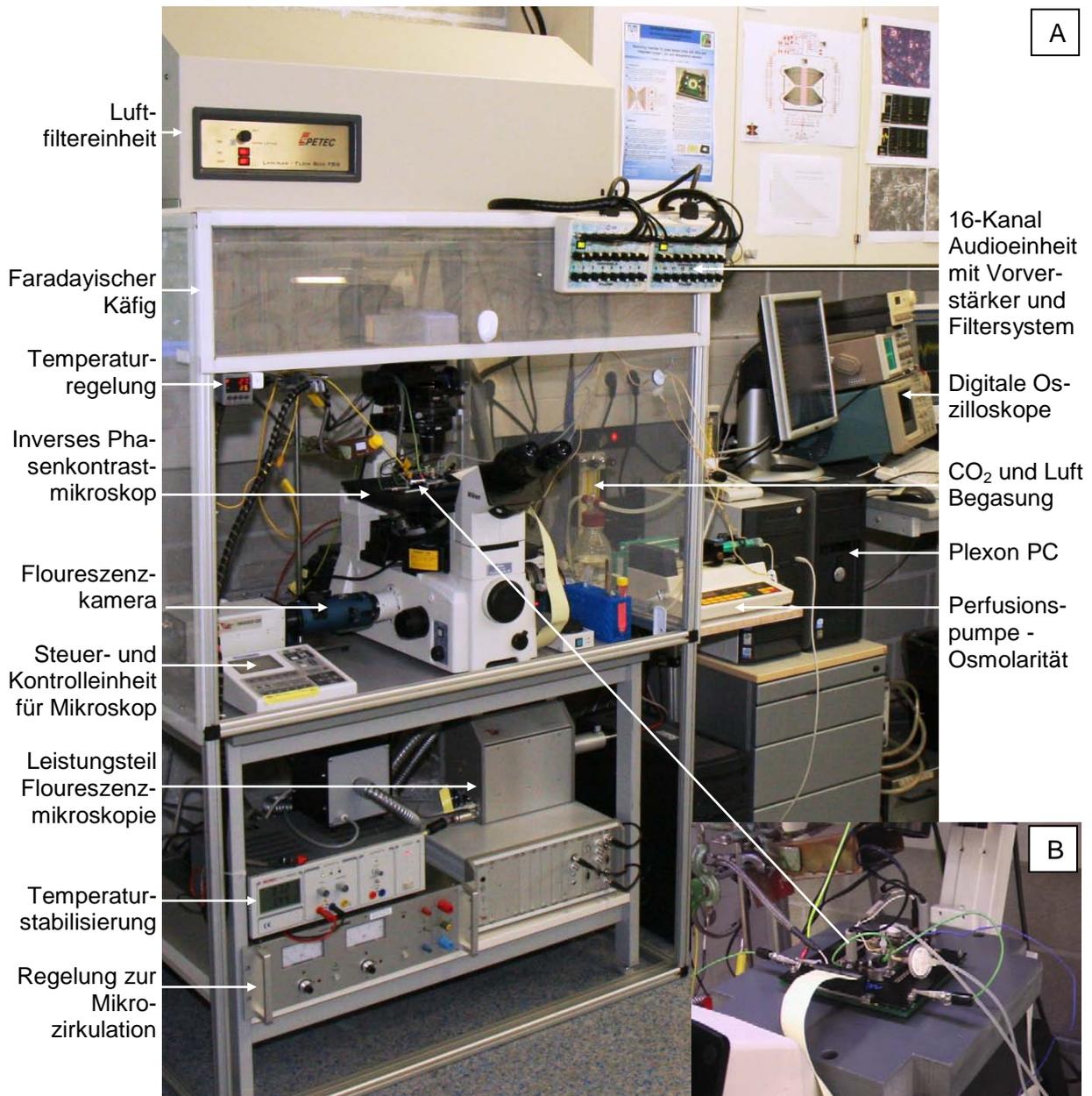


Abb. 15: A: Neuroversuchstand mit 64-Kanal-Analyse-Hardware der Fa. Plexon Inc., Dallas, USA, zur elektrischen Ableitung der neuronalen Signalaktivität, sowie Phasenkontrastmikroskopie zur Kontrolle der Morphologie und Viabilität der neuronalen Zellkulturen; B: Plexon Vorverstärkerplatine mit Datenübertragungs-Flachbandkabel, Heizungs- und Versorgungsleitungen sowie Erdungsklemmen.

3.3.2 Calcium-Oszillation

Die alternative Verwendung von spannungssensitiven Farbstoffen (Abb. 16) für die Messung der elektrischen Aktivität von Zellen beinhaltet eine mögliche Toxizität so-

wie eine nur gering zur Verfügung stehende Messdauer. Die Analyse, vor allem im Bereich der Genexpression der so behandelten Nervenzellen, führt zu Fehlinterpretationen aufgrund der invasiven methodischen Beeinflussung durch die verwendeten Färbemethoden. Auch ist eine deutliche Beeinflussung der neuronalen Signalaktivität in Form von Abnahme der Anzahl und Dichte der Spikes und Bursts bis hin zur vollkommenen Signalinaktivität registrierbar. Desweiteren ist eine quantitative oder qualitative Nutzung des Bildmaterials, mittels beispielsweise zugeordneter Farbskala, unpräzise und aufwendig. Die Calcium-Oszillation wurde exemplarisch durchgeführt, aber aufgrund der zuvor aufgeführten Nachteile nicht weiter verfolgt.

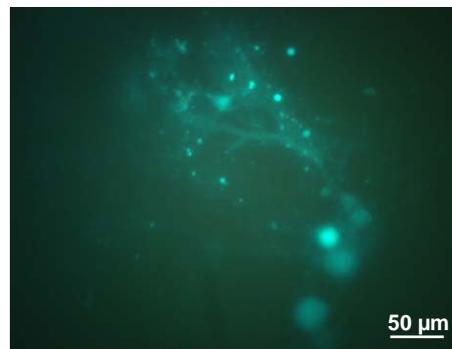


Abb. 16: Calcium-Oszillation von Nervenzellen des Frontalen Cortex auf Deckglas. Die Lebendzellefärbung wurde mittels Fluo-4 FL4 (Invitrogen, Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mikroskopisch (Axiovert 200, Zeiss, Oberkochen) bei einer Wellenlänge im Bereich von 550–560 nm.

3.4 Elektrophysiologische Signalerfassung

3.4.1 Hard- und Software zur Messung neuronaler Signalaktivität

Die verwendeten komplementären Mess-, Verstärkungs- und Kultivierungssysteme werden von der Firma Plexon Inc., Dallas, Texas, USA und dem Center for Network Neuroscience (CNNS), University of North Texas, Denton, USA produziert und vertrieben. Die Firma Plexon Inc., Dallas, USA bietet ein Verstärkersystem mit bis zu 128 Kanälen bei einer Sampling-Frequenz von 40 kHz und einer Verstärkung bis zu 14.000, sowie einer Realtime- und Offline-Datenverarbeitung, Spike-Sortierung und Datenanalyse-Software an. Die Sampling-Frequenz von 40 kHz erfüllt problemlos das Nyquist-Kriterium, bei dem die Abtastfrequenz mindestens doppelt so hoch sein muss, wie die zu erwartende abzutastende Frequenz (max. 1 kHz). Das CNNS, Denton, Texas, USA, produziert und entwickelt MEAs (Abb. 8 A und B) mit bis zu 256

Elektroden und 8 Kammern. Die Elektroden sind gold-beschichtet und reduzieren die Impedanz auf ca. 1–4 M Ω (1 M Ω bei 1 kHz), die Leiter aus transparentem, mikroskopie-tauglichem Indium-Titanoxid (ITO) hergestellt. Als elektrische Isolierung gegenüber dem Medium und den Zellkulturen wird Methyldimethylpolysiloxan (Impedanz > 10 M Ω bei 1 kHz) als Lacküberzug verwendet, der einen optimalen Kompromiss zwischen geforderter Haltbarkeit, Sprödigkeit, Zähigkeit und Elastizität darstellt. Somit liegt das optimale Verhältnis der Elektrode zum Nebenwiderstand bei 10, um die Detektion substantieller Aktionspotentiale (APs) zu garantieren. Weiterhin sind alternativ komplette Vitalitäts-Unterstützungssysteme mit sterilen CO₂- und H₂O-Versorgungen für Zeiträume bis weit über 6 Wochen für Langzeit-Mikroskop-Aufnahmen als '*closed chamber setup*' (Abb. 8A) möglich.

In den Experimenten der verschiedenen Versuchsreihen wurden CNNS MEA-Chips verwendet, die nach dem gängigen Arbeitsverfahren (s. 3.1.1 Vorbereitungen zur Zellpräparation) des CNNS präpariert wurden. Die Standardmaße der MEAs waren Elektroden Glaschips der Größe 5 x 5 cm² (MMEP-4, CNNS) mit einer zentralen Aufnahme-Matrix von 1,25 bis 1,44 mm² mit 64 passiven Elektroden (je ca. 20 μ m Durchmesser) und Indiumtitanoxid-Leiterbahnen einer Breite von 8-10 μ m und einer Schichtdicke von 1200 Å (Angström) oder alternativ als Doppelkammer mit zwei dezentralen Aufnahmematrizes und jeweils 32 passiven Aufnahme-Elektroden (Abb. 8). Der mittlere Elektrodenabstand bei den verwendeten MEAs, MMEP-4 und MMEP-5, betrug 150 μ m. Die Entwicklungs- und Fertigungsprozesse der MEAs im CNNS, Denton, Texas, USA, sind durch Gross *et al.* in der Literatur detailliert beschrieben (Gross *et al.*, 1985; Gross, 1994). Ein ebenfalls im CNNS gefertigter Silikonring, der das Kulturmedium auf dem MEA begrenzt und ein Fortfließen verhindert, wurde durch Silikonfett in der Mitte des MEAs fixiert und ermöglicht eine Besiedelungsfläche von ca. 9,6 cm² bei einer maximalen Medium-Menge von 3 ml. Zum Aufbringen der Kulturkammer auf MEA wurde der Silikonring wieder entfernt. Die mit Silikonlack isolierte Oberfläche wurde vor Besiedelung zur Steigerung der Zelladhäsion mit Poly-D-Lysin sowie Laminin beschichtet, wie detailliert unter Punkt 3.1.1 „Vorbereitungen zur Zellpräparation“ beschrieben.

Die Recordings (s. 3.4.2 Elektrophysiologische Aktivitätsmuster – Burst und Spike) erfolgten mit dem Mehrkanal-Aufzeichnungssystem und PC-gesteuerten, 64-Kanal-Verstärkersystem der Fa. Plexon Inc., Dallas, USA, das in der Lage war, die Aktivität einzelner Neurone (bis zu 256, Abb. 24 B) aufzuzeichnen und als Waveshapes (Wel-

lenformen, Abb. 24 A und B) und Timestamps (Zeitabbildungen, Abb. 24 C) zu visualisieren. Es konnte jede Einzelne der 64 Elektroden angewählt und jeweils bis zu 4 Neurone pro Elektrode definiert werden. Diese Signalaktivitäten der 4 Neurone konnten entweder simultan in einem Bild überlagert, oder jedes Neuron separat als Signalverlauf in einem Waveshape dargestellt werden (Abb. 24 A). Ein Waveshape entstand durch wiederholtes Aufeinanderlegen der Spontanaktivität eines Neurons mit gleicher Signalinizierung. Während einer Aufnahme wurden die einzelnen Spontanaktivitäten in allen Darstellungsarten (Abb. 24 A und B) zu den bestehenden Waveshapes mit gleichem Signalbeginn überlagert.

Im Rasterplot (Abb. 24 C) wurden die Aktivitäten als Balken (Timestamps), die mehrere direkt aufeinander folgende Spikes beinhalten, im zeitlichen Verlauf dargestellt. Nach Ablauf des zuvor parametrisierten Zeitintervalls erfolgte auf dem Monitor visualisiert, im Gegensatz zur akkumulierten Waveshape-Darstellung, repetitiv ein neuer Aktivitätsverlauf.

Die gesamte Spike-Erkennung und -Separation basierte auf einem Template-Matching-Algorithmus und ermöglichte somit eine exakte Signaldarstellung.

3.4.2 Elektrophysiologische Aktivitätsmuster – Burst und Spike

Zur Vitalitäts- und Qualitätskontrolle der neuronalen Zellkulturen wurden MEAs zur Aufzeichnung der elektrophysiologischen Aktivität verwendet. Spikes, Spike Trains und Bursts repräsentieren das charakteristische Merkmal der Netzwerkaktivität und sind ein wesentlicher Teil und Aspekt des Neuronalen Codes (Gross 1994; Johnstone *et al.*, 2010).

Konfiguration und Analyseparametrierung

Die analogen elektrischen Signale (Bursts and Spikes) der neuronalen Zellen auf MEAs wurden bei einer Verstärkung von 10.000 amplifiziert, anschließend mit einer Sample-Frequenz von 40 kHz digitalisiert und danach in sogenannten Timestamps gespeichert. Die Online-Analyse erfolgte unter Verwendung der Software Rasputin zur Separation der Wave Shapes und Neuroexplorer (Nex Technologies, Littleton, Massachusetts, USA).

Die quantitative Beschreibung der Bursts erfolgte durch direkte Spike-Train-Analyse mit dem Programm NeuroExplorer (Plexon Inc., Dallas, Texas, USA). Zur Definition

eines Bursts wurde das maximale Spike-Intervall eines Burststarts in einem Bereich von 50–150 ms gesetzt und das maximale Intervall des Burstends auf einen Bereich von 100–300 ms. Die Mindestanzahl der Spikes bei einer minimalen Dauer von 1 ms wurde auf zwei eingestellt. Die Parameter "minimum interval between bursts" wurden durch das Setzen auf einen arbiträr niedrigen Wert von der Burst-Definition ausgeschlossen, da das maximale Intervall eines Bursts als ausreichend beurteilt wurde um Bursts voneinander und von Interburst-Spikes zu trennen. Die folgenden aktivitätsbeschreibenden Parameter wie Spike Rate (SR), Burst Rate (BR), Percentage of Spikes in Burst (%S/B), Mean Spike (MS/B) und Peak Spike (PS/B), Frequency in Burst (F/B), Interspike Interval in Burst (ISI), Burst Period (BP), Number of Spikes in Burst (S/B), Burst Duration (BD), Interburst Interval (IBI), Number of Bursting Neurons (NBN), und Burst Surprise (BS) (Gramowski *et al.*, 2006) wurden bei den Qualitätskriterien berücksichtigt.

3.5 Genexpressionsanalytik

Standardisierte Nervenzellkulturen des Frontalen Cortexes embryonaler Mäusegehirne wurden mit unterschiedlichen Stimulationsmustern behandelt und die Zellantwort in Form der Transkriptionsanalyse zunächst semiquantitativ generalisiert mittels Microarrays durchgeführt, um beeinflusste Gene ohne Vorselektion zu detektieren (Stock *et al.*, *in praep.* a). Anschließend wurde die Genexpressionsanalyse mit RT-qPCR Arrays (Alzheimer und Neurodegeneration) erfasst und die Ergebnisse wurden in Einzel-RT-qPCR selektierter Gene validiert (Stock *et al.*, 2012). Ergänzend zur RNA-Expression erfolgte die Untersuchung des Einflusses von rTMS auf die miRNA (pathologiebezogen selektiert) (Stock *et al.*, *in praep.* b).

3.5.1 RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA wurde von den tiefgefrorenen Zellkulturen (–80 °C) mittels peccgold trifast (peccgold, Erlangen, Deutschland) und Quiazol Lysis Reagent Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Gewinnung wurde anhand des Protokolls für Zellkulturen, unter geringer Modifikation zur Zell-Lyse auf MEAs, durchgeführt.

Die Qualität und Quantität der RNA wurde mittels Spektrometermessung (Nanodrop, ND-1000, Thermo Fisher, Waltham, USA) evaluiert. Absorbtionswerte wurden bei 230 nm (Detektion organischer Substanzen) und 280 nm (Detektion von Proteinen

und Phenolen) gemessen. Die Quotienten der Absorption bei 260 nm (RNA) zu 280 nm bzw. 260 nm zu 230 nm wurden höher 1,7 verifiziert um mögliche Verunreinigungen auszuschließen.

Die RNA-Integritätszahlen (RIN-Werte) wurden zur Qualitätssicherung standardisiert durch kapillare Elektrophorese ermittelt und überprüft (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Palo Alto, USA; Experion Automated Electrophoresis Station, Bio-rad, Hercules, USA). Hierzu wurden standardisierte RNasefreie RNA Assays (RNA Serie II Kits, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) bei minimalem Probenverbrauch (1 µl Probe mit 50 pg gesamt-RNA) verwendet. Es erfolgten eine gelähnliche Abbildung (virtuelles Gelbild) und eine Darstellung der elektrophoretischen Daten (Elektropherogramm), wobei die einzelnen Fraktionen der ribosomalen RNA (rRNA), die mRNA und die fragmentierten RNAs der Größe nach getrennt visualisiert wurden. Eine scharfe und getrennte Abbildung der 28s und 18s Fraktionen ist notwendig, da die rRNA bis zu 85-90 % der Gesamt-RNA ausmacht. Eine RNA-Probe hoher Qualität zeigt sich durch das Verhältnis rRNA Ratio 28s/18s bei einem Wert von 2,0. Als Identifikation der Degradierung variiert die RNA-Integritätszahl von 10 als intakte, nicht degradierte und fragmentierte RNA hoher Qualität bis zu einem Wert von 1 bei kompletter Degradation und Fragmentation mit geringster Qualität.

Abschließend wurden die extrahierten RNA-Lösungen bei -80 °C zur weiteren qPCR-Analyse zwischengelagert.

3.5.2 Transkriptom-Analysen mit Affymetrix GeneChip® for Mouse

Zur Erfassung des gesamten Transkriptoms (mRNA) der Maus wurden Affymetrix Mouse GeneChip® 1.0 ST Microarrays mit 28.853 Genen verwendet.

In Anlehnung an die Richtlinien des Herstellers (Affymetrix) wurden je 200 ng Gesamt-RNA der drei Kontrollproben und der drei mit der Stimulationsart A stimulierten Proben (CRAMS V) mit dem Affymetrix GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Kit amplifiziert und spezifiziert. Unter Einhaltung der Standardprozeduren (Affymetrix) wurde die verstärkte und fragmentierte biotinylierte cDNA im GeneChip® Gene 1.0 ST Array System for Human, Mouse and Rat (Fremont, USA; Affymetrix Cat. Number 901169) hybridisiert und als cel-File ausgelesen. Die Microarray-Analytik wurde an der Core Facility, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München, durchgeführt.

Die generierten Microarray-Daten wurden einer Rohdatenanalyse in R und Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004; R Development Core Team 2007) unterzogen. Die Arrays wurden qualitativ überprüft und RMA-(Robust Multi-array Average)-normalisierte Daten nach unterschiedlicher Genexpression anhand empirisch Bayes-gemäßigtem t-Test analysiert und in das Bioconductor package LIMMA (Linear Models for Microarray Data) (Smyth, 2004; Huber *et al.*, 2015; Richie *et al.*, 2015) implementiert (s. 3.6). Die Microarray Experimente wurden übereinstimmend mit den MIAME Guidelines (Brazma *et al.*, 2001) durchgeführt.

Die sich hieraus ergebenden signifikant regulierten Gene ($p < 0,05$) wurden anhand existierender GeneOntology Annotations in der Reihenfolge ihrer Regulationsrichtung und in Abhängigkeit ihrer Klassifizierung und Unterklassifizierung in der AmiGo-Database gruppiert (s. 3.6) (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>).

3.5.3 RT-qPCR-Arrays

Speziell konfigurierte Microarrays bieten die Möglichkeit pathologie-selektierte Gene in ihrer Expression zu untersuchen. Zwei unterschiedliche 96-Well-Arrays, fokussiert auf Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Alzheimer Disease) sowie neuronale degenerative Erkrankungen (Neurodegeneration), wurden hierfür ausgewählt. Die mögliche Anzahl der durch Magnetstimulation beeinflussten pathologiebezogenen Gene wurde somit limitiert und eine Zusammenstellung von Zielgenen evident. Die in beiden Arrays identischen Gene wurden separat analysiert, danach normalisiert sowie die Genregulationen detektiert und validiert (9.4.5).

Beide 96-Well-Arrays beinhalten Primer für je 94 Gene zuzüglich einer Positiv- (18 S RNA) und einer Negativkontrolle (Genomic DNA). Insgesamt ermöglichten die verwendeten qPCR-Arrays Mouse Alzheimer Disease 96 StellARay™ und Mouse Neurodegeneration 96 StellARay™ (Bar Harbor Biotechnology, Trenton, USA) eine Gesamtanalyse von 171 Genen (Stock *et al.*, 2012).

Von drei biologischen Replikaten der Kontrollgruppe und drei mit Stimulationsmuster A (70 Hz; CRAMS V) behandelten Zellkulturen wurden in Anlehnung an das Herstellerprotokoll 0,5 µg der Gesamt-RNA mit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit für RT-qPCR (Fermentas, Burlington, Canada) in einer 20 µl Reaction Mix revers transkribiert (Tab. 4) und anschließend im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Tab. 4: Temperaturprotokoll und Mastermix für Synthesis Kit Maxima™ First Strand.

Temperaturprotokoll und Mastermix Maxima™ First Strand	
Dauer/ Temperatur	10 min/25 °C
	15 min/50 °C
	5 min/85 °C
Mastermix/ Menge	5 x Reaction Mix/4 µl
	H ₂ O-Nuclease-frei/9 µl
	Maxima® Enzyme Mix/2 µl
	Sample RNA (100 ng/µl)/5 µl
Gesamtmenge	20 µl

Die Amplifikation und Detektion der qPCR wurde mit Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, Burlington, Canada) Reaktionsmix (Tab. 5) auf einem Realplex Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) unter den vorgegeben Zyklusparametern (Tab. 5) durchgeführt. Nach der 'melt curve'-Analyse wurden den gewonnen Daten individuelle Schwellenwerte unter Anwendung des Noiseband-Algorithmus der Realplex Mastercycler Software (Eppendorf, Hamburg, Germany) zugeordnet. Die Daten wurden in Excel (Microsoft, Redmond, USA) exportiert und die Quantification-Cycle-(Cq)-Analysewerte via Bioconductor Package High-Throughput RT-qPCR (HTqPCR) (Dvinge und Bertone 2009) verglichen. Referenzgene des Arrays Neurodegeneration waren Nefm und Trp53, die des Arrays Alzheimer-Erkrankung Nctsn und Dhcr24 (GeNorm; Vandesompele *et al.*, 2002).

Tab. 5: Temperaturprotokoll und Mastermix der qPCR-Arrays unter Verwendung von Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X).

Temperaturprotokoll und Mastermix Maxima™ SYBR Green	
Dauer/ Temperatur/ Anzahl der Zyklen	2 min/50 °C/ 1
	15 sec/95 °C/40
	60 sec/60 °C/ 1
	schrittweise 0,5 °C/ 65 °C - 95 °C/ 1
Mastermix/ Menge	Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)/15,0 µl
	H ₂ O-Nuclease-frei/ 3,5 µl
	cDNA-Lösung (1:10 verdünnt)/ 1,5 µl
Gesamtmenge	20 µl

Die in beiden qPCR-Arrays vorkommenden Gene wurden wiederholt analysiert und normalisiert (Referenzgene Dctn1 und SSr4; GeNorm; Vandesompele *et al.*, 2002). Signifikante Änderungen der Genexpression wurden mittels $\Delta\Delta$ -Cq-Methode, angewandtem t-Test sowie Bayes moderated t-test detektiert.

3.5.4 Einzel-RT-qPCR

Zur Validierung möglicher signifikanter Zielgen-Expressionsänderungen wurden Einzel-qPCR-Analysen in einer größeren Zusammenstellung von Proben mit selbst designten Primern durchgeführt (Stock *et al.*, 2012).

Hierbei wurden 18 Referenzproben und 17 mit dem Stimulationsmuster A (einfach, 70 Hz, CRAMS V) behandelte Proben in RT-Duplikaten mit einer Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) für alle 27 Gene gemessen. Weiterhin wurde die Expression von 16 Genen der jeweils vier Kontrollproben, der mit Stimulationsmuster A (vierfach, 70 Hz, CRAMS X) und der mit Stimulationsmuster B (vierfach, 30 Hz, CRAMS X) behandelten Zellkulturen in RT-Duplikaten und gleichen Negativkontrollen (RNase-freies Wasser) quantifiziert.

Die Kontrollgruppen und die behandelten Zellkulturen wurden in Anlehnung an das Herstellerprotokoll bei 0,5 μ g der Gesamt-RNA mit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit für RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, USA) in einer 20 μ l Reaction Mix revers transkribiert (Tab. 6) und anschließend im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Tab. 6: Temperaturprotokoll und Mastermix für SuperScript® VILO™.

Temperaturprotokoll und Mastermix SuperScript® VILO™	
Dauer/ Temperatur	10 min/ 25 °C
	60 min/ 42 °C
	5 min/ 85 °C
Mastermix/ Menge	5 x VILO Reaction Mix/ 4 μ l
	H ₂ O-Nuclease-frei/ 9 μ l
	10 x Superscript® Enzyme Mix/ 2 μ l
	Sample RNA (100 ng/ μ l)/ 5 μ l
Gesamtmenge	20 μ l

Die cDNA-Lösung wurde 1:2 verdünnt um näherungsweise eine Konzentration von 25 ng pro Reaktion zu erhalten. Es wurde, wie bei den qPCR-Arrays zur Bestimmung der Target-Gen qPCR, der Kit Maxima™ SYBR Green qPCR Mastermix (2 x) (Fer-

mentas, Burlington, Canada), verwendet (Tab. 5). Die qPCR wurde auf einem StepOnePlus Real Time qPCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) unter Beachtung des Herstellerprotokolls auf 96-Wellplatten (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 ml; Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

In Abweichung der Mengenangaben zu Tab. 5 bestand die Gesamtmenge von 10 µl für eine Reaktion aus 2 µl cDNA-Lösung, 5 µl Maxima SYBR Green RT-qPCR Master Mix (2x), 2,4 µl Nuklease-freies Wasser und 0,3 µl jeder Primer Lösung (Forward Primer und Reverse Primer je 10 pmol/ µl). Das Cycling Program und die Genauigkeits-Verifizierung wurden äquivalent Tab. 5 ausgeführt. Abschließend wurden Baseline und Threshold manuell in der exponentiellen Phase mittels StepOnePlus Instrument Software (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) gesetzt. Die analysierten C_q -Werte wurden in das HTqPCR-Package in R (Dvinge and Bertone 2009) zur $\Delta\Delta-C_q$ -Normalisierung (Referenzgene Nae1 und Psenen) und zum Test der signifikanten Änderungen der Genexpression (t-Test) überführt. Die RT-qPCR Datenanalyse wurde in Anlehnung an die MIQE Guidelines (Bustin *et al.*, 2009) vollzogen.

Primer Design

Es wurden Primer für die durch die qPCR-identifizierten 24 Gene zuzüglich des bereits wissenschaftlich in Bezug auf rTMS untersuchten Gens Rnf103 (kf-1) sowie Bace1, das evident an der Kausalität der pathologiekorrelierten Genese von Alzheimer-Erkrankung beteiligt ist, unter Verwendung publizierter Nukleinsäure-Sequenzen der Mausgenom-GenBank (NCBI, Bethesda, USA), designt. Zur Optimierung und zum Design der Primer wurde das Programm Primer Design Primer 3 v.0.4.0 (<http://frodo.wLmit.edu/primer3/>, Rozen and Skaletsky 2000) angewendet und validiert mit Netprimer (Premier Biosoft, Silicon Valey, USA) in Bezug auf Primer Dimer Formation, Self-priming Formation und Similar Primer Annealing Temperature. Die Primer (Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland) wurden in Sample Pool und Negativ-Kontrolle für jedes Primer-Set getestet sowie die Genauigkeit durch die Melt Curve validiert. Die Sequenz und Location wurden mit PrimerBLAST (NCBI, Bethesda, USA) überprüft und zusätzlich die getesteten Primer für Marker neuronaler Abstammung (Gal, Gfap) zusammen mit einem möglichen Referenzgen (Actb) in das Target-Gene-Set eingebunden. In Tab. 7 ist eine zusammengefasste Darstellung aller designten Primer mit Bezeichnung und Sequenz für die Zielgene dargestellt.

Tab. 7: Zusammenstellung aller Primer zur Targetgen-Validierung mit Beschreibung der Kandidatengene, Abkürzung, NCBI Gene-Bank Accession Number, Forward (F) und Reverse (R) Primersequenz, Annealing Temperatur (Ann.Temp.), Annealing Position des Primer auf der Gensequenz (Start(bp)) und Amplicon Length (Ampl.Length) (Stock *et al.*, 2012).

Abkürzung	Primer Sequence 5'-3'	Ann. Temp.	Start (bp)	Ampl. Length
Mus musculus interleukin 1 alpha (Il1a), mRNA NCBI Ref: NM_010554.4				
Il1aF	GAGAGCCGGGTGACAGTATC	54	205	206
Il1a R	ACAACTTCTGCCTGACGAG		410	
Mus musculus beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1 (St6gal1), mRNA NCBI Ref: NM_145933.3				
St6gal1 F	GCCACAGATTTTCCCTTCAA	57	454	175
St6gal1 R	CATTAAACCTCAGGACCGCA		628	
Mus musculus interleukin 3 (Il3), mRNA NCBI Ref: NM_010556.4				
Il3 F	TGGAAAGCCAAGGAGAAGTG	57	274	238
Il3 R	CGGTTAGGAGAGACGGAGC		511	
Mus musculus synuclein, alpha (Snca), transcript variant 1, mRNA NCBI Ref: NM_001042451.1				
Snca F	GGAGTGACAACAGTGGCTGA	57	151	149
Snca R	TGCCATCTGGTCCTTCTT		299	
Mus musculus ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A (Abcb1a), mRNA NCBI Ref: NM_011076.2				
Abcb1a F	CATTGCGATAGCAGGAGTG	54	2559	157
Abcb1a R	AGAGACAACAGTGC GGAAGT		2715	
Mus musculus calmodulin 3 (Calm3), mRNA NCBI Ref: NM_007590.3				
Calm3 F	GGCACCATTACCACCAAG	54	76	185
Calm3 R	CGTATCTCCTCCTCGCTGT		260	
Mus musculus membrane metallo endopeptidase (Mme), mRNA NCBI Ref: NM_008604.3				
Mme F	ATTCAGCCAAAGCAAGCAG	57	1548	271
Mme R	CCAGTCAACGAGGTCTCCAT		1818	
Mus musculus NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1 (Nae1) NCBI Ref: NM_144931.3				
Nae1 F	CAAGGAGGGTCAAGGAAAT	54	946	162
Nae1 R	GCCAACAGACTGAAGCAAT		1107	
Mus musculus low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) NCBI Ref: NM_008512.2				
Lrp1 F	CTGCTTCTCCTGCTGCTTCT	57	13291	156
Lrp1 R	GGGCTCTCCACCTTCATACA		13446	
Mus musculus PTEN induced putative kinase 1 (Pink1) NCBI Ref: NM_026880.2				
Pink1 F	GCCCCACACTACTACCCA	57	894	236
Pink1 R	GACGCCATCTGAGTCCCAC		1129	
Mus musculus anterior pharynx defective 1a homolog (<i>C. elegans</i>) (Aph1a) NCBI Ref: NM_146104.2				
Aph1a F	GGCAGATGAGGGCTTAGCA	57	288	234
Aph1a R	CAAAAGGTGTGGAGCAGGAT		521	
Mus musculus calmodulin 4 (Calm4) NCBI Ref: NM_020036.4				
Calm4 F	TTGGACACAGATGGTGATGG	57	166	180
Calm4 R	GGACTCGCCTAACTTGGACA		345	
Mus musculus presenilin enhancer 2 homolog (<i>C. elegans</i>) (Psenen) NCBI Ref: NM_025498.2				
Psenen F	CTACACAGAGCAGAGCCAAATC	57	138	154
Psenen R	GGGAATGGTGAAGGAGAGGT		291	
Mus musculus BCL2-like 1 (Bcl2l1) NCBI Ref: NM_009743.4				
Bcl2l1 F	GGTATTGGTGAGTCGGATTG	54	480	211
Bcl2l1 R	GAAGAGTGAGCCCAGCAGA		690	
Mus musculus beta-site APP cleaving enzyme 1 (Bace1), transcript variant 1, mRNA NCBI Ref: NM_011792.5				

Bace1 F	CTCCGAAAGGGTGTGTATGTG	57	370	227
Bace1R	TCAAAGAAGGGCTCCAAAGA		596	
	Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (Ube2g2)			
	NCBI Ref: NM_019803.3			
Ubeg2g2 F	CCCACCTTGACTACCCCTTG	54	180	228
Ubeg2g2 R	TGCTCCACTCTCATCGTTG		407	
	Mus musculus growth associated protein 43 (Gap43)			
	NCBI Ref: NM_008083.2			
Gap43 F	TTGCTGATGGTGTGGAGAAG	57	221	218
Gap43 R	TTGGAGGACGGGGAGTTAT		438	
	Mus musculus presenilin 1 (Psen1)			
	NCBI Ref: NM_008943.2			
Psen1 F	CCTACTTCCAGAATGCCAG	57	26	177
Psen1 R	CCTCATCTTGTTCCACCACC		202	
	Mus musculus golgi associated ARF binding protein 3 (Gga3)			
	NCBI Ref: NM_173048.2			
Gga3 F	CCGTTGCCAGTCAAGAGC	57	1860	199
Gga3 R	CCGCACCTTTTCCTTCATT		2058	
	Mus musculus interleukin 6 (Il6)			
	NCBI Ref: NM_031168.1			
Il6 F	GAGATACAAAGAAATGATGGATGC	57	280	230
Il6 R	GAAATTGGGGTAGGAAGGACT		509	
	Mus musculus ring finger protein 103 (Rnf103, kf1)			
	NCBI Ref: NM_009543.2			
Rnf103 F	CATGTGAAAGGAAGAGGAGG	54	1753	155
Rnf103 R	GGCAACCCATTAGCAA		1907	
	Mus musculus mesenchyme homeobox 2 (Meox2)			
	NCBI Ref: NM_008584.3			
Meox2 F	CCCCTTCTCCAGTCTTCTCT	57	59	181
Meox2 R	TGGTGGTGGTATGGTATG		239	
	Mus musculus corticotropin releasing hormone (Crh)			
	NCBI Ref: NM_205769.2			
Crh F	GCTGCTGGTGGCTCTGT	54	33	167
Crh R	AGGCGGAGGAAGTATTCTT		199	
	Mus musculus actin, beta, cytoplasmic (Actb)			
	NCBI Ref: NM_007393.2			
Actb F	CTTCTTTGCAGCTCCTTC	57	31	151
Actb R	GATGGAGGGGAATACAGC		181	

3.5.5 MicroRNA-Expression

In Ergänzung zur mRNA-Expression wurde der Einfluss von rMS auf die miRNA-Expression anhand von 22 miRNAs, die mit Alzheimer und anderen ZNS-Störungen bei Mäusen assoziieren, untersucht. Für die cDNA-Synthese wurde TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), der 'looped primers' speziell für nur eine miRNA enthält, im Gegensatz zur cDNA-Synthese bei mRNA initialisiert durch 'random primers' ('random hexamer, oligo dT'), verwendet (Tab. 11). Die cDNA-Lösungen wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur qPCR gelagert. Die qPCR wurde mit TaqMan® MicroRNA Assays Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) in Verbindung mit TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. TaqMan® Fast Advanced Master Mix steigert die Leistungsfähigkeit der MicroRNA-Quantifizierung bei gleichen oder besseren Ergebnissen und kürzerer Laufzeit (Tab. 9).

Es wurden 12 Proben aus der Versuchsreihe CRAMS X, je vier mit Stimulationsmuster A (vierfach, 70 Hz, CRAMS X), Stimulationsmuster B (vierfach, 30 Hz, CRAMS X) sowie Referenz, als Triplikate einschließlich einer Negativkontrolle (RNase-freies Wasser) quantifiziert. Die in Tab. 8 und Tab. 9 aufgeführten Mastermix- und Temperaturprotokolle wurden bei allen Reaktionen entsprechend dem Herstellerprotokoll eingehalten.

Tab. 8: Temperaturprotokoll und Mastermix für TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit.

Temperaturprotokoll und Mastermix TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription	
Dauer/ Temperatur	30 min/ 16 °C
	30 min/ 42 °C
	5 min/ 85 °C
Mastermix/Menge	dNTP's (mit dTTP) (100 mM)/ 0,15 µl
	10 x Reverse Transcription Buffer/ 1,50 µl
	MultiScribe™ Reverse Transcription (50 U/µl)/ 1,00 µl
	RNase Inhibitor (20 U/µl) / 0,19 µl
	H ₂ O Nuclease frei/ 4,16 µl
	miRNA spezifischer RT Primer/ 3,00 µl
	Sample RNA (2 ng/µl)/ 5,00 µl
Gesamtmenge	15,00 µl

Tab. 9: Temperaturprotokoll und Mastermix für TaqMan® MicroRNA Assays Kit mit TaqMan® Fast Advanced Master Mix.

Temperaturprotokoll und Mastermix TaqMan® MicroRNA Assay Kit	
Dauer/ Temperatur/ Anzahl der Zyklen	10 min/ 95 °C/ 1
	15 s/ 95 °C/ 40
	60 s/ 60 °C/ 1
Mastermix/ Menge	TaqMan® MicroRNA Assay/ 1,00 µl
	TaqMan® Fast Adv. Master Mix/ 10,00 µl
	H ₂ O Nuclease frei / 7,67 µl
	cDNA-Lösung/ 1,33 µl
Gesamtmenge	20,00 µl

In Tab. 10 sind sämtliche miRNA-Kits mit ihrer 'mature accession'-Nummer und den miRNA-Sequenzen ersichtlich. Anschließend wurde manuell die Schwelle in der ex-

ponentiellen Phase mit StepOnePlus Instrument Software (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) gesetzt. Die analysierten C_qs wurden in Excel (Microsoft, Redmond, USA), für weitere Analysen in R, exportiert. Als Referenzgene dienten hsa miR 125b und hsa let 7a.

Tab. 10: Aufstellung der untersuchten miRNAs mit Mature Accession Number, Bezeichnung und Mature miRNA-Sequenz.

Mature Accession Number	Bezeichnung	Mature miRNA Sequenz
MIMAT0000521	hsa-let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
MIMAT0000523	hsa-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
MIMAT0000524	hsa-let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
MIMAT0000648	hsa-miR-10a	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG
MIMAT0000208	hsa-miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
MIMAT0000136	hsa-miR-125b	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
MIMAT0000140	hsa-miR-128a	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
MIMAT0000144	hsa-miR-132	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG
MIMAT0000769	hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA
MIMAT0000213	hsa-miR-184	UGGACGGAGAACUGAUAAGGGU
MIMAT0000519	hsa-miR-200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
MIMAT0000237	hsa-miR-204	UUCCCUUGUCAUCCUAUGCCU
MIMAT0000565	hsa-miR-328	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU
MIMAT0000143	hsa-miR-9	AUAAAGCUAGAUAACCGAAAGU
MIMAT0004620	mmu-let-7a	CUAUACAAUCUACUGUCUUUCC
MIMAT0004622	mmu-let-7c-1	CUGUACAACCUUCUAGCUUCC
MIMAT0000134	mmu-miR-124a	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC
MIMAT0000146	mmu-miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG
MIMAT0000659	mmu-miR-212	UAACAGUCUCCAGUCACGGCCA
MIMAT0000372	mmu-miR-294	AAAGUGCUUCCUUUUGUGUGU
MIMAT0000376	mmu-miR-298	GGCAGAGGAGGGCUGUUCUCC
MIMAT0003456	mmu-miR-495	AAACAAACAUGGUGCACUUCU

3.6 Bioinformatische Auswertung der Transkriptionsergebnisse

Die statistische Analyse der Transkriptionsergebnisse der Microarrays erfolgte mittels R/Bioconductor Softwarepackage LIMMA (Linear Model for Microarray Analysis; Smyth 2005; Huber *et al.*, 2015; Ritchie *et al.*, 2015) unter Berücksichtigung der Genonthologie (AmiGo-Datenbank; Carbon *et al.*, 2009) und der Pathway-Architektur (KEGG-Pathway; Kanehisa *et al.*, 2000 und 2017). Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse (RT-qPCR-Array, Einzel-RT-qPCR) wurden mittels deskriptiver Statistik in R (R Development Core Team 2013) Bioconductor Plattform (Gentleman *et al.*, 2004) bioinformatisch weiterverarbeitet. Zur differenzierteren Betrachtung

tung der biologischen Prozesse wurde das GO Enrichment Tool GOrilla (Eden *et al.*, 2009) angewendet. Die funktionelle Interpretation der Microarray-Daten wurde in DAVID (Dennis *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2009) visualisiert.

Die Joint-Analysis der Target mRNAs zu den ausgewählten miRNAs wurde über zeitgemäße Analyse-Algorithmen wie DIANA (Vlachos *et al.*, 2015) sowie der auf experimentell verifizierten und weitreichenden Datenbanken basierenden prädiktiven miRNA-Interaktionen der Software miRWalk2.0 (Dweep *et al.*, 2015) untersucht.

3.6.1 Statistische Auswertung der Daten in R

Programmiersprache R

R (R Development Core Team 2013) ist eine Open-Source-Alternative (freie Programmiersprache) zur kommerziellen Statistik-Software S-Plus mit der Programmiersprache S für statistisches Rechnen und statistische Grafiken. Die Nutzung der Repositories aus Bioconductor setzt R als Programmiersprache voraus. Der Funktionsumfang von R kann durch eine Vielzahl von Core-Paketen erweitert und an spezifische statistische Problemstellungen angepasst werden. Eine große Anzahl an Paketen kann dabei direkt als Basisfunktionalität aus einer über die R-Console abrufbaren Liste ausgewählt und automatisch installiert werden. Das offizielle Package-Repository als zentrales Archiv für diese Pakete ist das 'Comprehensive R Archive Network' (CRAN). Aktuell (Februar 2017) existieren über 10.119 verfügbare Software-Packages auf CRAN (<http://cran.r-project.org/web/packages/>) und über 1296 Software-Packages auf Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) (Ihaka and Gentleman 1996; Huber *et al.*, 2015).

HTqPCR – High-throughput-qPCR

Aufgrund hoher Datenmengen bei High-throughput-qPCR-Anwendungen ist es notwendig, eine effiziente Datenverarbeitung in jeder Analysestufe zu gewährleisten. Das Software Package HTqPCR in R/Bioconductor, basierend auf der Programmiersprache R, ist zur Analyse von high-density-qPCR-Arrays in allen Phasen der Daten-Akquirierung und -Verrechnung geeignet. Es ist mit verschiedensten Werkzeugen des Bioconductor-Projects adaptierbar und bietet die Möglichkeit unkompliziert Daten in andere Analyse-Systeme zu integrieren (Dvinge und Bertone 2009). Der Workflow

von HTqPCR bei der Analyse von qPCR-Daten ist in Abb. 17 (Mitte) dargestellt und besteht aus nachfolgend beschriebenen Einzelschritten. Zunächst werden die Rohdaten (Ct-Werte der Gene) in tabulatorgetrennten Textfiles in der Objektklasse qPCR eingegeben und gespeichert. Zur Daten-Qualitätskontrolle (QC) ist es möglich verschiedene Kriterien (Ct-Werte Gesamtdarstellung, spatiale Darstellung, Duplikate, Hauptkomponentenanalyse (PCA), Replikatvariation) über die spezifizierten Plot-Befehle in R angewendet zu visualisieren. Zur Validierung der Zuverlässigkeit werden die qPCR-Daten funktionsassoziiert kategorisiert, gefiltert und dargestellt. Die Normalisierung erfolgt über fünf unterschiedliche Methoden. Hiervon skalieren drei Methoden ('scale.rankinvariant', 'deltaCt' und 'geometric.mean') jede individuelle Probe nach einem vorgegebenen Wert und zwei ('quantile' und 'norm.rankinvariant') berechnen die Verteilung der Ct-Werte. Das anschließende Filtern ermöglicht die Exklusion sowohl individueller Funktionen, als auch die von Funktions-Gruppierungen niedriger Qualität oder Analyseunrelevanz. Durch Anwendung der Standardnotation [,] aus R kann eine kleinere Untereinteilung des qPCset-Objekts erreicht werden, um eine anteilige Merkmalklassifizierung oder Exklusion weniger Proben zu analysieren. Nach einer erneuten qualitativen Beurteilung (QC) der Probenkorrelation, Verteilung der Ct-Werte, Vergleich der unbearbeiteten und der normalisierten Ct-Werte der Proben, Boxplots, Scatterplots, Heatmaps und Koeffizientenvariation erfolgt ein Clustering in hierarchischer (Euklidische oder Pearson-Korrelation) oder Hauptkomponenten (PCA)-Struktur. Der letzte Programmierschritt beinhaltet die Signifikanzanalyse der verschiedenen Ct-Werte (Differentialexpression). Es stehen in HTqPCR die drei statistischen Testarten t-Test, Mann-Whitney (Wilcoxon-Rangsummentest) und LIMMA zur Verfügung.

Die abschließenden Rechenergebnisse lassen sich wiederum generalisiert explizit durch den Befehl 'plotCtOverview' (QC) oder die relativen Ct-Werte in Abhängigkeit des p-Values zweier Gruppen mit 'plotCtRQ' darstellen. Individuelle Fokussierung auf Ct-Werte, die Dispersion oder die kategorische Zuordnung der Richtigkeit der Daten können über den Befehl 'plotCtSignificance' visualisiert werden.

Hierbei werden signifikante p-Values aus den Ergebnissen der 'ttestCtData'- oder 'limmaCtData'-Funktionen (relative Quantifizierung) mit den eingegeben Daten dieser Funktionen, in einem Barplot markiert dargestellt, verglichen. Bei einem Vergleich mehrerer Relationen mit der Funktion 'limmaCtData' können Cluster gleicher Eigen-

schaften basierend auf den Euklidischen Abständen im Heatmap durch die Funktion 'heatmapSig' sichtbar werden (Dvinge 2015).

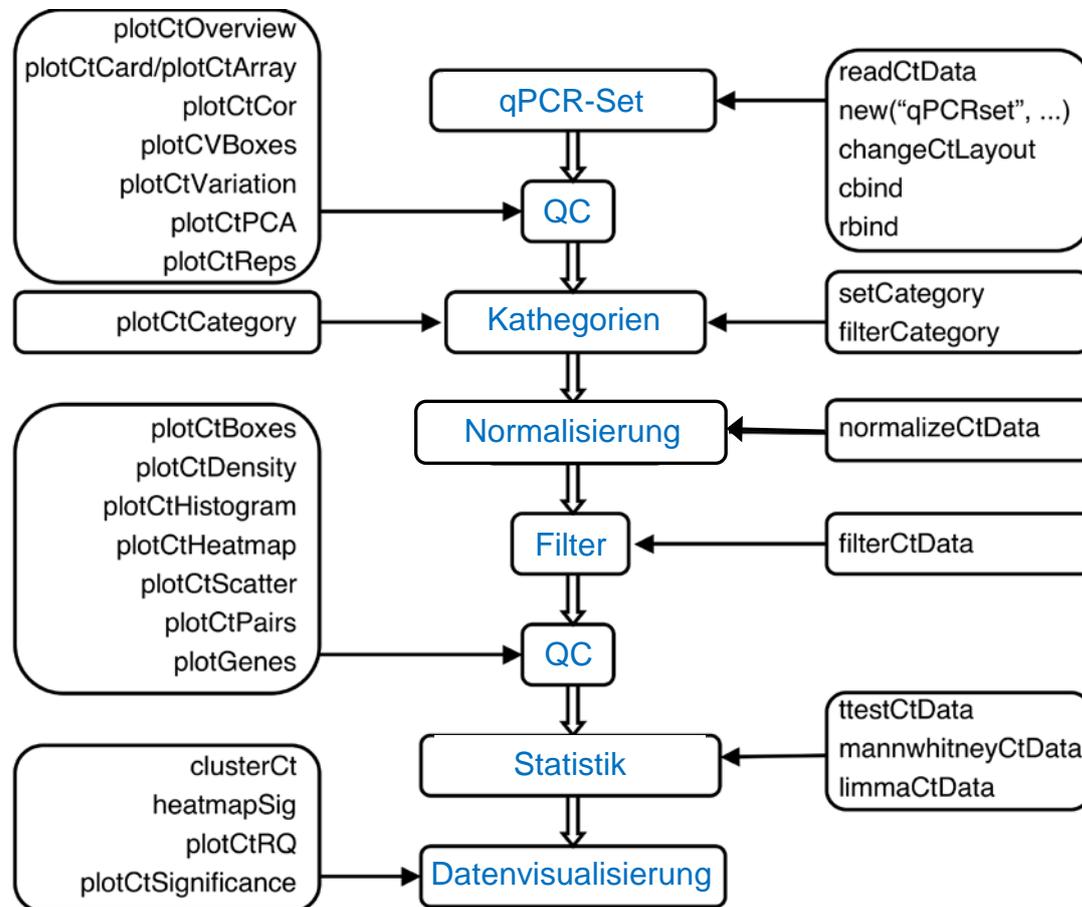


Abb. 17: Workflow in HTqPCR zur Analyse von qPCR-Daten; links: Anweisungsfunktionen (R-Commands) zur Visualisierung; Mitte: Programmschritte als Workflow anhand typischer qPCR-Analyse; rechts: Anweisungskommandos (R-Commands) der einzelnen Rechenschritte zur Datenanalyse. (modifiziert nach Dvinge, 2015)

Differentielle Expressionsanalyse für Microarrays

Das R/Bioconductor-Softwarepackage LIMMA (Smyth 2005; *Ritchie et al.*, 2015) eignet sich besonders bei kleinen Sample-Größen als integrative Lösung zur Datenanalyse bei Genexpressionsanalysen, speziell bei Microarrays und High-throughput-Datensätzen. Das Package umfasst statistische Methoden (Abb. 18), die eine Informationserweiterung durch empirische Bayes Methoden (Statistik basierend auf Abschätzung der Hyperparameter) zur späteren Varianzabschätzung erzielen, die eine Betrachtungsgewichtung zur Variation der Datenquantität erlauben, die eine Varianzmodellierung bei Auftreten einer technischen oder biologischen Heterogenität zulassen und die Varianz-Stabilisierungen zur Rauschunterdrückung als Daten-

Vorverarbeitungs-Methode ermöglichen. Mithilfe dieser Methoden werden die Schlussfolgerungen bezüglich der Gene und der Gen-Levels in kleinen Experimenten höchst effizient verbessert (Ritchie *et al.*, 2015).

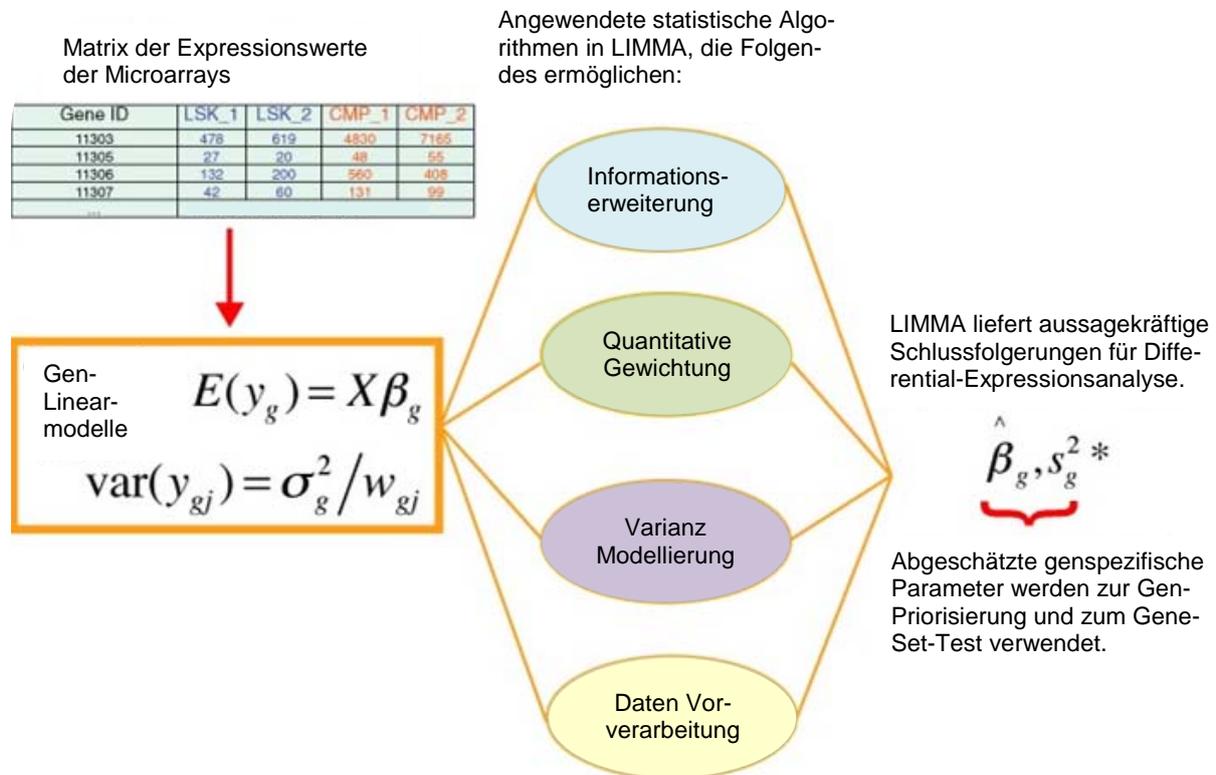


Abb. 18: Schematische Darstellung der essentiellen Hauptkomponenten jeder LIMMA-Analyse. Für jedes Gen g gibt es einen Vektor der Genexpressionswerte y_g und eine Design-Matrix X , die diese Werte zu den Koeffizienten β_g korreliert. (modifiziert nach Ritchie *et al.*, 2015)

LIMMA wendet zwei verschieden spezifizierte Matrizen zur Analyse zusammengesetzter Microarray-Experimente an. Die Design-Matrix (Abb. 18) repräsentiert verschiedene RNA-Targets, die im Array hybridisiert wurden. Die Kontrastmatrix stellt die definierten Koeffizienten (Design-Matrix) vergleichend gegenüber, wobei jede Gegenüberstellung mit einem Vergleich der RNA-Targets korrespondiert (Smyth 2005). Mathematisch wird das Linearmodell E modifiziert nach Smyth (2005) wie nachfolgend beschrieben.

$$E(y_g) = X\beta_g$$

Hierbei sind die Expressionsdaten des Gens g im Genexpressionswert y_g enthalten, X entspricht der Design-Matrix und β_g dem Koeffizientenvektor. Die Reihe des Gens g der Expressionsmatrix wird als y_g^T bezeichnet und beinhaltet entweder Log-Ratios

oder Log-Intensitäten. Der Contrast of Interest ist gegeben, wenn $\alpha_g = C^T \beta_g$, wobei C der Kontrastmatrix entspricht. Die Koeffizientenkomponente des angepassten Modells nach der Funktion 'lmFit()' enthält die geschätzten Werte des Koeffizientenvektors β_g und nach Anwendung der Funktion 'contrasts.fit()' die geschätzten Werte für α_g (Smyth 2005). Zur Vereinfachung der Konfiguration eines modifizierten Matrixdesigns kann alternativ die Funktion 'modelMatrix()' angewendet werden.

Die generierten Microarray-Daten aus der Versuchsreihe CRAMS V wurden in R statistisch (LIMMA) analysiert. Hierzu war es nötig den nachfolgenden komprimiert dargestellten Programmablauf in R zu schreiben. Die explizite Version der einzelnen Commands der jeweiligen Programmierschritte mit explizierter Deskription befindet sich im Anhang (9.2).

Statistische Analyse der Microarray-Daten - Programmierung in R

1. Installieren und Laden der initialisierenden Paketzusammenstellung 'Install/Load Initial Package Set'.

Im ersten Schritt wird das Paket 'oligo', ein Paket zur Analyse von Oligonucleotide-Arrays, installiert. Daraufhin wird das Paket 'Platform Design Info for Affymetrix MoGene-1_0-st-v1', das speziell für unser verwendetes Array gestaltet wurde, mit dem zuvor aufgerufenen in Verbindung gebracht. Weiterhin wird in einem nächsten Schritt das passende Transcript-Cluster 'mogene10sttranscriptcluster.db' zu unserem Microarray assembliert. Anschließend wurden die Daten in Linearmodellen und Expression für Microarrays analysiert.

2. Bestimmung der Arbeitsrichtung 'Set/Check Working Directory'

Die Working Directory muss alle Rohdaten und Phänotyp-Daten ('design matrix/ targets.txt') enthalten.

3. Einlesen der CEL-Files und Phänotyp-Text-Files

4. Einleitende explorative Datenanalyse

In Histogrammen und Box Plots wird die Intensitätsverteilung der einzelnen Arrays dargestellt. Zur Kontrolle technischer Probleme werden die Arrays als Cel-File-Bilder visualisiert.

5. Zusammenfassung der Expressionswerte zur Normalisierung und Hintergrundkorrektur als Vorverarbeitung (Pre-Processing). In der angewandten RMA-Analyse (Robust Multi-Array Analysis) werden die Daten subtrahiert, normalisiert und summiert.

Anschließend werden die Rohdaten mit den verarbeiteten Daten verglichen und als Box Plots, Histogramme, M-A Plots (Blend-Altman Darstellung, transformiert in M- (log-ratios) und A-Skalierung (gewogener Mittelwert)) dargestellt.

6. Die Annotation-Files werden importiert und vektoruell umgewandelt sowie die Kontrollproben aus der Annotation-File entfernt.

7. Das Package 'Limma' (modified t-test; eBayes Function) wird geladen und Design Matrix aktiviert. Das Linearmodell wird für jedes Gen angepasst und die differentielle Expression berechnet. Abschließend werden die Daten gespeichert und in Excel-Files exportiert.

3.6.2 Funktionale Interpretation der Microarray-Daten

Functional Annotation Tools in DAVID

Nach Auswahl der signifikanten Gene aus den Daten der Microarray-Analyse (CRAMS V) wurden diese mittels des Functional Annotation Tools in DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; Dennis *et al.*, 2003) v6.7 in Anlehnung an Huang *et al.*, (2009) überführt. Diese funktionale Annotation in Bioinformatics Microarray Analysis (Web-based Service) ermöglicht eine gruppierende Analytik und Visualisierung der annotierten Gene. Die Eingabe und bioinformatische Bearbeitung der Daten in DAVID ist in Abb. 19 'Flow Chart' explizit immersiv dargestellt.

Die Eingabe der Daten (Excel-File) erfolgt in einem Basisdaten-Management auf drei verschiedenen Wegen, wie der Web-Hinterlegung in Online-Formularen (Web Deposit Filling Online Forms), der Web-Hinterlegung in projektdefinierten Dateien (Web Deposit by a Project Definition File) oder aber basierend auf der Befehlskonsole über projekt-definierte Dateien lokaler User (Command Console based by a Project Definition File, local Users only). Nach erfolgter Übertragungskontrolle (Check Upload Status) besteht die Möglichkeit weitere Daten nach Suche, Downloaden und Editieren (Search/Browse/Download/ Edit) erneut dem Basisdatenmanagement zuzuführen.

Die Datenanalyse beinhaltet nach Vorgabe der verwendeten Array-Spezifikation eine Datenaufbereitung, bei der zunächst eine Hintergrund-Subtraktion und danach innerhalb des Arrays eine Normalisierung durchgeführt wird. Im nächsten Schritt folgt eine Normalisierung zwischen den Arrays, eine plattformübergreifende Sondierung und abschließende Normalisierung. Letztendlich werden die Daten innerhalb der Datenaufbereitung einer Differentialanalyse unterzogen (Abb. 19).

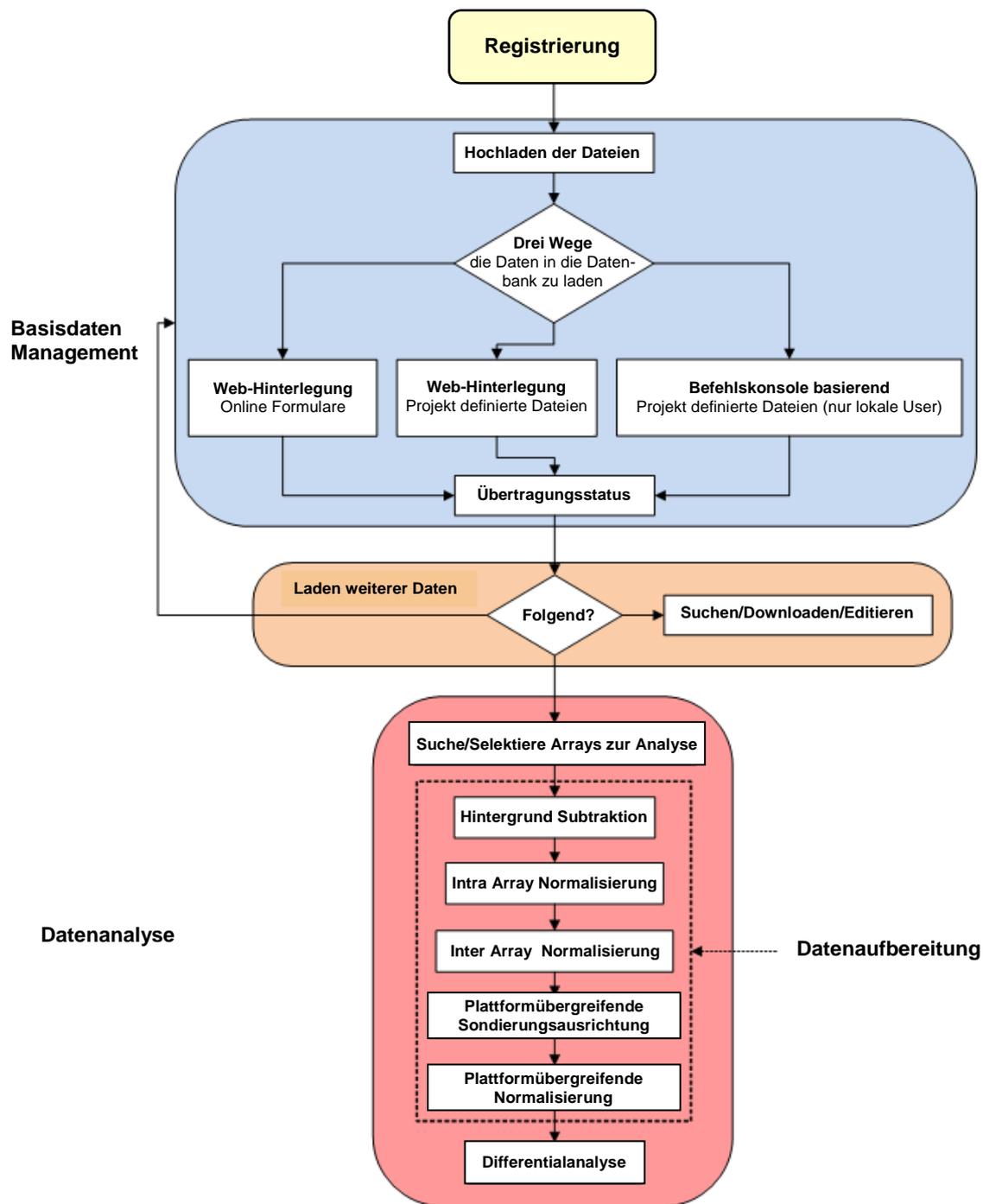


Abb. 19: Basisdaten-Eingabe und Datenanalyse mittels WebArrayDB. (modifiziert nach <http://www.webarraydb.org/webarray/index.html>)

Zur funktionellen Annotation der verwendeten Microarrays Affymetrix Mouse Gene-Chip® 1.0 ST erfolgt konkret nachfolgende Eingabe und Bearbeitung der Commands in DAVID:

DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis (Web-based Service).

- o 1. Create a list of Significant Genes (AffyID's)
- o 2. Go to the DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis Website and Start Analysis
 - 2.1 david.abcc.ncifcrf.gov
 - 2.2 Click on "Start Analysis" Tab
 - 2.3 Select the "Upload" tab in the Blue right Side Bar (top Left)
 - 2.3.1 In step 1 of Upload, Copy the significant genes (AffyID's) from the filtered Excel file and Paste them into the Upload Data Field (Step 1A: Paste a list)
 - 2.3.2 In step 2 of Upload, select "Affymetrix Exon Gene ID"
 - 2.3.3 In Step 3 of Upload, Select Gene List
 - 2.4 Select the "Background" tab in the Blue right Side Bar (top Right)
 - 2.4.1 Select Affymetrix Exon Background, Mogen1-0-st-vlservice)
- #--> Once Gene list and Background are entered-Selected, the analysis should complete automatically

3.6.3 Molekulare Interaktionen, Reaktionen und Relationen

KEGG-Pathway

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ist eine Enzyklopedie von Genen und Genomen, die die funktionalen Bedeutungen auf molekularer und höherer Ebene ermöglichen. Molekulare Funktionen repräsentiert die KEGG Orthology (KO) durch funktionale Orthologie der Gene und Proteine, während Funktionen höherer Ebene durch Vernetzungen molekularer Interaktionen, Reaktionen und Relationen in KEGG Pathway Maps, BRITE Hierarchien und KEGG Modulen definiert sind. Die KEGG PATHWAY-Datenbank ist die Hauptdatenbank in KEGG (Kanehisa *et al.*, 2000 und 2017) und besteht aus manuell erstellten Referenz Pathway Maps zusammen mit organismusspezifischen Maps, die rechnergenerierte KO-Zuweisungen des Genoms mit Referenz-Pathway aufweisen (Kanehisa *et al.*, 2017). Die Untergruppierung der KEGG-Pathway-Einteilung erfolgt in Kategorien wie Stoffwechsel (Metabolism), Genexpression- und Regulation (Genetic Information Processing), Umgebungsinteraktionen (Environmental Information Processing), zelluläre Prozesse (Cel-

Bronchialkarzinom; hsa05223) mit markierten (rot) pathologiebedingten genetischen Alterationen. Die pharmakologischen Ansatzpunkten der Wirkstoffe Gefitinib und Erlotinib für EGFR und Crizotinib für ALK sind farblich (lila) hervorgehoben (modifiziert nach Kanehisa *et al.*, 2017).

lular Processes), Systeme des Organismus (Organismal Systems), Humanpathologie (Human Diseases) und Arzneimittelentwicklung (Drug Development) beschreiben. Hierarchisch untergeordnet befinden sich verschiedene Maps wie relevante Stoffwechselforgänge, Signalinteraktionen sowie humanspezifische Pathologien, die wiederum in Subklassen, auf Transkriptom-Ebene, relevante regulierende Einzelgene farblich markiert graphisch darstellen, wobei das Pathway-Tool 'Color Pathway' mit eingestellter colorierter Gradation von grün (Downregulation) bis rot (Upregulation) entsprechend 'negative-zero-positive' (-1/+1) verwendet wird.

Diese Integration der generierten Genomdaten der Versuchsreihen führt zu organismenspezifischen Pathway-Maps mit metabolischen und regulatorischen Pfaden. Die in der Pathway-Datenbank als Protein-Network gespeicherten Pathway-Diagramme beinhalten im wesentlichen drei verschiedene Interaktionstypen (Edges), wie Direct Protein-Protein Interaction, Gene Expression Relation und Enzyme-Enzyme Relation. Die zugehörigen Bausteine (Nodes) sind als Gene Product oder Subnetwork gegeben.

Die Humanpathologie, mit 81 (Stand 1. Oktober 2016) verschiedenen Maps, ist durch die kontinuierliche Aktualisierung zu einer der Hauptkategorien der manuell erstellten Referenz Pathways herangewachsen. Die Pathologie Pathway Map für 'non-small cell lung cancer' (Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom; hsa05223), bei dem bekannte Genmutationen grafisch farblich rot hervorgehoben sind, ist in Abb. 20 dargestellt. Die verschiedenen medikamentösen Ansatzpunkte mit den bekannten Wirkstoffen Gefitinib (D01977) und Erlotinib (D04023) für das Onkogen EGFR-(Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; transmembranöse Rezeptor-Tyrosinkinase; in Tumoren überexprimiert)-Mutation und Crizotinib (D09731) für das ALK-(EML4-ALK-Translokation; Anaplastische Lymphomkinase - Echinoderm Mikrotubuli assoziiertes Protein-4)-Fusionsgen. Tumor-Suppressoren sind in Abb. 20 ebenso rot an entsprechender Stelle im Zellzyklus-Pathway markiert (Kanehisa *et al.*, 2017).

3.6.4 Klassifizierung der annotierten Gene

AmiGo-Datenbank

Die hierarchische Gruppierung in Haupt- und Unterklassen erfolgte durch Eingabe der annotierten Ontologie Gene in die AmiGo-Datenbank (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>) nach Carbon *et al.*, (2009).

Die Hauptklassifizierung der Gene Ontology zeigt eine Unterteilung in Cellular Component, Biological Process und Molecular Function. Hierbei können die Genprodukte mit den zellulären Komponenten (Cellular Component) assoziieren oder sich selbst darin befinden, wobei sie an dieser Stelle an biologischen Prozessen (Biological Process) partizipieren und somit eine oder mehrere molekulare Funktionen (Molecular Function) ausüben.

Die Unterklassifizierungen, die die regulierenden Gene enthalten, wird in positiv und negativ regulierend getrennt dargestellt. Hierbei werden die Werte der auf und ab regulierenden Gene in beschreibender Statistik $\Lambda (\ln(\text{ratio})) = \ln(\text{Anzahl der aufregulierten Gene}/\text{Anzahl der annotierten Gene}) - \ln(\text{Anzahl der abregulierten Gene}/\text{Anzahl der annotierten Gene})$ pro Unterklasse normiert sowie nach Rangfolge dargestellt.

'enriched GO terms' in GOrilla

Das webbasierte Analyse-Tool GOrilla (Gene Ontology EnRichment AnaLysis and VisuaLizAtion Tool; Eden *et al.*, 2009) bietet die Möglichkeit auf Basis der GO-Datenbank (Gene Ontology Database), Gen-Sets in angereicherten (enriched) GO-Gruppierungen, hierarchisch der entsprechenden Gene, zu identifizieren. Über- oder unterrepräsentierte GO-Gruppierungen anhand Annotierungen des entsprechenden Gen-Sets werden durch die Enrichment-Analyse gefunden. Die signifikant regulierten Gene werden in den GO-Bereichen Molecular Function, Biological Process und Cellular Component separiert dargestellt. Weiterhin sind die markierten GO-Terme in einer Tabelle anhand ihrer Bezeichnung sowie der Beschreibung und den entsprechenden P- und FDR-q-Values, dem errechneten Enrichment und den selektierten Genen aufgeführt.

Die Daten-Analyse ist in GOrilla via zweier Applikationsmodi möglich: Einerseits die Darstellung der angereicherten GO Gruppen an der Spitze einer Rangliste von Genen unter Anwendung der mHG Statistik (minimale hypergeometrische Verteilungst Statistik) als eine mögliche Variante der Analytik, andererseits, wie mit unseren Da-

ten-Ergebnissen appliziert, die Möglichkeit der Darstellung der angereicherten GO Gruppen in einer Gegenüberstellung des Target Gene Sets (up- und downregulierte Gene) zum Background Gene Set (gesamte Anzahl der Gene) wiederum rechnerisch mittels standardisierter hypergeometrischer Statistik.

Die hypergeometrische Verteilung (HGT) zur Identifikation angereicherter GO-Terme zeigt bei einer Gesamtanzahl von N Genen, bei denen B dieser Gene in GO-Termen und n dieser Gene im Target-Genset assoziiert sind, die Wahrscheinlichkeit, dass b oder mehr Gene des Target-Gensets mit dem gegebenen GO-Term assoziiert sind. Mathematisch stellt sich die Enrichment-Analyse wie folgt dar:

$$\text{Prob}(X \geq b) = \text{HGT}(b; N, B, n) = \sum_{i=b}^{\min(n, B)} \frac{\binom{n}{i} \binom{N-n}{B-i}}{\binom{N}{B}}$$

Der minimal hypergeometrische (mHG) Wert ergibt sich bei Ersatz eines Target-Gensets durch eine geordnete Liste von Genen g_1 bis g_N . Durch Definition eines Label-Vektors für $i = 1$ bis $N \in \{0,1\}^N$ in Übereinstimmung der Assoziation der geordneten Gene des GO-Terms, ist $i = 1$ wenn g_i mit dem Term assoziiert ist, und ergibt mathematisch:

$$mHG(\lambda) = \min_{1 \leq n \leq N} \text{HGT}(b_n(\lambda); N, B, n)$$

Zur Vermeidung von statistischem Bias aufgrund der Mehrfachbezeichnung gleicher Gene wurden Duplikate automatisch entfernt, wobei das Gen mit der jeweils höchsten Rangscheinung statistisch erhalten blieb. Das Ergebnis der Enrichment-Analyse im Bereich 'biological process' kann klassisch in einer hierarchischen Struktur (Abb. 21) visualisiert werden. Alternativ wurden jedoch die Ergebnisse aufgrund der Vielzahl der Gruppierungen und zur Gestaltung der besseren Übersichtlichkeit in Excel transferiert. Die Weiterverarbeitungen und Darstellungen erfolgten als Kreisdiagramme mit den entsprechenden Zahlenwerten. Die Beziehungen der angereicherten Begriffe konnten so deutlich abgegrenzt und klar strukturiert grafisch und tabellarisch dargestellt werden. Der p-Value-Threshold wurde vor Rechenbeginn bei $p < 0,001$ parametrisiert.

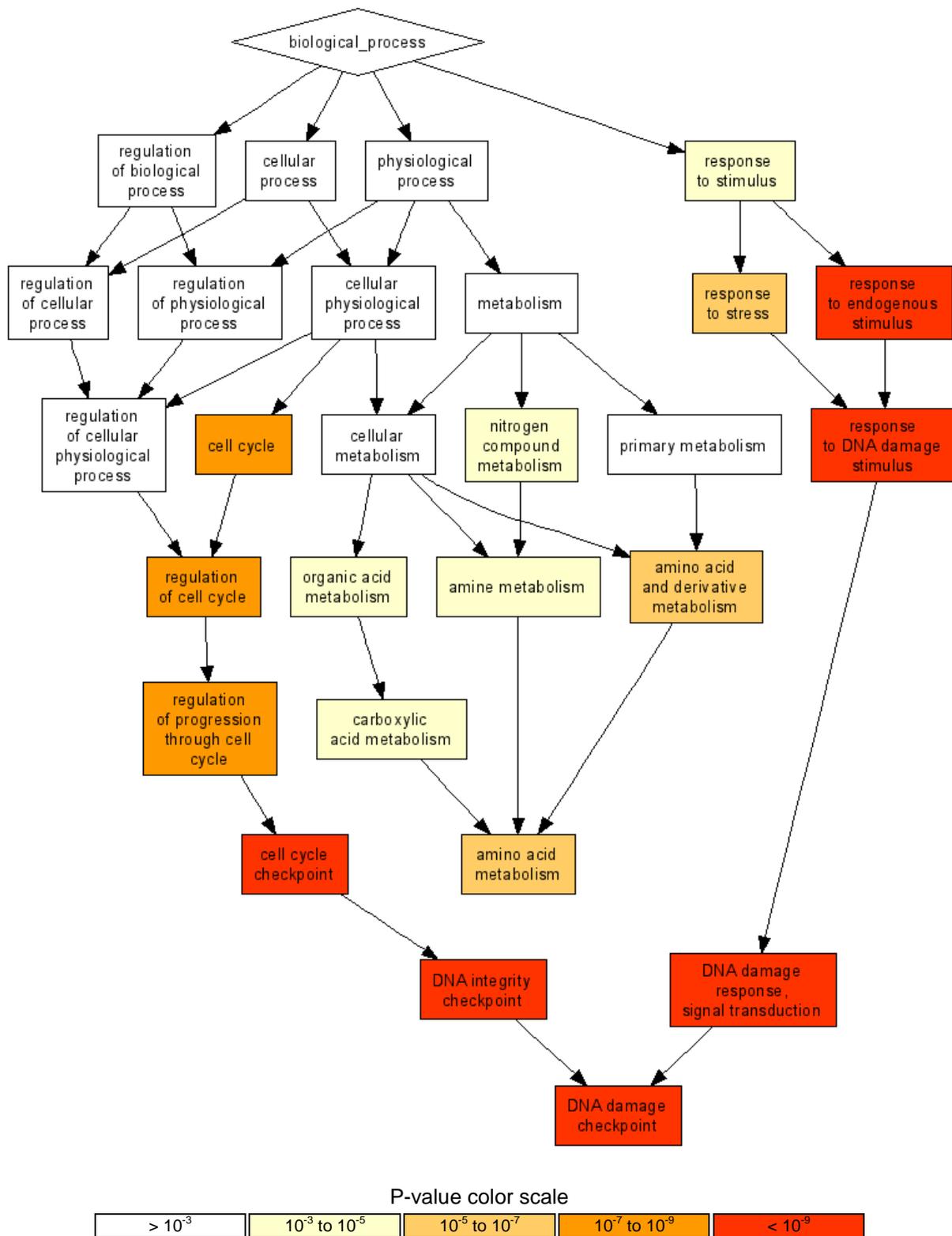


Abb. 21: Baumdiagramm zur Ontologie 'biological process'. (modifiziert nach http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/pics/tree_example.png)

4. Ergebnisse

4.1 Morphologie

Die auf MEAs, Deckgläsern (Cover Slips) und 6-Wellplatten großflächig kultivierten neuronalen Netzwerke des Frontalen Cortex embryonaler Mäusegehirne (Ransom *et al.*, 1977) zeigten an Tag 21 nach Aussaat nahezu kein Migrationsverhalten, bei der Literatur entsprechender guter zellulärer Morphologie (Potter *et al.*, 2001), sowie reguläre interzelluläre synaptische Verbindungen mit gleichmäßiger basaler Gliabewachung im Glia- zu Neuronenverhältnis von 4:1 (Gross *et al.*, 1997).

MEAs

An Tag 1 nach Aussaat (Abb. 22 A) konnte durch Phasenkontrast-Mikroskopie eine relativ gleichmäßige Verteilung kleiner, kugelig, frisch isolierter und dissoziierter Zellen beobachtet werden. Eine Differenzierung zwischen Glia und Neuronen war zu diesem Zeitpunkt zellphysiologisch noch nicht möglich. Im Stadium der embryonalen Entnahme waren die Zellen nicht mehr pluripotent, aber auch noch nicht vollkommen ausdifferenziert. Sie waren jedoch in der Lage, nach der mechanischen Trennung, aufgrund des Prozedere während der Zellgewinnung, zu einem vollkommen intakten neuronalen Netzwerk heranzuwachsen. An Tag 3 DIV (Abb. 22 B) konnten deutliche Zeichen einer neuronalen Vernetzung und Zentralisierung mikroskopiert werden. Aufgrund des fortschreitenden zellulären Wachstums erfolgte die neuronale Darstellung unter Phasenkontrastmikroskopie jetzt leuchtend und plastisch, wodurch deutlich eine optische Separation zur Neuroglia ermöglicht wurde. Klare neuronale Strukturen durch clusterartige Migration und verstärkte Ausprägung der Netzwerkverbindungen bildeten sich ab Tag 8 DIV heraus (Abb. 22 C und D). Im weiteren temporären Verlauf, von DIV 14 bis DIV 21 (Abb. 22 E bis H), wurde visuell die Zunahme der Volumina der Zellkompartimente detektierbar. Die Soma zeigten intensivere Lumineszenz und die Dendriten und Axone eine Zunahme der Leitungsquerschnitte. Auch im Bereich der mit Silikonlack beschichteten Zuleitungen, außerhalb des Elektrodenzentrums auf MEAs, erfolgten Zelladhäsion und reguläre Morphologie in neuronalen Clustern (Abb. 22 D, F und H).

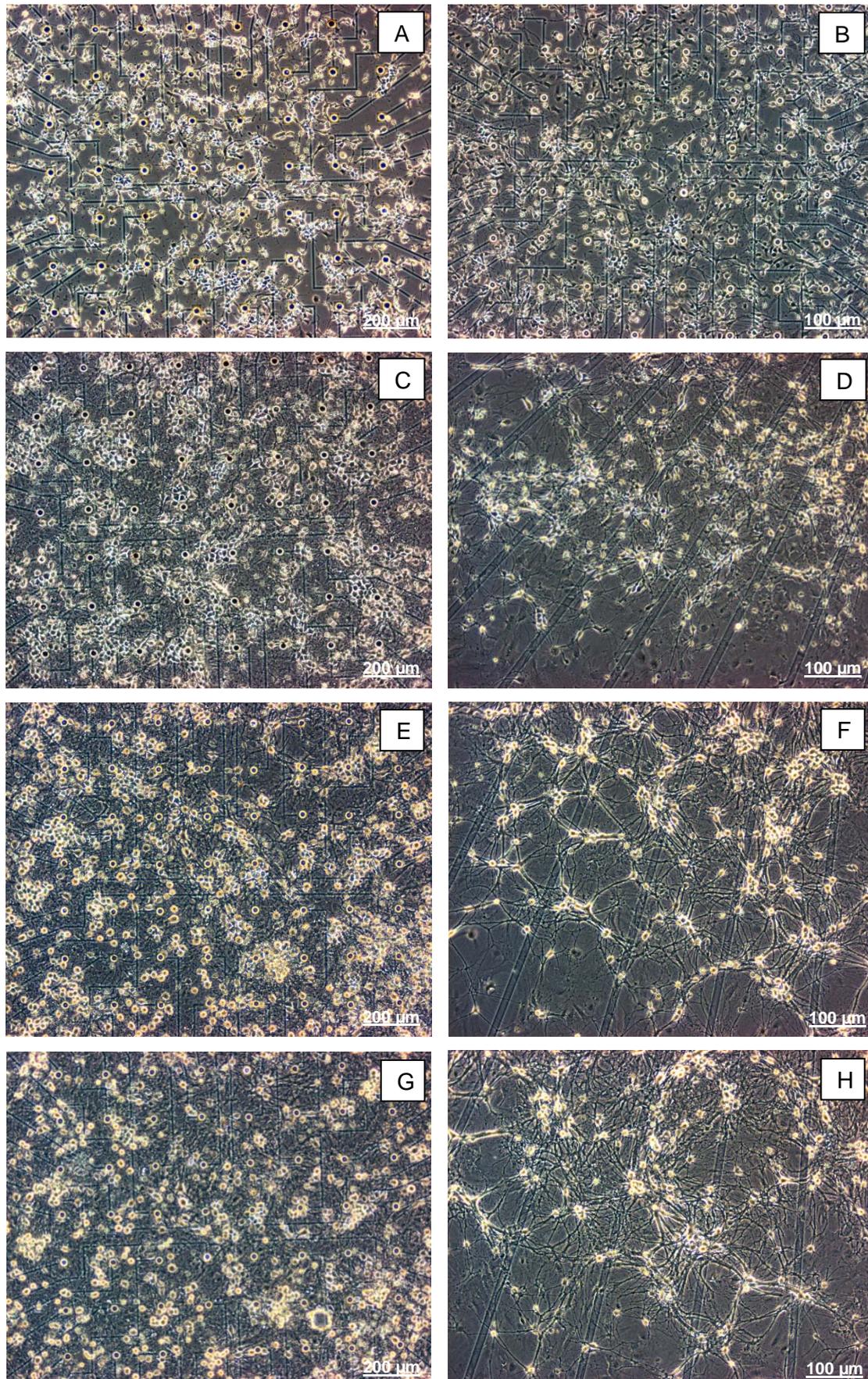


Abb. 22: Mikroskopische Kontrolle der neuronalen Zellkulturen auf MEAs der Versuchsreihe CRAMS V; A: MEA 90909 Tag 1 10x; B: MEA 90911 Tag 3 10x; C: MEA 90916 Tag 8 10x;

D: MEA 90916 Tag 8 20x; E: MEA 90922 Tag 14 10x; F: MEA 90922 Tag 14 20x; G: MEA 90930 Tag 21 10x; H: MEA 90930 Tag 21 20x.

Deckgläser und 6-Well-Platten

Die elementare Präparation der Oberflächen (Lehle *et al.*, 2008; Dryia *et al.*, 2008) von den Deckgläsern und den 6-Wellplatten ermöglichte, ebenso wie bei den MEAs, ein reguläres Zellwachstum mit entsprechender Zelladhäsion. Die mikroskopische Kontrolle mittels Phasenkontrastmikroskopie der Kulturen auf Deckgläsern und 6-Wellplatten ergab ebenfalls an Tag 21 nach Aussaat eine adäquate Morphologie (Potter *et al.*, 2001) sowie reguläre interzelluläre synaptische Verbindungen bei basaler Gliabewachung im Glia- zu Neuronenverhältnis von 4:1 (Gross *et al.*, 1997) (Abb. 23).

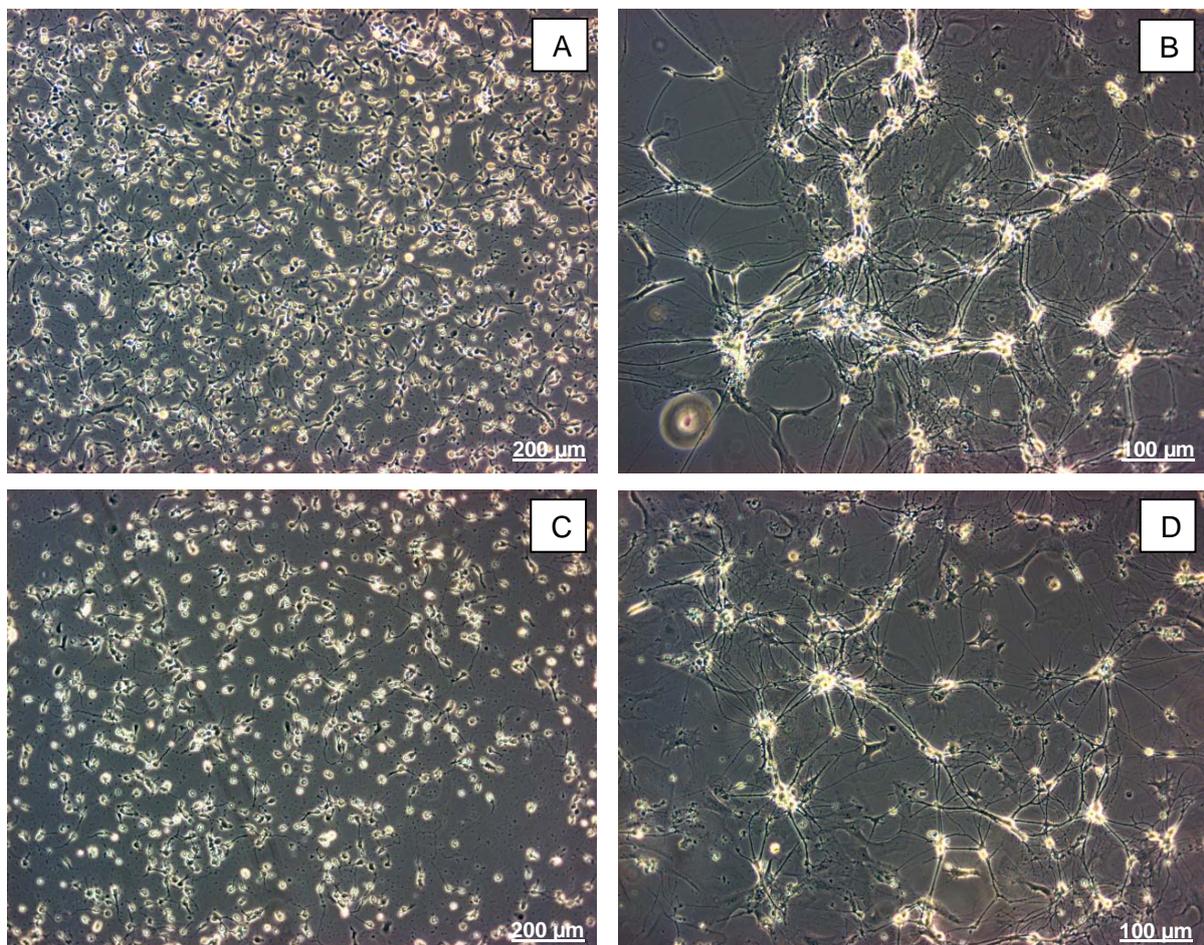


Abb. 23: Mikroskopische Kontrolle der neuronalen Zellkulturen auf Deckglas und 6-Well-Platte der Versuchsreihe CRAMS V; A: Deckglas, DIV 21, 10-fach; B: Deckglas, DIV 21, 20-fach; C: 6-Well-Platte, DIV 21, 10-fach; D: 6-Well-Platte, DIV 21, 20-fach.

Die visuelle Kontrolle der Zellkulturen des Frontalen Cortex an den Tagen DIV 1, 3, 8, 14 und 21 nach Aussaat verlief konform den visuellen Kriterien für neuronales Zellwachstum (Potter *et al.*, 2001) (Abb. 22).

4.2 Burst und Spikes

Die elektrophysiologische Signalaktivität, die sogenannten Spikes, Spike Trains und Bursts als elementares Kriterium der neuronalen Vitalität (Gross 1994; Johnstone *et al.*, 2010), zeigte bei jeweils drei randomisierten Zellkulturen auf MEA pro Versuchsreihe eine Aktivität von 50-60% des Verhältnisses der aktiven zu der Gesamtelektrodenzahl am Tag 21 nach Aussaat. Sämtliche erfassten Daten indizierten eine homogene Netzwerkaktivität und sehr gute Qualität der Kulturen.

Die Ableitung der Signalmuster erforderte ein jeweiliges Aufbauen der besiedelten MEAs im Versuchstand. Nach Aufbau benötigten die neuronalen Netzwerke eine Ruhezeit von ca. 30 min zur Akkommodation im Versuchstand. Es zeigten sich reguläre Spontanaktivitäten (Abb. 24) als Ableitungssignale. Die mit der Plexon Software aufgenommenen Signale und Muster zeigen in Abb. 24 A einen ausgewählten Kanal (Elektrode 58) mit vier ‚feuernden‘ Neuronen und in Abb. 24 B die gesamte 64-Elektroden-Matrix des MEA (59 definierte Neurone). Die spatiotemporale Erfassung als Burst-Muster mit einzelnen Timestamps aller definierten (59 der bis zu 256 Neurone) aktiven Neuronen (vertikal) ist in Abb. 24 C über einen zuvor festgelegten Zeitraum von 20 s (horizontal) zu erkennen. Der Referenzstatus der Neuronen des Frontalen Cortex (FCN) bezieht sich auf die Grundlinie der Spontanaktivität. Die Amplituden der aufgezeichneten Signale lagen üblicherweise zwischen 100–500 μV , mit einem exzellent hohen Signal-Rausch-Verhältnis bei einer Rauschamplitude von 20 bis 40 μV .

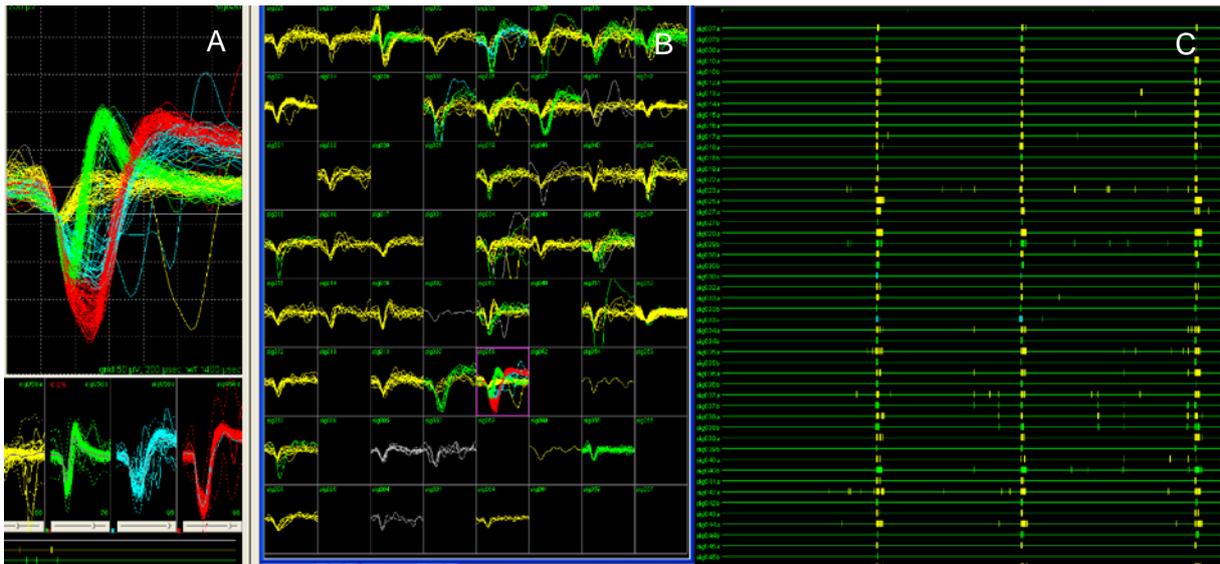


Abb. 24: Ableitungssignale kortikaler neuronaler Zellkultur mittels Plexon-Software (CRAMS V); A: Vier aktive Neurone auf einer ausgewählten Elektrode; B: 64-Elektroden-Matrix des MEA MMEP-4 in Online-Darstellung mit chronologisch kumulierten Signalen einer oder mehrerer Neurone (Waveforms) C: Einzeldarstellung aller aktiven Neurone des MEA in zeitlicher Reihenfolge (ca. 20 sec.; Timestamps).

Die gewonnenen Waveshapes und Timestamps (Kapitel 3.4.1) wurden mit dem Plexon-Software-Paket (Rasputin und Neuroexplorer, Nex Technologies, Littleton, MA, USA) online analysiert. Es erfolgte die Darstellung der Histogramme der Einzelkanäle (Minuten-Mittelwerte, PopVector) sowie der Rasterplots (Abb. 25 C).

In der Offline-Analyse bot sich die Möglichkeit, über die Software des CNNS 'iBurst' die Dateien in Einzelkanaldateien zu splitten, wodurch die den einzelnen Neuronen genau zugeordneten Signalmuster bearbeitet werden konnten. Ebenso wurde durch *Autoplots* (CNNS-Software) die Übertragung in Excel-Makros ermöglicht. Burst-Parameter konnten analysiert und die Erfassung der Variation der Koeffizienten ('burst rate, spike rate, burst duration, burst amplitude') durchgeführt werden.

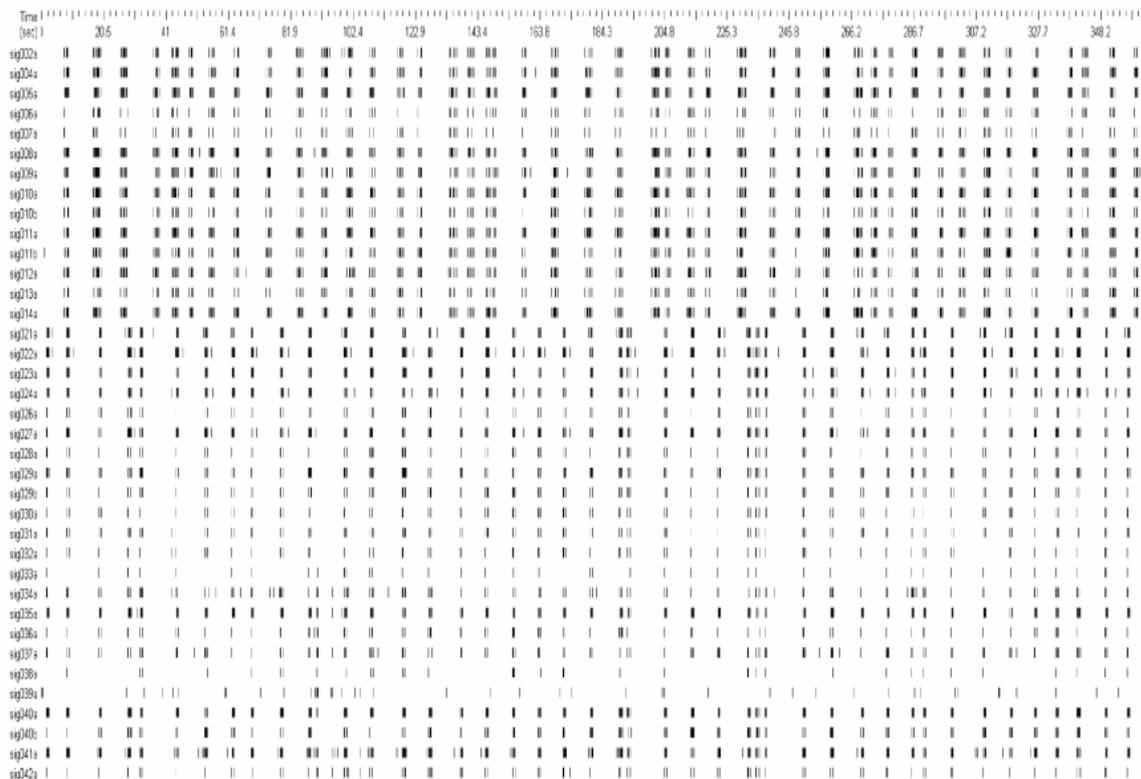


Abb. 25: Bursts als Rasterplot (Timestamps) von 37 aktiven Neuronen des Frontalen Cortex über eine Dauer von 360 sec (CRAMS V).

In jeder der durchgeführten Versuchsreihen wurde bei drei randomisierten MEAs (CRAMS V; insgesamt 143 aktive Neurone) die Signalaktivität über einen Zeitraum von 30 min aufgezeichnet und analysiert. Die neuronale Spontanaktivität erwies sich gleichermaßen als sehr gut mit keinen signifikanten Unterschieden ($P > 0.05$, t-Test) im Mittelwert der Anzahl der Spikes pro Minute (SR) und der Anzahl der Bursts pro Minute (BR) (Tab. 11). Dies lässt auf eine homogene spatiotemporale Netzwerkaktivität der neuronalen Zellen auf MEAs schließen.

Tab. 11: Die Mittelwerte der Spikes pro Minute (SR) und Bursts pro Minute (BR) jeweils dreier randomisierter Zellkulturen des Frontalen Cortex auf MEA der zwei Versuchsreihen CRAMS V und X als Qualitätskriterium für homogene spatiotemporale Netzwerkaktivität.

Versuchsreihe	Mittelwert Spikes pro Minute (SR)	Mittelwert Bursts pro Minute (BR)
CRAMS V	311±59, 298±42, 306±46	20±3, 17±2, 19±2
CRAMS X	301±52, 309±50, 297±44	19±2, 20±2, 18±3

4.3 Genexpression

4.3.1 Microarray – Ontology und Pathway

Zur Erfassung des gesamten Transkriptoms der Maus wurden Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Microarrays mit 28853 Genen verwendet. Hierbei zeigten sich 1808 Gene mit signifikanter Expression ($P < 0.05$, Bayes moderated t-test) im Vergleich der stimulierten Proben (CRAMS V) zu den Referenzproben.

Gene Ontology

905 Gene (3,13% aller analysierten Gene) der 1808 signifikanten Gene waren in der Gene Ontology annotiert. Der Fold-Change dieser annotierten Gene lag zwischen 1,733 und 0,622. Von diesen zeigten 409 Gene (1,42%) ein reduziertes Expressionsniveau in einem Bereich von 0,833 bis 0,622 und 496 Gene (1,72%) waren signifikant hochreguliert in einem Fold-Change-Bereich von 1,145 bis 1,733.

Die Einteilung der Gene mit signifikant unterschiedlicher Expression, zwischen den einfach stimulierten (Stimulationsart A) Proben und den Neutral-Proben, wurde funktionell anhand der Gene Ontology der AmiGo Datenbank in den Bereichen 'biological process', 'cellular component' und 'molecular function' (Abb. 26) (Stock *et al.*, *in praep.* a) vorgenommen. Hierbei war der größte Einfluss der Regulationen in beiden Richtungen durch Magnetstimulation mit Stimulationsmuster A deutlich erkennbar im Bereich der biologischen Prozesse (biological Process), gefolgt von 'cellular component' und 'molecular function'.

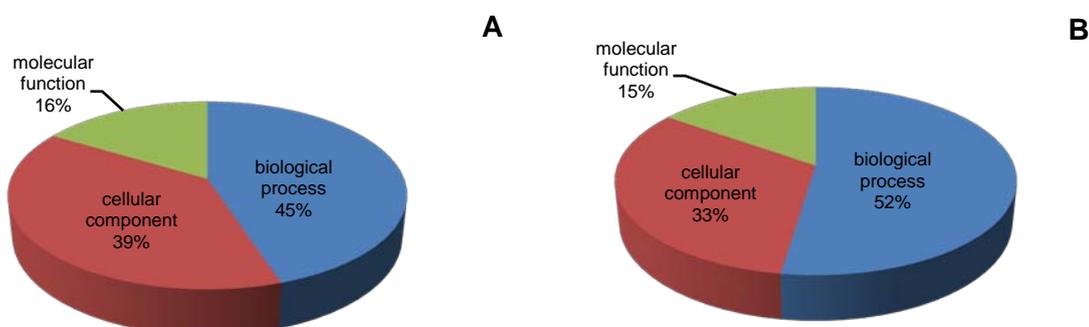


Abb. 26: Verhältnis der positiv (A) und negativ (B) regulierten Gene, erfasst durch Microarray-Analyse (Mouse Gene 1.0 ST, Affymetrix), zur Anzahl aller annotierten Gene in der ersten hierarchischen Gruppe der jeweiligen Ontology-Klassen 'biological process', 'cellular component' und 'molecular function' gemäß AmiGo-Datenbank (Stock *et al.*, *in praep.* a).

Zur Untersuchung der Unterklassen der ersten drei Ontologien nach vorherrschenden auf- oder abregulierenden Genen in deskriptiver Statistik wurde der $\Delta \ln(\text{ratio}) = \ln(\text{Anzahl der aufregulierten Gene im Verhältnis zu den annotierten Genen}) - \ln(\text{Anzahl der abregulierten Gene im Verhältnis zu den annotierten Genen})$ jeder Unterklassifizierung berechnet und in Abb. 27 dekrementierend dargestellt. Die Subklassen 'structural molecule activity' (molecular Function) und 'synapse part' (cellular Component) wiesen die stärkste Repräsentanz an signifikant auf- bzw. abregulierten Genen im Verhältnis zu allen annotierten Genen dieser Sequenz auf. Die Subklasse 'sugar utilization' wurde ausgeschlossen, da nur eine Annotation in der AmiGO-Datenbank, keine Hochregulation und nur eine Abregulation gefunden wurde. Auch 'virale reproduction' wurde bei diesem Vergleich ausgeschlossen, da sich 10 Annotationen in AmiGO, keine Abregulation und nur eine Hochregulation zeigten. Die klassifizierten Expressionsgruppierungen wiesen keinen signifikanten Unterschied auf ($P < 0,5$; χ^2 -Test).

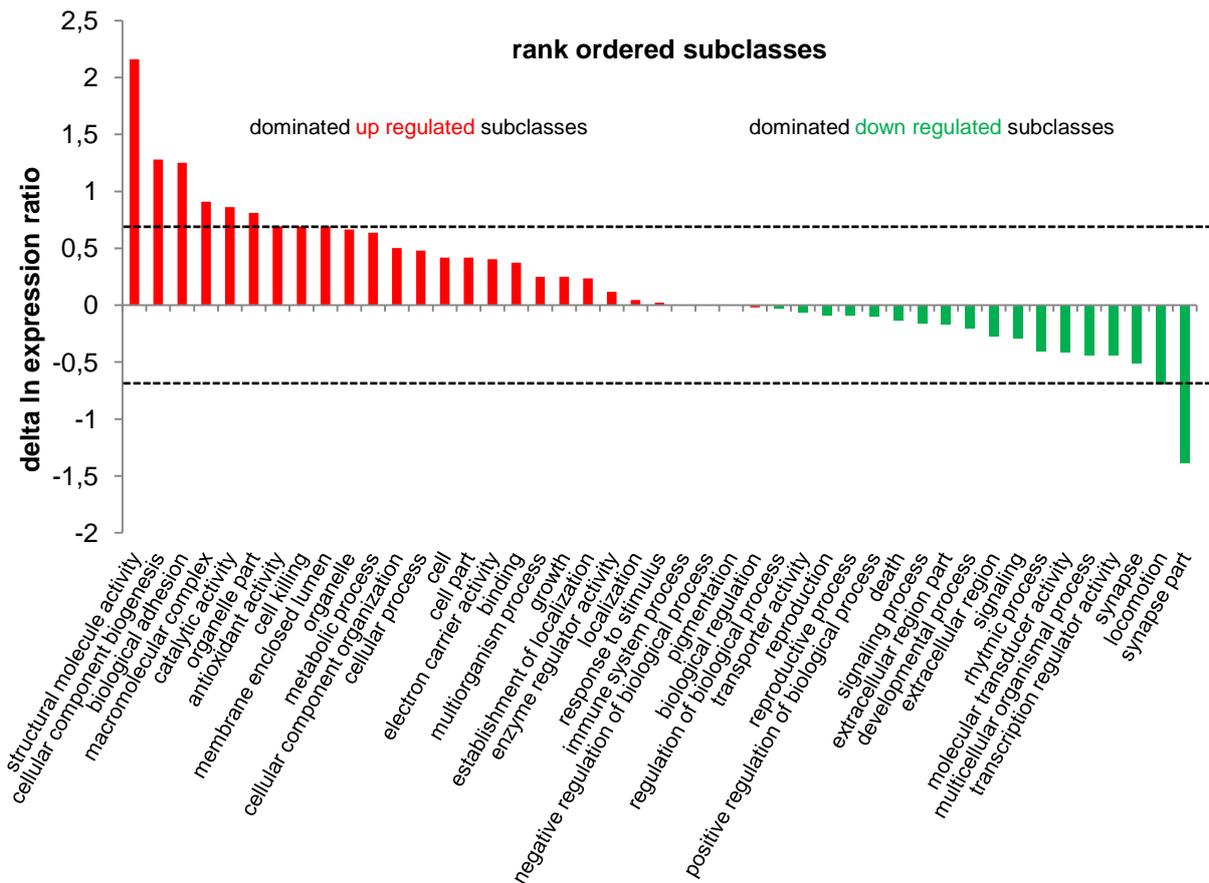


Abb. 27: Verhältnis der dominierenden positiv und negativ regulierten Gene, erfasst durch Microarray-Analyse (Mouse Gene 1.0 ST, Affymetrix) zur Anzahl aller annotierten Gene in den jeweiligen Unterklassifizierungen der Gene Ontology gemäß AmiGo-Datenbank. Die gestrichelten Linien bezeichnen die Schwellenwerte bei doppelter Präsenz der auf- und ab-regulierten Gene.

Sämtliche signifikanten 905 Gene in Up- und Down-Regulation sind zusammengefasst und übersichtlich in Tab. 12 in alphabetischer Reihenfolge gruppiert. Hierbei sind die drei Hauptkategorien unterteilt in die einzelnen Subklassen entsprechend der Gene Ontology.

Tab. 12: Funktionelle Klassifizierung der signifikanten Gene unterschiedlicher Expression nach Behandlung A versus Kontrolle (CRAMS V) entsprechend der Gen-Orthologie der AmiGo-Datenbank, basierend auf der Microarray-Analyse (Mouse Gene 1.0 ST, Affymetrix). Die einzelnen Gene können in mehr als einer Untergruppierung erscheinen.

Class	Subclass	Number of genes down regulated	Number of genes up regulated
Biological process	biological adhesion	4	14
	biological regulation	112	110
	cell killing	2	4
	cellular component biogenesis	5	18
	cellular component organization	23	38

	cellular process	146	236
	death	16	14
	developmental process	49	40
	establishment of localization	34	43
	growth	7	9
	immune system process	15	15
	localization	43	45
	locomotion	8	4
	metabolic process	94	178
	multicellular organismal process	87	56
	multiorganism process	7	9
	negative regulation of biological process	27	27
	pigmentation	2	2
	positive regulation of biological process	32	29
	regulation of biological process	103	100
	reproduction	11	10
	reproductive process	11	10
	response to stimulus	44	45
	rhythmic process	3	2
	signaling process	53	45
	signaling	66	49
	sugar utilization	1	0
	viral reproduction	0	1
Cellular component			
	cell part	196	298
	cell	196	298
	extracellular region part	19	16
	extracellular region	37	28
	macromolecular complex	31	77
	membrane enclosed lumen	8	16
	organelle part	32	72
	organelle	95	185
	synapse part	4	1
	synapse	5	3
Molecular function			
	antioxidant activity	1	2
	binding	132	192
	catalytic activity	52	123
	channel regulator activity	1	0
	electron carrier activity	2	3
	enzyme regulator activity	8	9
	molecular transducer activity	50	33
	structural molecule activity	3	26
	transcription regulator activity	25	16
	transporter activity	17	16

'enriched GO terms' in GOrilla

Das Analyse-Tool GOrilla registrierte 11166 Gene von insgesamt 11436 Gen-Termen des eingegebenen Background-Set. Hierbei wurden 10979 Gene durch ihr Gensymbol und weitere 187 durch andere Gene IDs (Identitäten) erkannt. 1226 duplikate Gene (Bias) wurden entfernt, wobei jeweils das Gen mit höchstem Ranking erhalten blieb, und es resultierte somit eine Gesamtzahl von 9940 Genen. Hiervon waren wiederum 9015 Gene mit einem GO-Term assoziiert. Von den eingegebenen Target-Gen-Sets (insgesamt 905 Gene) wurden 439 Gene der Down-Regulation und 342 der Up-Regulation erkannt und registriert (Stock *et al.*, *in praep.* a).

Im Bereich 'cellular component' zeigten sich keine GO-Terme bei dem zuvor spezifizierten Enrichment p-Value ($p < 0,001$).

In der Onthologie 'molecular function' (Abb. 28, Tab. 13) zeigte sich überschneidend sowohl in Up- als auch in Down-Regulation ein Enrichment in den zwei Gruppen Geruchsstoffbindungsproteine ('odorant binding proteins', OBP) und olfaktorische Rezeptoraktivität ('olfactory receptor activity'). Diese regulative Beeinflussung der entsprechenden Gene olfaktorischer Assoziation belegt auch die Arbeit von Henkin *et al.*, 2011, die der rTMS eine potentielle therapeutische Option zur Verbesserung bei Phantosmie und Phantageusie sowie bei Dysosmie und Dysgeusie suggeriert. Dies scheint wiederum auf einen herabgesetzten GAGA-Level (Levy *et al.*, 2004) zurückzuführen zu sein, wobei der Neurotransmitterspiegel durch Magnetstimulation dem entgegen angehoben wird (Keck *et al.*, 2002; Luborzewski *et al.*, 2007).

Im Bereich der positiv regulierenden Gene (Abb. 28 A) fand eine nahezu homogene Verteilung der 10 gefundenen GO-Terme statt, hingegen im Bereich der negativ regulierenden (Abb. 28 B) waren die Struktur-Molekül-Aktivität (17) und die Strukturbestandteile der Ribosomen (20) dominant (50 % aller gefundenen GO-Terme in 'molecular Function', Down-Regulation).

Die molekulare Übertragungsaktivität (molecular Transducer Activity) und die Rezeptoraktivität (Receptor Activity) waren in der Up-Regulation der GO 'molecular function' mit jeweils 47 Genen vertreten. Ähnliche Werte zeigten die Signal-Rezeptor- und die Signal-Übertragungsaktivität mit je 46 Genen sowie die transmembranöse Signalrezeptoraktivität mit 45 Genen. Diese fünf Terme mit zusammen 231 (65 %) von 354 annotierten Genen zeigten deutlich hochregulierte Aktivität in der intra- oder extrazellulären Signal- und Informationsübertragung.

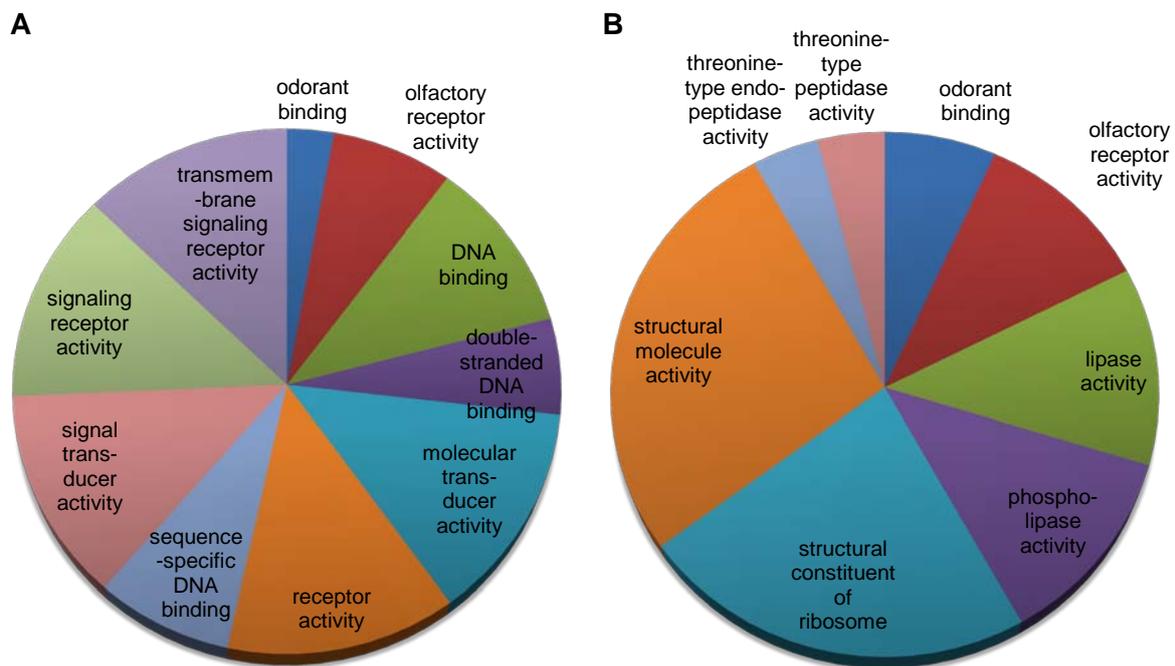


Abb. 28: Positiv regulierte (A) und negativ regulierte (B) Gene in der Ontologie 'molecular function' der enriched GO-terms in GOrilla.

Tab. 13: Funktionelle Klassifizierung der signifikanten Gene unterschiedlicher Expression nach Behandlung A versus Kontrolle (CRAMS V) entsprechend der Gene Enrichment-Analytik für die Ontologie 'molecular function' in GOrilla, basierend auf der Microarray-Analyse (Mouse Gene 1.0 ST, Affymetrix).

Molecular Function	GO Term	Description	Genes in GO Term
Up-Regulation			
	GO:0005549	odorant binding	10
	GO:0004984	olfactory receptor activity	26
	GO:0003677	DNA binding	38
	GO:0003690	double-stranded DNA binding	21
	GO:0060089	molecular transducer activity	47
	GO:0004872	receptor activity	47
	GO:0043565	sequence-specific DNA binding	28
	GO:0004871	signal transducer activity	46
	GO:0038023	signaling receptor activity	46
	GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity	45
Down-Regulation			
	GO:0005549	odorant binding	5
	GO:0004984	olfactory receptor activity	8
	GO:0016298	lipase activity	9
	GO:0004620	phospholipase activity	9
	GO:0003735	structural constituent of ribosome	17

GO:0005198	structural molecule activity	20
GO:0004298	threonine-type endopeptidase activity	3
GO:0070003	threonine-type peptidase activity	3

Die Verteilung der gefundenen GO-Terme in der Ontologie 'biological process' sind in Abb. 29 A und B sowie in Tab. 14 dargestellt.

In der Up-Regulation der biologischen Prozesse zeigt die Regulation der biologischen Prozesse eine deutliche Präsenz mit 168 Genen (35 %). Vielzelluläre Prozesse auf Organismen Ebene zeigte die zweitgrößte Anzahl mit 69 Genen (16 %), gefolgt von System-Prozessen mit 43 Genen (9 %) in der Ontologie. Im Bereich der neurologischen Prozesse und Wahrnehmungen zeigten sich die neurologischen System-Prozesse, der Rezeptor-Signal-Pathway, die sensorische Wahrnehmung, die sensorische Wahrnehmung chemischer Stimuli und die sensorische Wahrnehmung des Geruchs deszendierende Werte im Bereich von 41 bis 25 Genen (8 bis 5 %). In der Summe sind somit 167 Gene (34 %) aller gefundenen GO-Terme in der Ontologie 'biological process'-Up-Regulation im neurologischen Bereich anzutreffen.

Die Down-Regulation der biologischen Prozesse wird durch die vier Ontologie-Terme mit insgesamt 702 Genen (40% aller Down regulierten Gene der biologischen Prozesse), wie den metabolischen Prozessen (196 Gene), den metabolischen Prozessen der organischen Substanzen (177 Gene), den primären (167 Gene) und den zellulären metabolischen Prozessen (162 Gene), bestimmt.

Die chemischen Reaktionen und Pathways (biosynthetic Process), die aus der Neubildung von Substanzen resultieren, lagen bei der Down-Regulation bei 95 gefundenen Genen. Im Bereich der biosynthetischen Prozesse der organischen Substanzen waren es 92 Gene, bei den zellulären biosynthetischen Prozessen 86, bei den zellulär- und Organ-Stickstoff zusammengesetzten biosynthetischen Prozessen 66 und 36 Gene. Es ergibt sich im gesamten Bereich der biosynthetisch assoziierten Vorgänge ein Anteil von 22 % aller annotierten down-regulierten Gene in der Ontologie 'biological process'.

Die Gen-Ontologie der Stickstoff-beteiligten metabolischen Prozesse (Nitrogen compound metabolic Process), bei denen organische oder anorganische Bestandteile Stickstoff enthalten sind, zeigte 110 Gene. Die zellulär-Stickstoff-gebundenen und die Organ-Stickstoff-gebundenen metabolischen Prozesse lagen bei 97 und 56 Genen in der Down Regulation.

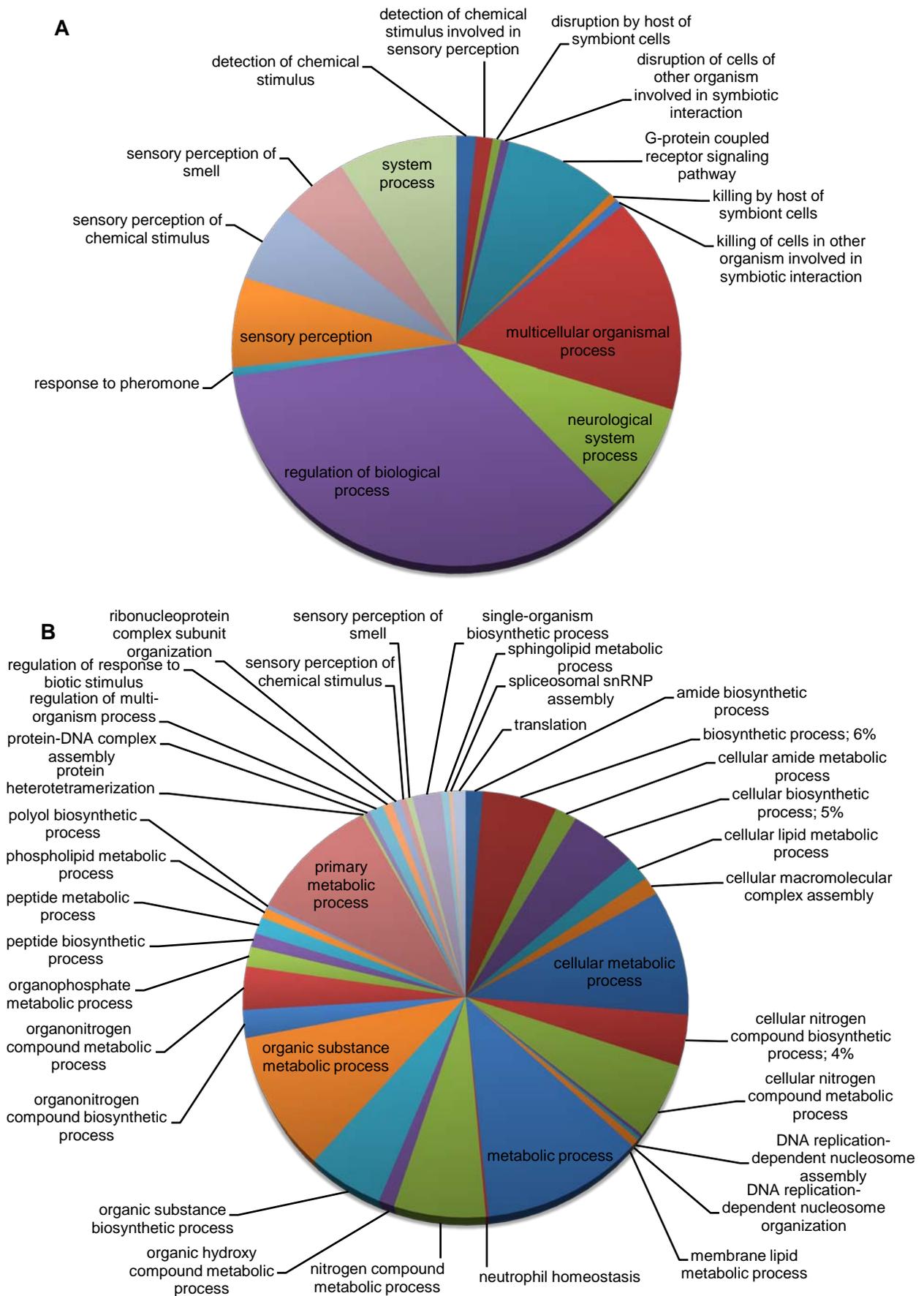


Abb. 29 Positiv regulierte (A) und negativ regulierte (B) Gene in der Ontologie 'biological process' der enriched GO-terms in GOrilla.

Tab. 14: Funktionelle Klassifizierung der signifikanten Gene unterschiedlicher Expression nach Behandlung A versus Kontrolle (CRAMS V) entsprechend der Gene-Enrichment-Analytik für die Ontologie 'biological process' in GOrilla, basierend auf der Microarray-Analyse (Mouse Gene 1.0 ST, Affymetrix).

Biological Process	GO Term	Description	Genes in GO Term
Up-Regulation			
	GO:0009593	detection of chemical stimulus	7
	GO:0050907	detection of chemical stimulus involved in sensory perception	6
	GO:0051852	disruption by host of symbiont cells	3
	GO:0051818	disruption of cells of other organism involved in symbiotic interaction	3
	GO:0007186	G-protein coupled receptor signaling pathway	41
	GO:0051873	killing by host of symbiont cells	3
	GO:0051883	killing of cells in other organism involved in symbiotic interaction	3
	GO:0032501	multicellular organismal process	79
	GO:0050877	neurological system process	39
	GO:0050789	regulation of biological process	168
	GO:0019236	response to pheromone	3
	GO:0007600	sensory perception	33
	GO:0007606	sensory perception of chemical stimulus	29
	GO:0007608	sensory perception of smell	25
	GO:0003008	system process	43
Down-Regulation			
	GO:0043604	amide biosynthetic process	22
	GO:0009058	biosynthetic process	95
	GO:0043603	cellular amide metabolic process	28
	GO:0044249	cellular biosynthetic process	86
	GO:0044255	cellular lipid metabolic process	32
	GO:0034622	cellular macromolecular complex assembly	24
	GO:0044237	cellular metabolic process	162
	GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	66
	GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	97
	GO:0006335	DNA replication-dependent nucleosome assembly	4
	GO:0034723	DNA replication-dependent nucleosome organization	4
	GO:0006643	membrane lipid metabolic process	10
	GO:0008152	metabolic process	196
	GO:0001780	neutrophil homeostasis	3
	GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	110
	GO:1901615	organic hydroxy compound metabolic process	19
	GO:1901576	organic substance biosynthetic process	92
	GO:0071704	organic substance metabolic process	177

GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic process	36
GO:1901564	organonitrogen compound metabolic process	56
GO:0019637	organophosphate metabolic process	26
GO:0043043	peptide biosynthetic process	18
GO:0006518	peptide metabolic process	22
GO:0006644	phospholipid metabolic process	13
GO:0046173	polyol biosynthetic process	5
GO:0044238	primary metabolic process	167
GO:0051290	protein heterotetramerization	4
GO:0065004	protein-DNA complex assembly	7
GO:0043900	regulation of multi-organism process	18
GO:0002831	regulation of response to biotic stimulus	12
GO:0071826	ribonucleoprotein complex subunit organization	11
GO:0007606	sensory perception of chemical stimulus	8
GO:0007608	sensory perception of smell	8
GO:0044711	single-organism biosynthetic process	37
GO:0006665	sphingolipid metabolic process	10
GO:0000387	spliceosomal snRNP assembly	4
GO:0006412	translation	17

Pathway Analytik

Die Pathway-Analytik ermöglicht, basierend auf der anwachsenden Zahl der Microarray-Analysen und RNA-Sequenzierungen, die unterschiedlich regulierenden Gene zu registrieren und ihre biologische Signifikanz zu verdeutlichen. Gestörte oder abweichende Gene können so in biologischer Relation aus großen Datenmengen identifiziert werden, wodurch die Möglichkeit geschaffen wird, Datensätze zu hinterfragen (Kavanagh *et al.*, 2013).

Zur Analyse der funktionalen Hierarchie der biologischen Systeme wurden mittels Microarray-Analyse Transkriptomänderungen bei elektromagnetischer Befeldung erfasst. Um Stoffwechselwege (Pathways) zu identifizieren wurde die KEGG-Datenbank, die den Zugriff auf Enzyme, Substrate, Reaktionsaktivatoren und -Inhibitoren ermöglicht, ausgewählt. Nach Pathway-orientierter bioinformatischer Auswertung (KEGG Pathway) zeigten sich signifikante Einflüsse der rMS auf die Transkription relevanter Gene in den Pathways *Morbus Alzheimer*, *Chorea Huntington*, *Morbus Parkinson*, Vaskuläre glatte Muskelkontraktion und Arachidonsäure-Metabolismus (Stock *et al.*, *in praep. a*).

Morbus Alzheimer (Alzheimer's Disease AD)

Wie in Abb. 30 ersichtlich, regulierten im Bereich der mitochondrialen Atmungskette der Neuronen innerhalb der Enzym-Komplexe I-V die entsprechenden Gene am signifikantesten im positiven Maximalbereich (roter Bereich der Farbskala) der Up-Regulation.

Hierbei erfolgt in den Komplexen I-IV der eigentliche Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung und in dem Komplex V die ATP-Synthase mittels protonenmotorischer Kraft. Die Energie für die Protonenpumpen wird über den Elektronenfluss der Komplexe I-IV geliefert, wobei die H^+ -Ionen vom extra-mitochondrialen in den intra-mitochondrialen Raum transferieren.

Die NMDA-Rezeptoren zeigten eine positive Ausprägung im mittleren Bereich. Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren in der Zellmembran veranlassen durch Bindung des Liganden Glutamat die Öffnung der spezifischen Ionenkanäle (Ca^{2+} -Kanäle) und somit Ca^{2+} -Freisetzung. Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) mit ihrer Isoform nNOS (extrem kurzen Halbwertszeit von ca. 5 sec), die im ZNS die Funktion eines Neurotransmitters übernimmt, zeigt im Pathway ebenso erhöhte Aktivität.

Neprilysin oder Neutrale Endopeptidase (NEP) regulierte geringfügig hoch bei der Degradation des β -Amyloid. Im Extrazellulärraum baut NEP durch enzymatische Spaltung Peptidhormone wie Glukagon und Beta-Amyloid ab (Malito *et al.*, 2008). Hier könnte NEP den geschwindigkeitsregulierenden Schritt beim Abbau definieren und damit den AD-assoziierten Abbau von Beta-Amyloid beschleunigen (Pacheco-Quinto *et al.*, 2013).

Der Regulator des Reifungsprozesses 'anterior pharynx-defective 1' (APH-1) des katalytisch aktiven Präsenilins des Proteinkomplexes der γ -Sekretase im Membranprotein regulierte im positiven Bereich geringfügig, was eine aktive Einleitung der Bildung des Membranprotein-Komplexes durch noch unreife Bestandteile bedeutet. Die Enzyme der Phospholipase C (PLC), deren Reaktionsschritt verantwortlich für die Weiterleitung von Signalen von extra- nach intrazellulär ist, lassen das Second Messenger IP_3 verstärkt entstehen. Das Mikrotubuli assoziierte Protein Tau (Protein zu Tangles), involviert in einer Anzahl an neurodegenerativen Erkrankungen, sowie die Cystein Aspartat Protease-7 (CASP-7), ein Protein der Apoptose, lagen leicht im aufregulierten Bereich.

Negativ reguliert erschienen Calcineurin (CN), ein Protein der Phosphatase, und Cytochrom c (CytC), ein Elektronen-Carrier Protein der mitochondrialen oxydativen Phosphorylierung.

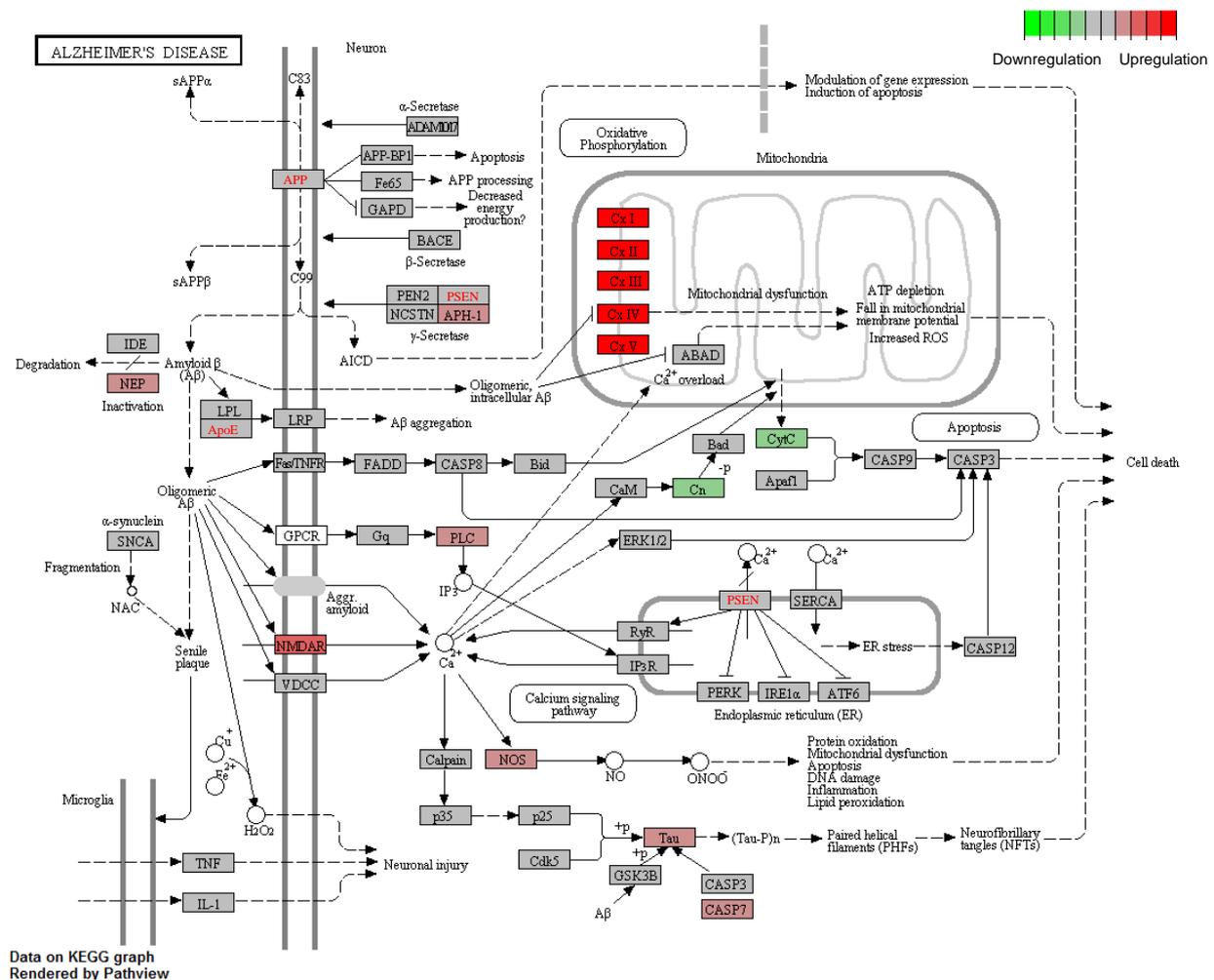


Abb. 30: Alzheimer-Erkrankung: Visualisierung der KEGG-Pathway-Analyse in der Untergruppierung Human Diseases / Neurodegenerative Diseases / Alzheimer's Disease mit farblich hervorgehobenen regulierenden Genen der Micro-Array-Daten der Versuchsreihe CRAMS V.

Chorea Huntington (Huntington's Disease HD)

Im Bereich der mitochondrialen Atmungskette (Abb. 31) der Neuronen innerhalb der Enzym-Komplexe I-V regelten die entsprechenden Gene am signifikantesten im positiven Maximalbereich der Farbskala. Demgegenüber zeigte sich Cytochrom c (CytC) negativ geringfügig markiert.

Der RNA-Polymerase II (POL II)-Enzymkomplex zeigte sich maximal im positiven Up-Regulationsbereich auf der Referenzskala. Er katalysiert die Synthese von RNA bei der Transkription der DNA in Eukaryoten. Weiterhin waren im Bereich der RNA polymerasen/transkriptionalen Repression die RNA-Polymerase II (TAF4/TAFII130) und die Glutathion Peroxidase 1 (Gpx1) geringfügig positiv reguliert hervorgehoben. Das

Protein p53 im p53-Signal-Pathway lag im identischen positiven Bereich hochreguliert, der RE1-Silencing Transcription Factor (REST) hingegen im Negativen geringfügig und der zelluläre Transkriptionsfaktor (CREB) deutlich abreguliert.

Dynactin oder Dynein Activator Complex, als ein Protein mit vielfachen Untereinheiten im bidirektionalen intrazellulären Transport, war leicht positiv reguliert.

Der Adaptorprotein-Komplex AP2, zwischen der äußeren Vesikelmembran und Clathrin lokalisiert, regulierte ebenfalls leicht im Positiven, gleiches zeigte sich für die Phospholipase C (PLC) und NMDAR.

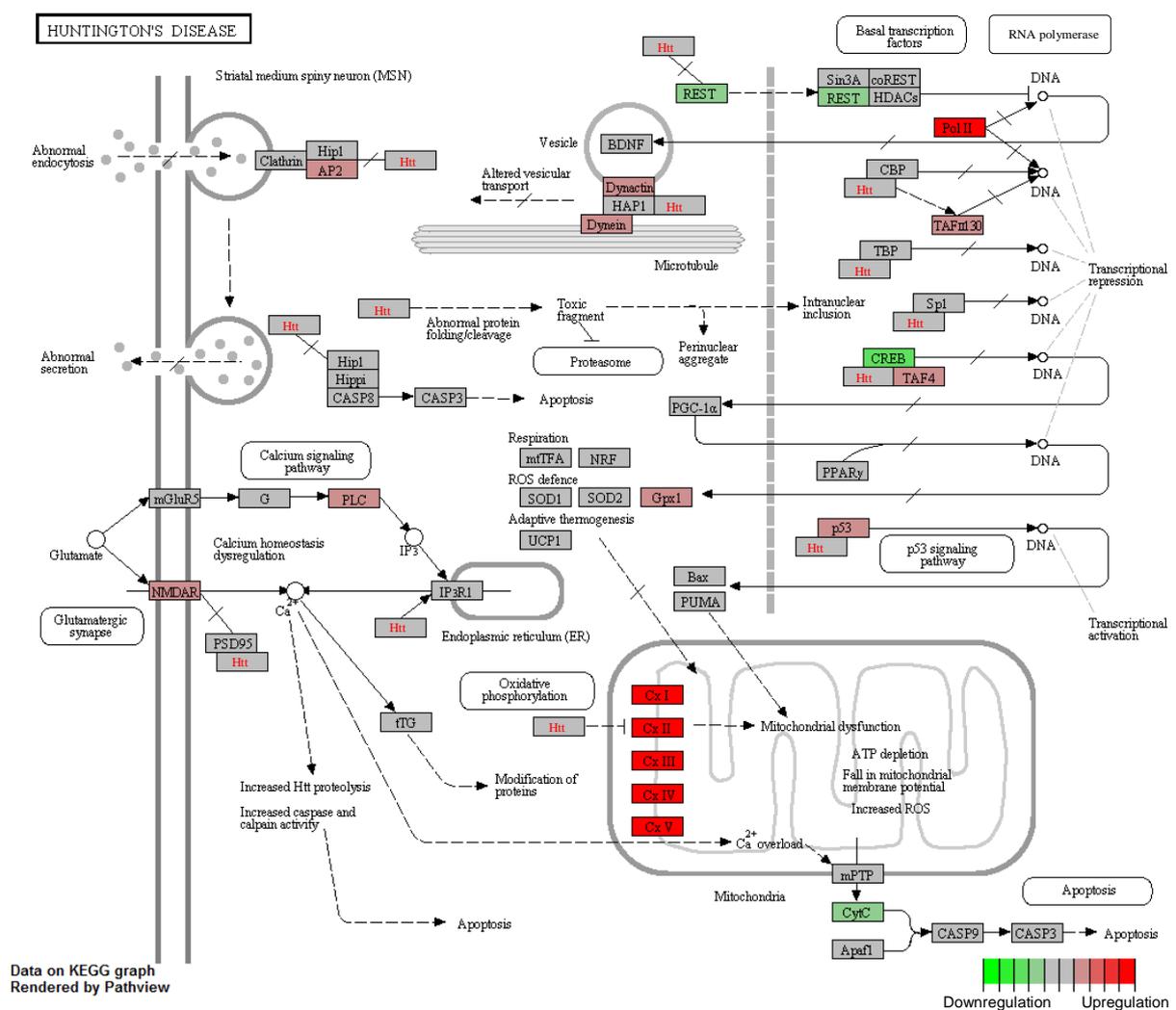


Abb. 31: Corea Huntington: KEGG-Pathway-Analyse in der Untergruppierung Human Diseases / Neurodegenerative Diseases / Huntington's Disease mit farblich hervorgehobenen regulierenden Genen der Micro-Array-Daten der Versuchsreihe CRAMS V.

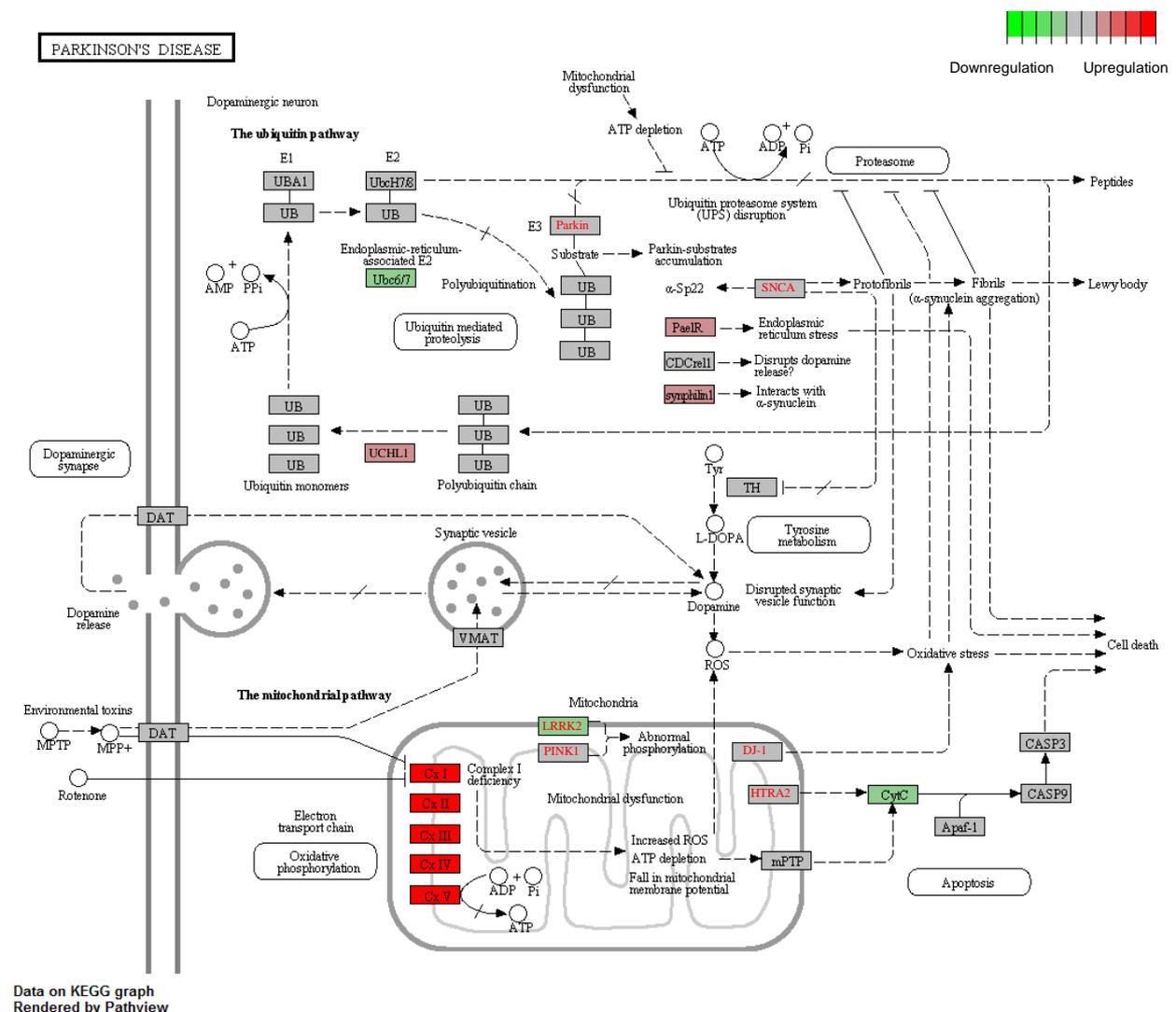
Morbus Parkinson (Parkinson's Disease PD)

Alle fünf Komplexe der mitochondrialen Atmungskette Cx I-V (Abb. 32) zeigten maximalen Bereich der positiven Regulation, wie bereits zuvor bei den Pathways AD

und HD. Wiederum wurde auch die gleiche negative Regulation des Cytochrom c (CytC) wie bei AD und HD auf dem Pfad der Apoptose angezeigt. Die Serin/Threoninkinase LRRK2, die mutiert zu familiärer *Morbus Parkinson* führen kann, erschien leicht negativ markiert, mit einem Rückgang der pathologiebedingten anormalen Phosphorylierung.

Im Ubiquitin-Pathway, bei der Aufspaltung der Polyubiquitin-Kette in die Monomere, regulierte Ubiquitin Carboxyl-Terminal Esterase L1 (UCHL1), das Enzym, das mutiert in kausaler Relation der Pathogenese der PD steht, leicht ins Positive.

Das endoplasmatische Retikulum assoziierte Enzym Ubc6/7 der Ubiquitin geführten Proteolyse lag im negativen Bereich der Regulation.



Data on KEGG graph
 Rendered by Pathview
 Abb. 32: Parkinson-Erkrankung: Visualisierung der KEGG-Pathway-Analyse in der Untergruppierung Human Diseases / Neurodegenerative Diseases / Parkinson's Disease mit farblich hervorgehobenen regulierenden Genen der Micro-Array-Daten der Versuchsreihe CRAMS V.

Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 37 (PaelR), lokalisiert in Zell- und endoplasmatischen Retikulum Membranen, regelte hingegen im positiven Bereich.

Das Gen Synphilin1 kodiert ein Protein, das mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen enthält und zeigte ebenfalls eine positive Regulation in geringer Ausprägung.

Vaskuläre glatte Muskelzellen Kontraktion (vascular smooth Muscle Contraction VSMC)

Im Bereich der Vasokonstriktion (Abb. 33) ließ das von peripheren Gewebszellen gebildete Hormon Endothelin die G-Protein-gekoppelten Endothelin-Rezeptoren Typ A (EDNRA) auf einen leicht positiven Bereich der Farbskala ansteigen. Hierarchisch nachfolgend in der glatten vaskulären Muskelzelle stiegen die G-Proteine G-Alpha 12 und G-Alpha 13 (G α 12/13), die notwendig für Regulation des Zytoskeletts (Rho) und Wachstumsfaktor induzierte Zellmigration sind (Shan *et al.*, 2006), auf den gleichen positiv regulierten Wertebereich. Hingegen regulierte die Rho-assoziierte Proteinkinase 1 (ROCK) ins leicht Negative. Die Aufzweigung des G-Proteins G-Alpha 11 in Phospholipase A (PLA) regulierte, deutlicher als die in Phospholipase C (PLC), leicht ins Positive. Im Arachidonsäure-Metabolismus erfolgte auf dem Pfad nach dem up-regulierten PLC das Zytochrom Cyt p450, das hydroxylierend 20-HETE bildet, down-reguliert in einer mittleren Aktivität, der Farbskala entsprechend. Im Signalweg des Arachidonsäure-Metabolismus zeigte sich der Kaliumionenausstoß Kca über das down regulierte Gen KCNMB2 reduziert. Bei der Muskelkontraktion zeigte sich weiterhin der Proteinkinase-Weg PKC positiv regulatorisch erhöht.

Die Vasodilatation zeigte, wie bei der Konstriktion, den Kaliumionenausstoß Kca des Kalzium gesteuerten Kaliumkanals reduziert. Das Gen ADORA2, das die Adenosin-gesteuerten transmembranösen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kodiert, bewegte sich ebenfalls im negativen Regulationsbereich. Die gleichen Werte zeigte in Folge das hochkomplexe Expressionsmuster der Guanin-Nukleotid-bindenden-Protein Untereinheit Alpha Gs. In Reaktion reguliert das Protein-kodierende Gen AC deutlich im positiven Bereich. Das Protein ist durch die Kalzium/Calmodulin-Konzentration gesteuert und an der Gehirnentwicklung beteiligt.

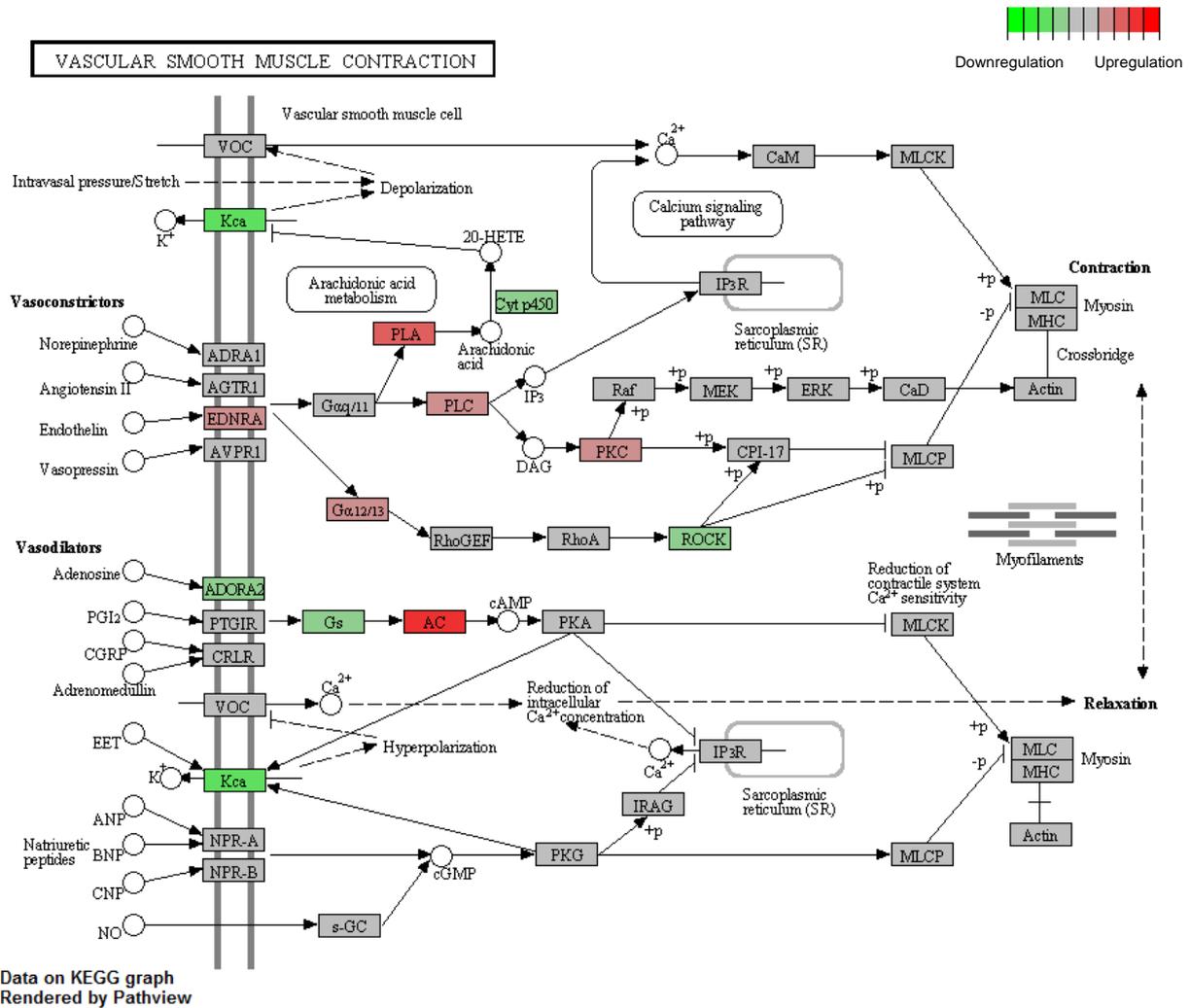


Abb. 33: Vaskuläre glatte Muskelzellen-Kontraktion: KEGG-Pathway-Analyse in der Untergruppierung Organismal Systems / Circulatory System / Vascular Smooth Muscle Contraction mit farblich hervorgehobenen regulierenden Genen der Micro-Array-Daten der Versuchsreihe CRAMS V.

Arachidonsäure-Metabolismus (Arachidonic Acid Metabolism)

Die Arachidonsäure wird über die Cytochrom-P4-Enzyme zu 20-HETE (20-Hydroxyeicosatetraensäure) hydroxiliert (Abb. 34). Hierbei zeigte die Regulationsaktivität von CYP4A einen leicht negativen (Down-Regulation) und CYP4F einen mittleren positiven (Up-Regulation) Farbausschlag im Pathway. Weiterhin katalysierte unter anderem das Enzym CYP4A11 die Arachidonsäure zu 19(S)HETE bei einer negativen Regulation. Ebenfalls erfolgten deutlich negative Regulationen im Cytochrom-P-Komplex (CYP2, CYP4A) des Epoxygenase-Pathways bei der Metabolisierung der Arachidonsäure in Tetrahydrofuran-Diol in die vier regio- und stereoisomeren Epoxy-Eicosatriensäuren (EETs). Auf dem Pathway zur Bildung von 16(R)-HETE war deutliche negative Regulationsaktivität des Cytochroms CYP2C (1.14.14.1) sichtbar. Die Arachidon-15-Lipoxygenase (1.13.11.33) zeigte geringe negative Regulationen.

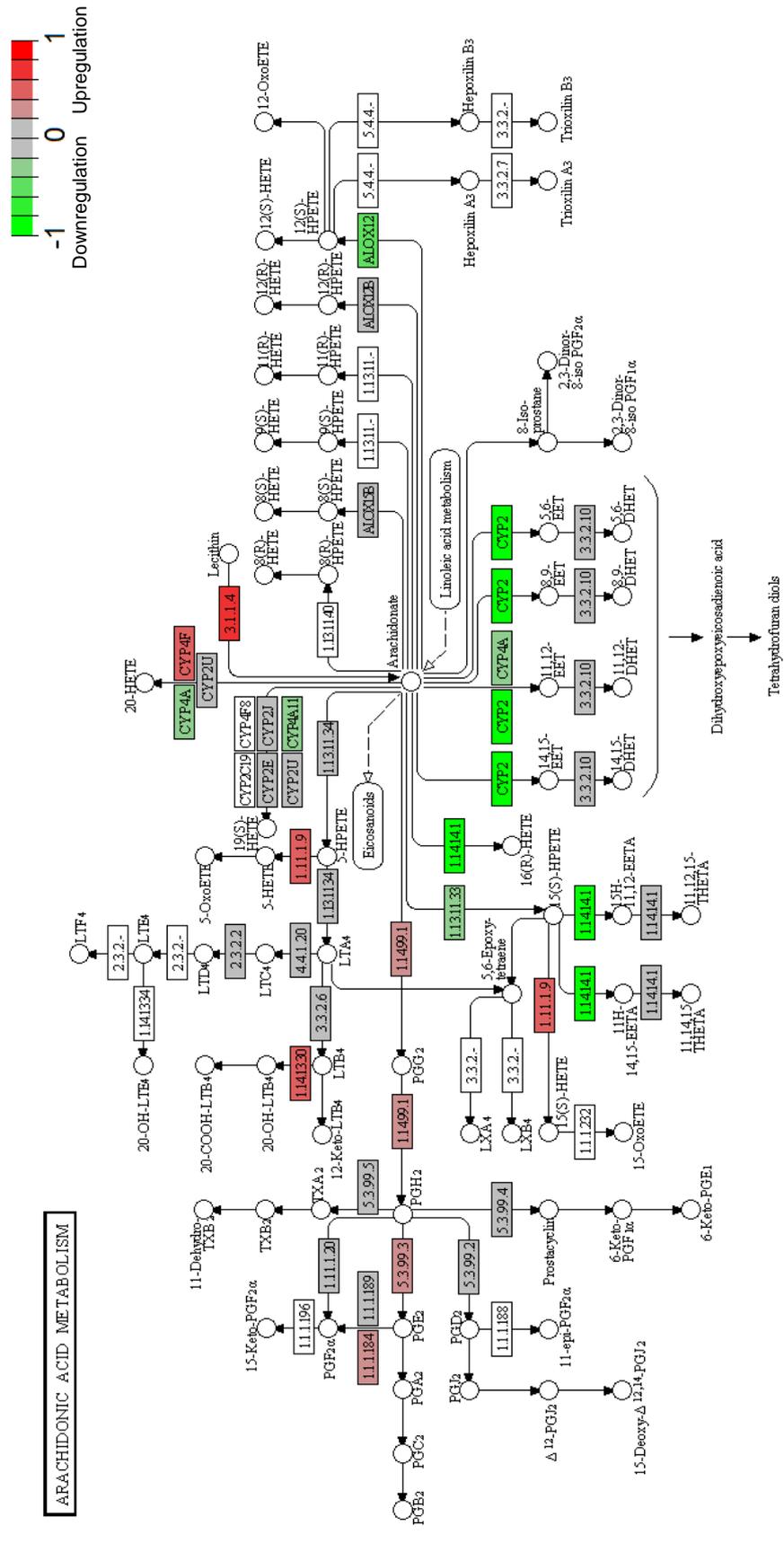
on zur Bildung von 15(S)-HPETE, das wiederum bei deutlicher negativer Expression auf zwei Wegen zu den Epoxy-Derivaten (EETs) 11-Hydroxy-14,15-Epoxy-Eicosatriensäure und 15-Hydroxy-11,12-Epoxy-Eicosatriensäure epoxiliert. Ebenfalls ausgehend von 15(S)-HPETE bildete sich bei mittlerer Up-Regulation metabolisch durch Glutathion-Peroxidase (1.11.1.9) die 15(S)-Hydroxyeicosatetraensäure.

Die Arachidonat-12-Lipoxygenase (ALOX12) zeigte mittlere down-regulierte Aktivität bei der Dioxigenase von Arachidonsäure zu 12(S)HPETE.

Das Glycerophospholipid Lecithin metabolisierte mittels sekretorischer Phospholipase (3.1.1.4) zu Arachidonsäure bei einer maximalen Up-Regulation auf der Referenzskala.

Durch verschiedene COX-Enzyme (Zyklooxygenase) wird die Bildung von Prostaglandinen und Thromboxanen initiiert. Im Pathway zeigte sich eine positive Aktivität der Prostaglandinendoperoxidase-Synthase (1.1499.1) bei der Bildung von Prostaglandin G₂ (PGG₂), das wiederum (1.1499.1) zu PGH₂ katalysiert um weiter (5.3.99.3) das Prostaglandin PGE₂ zu bilden. Den gleichen positiven Regulationsbereich zeigte die Carbonyl Reduktase 1 (NADPH, 1.1.1.184) bei der Bildung von PGF_{2α}.

Die Glutathion-Peroxidase (1.11.1.9), zur Bildung von 5-HETE aus 5-HPETE, zeigte positive Up-Regulation, ebenso wie bei der Umwandlung von Leukotrien B₄ in 20-Hydroxy-Leukotrien B₄ durch Leukotrien, die B₄-Monooxygenase (1.14.13.30).



Data on KEGG graph
Rendered by Pathview

Abb. 34: Arachidonsäure-Metabolismus: Graphische Darstellung der KEGG-Pathway-Analyse in der Untergruppierung Metabolism / Lipid Metabolism / Arachidonic Acid Metabolism mit farblich hervorgehobenen regulierenden Genen der Micro-Array-Daten der Versuchsreihe CRAMS V.

4.3.2 RT-qPCR-Arrays – Alzheimer und Neurodegeneration

Unter Verwendung von Mouse Alzheimer`s Disease 96 StellarRay™ RT-qPCR Array und Mouse Neurodegeneration 96 StellarRay™ RT-qPCR Array von Bar Harbor Biotechnology (Trenton, USA; Lonza Cat. number 00188072 und 00188174) konnten vom gleichen Probenmaterial (Stimulation-A, einfach; Referenzproben) wie dem der Microarrays, RT-qPCR-Daten von insgesamt 171 verschiedenen Genen ermittelt werden. Die Normalisierung des Alzheimer-Arrays erfolgte mit den Referenzgenen Nctsn und Dhcr24, die des Neurodegeneration-Arrays mit Nefm und Trp53. 17 Gene (ApoE, App, Bace1, Bdnf, Casp3, Gsk3b, Casp6, Ide, Lrp1, Mapt, Mme, Nae1, Nestn, Psen1, Snea, Psenen, Psen2) waren auf beiden Arrays identisch und wurden mit den Referenzgenen Dctn1 und Ssr4 normalisiert (9.4.5) und validiert.

Nach $\Delta\Delta$ -Cq-Normalisierung zeigten hierbei 10 Gene (Aph1a, Crh, Gap43, Gga3, Il6, Lrp1, Nae1, Pink1, Psen1, Ube2g2) signifikante Genexpressionsänderungen ($p < 0,05$; Bayes moderated t-test) und 11 weitere Tendenzen ($0,05 < p < 0,1$; Bayes moderated t-test) in einem Fold Change-Bereich von 1,76 bis 0,653.

4.3.3 Validierung selektierter Gene mittels RT-qPCR

Auf den Microarray- und RT-qPCR-Array-Ergebnissen basierend wurden 16 Kandidatengene (Abb. 35) in Einzel-RT-qPCR-Analysen mit sechs biologischen und je drei technischen Replikaten zur Erhöhung der statistischen Aussagekraft je Stimulationsart (einfach-Stimulation A, vierfach-Stimulation A, vierfach-Stimulation B) und Referenz untersucht (Stock *et al.*, 2012; Medina und Túnez, 2013; Lenz *et al.*, 2015 und 2016; Grehl *et al.*, 2016). Bei Stimulationsart A im Vergleich zur Referenz zeigte sich lediglich ein Gen (Gga3) als signifikant reguliert. Bei vierfach-Stimulation A trat bei vier Genen (Calm4, Gap43, Il6, MEOX2) eine signifikante Genexpressionsänderung mit Änderungswerten von 2,30 bis 0,51 auf. Die vierfach-Stimulation B zeigte sechs signifikante Genexpressionsänderungen (Calm4, Il6, Meox2, Nae1, Pink1, Psenen) im Bereich von 5,39 bis 0,60 im Vergleich zu den Referenzproben (Abb. 35).

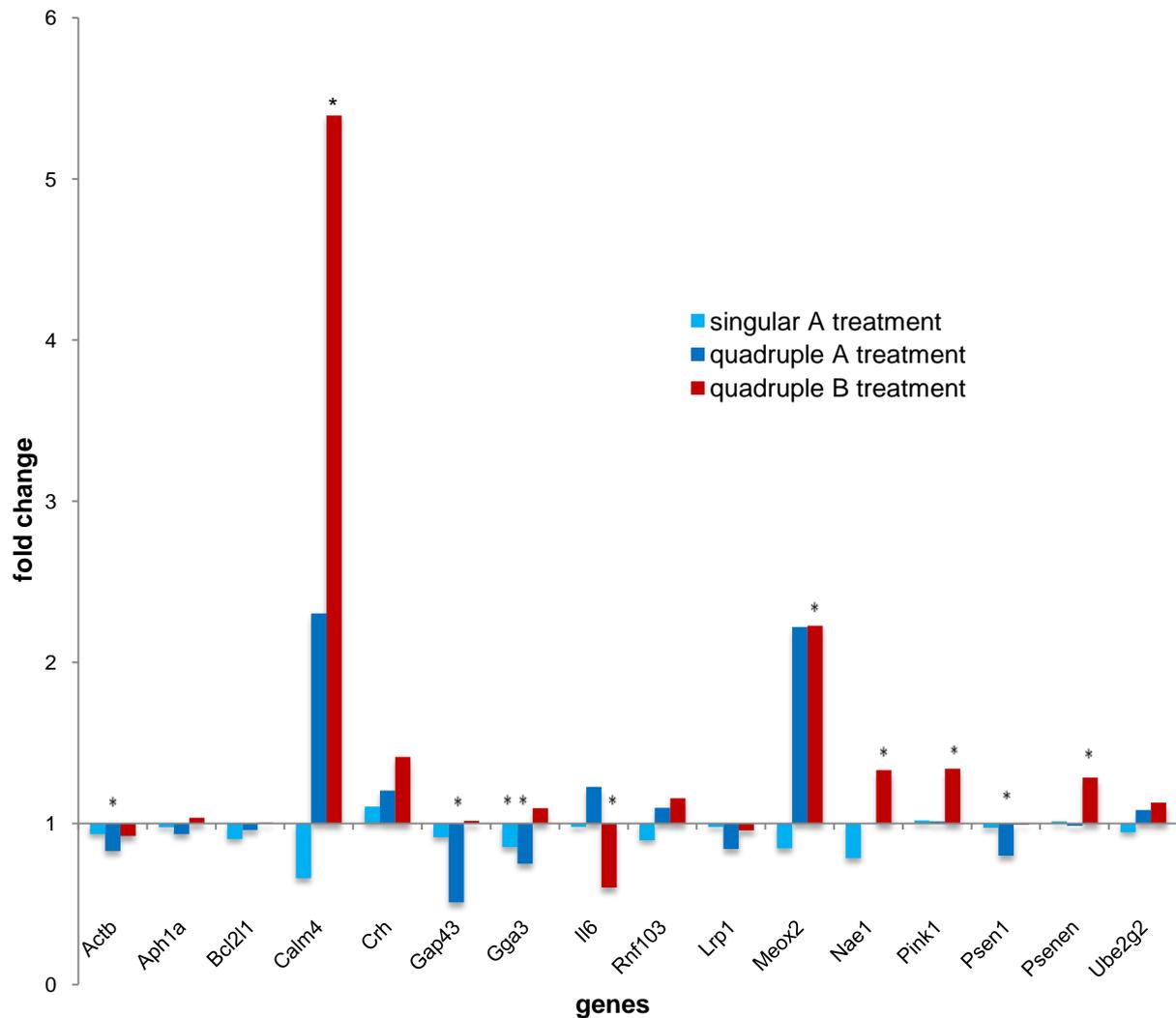


Abb. 35: Genexpressionsänderungen der Kandidatengene nach verschiedenen Behandlungsmustern im Verhältnis zur Referenzgruppe nach $\Delta\Delta$ Cq-Normalisierung. Sternchen zeigen signifikante Expressionsunterschiede ($p < 0,5$; t-Test) zwischen Behandlung und Referenz (Stock *et al.*, 2012).

Der Vergleich zwischen den Behandlungen vierfach-A und -B zeigte bei drei Genen (Actb, Bcl2l1, Il6) signifikante Änderungen in der Genexpression in einem Bereich des Fold Changes von 1,777 bis 0,373 wie in Abb. 36 ersichtlich (Stock *et al.*, 2012). Die Daten der Einzelgenvalidierungen der 27 Gene nach Stimulation mit Muster A (einfach) sind tabellarisch im Anhang zu finden (9.4.4).

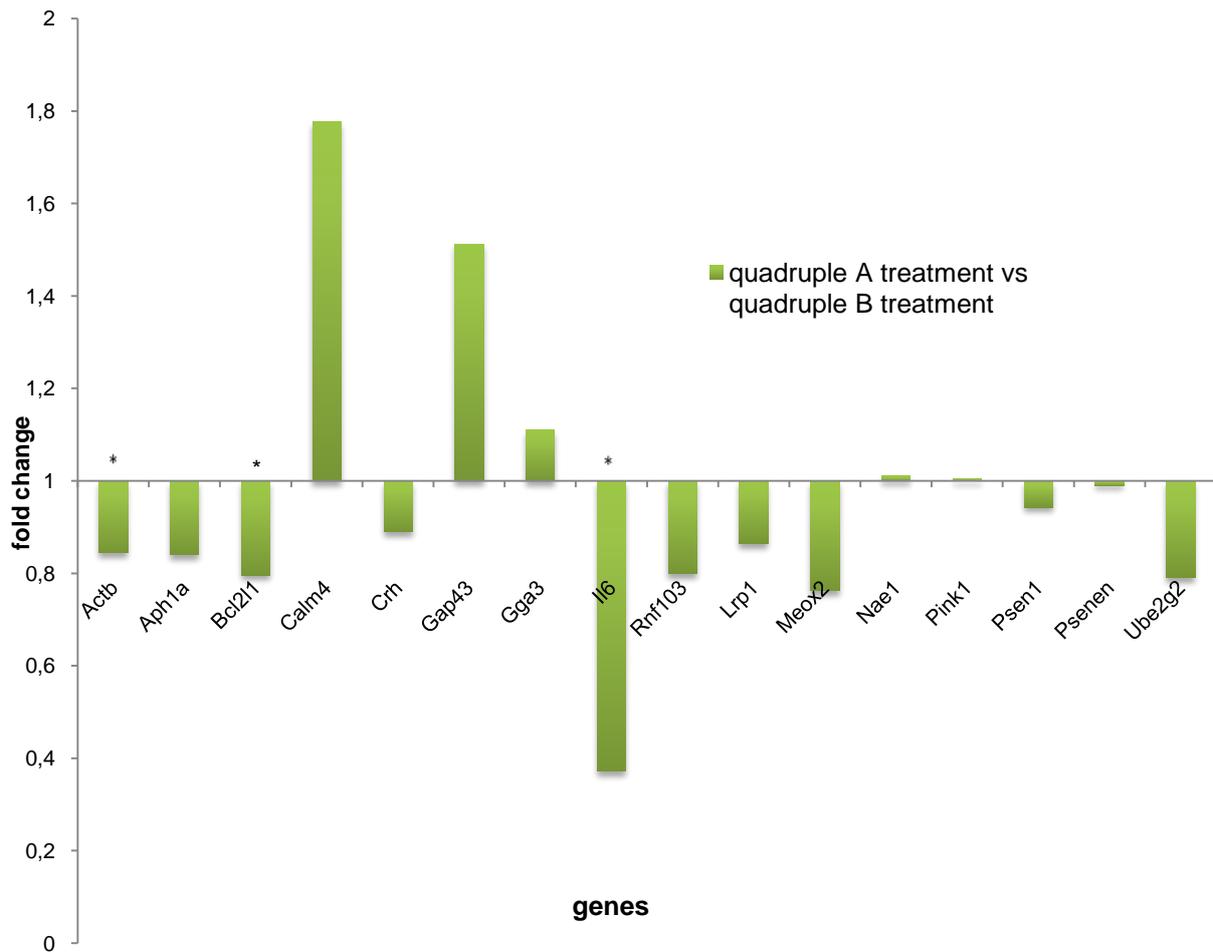


Abb. 36: Fold Change der Kandidatengene in Gegenüberstellung von vierfach-A vs. vierfach-B-Behandlung. Die Sternchen markieren die unterschiedlich signifikant exprimierte Gene nach $\Delta\Delta C_q$ -Normalisierung zwischen vierfach-A und B Behandlung ($p < 0,5$; t-Test) (Stock *et al.*, 2012).

4.3.4 Micro-RNA-Profiling

Der Einfluss von Magnetstimulation auf die Expressionsregulation der miRNA neuronaler Zellen ist, wie in Abb. 37 dargestellt, deutlich sichtbar und signifikant für eine große Anzahl von miRNAs im Vergleich zur Kontrollprobe (Stock *et al.*, *in praep.* b). Die Daten wurden $\Delta\Delta C_q$ normalisiert unter Verwendung von hsa-miRNA-125b und mmu-let-7a als Referenz und subsequent nach t-Test zeigten sich Expressionsänderungen von 41 und 36 % der miRNA bei Behandlung A und B. Im Gegensatz zur Target-Gen-Validierung, bei der die meisten Gene auf die Einfach-Stimulation A signifikant regulierten, wurden die miRNAs nahezu gleich durch Stimulation A und B beeinflusst. Hierbei zeigten die miRNAs hsa-miR-133b, hsa-miR-200a, hsa-miR-212 und mmu-miR-124a signifikante Expressionsänderungen für beide Stimulationsarten.

Ein ähnlicher Trend war bei der Regulation von hsa-let-7e, hsa-miR-128a und hsa-miR-204 durch Stimulation A erkennbar, wobei hsa-miR-204 Tendenz zur Signifikanz (p -value < 0.1) bei Behandlung B zeigte.

Dennoch konnten signifikante miRNA-Expressionsänderungen bei jeweils nur einer Stimulation, wie bei Behandlung B für hsa-miR-10b, mmu-miR-134 und mmu-miR-294 und bei Behandlung A für hsa-miR-9 und mmu-miR-495, gefunden werden.

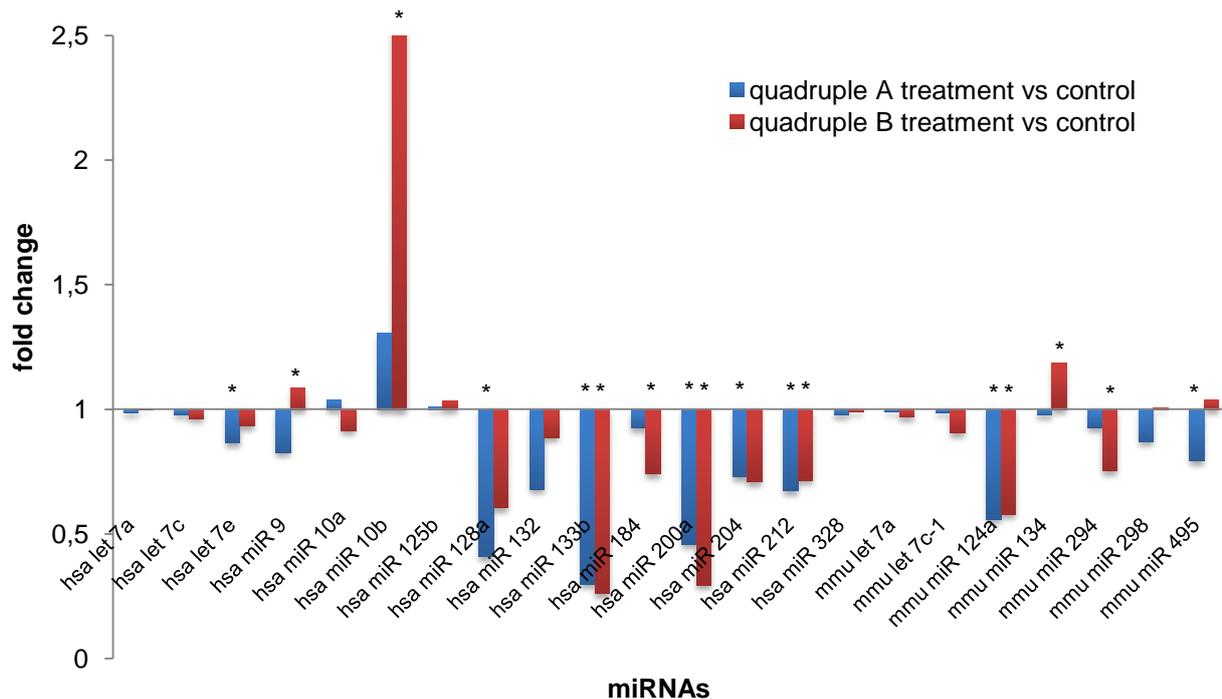


Abb. 37: Genexpressionsregulationen der miRNA für vierfach-B und vierfach-A-Stimulation im Vergleich zur Referenzgruppe (* signifikante Änderung) (Stock *et al.*, *in praep.* b).

Im direkten Vergleich der beiden Stimulationsarten (Abb. 38) wurden ähnliche Effekte der Expression der miRNA deutlich (Stock *et al.*, *in praep.* b). Es trat nur eine geringe Anzahl an signifikant unterschiedlichen Expressionen beider Stimulationsarten auf, betreffend die miRNAs, die nur bei einer Behandlungsart im Vergleich zur Kontrollgruppe regulierten, wie hsa-miR-10b, hsa-miR-9 und mmu-miR-134. Die signifikante Expressionsänderung von hsa-miR-200a zeigte eine erhöhte Down-Regulation bei Behandlung B.

Die gesamten Werte der Stimulationsarten A und B im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie A und B im direkten Vergleich, einschließlich der p -Values und der exakten Fold Changes für alle miRNAs, befindet sich tabellarisch im Anhang.

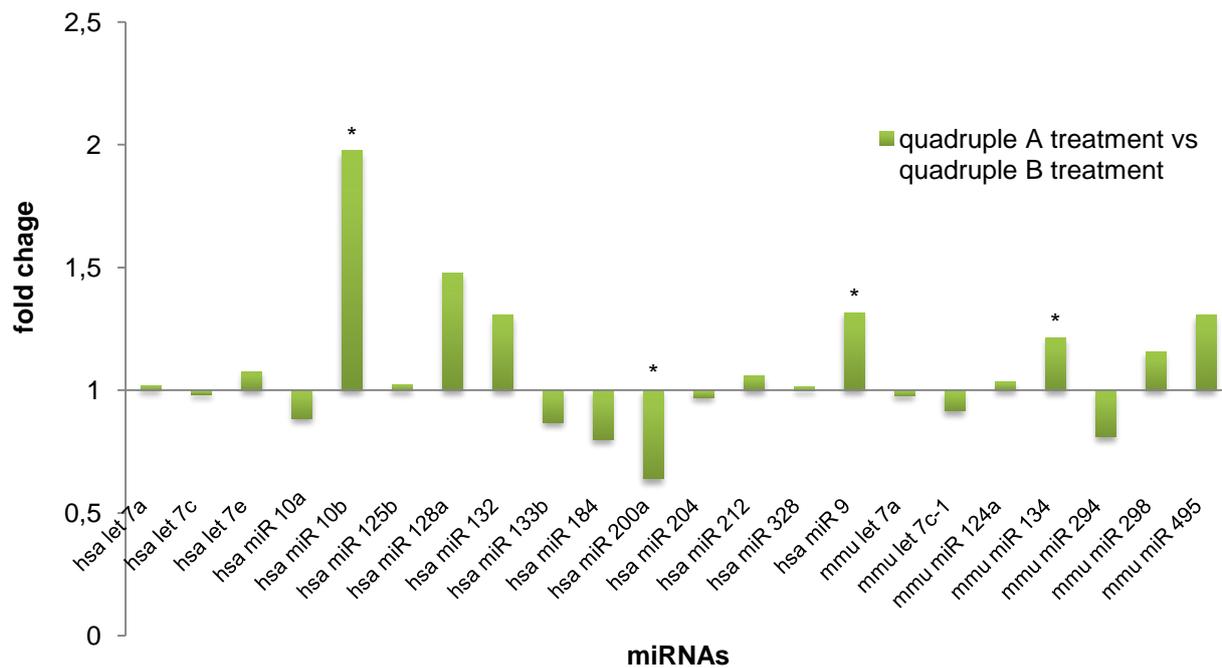


Abb. 38: Genexpressionsregulationen der miRNA für vierfach-B-Stimulation im Vergleich zu vierfach-A-Stimulation (*' signifikante Änderung).

4.3.5 Integrative Analyse – Target Gene Interaction

Die Joint-Analyse zwischen den ausgewählten miRNAs und den Ziel-mRNAs erfolgte durch Dateneingabe der miRNAs sowie der Target-Gen-IDs oder -Namen in der Analyse-Software DIANA-mirPath v3.0 (Vlachos *et al.*, 2015) sowie miRWalk2.0 (Dweep *et al.*, 2015).

DIANA-mirPath v3.0

DIANA-mirPath appliziert vorbestimmte miRNA-Targets (in CDS oder 3'-UTR Regionen), die auf Basis von DIANA-microT-CDS Algorithmen oder auch experimentell validierten miRNA-Interaktionen, abgeleitet von DIANA-TarBase (DIANA-TarBase v7.0), resultieren (Vlachos *et al.*, 2015). Mit mehr als einer halben Million miRNA-Gen-Interaktionen, basierend auf experimentell validierten Experimenten unter Implementierung von 356 verschiedenen Zelltypen und 24 Spezies, stellt DIANA-TarBase v7.0 eine der größten Datenbanken weltweit dar (Vlachos *et al.*, 2014).

In der Darstellung microRNA/Pathway-Clusters zeigte der Pathway Alzheimer's Disease (Abb. 30, hsa05010) drei verschiedene Gene (APH1A, LRP1, PSEN1) korreliert mit sechs miRNAs, wie in Tab. 15 ersichtlich. In der Hierarchie der Signifikanz-

Cluster 'pathway unions' positionierte sich der Pathway AD an erster Stelle (p-Value < 0,1), gefolgt von 'NF-kappa B signaling pathway' (hsa04064, BCL2L1), 'Antigen processing and presentation' (hsa04612, HLA-B) und 'Notch signaling pathway' (hsa04330, APH1A und PSEN1). Die Signifikanz-Cluster der vier Pathways in Abhängigkeit der gewählten miRNAs sind zweidimensional als Heatmap in Abb. 39 visualisiert (Stock *et al.*, *in praep.* b).

Tab. 15: microRNA / Pathway Cluster Alzheimer's Disease (hsa05010).

miRNA	database	target gene	gene Ensembl id
hsa-let-7e-5p	Tarbase	LRP1	ENSG00000123384
	Tarbase	PSEN1	ENSG00000080815
hsa-miR-125b-2-3p	Tarbase	LRP1	ENSG00000123384
hsa-miR-128-3p	microT-CDS	PSEN1	ENSG00000080815
hsa-miR-132-3p	Tarbase	APH1A	ENSG00000117362
hsa-miR-200a-3p	Tarbase	PSEN1	ENSG00000080815
hsa-miR-200a-5p	microT-CDS	PSEN1	ENSG00000080815

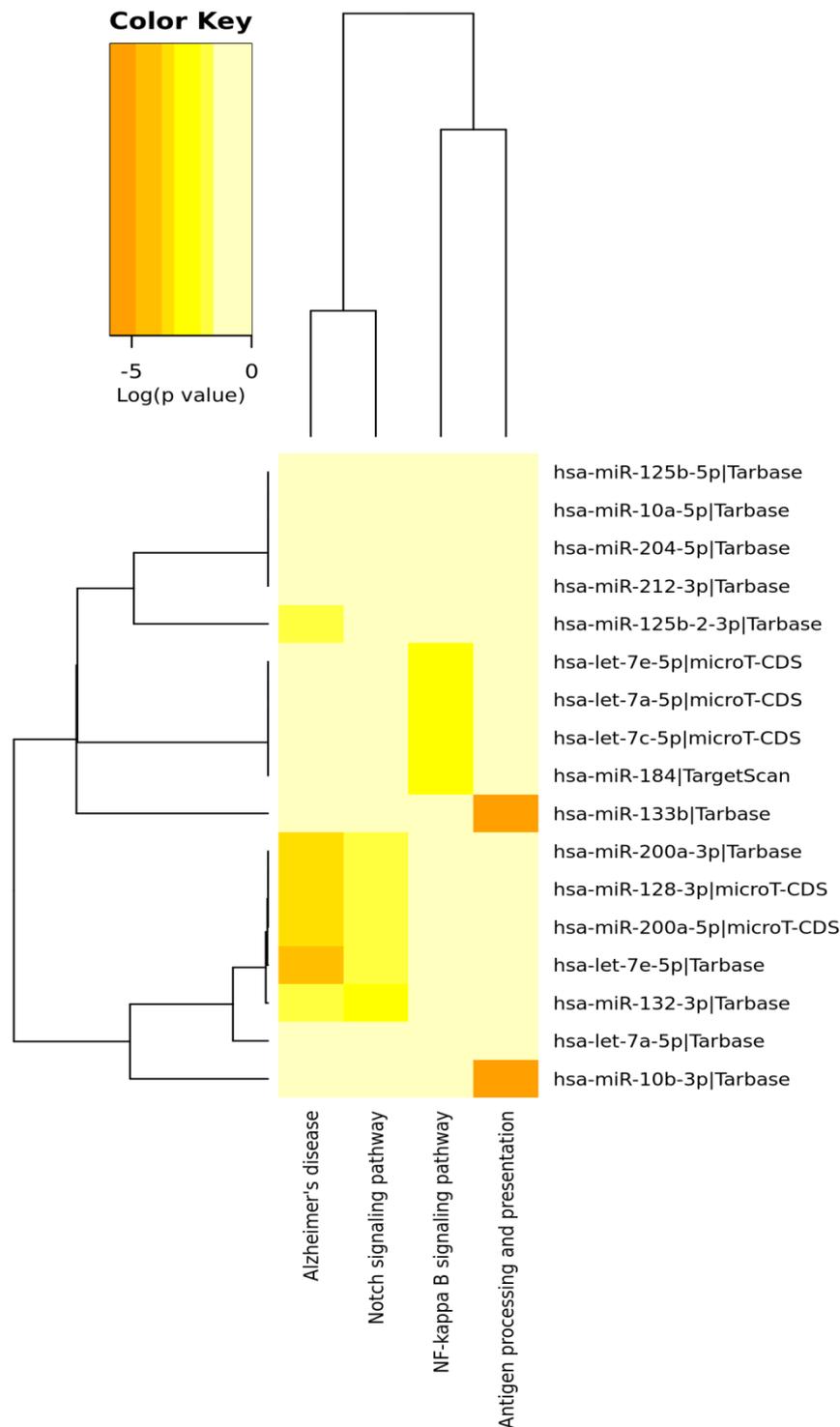


Abb. 39: Heatmap der miRNA-Zielgen-Interaktion in Relation der analysierten Pathways (Stock *et al.*, *in praep.* b).

Sämtliche miRNA-Gen-Interaktionen der von uns untersuchten hsa-miRNA (4.3.4 Micro-RNA-Profilung) und der selektierten Zielgene (4.3.3 Validierung selektierter Gene mittels RT-qPCR) sind in Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16: Integrative Analyse aller ausgewählten microRNAs korreliert mit den Target-Genen aus 4.3.3 in DIANA-mirPath v3.0

miRNA	database	target gene	gene Ensembl id
hsa-let-7a-5p	Tarbase	PICALM	ENSG00000073921
	Tarbase	APH1A	ENSG00000117362
	Tarbase	GGA3	ENSG00000125447
	Tarbase	LRP1	ENSG00000123384
	Tarbase	UBE2G2	ENSG00000184787
	Tarbase	IL6	ENSG00000136244
	microT-CDS	BCL2L1	ENSG00000171552
hsa-let-7c-5p	microT-CDS	BCL2L1	ENSG00000171552
hsa-let-7e-5p	Tarbase	LRP1	ENSG00000123384
	Tarbase	PSEN1	ENSG00000080815
	microT-CDS	BCL2L1	ENSG00000171552
hsa-miR-10a-5p	Tarbase	GAP43	ENSG00000172020
hsa-miR-10b-3p	Tarbase	HLA-B	ENSG00000234745
	Tarbase	APH1A	ENSG00000117362
	microT-CDS	HLA-B	ENSG00000234745
	TargetScan	HLA-B	ENSG00000234745
hsa-miR-125b-2-3p	Tarbase	LRP1	ENSG00000123384
hsa-miR-125b-5p	Tarbase	PICALM	ENSG00000073921
hsa-miR-128-3p	microT-CDS	PSEN1	ENSG00000080815
hsa-miR-132-3p	Tarbase	APH1A	ENSG00000117362
hsa-miR-133b	Tarbase	HLA-B	ENSG00000234745
hsa-miR-184	TargetScan	BCL2L1	ENSG00000171552
hsa-miR-200a-3p	Tarbase	PICALM	ENSG00000073921
hsa-miR-200a-5p	microT-CDS	PSEN1	ENSG00000080815
hsa-miR-204-5p	Tarbase	PICALM	ENSG00000073921
hsa-miR-212-3p	Tarbase	PICALM	ENSG00000073921

miRWalk 2.0

Die Eingabe der selektierten Gene wird grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen durchgeführt. Alternativ kann die Dateneingabe im Modul 'vorhergesagtes Zielmodul' (predicted Target Modul) oder 'validiertes Zielmodul' (validated Target Modul) erfolgen.

'predicted target modul' basiert auf zwölf verschiedenen miRNA-Target-Prediction-Programmen (DIANA-microTv4.0, DIANA-microT-CDS, miRanda-rel2010, mirBridge, miRDB4.0, miRmap, miRNAMap, doRiNA i.e., PicTar2, PITA, RNA22v2, RNAhybrid2.1 and Targetscan6.2) zur Bildung neuer komparativer Plattformen der Bindungsseite des Promotors (vier Vorhersage-Datensets), der cds (fünf Vorhersage-

Datensets), 5'-UTR (vier Vorhersage-Datensets)- und 3'-UTR (13 Vorhersage-Datensets)-Regionen (Dweep *et al.*, 2015).

Es erfolgte die Eingabe der Zielgene (4.3.3 Validierung selektierter Gene mittels RT-qPCR) im Bereich des validierten Zielmoduls Gene-miRNA-Targets (validated Gene-miRNA Interaction Information Retrieval System). In diesem Bereich des validated Target Modul sind verifizierte miRNA-Target-Interaktionen basierend auf mehr als 13650 Publikationen in vier bestehenden Ressourcen (miRTarBase, PhenomiR, miR2Disease and HMDD) in miRWalk 2.0 (Dweep *et al.*, 2015) dokumentiert und angewendet.

Diese Möglichkeit der integrativen Analyse (Tab. 17) zeigte eine Korrelation dreier Zielgene (IL6, BCL2L1, LRP1) mit drei gefundenen miRNAs (hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-9-5p), die ebenfalls in den selektierten miRNAs vorhanden sind. Das Gen LRP1 korrelierte, in Übereinstimmung mit den Zuordnungen aus DIANA-mirPath v3.0, mit hsa-let-7c-5p. Die selektierten mus musculus-miRNAs zeigten keine Korrelation zu den Target-Genen aus 4.3.3 in miRWalk 2.0.

Tab. 17: Integrative Analyse der Target-Gene mit den selektierten miRNAs in miRWalk 2.0

miRNA	database	target gene	gene Ensembl id
hsa-let-7a-5p	miRWalk	IL6	ENSG00000136244
hsa-let-7c-5p	miRWalk	BCL2L1	ENSG00000171552
hsa-miR-9-5p	miRWalk	LRP1	ENSG00000123384

5. Diskussion

5.1 Einzelgenexpressionsanalytik

Die Ergebnisse zeigen, dass grundsätzlich, bei murinen neuronalen Zellverbänden *in vitro*, wie auch in anderen Forschungsarbeiten am Organismus gezeigt (Müller *et al.*, 2000; Kudo *et al.*, 2005; Medina und Túnez 2013; Nardone *et al.*, 2015), nach repetitiver Magnetstimulation verschiedener Stimulationsmuster, signifikante Genexpressionsänderungen eintreten. Die in der Einzel-qRT-PCR spezifisch ermittelten Gene stellen die Basis zum Verständnis der Wirkung der rMS auf neuronale Netzwerke des Frontalen Cortex dar. Hiermit lassen sich aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse der Genexpressionsänderung neuronaler Netzwerke durch repetitive Magnetstimulation möglicherweise rehabilitative Verbesserungen *in vivo* (Medina-Fernández *et al.*, 2017) erreichen, sowie Anwendungsperspektiven bei diversen pharmakologischen und toxikologischen Tests (Johnstone *et al.*, 2010; Grehl *et al.*, 2016) *in vitro* erschließen.

In Folgeuntersuchungen mit veränderten bzw. wiederholten bekannten Stimulationsmustern könnten die verschiedenen Pathways charakterisiert und die funktionellen Interaktionen innerhalb einer Gruppierung von Genen (Gstir *et al.*, 2014) aufgezeigt und verstanden werden. Weitreichend wäre eine koordinierte Transkriptom-Reaktion, hervorgerufen durch validierte magnetische Stimulationsmuster, denkbar. Eine fokussierte und skalierte Beeinflussung Alzheimer- und Neurodegeneration-assoziiierter Gene wie z.B. Psen1 (Miller *et al.*, 2010) oder Rnf103 (Yasojima K. *et al.*, 1997; Tsujimura *et al.*, 2008), das durch andere Arbeitsgruppen belegt im Organismus Beeinflussung durch repetitive Magnetstimulation (Kudo *et al.*, 2005) erfährt, ist möglich. Die reziproken Interaktionen der miRNAs mit Zielgenen können hierbei über eine durchgeführte Jointanalyse Hinweise und Erklärungen geben, die ein Verständnis des komplexen Zusammenspiels der Einzelgenexpressionen geben können (Godard *et al.*, 2015).

5.2 Stoffwechselforgänge, Signalinteraktionen sowie Pathologien

Die Darstellungen der Pathologien Alzheimer-Erkrankung (AD), Parkinson-Erkrankung (PD) und Corea Huntington (HD) in Pathways (KEGG) zeigen übersichtlich die annotierten Gene und aktiven Enzyme bei unterschiedlichen normierten positiven sowie negativen Regulationen aufgrund Magnetstimulation farblich markiert (Abb. 30 - 32). Hierbei fanden bei allen pathologiebezogenen Genen und Metabolismen aller drei Pathways Regulationen statt. Analogien bestanden bei den Chromatin-Komplexen I-V im Bereich positiver Regulation der Mitochondrien sowie einer negativen Aktivität des Zytochrom C. Möglicherweise kann die pathologiebedingte Apoptose basierend auf mitochondrialen Dysfunktionen, wie beispielsweise dem gestörten Proteinabbau, durch Magnetstimulation retardiert oder vielleicht sogar terminiert werden. Somit könnte dem oxydativen Stress aufgrund des Anstieges der basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin und Ornithin) und dem daraus resultierenden Freisetzen des Proteins Zytochrom C (Braun *et al.*, 2015) durch Magnetstimulation entgegen gewirkt und ein rehabilitativer Prozess eingeleitet werden.

Im Pathway Huntington Disease zeigte sich eine deutliche Negativregulation in den Genen REST und CREB. Eine Herabsetzung der Hemmung der transkriptionalen oder post-transkriptionalen Genexpression beim Gen-Silencing (REST) lässt eine höhere Expression neuronaler Gene wie BDNF oder nicht kodierender miRNAs, die elementar für neuronale Vitalität, Plastizität oder dendritisches Wachstum sind (Hellmann *et al.*, 2012; Mounmé *et al.*, 2013), zu. Dies würde im pathologischen HD-Organismus der REST-gesteuerten Gen-Repression, bei der REST aufgrund gestörter Huntingtin-(Htt)-Interaktion überexprimiert, entgegen wirken. Die PD-Pathogenese korreliert mit einer Variabilität der CAG-Wiederholung im Htt-Gen (Lee *et al.*, 2015). Dies müsste in weiterführenden Experimenten validiert und examiniert werden um eine mögliche gezielte Regulationsmanipulation zu erschließen.

Die negative Aktivierung des LRRK2-Gens im Bereich der anormalen Phosphorylierung der Mitochondrien im mitochondrialen Pathway der Parkinsonschen Krankheit stellt einen deutlichen therapeutischen Ansatz dar, der in weiteren skalierten Untersuchungen eine kontrollierte Beeinflussbarkeit möglich machen könnte, da LRRK2-Mutationen erwiesen mit PD korrelieren. LRRK2 (PARK8) stellt kausal 10% der autosomal dominant vererbten Parkinson-Formen sowie bei 3 % der sporadischen pathologischen Fälle (Simón-Sánchez *et al.*, 2009). Im Parkin-Ubiquitin Proteosom Pathway kann eine stressbedingte Abhängigkeit der PaelR-Aktivität (Anhäufung von ungefaltetem PaelR) im endoplasmatischen Retikulum letztlich zum Zelltod führend, mit

Magnetstimulation assoziiert werden. Dem gegenüber verstärken Hsp70 und CHIP als Cofaktoren Parkins die Ubikinase von PaelR und wirken konträr dem Zelltod (Takahasi & Imai 2003). Auch scheint sich eine erhöhte Aktivität bei Synphilin1, das einem Abbau durch das Proteasom von Alpha-Synuclein entgegen wirkt (Alvarez-Castelao & Castaño 2011), positiv zu erhöhen. In einer Einzelgenuntersuchung der Regulationsreaktionen bei fein abgestimmter Magnetstimulation unterschiedlicher Intensitäten und unterschiedlicher Frequenzen (70 +/- 4 Hz) könnte eine direkte Korrelation und Schlüsselgenfunktion evident werden. Basierend auf diesen Daten sollte eine Untersuchung des Gesamtgenoms bei markanten Stimulationswerten in Pathway orientierter Darstellung erfolgen um die komplexe Vernetzung im Pathway zu visualisieren und das Regulationsverhalten weiterer Gene, Enzyme und Proteine zu analysieren, die systematische ambivalente Gesamtdynamik zu erfassen (Godard *et al.*, 2015) und, wie bisher erfolgt, gezielte Einzelgenanalytik durchzuführen.

5.3 Pathologie-korrelierende MicroRNA-Regulationen

Die anormale Expression verschiedener miRNAs in psychischen Erkrankungen wie Depression, Autismus und vielen weiteren, ist auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie *Morbus Alzheimer* (AD), *Morbus Parkinson* (PD) und *Corea Huntington* (HD) evident (Chan *et al.*, 2012).

Pathologien kausal bedingter Up-Regulation einer miRNA kann eine miRNA-Inhibitionstherapie entgegen wirken, während bei Repression der miRNA eine miRNA-Ersatztherapie möglich ist (Zhang *et al.*, 2013; Bhalala *et al.*, 2013; Abb. 10). Hierbei ist die Möglichkeit, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, eine unterschiedliche Beeinflussung der Expression der miRNA durch unterschiedliche Stimulationsmuster der Magnetstimulation gegeben. Ähnliches belegen auch Experimente mit rTMS bei Frequenzen von 10 Hz von Feng *et al.* (2014), bei denen neuronale Stammzellproliferation mittels magnetstimulierter Up-Regulation der miRNA-25 und des identifizierten Target-Gens p57 bei erfolgter Down-Regulation erzielt werden konnte.

Eine durch Magnetstimulation hervorgerufene Up-Regulation der entsprechenden miRNA wirkt somit als miRNA-Amplifikation mit entsprechender Zielgendeaktivierung, hingegen bei Down-Regulation als miRNA-Inhibitor mit daraus resultierender Zielgenaktivierung.

Somit könnte durch definierte Magnetstimulation bedingte Up-Regulation der entsprechenden miRNA ähnliche Amplifikation wie durch modifizierte Doppelstrang-RNA-Moleküle als miRNA-Mimics oder der Anwendung DNA-basierter Plasmide (Abb. 10, 1) erzielt werden. Andererseits könnte Magnetsimulation-bedingte Down-Regulation inhibitorische Effekte, hervorgerufen durch Antagomire (anti-miRs, chemisch synthetisierte Oligonukleotide), Plasmid-Inhibition, 'locked nucleic acids' (LNAs) oder miRNA-Sponges, substituieren (Abb. 10; 3, 4) (Ma *et al.*, 2010; Bhalala *et al.*, 2013).

Eine pro-inflammatorische Reaktion mit Makrophagenaktivierung, wie durch die miRNA-125b mit Target Gen IRF4 hervorgerufen (Ponomarev *et al.*, 2013), erscheint in den vorliegenden Experimenten bei beiden Stimulationsarten A und B geringfügig gegeben, wie sich an den positiven Fold Changes aus Abb. 37 erkennen lässt. Im Falle der Alzheimer-Erkrankung (AD), bei dem eine zu geringe Makrophagenaktivierung einen Anstieg an Amyloid-Ablagerungen hervorruft, kann die Up-Regulation der miRNA-125b durchaus sinnvoll sein. Bei der Identifikation der miRNA-Regulationen von Alzheimer-(AD)-Patienten zeigten Cogswell *et al.* (2008) die miRNA-9 signifikant negativ reguliert in den Bereichen des Hippocampus, Cerebellum und medialem frontalem Gyrus. Auch hier könnte Magnetstimulation der Stimulationsart B, wie in unseren Versuchen gezeigt, entgegen wirken. Weiterhin war bei den AD Patienten die miRNA-200 im Hippocampus positiv und im medialen frontalen Gyrus wiederum negativ reguliert, wobei durch die Magnetstimulation beider Stimulationsarten A und B negative Regulation der miRNA-200 hervorgerufen wurde und somit partiell eine Absenkung im Hippocampus erreicht werden könnte. Dies bedarf jedoch eingehender hochfokaler Magnetstimulations-Experimente an transgenen Mäusen, da der Hippocampus ohne Beeinflussung anderer Partitionen des Encephalons lokal diffizil insistierbar ist. Die Ergebnisse von Lau *et al.* (2013) zeigen im frühen und mittleren Stadium der AD geringste Mengen an miRNA-10b im humanen Frontalen Cortex gegenüber normal. Dies zeigten bereits die Ergebnisse von Cogswell *et al.* (2008) an humanem Gewebe und cerebrospinalem Liquor *post mortem*. miRNA-10b kann in karzinogenem Gewebe Supression und Aktivierung der Translation verschiedener Gene hervorrufen (Ma *et al.*, 2010), über das Regulationsverhalten in validem neuronalen Zellgewebe ist in der Literatur wenig zu finden, lediglich die Aussage, dass miRNA-10b im Cerebrum fehlend sei, und in der Entwicklungsphase für humane neuronale

Progenitor-Zellen (hNPCs) eine kausale Rolle spielen könnte (Jönsson *et al.*, 2015). Beide in der vorliegenden Arbeit angewandten Stimulationsarten wirken bei miRNA-10b konträr hochregulierend, Stimulationsart B signifikant.

In allen temporären Phasen von AD zeigte sich miRNA-200a durchwegs positiv reguliert. In unseren Versuchen reguliert bei beiden Stimulationsarten miRNA-200 signifikant negativ. Die miRNA-200-Familie ist in der Literatur in vielen karzinogenen Studien als Tumorsuppressor beschrieben (Feng *et al.*, 2014), jedoch existiert wenig Literatur über miRNA-200 in neuronalem (Trümbach & Prakash, 2015) oder sich entwickelndem neuronalen Gewebe (Pandey *et al.*, 2015). Down-regulierte miRNA-200 unterstützt neuronale Proliferation, hingegen Up-Regulation neuronale Differentiation (Pandey *et al.*, 2015; Beclin *et al.*, 2016).

Somit können miRNA-10b und miRNA-200a als durch Magnetstimulation beeinflussbare Schlüsselgene bei AD angesehen werden.

Die neuropathologischen Kennzeichen der Parkinson-Erkrankung (PD) sind nicht nur im Verlust der nigrostriatalen dopaminergen Neurone (PDN) oder der zellulären Akkumulation des AlphaSynuclein in den Lewy-Körperchen (PDD) sichtbar, sondern betreffen auch Areale des Präfrontalen Cortex mit dopaminergen Ausläufern pathologischer Kennzeichnung, jedoch nicht in der mortalen Exhibition als neuronaler Zelltod (Hoss *et al.*, 2016).

Die heterogene Kausalität der PD-Pathogenese ist assoziiert mit einer Dysregulation der miRNA (Kim *et al.*, 2007). Hoss *et al.* (2016) konnten jedoch keine signifikanten Expressionsänderungen der miRNAs (miRNA-133b, miRNA-134b, miRNA-34c), wie in den Arbeiten von Kim *et al.* (2007) und Miñones-Moyano *et al.* (2011), feststellen, was sich auf fundamental differenziertes Gehirngewebe (*Substantia nigra* und Frontaler Cortex) zurückführen lässt. Dies zeigt deutlich die sensible Beurteilung der Expressionsergebnisse in Relation zum untersuchten Gewebe sowie der molekularen Analysemethoden wie RT-qPCR, Micro-Arrays und miRNA-Sequencing. miRNA-10b ist bei PD (Hoss *et al.*, 2016) signifikant down-reguliert. Die Stimulationsarten A und B (signifikant) unserer Versuchsreihen zeigten hier eine Up-Regulation. Diese magnetstimulations-bedingten Regulationen könnten eine mögliche Pathologieassoziation bei PD darstellen.

Packer *et al.* (2008) zeigte einen signifikanten Abfall von miRNA-9 bei Corea Huntington-(HD)-Patienten im fortgeschrittenen Stadium mittels eines Rasters von vorhergesagten REST-miRNA-Korrelationen. Eine Up-Regulation von miRNA-9, wie in unseren Versuchen an salubren neuronalen Netzwerken durch Stimulationsart B durchgeführt, könnte als miRNA-Amplifikation diesem HD-pathologischen supprimierten miRNA-Level entgegen wirken, jedoch ist hier Validierung der Regulation unter Verwendung HD-pathologischer Zellkulturen notwendig.

Die Stimulation mit Muster B (30 Hz) zeigte eine signifikante Erhöhung der miRNA-134, die mit Muster A (70 Hz) eine Down-Regulation. miRNA-134 korreliert inhibierend auf Ube3a, das die aktivitätsabhängige synaptische Entwicklung und Plastizität reguliert. Eine bidirektionale Stimulationsart-abhängige Regulation könnte in Korrelation zu Autismus oder Angelmann-Syndrom stehen (Valluy *et al.*, 2015).

Ein möglicher therapeutischer Nutzen der Bestimmung der miRNA als Biomarker (Pritchard *et al.*, 2012) für die Feststellung der temporär optimalen Applikation der Magnetstimulation, ähnlich der temporal dependenten Pathologie-Bestimmung der medikamentösen Therapie traumatischer Hirnverletzungen (TBI), aus Tierexperimenten bekannt, oder der Unterscheidung bei Apoplexie-Pathologie zwischen ischämischem und hämorrhagischem Infarkt, wäre denkbar (Bhalala *et al.*, 2013). Die diagnostische Applikation der zellfreien zirkulierenden miRNA in Blut, Liquor, Flüssigkeiten und Gewebe zur Graduierung der differenten Entwicklungsstadien der Früherkennung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems stellt einen vielversprechenden Therapieansatz mit ersten Erfolgen dar (Sheinerman & Umansky 2013; Basak *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016).

miRNA-124 (auch miRNA-124a) gilt als die am meisten im Cerebellum vorkommende (Guo *et al.*, 2009) sowie am besten an verschiedenen Organismen untersuchte miRNA (Gao, 2010). Die signifikante negative Regulation der anti-inflammatorischen miRNA-124a bei unseren beiden Stimulationsmustern A und B korreliert in einem Ansteigen der Proliferationsrate sowie einer negativen Expression des Interleukin 6 (IL-6). Somit könnte via Magnetstimulation die Möglichkeit der Modulation der Mikroglia und Makrophagen bei neurodegenerativen Erkrankungen zur Überwindung der Blut-Hirnschranke gegeben sein (Ponomarev *et al.*, 2013).

miRNA-128a exprimiert in adulten neuronalen Zellen und reguliert das motorische Verhalten durch Modulation neuronaler Netze sowie deren Exzitabilität (Tan *et al.*,

2013). Die Suppression der miRNA-128, wie in unserem Fall durch beide Stimulationsarten hervorgerufen, bewirkt eine Expression der extrazellulären signalregulierenden Kinase (ERK2, MAPK1) und somit neuronal exzitatorisch. Die Stimulation mit Muster A (70 Hz) zeigte signifikante Down Regulation und damit Erhöhung der motorischen Signalaktivität.

Ein Gesamt-miRNA-Profilung neuronaler Zellkulturen des Frontalen Cortex und anderer Segmente des Cerebellum (Pritchard *et al.*, 2012) nach elektromagnetischer Befeldung, mit der Analyse aller zur Zeit bekannter miRNAs, wird sicherlich einige hochinteressante miRNA-Regulationen aufdecken, die in weiteren Studien validiert und auch in Anbetracht der reziproken mRNA-Regulationen korreliert werden müssen. Diese Netzwerk-Genregulationsmuster basieren auf der Tatsache, dass eine miRNA mehrere hundert mRNAs regulieren kann und hierin multiple komplexe biologische Informationen enthalten sind. Aktuell sind 709 verschiedene miRNAs beim Maus-miRNome und 1113 beim Human miRNome mittels kommerziell erhältlicher MicroRNA-qPCR-Array-Panels gleichzeitig analysierbar (System Biosciences 2017; <http://www.mirbase.org/search.shtml>). Eine Selektion Pathologie-relevanter miRNAs wie bei Gstyr *et al.* (2014), zusammengestellt auf einem Microarray, stellt eine effiziente Möglichkeit der Erfassung einer fokussierten Diversifikation durch Magnetstimulation dar.

5.4 Integrative Analyse

Die Software-Tools miRWalk2.0 und DIANA-mirPath v3.0 dienten zum Auffinden der Korrelationen unserer selektierten Zielgene und miRNAs. miRWalk fand lediglich bei drei miRNAs (hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-9-5p) und drei Zielgenen (IL6, BCL2L1, LRP1) Korrelation. In Übereinstimmung der Ergebnisse aus DIANA-mirPath v3.0 korrelierte das Gen LRP1 mit hsa-let-7c-5p.

In DIANA zeigte sich GAP43 mit hsa-miR-10a korreliert. Experimentell bewirkte die vierfache Stimulation A eine signifikante Down-Regulation, wobei hsa-miR-10a in Repressorfunktion entsprechend reziprok positiv regulierte. Eine ähnlich negative Regulation zeigte APH1A bei singulärer und deutlicher bei vierfacher Stimulation A und Hochregulation von hsa-miR-10b. Hierbei sind Polymorphismen in der Promoter-Region dieses Gens assoziiert mit einem erhöhten Risiko einer Entwicklung der sporadischen Alzheimer-Erkrankung (AD). LRP1 regulierte bei allen Stimulationsarten gering negativ und stimmt mit der positiven Regulation von hsa-miR-125b bei den

Stimulationsarten vierfach-A und vierfach-B überein. Das Gen CALM4 regulierte signifikant positiv nach beiden Stimulationsarten (vierfach-A und B) bei entsprechend signifikant negativ regulierender hsa-miR-200a ebenfalls bei beiden Stimulationsarten. Auch die zusätzlich mit CALM4 korrelierende hsa-miR-212 regulierte in beiden Stimulationsarten signifikant negativ. Diese konsistenten Regulationen der mRNAs reziprok mit miRNAs nach Korrelationsanalyse in DIANA-mirPath v3.0 validieren die Möglichkeit, unter Vermeidung des Bias-Konflikts (Godard *et al.*, 2015), selektierte Genregulationen, durch verschiedene Stimulationsmuster hervorgerufen, in ihrer Interaktion zu erfassen. Hieraus können Assoziationen und Funktionen mit weiteren mRNAs oder miRNAs aufgedeckt werden, die das zu untersuchende Spektrum mit experimenteller Unterstützung erweitern und erklären (Vlachos *et al.*, 2015).

6. Schlussfolgerungen

Elektromagnetische Befeldung in Form von repetitiver Magnetstimulation (rMS) beeinflusst das Transkriptom neuronaler muriner Zellen in multiplen Aspekten. Die Forschungsergebnisse validieren bestehende und liefern neue Erkenntnisse sowie Pathologie-assoziierte Schlüsselgene (miRNA-10b, miRNA-200a), die als Basis für weiterführende Untersuchungen dienen können.

Die Methodik der Messung der Signalaktivität auf MEAs als qualitatives Vitalitätskriterium erfüllte vollkommen die geforderten Kriterien. Die Validierung der elektrophysiologischen Signalaktivität neuronaler Zellkulturen vor molekularer Expressionsanalytik stellt ein Novum in der Methodik dar. Es zeigte sich weiterhin die Möglichkeit einer experimentellen Vorselektion bestimmter Feldapplikationen anhand der respondierenden Spontanaktivität mit den entsprechenden Mustern und Amplituden.

Gezielte Gen- und miRNA-Regulationen, hervorgerufen durch unterschiedliche Stimulationsmuster und Intensitäten, sind aufgrund der Ergebnisse realisierbar. Der hochkomplexe Bereich des Gen-Silencing mit Regulation der miRNA und folgender Aktivierung oder Suppression bzw. Degradation selektierter mRNAs kann durch rMS determiniert erreicht und beeinflusst werden. Pathologie-assoziierte definierte Regulationen der mRNA und miRNA, durch rMS induziert, eröffnen neue *non-invasive* therapeutische Forschungsansätze. Weiterführende intensive Untersuchungen, die zu Validierungen und Evaluierungen der Wirkungsweise der rMS an gesunden und neuropathologischen murinen Zellkulturen führen, sind notwendig. Sukzessive können durch Applikation an pathologischen Mausorganismen (transgene Mäusen, AD, PD und HD) oder Zellkulturen, basierend auf patienteneigenen iPSCs (Mertens *et al.*, 2016; Tidball & Parent, 2016), die Stimulationsmuster optimiert werden.

Expressions-Profiling des gesamten Genoms und miRNoms bei Applikation der Stimulation A (70 Hz Stimulation, 2-/4-/6-/8-fach) unterschiedlicher Intensitäten (Feldstärken) und Intervalle sind vielversprechend. Hierbei ist eine Variation des zu untersuchenden Gewebes nicht nur nach Pathologie-bedingter Kausalität sinnvoll, sondern auch kategorisch um komparativ gegenüberstellen zu können und reziproke Regulationen zu erfassen (Lau *et al.*, 2013). Die Variation der Parametrierung wie Substitution des Kulturmediums (Serum-freie Zellkultur) durch Liquor-äquivalentes Medium (Bikbaev *et al.*, 2015) oder temporäre Variation der Kryokonservierung post

Stimulation stellen gravierende zu beachtende Faktoren der Genexpressionsanalyse dar, die validiert werden müssen.

7. Literatur

- Adriaens C, Standaert L, Barra J, Latil M, Verfaillie A, Kalev P, Boeckx B, Wijnhoven PW, Radaelli E, Vermi W, Leucci E, Lapouge G, Beck B, van den Oord J, Nakagawa S, Hirose T, Sablina AA, Lambrechts D, Aerts S, Blanpain C, Marine JC (2016) p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. *Nature Medicine* 22: 861-868.
- Akhtar MW, Sanz-Blasco S, Dolatabadi N, Parker J, Chon K, Lee MS, Soussou W, McKercher SR, Ambasudhan R, Nakamura T, Lipton SA (2016) Elevated glucose and oligomeric β -amyloid disrupt synapses via a common pathway of aberrant protein S-nitrosylation. *Nature Communications* 7: 10242.
- Alberini CM (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews* 89: 121-145.
- Alberini CM, Kandel ER (2014) The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a021741.
- Alvarez-Castelao B, Castaño JG (2011) Synphilin-1 inhibits alpha-synuclein degradation by the proteasome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 2643-2654.
- Amassian VE, Stewart M, Quirk GJ, Rosenthal JL (1987) Physiological basis of motor effects of a transient stimulus to cerebral cortex. *Journal of Neurosurgery* 20: 74-93.
- Andre-Obadia N, Peyron R, Mertens P, Mauguier F, Laurent B, Garcia-Larrea L (2006) Transcranial magnetic stimulation for pain control. Double-blind study of different frequencies against placebo, and correlation with motor cortex stimulation efficacy. *Clinical Neurophysiology* 117: 1536–1544.
- Arancibia-Carcamo IL, Attwell D (2014) The node of Ranvier in CNS pathology. *Acta Neuropathologica* 128: 161-175.
- Attardo A, Fitzgerald JE, Schnitzer MJ (2015) Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus. *Nature* 523: 592-596.
- Bailey CH, Kandel ER, Harris KM (2015) Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a021758.
- Baker MR (2016) On the analytical formulation of classical electromagnetic fields. *[Classical Physics] arXiv preprint arXiv: 1607.00406*.
- Bali KK, Kuner R (2014) Noncoding RNAs: key molecules in understanding and treating pain. *Trends in Molecular Medicine* 20: 437-448.
- Balmori A (2014) Electrosmog and species conservation. *Science of the Total Environment* 496: 314-316.

- Barker AT, Jalinous R, Freeston IL (1985) Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *The Lancet* 1: 1106-1107.
- Basak I, Patil KS, Alves G, Larsen JP, Møller SG (2016) microRNAs as neuroregulators, biomarkers and therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 811-827.
- Beclin C, Follert P, Stappers E, Barral S, Coré N, Chevigny A, Magnone V, Lebrigand K, Bissels U, Huylebroeck D, Bosio A, Barbry P, Seuntjens E, Cremer H (2016) miR-200 family controls late steps of postnatal forebrain neurogenesis via Zeb2 inhibition. *Scientific Report* 6: 39368.
- Bikbaev A, Frischknecht R, Heine M (2015) Brain extracellular matrix retains connectivity in neuronal networks. *Science Reports* 5:14527.
- Bolstad B M, Collin F, Simpson K M, Irizarry R A, Speed TP (2004) Design and low level analysis of microarray experiments. *International Review of Neurobiology* 60, 25-58.
- Borodinsky LN, Root CM, Cronin JA, Sann SB, Gu X, Spitzer NC (2004) Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. *Nature* 429: 523-530.
- Braun RJ, Sommer C, Leibiger C, Gentier RJ, Dumit VI, Paduch K, Eisenberg T, Habernig L, Trausinger G, Magnes C, Pieber T, Sinner F, Dengjel J, van Leeuwen FW, Kroemer G, Madeo F (2015) Accumulation of Basic Amino Acids at Mitochondria Dictates the Cytotoxicity of Aberrant Ubiquitin. *Cell Reports* 10: 1557–1571.
- Breunig JJ, Haydar TF, Rakic P (2011) Neural Stem Cells: Historical Perspective and Future Prospects. *Neuron* 70: 614–625.
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal™, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research* 35: 567–576.
- Burt T, Lisanby SH, Sackeim HA (2002) Neuropsychiatric applications of transcranial magnetic stimulation: a Meta analysis. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 5: 73–103.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55: 611-622.
- Bustin SA, Nolan T. (2016) Improving the reliability of peer-reviewed publications: We are all in it together. *Biomolecular Detection and Quantification* 7: 1-5.
- Cao L, Cui X, Hu J, Li Z, Choi JR, Yang Q, Lin M, Ying Hui L, Xu F (2016) Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics* 5663: 30972-30981.

- Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S (2009) AmiGO Hub.; WebPresence Working Group.. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* 25: 288-289.
- Carpenter LL, Janicak PG, Aaronson ST, Boyadjis T, Brock DG, Cook IA, Dunner DL, Lanocha K, Solvason HB, Demitrack MA (2012) Transcranial magnetic stimulation (TMS) for major depression: a multisite, naturalistic, observational study of acute treatment outcomes in clinical practice. *Depression and Anxiety* 29: 587-596.
- Chan AW, Kocerha J (2012) The Path to microRNA Therapeutics in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Genetics* 13: 82.
- Cheeran B, Talelli P, Mori F, Koch G, Suppa A, Edwards M, Houlden H, Bhatia K, Greenwood R, Rothwell JC (2008) A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. *The Journal of Physiology* 586: 5717-5725.
- Chen R, Cros D, Curra A, Di Lazzaro V, Lefaucheur JP, Magistris MR, Mills K, Rösler KM, Triggs WJ, Ugawa Y, Ziemann U (2008) The clinical diagnostic utility of transcranial magnetic stimulation: report of an IFCN committee. *Clinical Neurophysiology* 119: 504-532.
- Chen JL, Margolis DJ, Stankov A, Sumanovski LT, Schneider BL, Helmchen F (2015) Pathway-specific reorganization of projection neurons in somatosensory cortex during learning. *Nature Neuroscience* 18:1101-1108.
- Chouchane M, Costa MR (2012) Cell therapy for stroke: use of local astrocytes. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 6: 49.
- Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, Waters M, Shi Y, Cannon B, Kelnar K, Kempainen J, Brown D, Chen C, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders AM, Roses AD, Richards CA (2008) Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *Journal of Alzheimer's Disease* 14: 27-41.
- Cohen LG, Roth BJ, Nilsson J, Dang N, Panizza M, Bandinelli S, Friauf W, Hallett M (1990) Effects of coil design on delivery of focal magnetic stimulation. Technical considerations. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 75: 350-357.
- Collins, Francis S (1999) Medical and societal consequences of the Human Genome Project. *New England Journal of Medicine* 341: 28-37.
- Connolly KR, Helmer A, Cristancho MA, Cristancho P, O'Reardon JP (2012) Effectiveness of transcranial magnetic stimulation in clinical practice post-FDA approval in the United States: results observed with the first 100 consecutive cases of depression at an academic medical center. *The Journal of Clinical Psychiatry* 73: 567-573.

- Cooper-Knock J, Kirby J, Ferraiuolo L, Heath PR, Rattray M, Shaw PJ (2012) Gene expression profiling in human neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology* 8: 518-530.
- Courtney E, Kornfeld S, Janitz K, Janitz M (2010) Transcriptome profiling in neurodegenerative disease. *Journal of Neuroscience Methods* 193: 189-202.
- Couturier JL (2005) Efficacy of rapid-rate repetitive transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 30: 83-90.
- Cullen CL, Young KM (2016) How Does Transcranial Magnetic Stimulation Influence Glial Cells in the Central Nervous System? *Frontiers in Neural Circuits* 10: 26.
- Dayan E, Censor N, Buch ER, Sandrini M, Cohen LG (2013) Noninvasive brain stimulation: from physiology to network dynamics and back. *Nature Neuroscience* 16: 838-844.
- De Arruda HF, Comin CH, Miazaki M, Viana MP, Costa Lda F (2015) A framework for analyzing the relationship between gene expression and morphological, topological, and dynamical patterns in neuronal networks. *Journal of Neuroscience Methods* 245: 1-14.
- Debanne D, Campanac E, Bialowas A, Carlier E, Alcaraz G (2011) Axon physiology. *Physiological reviews* 91: 555-602.
- DeBry RW, Seldin MF (1996) Human/mouse homology relationships. *Genomics* 33: 337-351.
- Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology* 4: 3.
- Di Lazzaro V, Oliviero A, Pilato F, Saturno E, Dileone M, Mazzone P, Insola A, Tonali PA, Rothwell JC (2004) The physiological basis of transcranial motor cortex stimulation in conscious humans. *Clinical Neurophysiology* 115: 255-266.
- Dong X, You Y, Wu JQ (2016) Building an RNA Sequencing Transcriptome of the Central Nervous System. *The Neuroscientist* 22: 579-592.
- Dryia C, Schmid T, Stock M, Schopka S, Schmid C, Lehle K (2008) Cell-Type Specific Evaluation of the Biocompatibility of Polyurethanes used as a Base Material for Ventricular Assist Devices. *The International Journal of Artificial Organs* 31: 625.
- Dulcis D, Spitzer NC (2008) Illumination controls differentiation of dopamine neurons regulating behavior. *Nature* 456:195-201.
- Dulcis D, Jamshidi P, Leutgeb S, Spitzer NC (2013) Neurotransmitter switching in the adult brain regulates behavior. *Science* 340:449-453.
- Dvinge H, Bertone P (2009) HTqPCR: high-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R. *Bioinformatics* 25: 3325-3326.

- Dvigne H (2015) HTqPCR-high-throughput qPCR analysis in R and Bioconductor. <http://bioconductor.jp/packages/3.2/bioc/vignettes/HTqPCR/inst/doc/HTqPCR.pdf>
- Dweep H, Gretz N (2015) miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nature Methods* 12: 697.
- Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z (2009) GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BioMed Central Bioinformatics* 10: 48.
- Elsayed M, Magistretti PJ (2015) A New Outlook on Mental Illnesses: Glial Involvement Beyond the Glue. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9:468.
- Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, Keren-Shaul H, Mhlahoi T, Jakobshagen K, Buch T, Schwierzeck V, Utermöhlen O, Chun E, Garrett WS, McCoy KD, Diefenbach A, Staeheli P, Stecher B, Amit I, Prinz M (2015) Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience* 18: 965-977.
- Falkner S, Grade S, Dimou L, Conzelmann KK, Bonhoeffer T, Götz M, Hübener M (2016) Transplanted embryonic neurons integrate into adult neocortical circuits. *Nature* 10: 1038.
- Faubel R, Westendorf C, Bodenschatz E, Eichele G (2016) Cilia-based flow network in the brain ventricles. *Science* 353: 176-178.
- Fekete Z, Pongrácz A (2017) Multifunctional soft implants to monitor and control neural activity in the central and peripheral nervous system: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical* 243: 1214-1223.
- Feng HL, Yan L, Cui LY (2008) Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on adenosine triphosphate content and microtubule associated protein-2 expression after cerebral ischemia-reperfusion injury in rat brain. *Chinese Medical Journal* 121: 1307-1312.
- Feng X, Wang Z, Fillmore R, Xi Y (2014) MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Letters* 344: 166-173.
- Ferrea E, Maccione A, Medrihan L, Nieuws T, Ghezzi D, Baldelli P, Benfenati F, Berdondini L (2012) Large-scale, high-resolution electrophysiological imaging of field potentials in brain slices with microelectronic multielectrode arrays. *Frontiers in Neural Circuits* 6: 80.
- Ferster D, Jagadeesh B (1992) EPSP-IPSP interactions in cat visual cortex studied with *in vivo* whole-cell patch recording. *The Journal of Neuroscience* 12: 1262-1274.
- Fierro B, Giglia G, Palermo A, Pecoraro C, Scalia S, Brighina F (2007) Modulatory effects of 1 Hz rTMS over the cerebellum on motor cortex excitability. *Experimental Brain Research* 176: 440-447.

- Fitzgerald PB, Fountain S, Daskalakis ZJ (2006) A comprehensive review of the effects of rTMS on motor cortical excitability and inhibition. *Clinical Neurophysiology* 117: 2584-2596.
- Fitzgerald PB, Grace N, Hoy KE, Bailey M, Daskalakis ZJ (2013) An open label trial of clustered maintenance rTMS for patients with refractory depression. *Brain Stimulation* 6: 292-297.
- Ford MC, Alexandrova O, Cossell L, Stange-Marten A, Sinclair J, Kopp-Scheinpflug C, Pecka M, Attwell D, Grothe B (2015) Tuning of Ranvier node and internode properties in myelinated axons to adjust action potential timing. *Nature Communications* 6: 8073.
- Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 126-139.
- Fregni F, Boggio PS, Valle AC, Otachi P, Thut G, Rigonatti SP, Marcolin MA, Fecteau S, Pascual-Leone A, Fiore L, Valente K (2006) Homeostatic effects of plasma valproate levels on corticospinal excitability changes induced by 1 Hz rTMS in patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Clinical Neurophysiology* 117: 1217-1227.
- Friese MA, Schattling B, Fugger L (2014) Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology* 10: 225-238.
- Frühbeis C, Fröhlich D, Krämer-Albers EM (2012) Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Frontiers in Physiology* 3: 119.
- Fujiki M, Steward O (1997) High frequency transcranial magnetic stimulation mimics the effects of ECS in upregulating astroglial gene expression in the murine CNS. *Molecular Brain Research* 44: 301-308.
- Gao FB (2010) Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development. *Neural Development* 5: 25.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 5: 1.
- Genuis, Stephen SJ (2008) Fielding a current idea: exploring the public health impact of electromagnetic radiation. *Public Health* 122: 113-124.
- George MS, Lisanby SH, Avery D, McDonald WM, Durkalski V, Pavlicova M, Anderson B, Nahas Z, Bulow P, Zarkowski P, Holtzheimer PE 3rd, Schwartz T, Sackeim HA (2010) Daily left prefrontal transcranial magnetic stimulation therapy for major depressive disorder: a sham-controlled randomized trial. *Archives of General Psychiatry* 67:507-516.
- Gershon AA, Dannon PN, Grunhaus L (2003) Transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression. *The American Journal of Psychiatry* 160: 835-845.

- Gertz SD (2003) Basiswissen Neuroanatomie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart und New York* ISBN-13: 978-3131144041.
- Godard P, van Eyll J (2015) Pathway analysis from lists of microRNAs: common pitfalls and alternative strategy. *Nucleic Acids Research* 43: 3490-3497.
- Gopal KV, Gross GW (1996) Auditory cortical neurons *in vitro*: cell culture and multi-channel extracellular recording. *Acta Oto-Laryngologica* 116: 690-696.
- Gramowski A, Jugelt K, Weiss DG, Gross GW (2004) Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. *European Journal of Neuroscience* 19: 2815-2825.
- Gramowski A, Jügelt K, Stüwe S, Schulze R, McGregor GP, Wartenberg-Demand A, Loock J, Schröder O, Weiss DG. (2006) Functional screening of traditional antidepressants with primary cortical neuronal networks grown on multielectrode neurochips. *European Journal of Neuroscience* 24: 455-465.
- Grehl S, Martina D, Goyenvalle C, Deng ZD, Rodger J, Sherrard RM (2016) *In vitro* Magnetic Stimulation: A Simple Stimulation Device to Deliver Defined Low Intensity Electromagnetic Fields. *Frontiers in Neural Circuits* 10: 85.
- Gross GW, Rieske E, Kreutzberg GW, Meyer A (1977) A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity *in vitro*. *Neuroscience Letters* 6: 101-105.
- Gross GW, Williams AN, Lucas JH (1982) Recording of spontaneous activity with photoetched microelectrode surfaces from mouse spinal neurons in culture. *Journal of Neuroscience Methods* 5: 13-22.
- Gross GW, Wen WY, Lin JW (1985). Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures. *Journal of Neuroscience Methods* 15: 243-252.
- Gross GW, Rhoades BK, Reust DL, Schwalm FU (1993). Stimulation of monolayer networks in culture through thin-film indium-tin oxide recording electrodes. *Journal of Neuroscience Methods* 50: 131-143.
- Gross GW (1994) Internal dynamics of randomized mammalian neuronal networks in culture. In: Stenger, D.A. & McKenna, T.M., Eds. *Enabling Technologies for Cultured Neural Networks*. *Academic Press San Diego CA*: 277-317
- Gross GW, Schwalm FU (1994) A closed flow chamber for long-term multichannel recording and optical monitoring. *Journal of Neuroscience Methods* 52: 73-85.
- Gross GW, Rhoades BK, Azzazy HM, Wu MC (1995) The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 10: 553-567.
- Gross GW, Harsch A, Rhoades BK, Göpel W. (1997) Odor, drug and toxin analysis with neuronal networks *in vitro*: extracellular array recording of network responses. *Biosensors & Bioelectronics* 12: 373-393.

- Gross M, Nakamura L, Pascual-Leone A, Fregni F (2007) Has repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) treatment for depression improved? A systematic review and meta-analysis comparing the recent vs. the earlier rTMS studies. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 116: 165-173.
- Gstir R, Schaffner S, Scheideler M, Misslinger M, Griehl M, Daschil N, Humpel C, Obermair GJ, Schmuckermair C, Striessnig J, Flucher BE, Hüttenhofer A (2014) Generation of a neuro-specific microarray reveals novel differentially expressed noncoding RNAs in mouse models for neurodegenerative diseases. *RNA* 20: 1929-1943.
- Guo L, Sun B, Sang F, Wang W, Lu Z (2009) Haplotype distribution and evolutionary pattern of miR-17 and miR-124 families based on population analysis. *Public Library of Science One* 4: e7944.
- Haim LB, Rowitch DH (2017) Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature Reviews Neuroscience* 18: 31-41.
- Hamilton KS, Gopal KV, Moore EJ, Gross GW (2017) Pharmacological response sensitization in nerve cell networks exposed to the antibiotic gentamicin. *European Journal of Pharmacology* 794: 92-99.
- Hausmann A, Weis C, Marksteiner J, Hinterhuber H, Humpel C (2000) Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) enhances c-fos in a definite pattern in the parietal cortex. *Molecular Brain Research* 76: 355-362.
- Havas M (2017) When theory and observation collide: Can non-ionizing radiation cause cancer?. *Environmental Pollution* 221: 501-505.
- Heinrich C, Bergami M, Gasco S, Lepier A, Vigano F, Dimou L, Sutor B, Berninger B, Götz M (2014) Sox2-mediated conversion of NG2 glia into induced neurons in the injured adult cerebral cortex. *Stem Cell Reports* 3: 1000-1014.
- Hellmann J, Jüttner R, Roth C, Bajbouj M, Kirste I, Heuser I, Gertz K, Endres M, Kronenberg G (2012) Repetitive magnetic stimulation of human-derived neuron-like cells activates cAMP-CREB pathway. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 262: 87-91.
- Henkin RI, Potolicchio SJ Jr, Levy LM (2011) Improvement in smell and taste dysfunction after repetitive transcranial magnetic stimulation. *American Journal of Otolaryngology* 32: 38-46.
- Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research Reviews* 28: 370-490.
- Hernández D, Millard R, Sivakumaran P, Wong RC, Crombie DE, Hewitt AW, Liang H, Hung SS, Pébay A, Shepherd RK, Dusting GJ, Lim SY (2016) Electrical Stimulation Promotes Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International* 2016: 1718041.

- Hirayama A, Saitoh Y, Kishima H, Shimokawa T, Oshino S, Hirata M, Kato A, Yoshimine T (2006) Reduction of intractable deafferentation pain by navigation-guided repetitive transcranial magnetic stimulation of the primary motor cortex. *Pain* 122: 22-27.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952a) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology* 116: 449-472.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952b) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* 117: 500-544.
- Holtzheimer PE, Russo J, Avery DH (2001) A meta-analysis of repetitive transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression. *Psychopharmacology Bulletin* 35: 149-169.
- Hoogendam JM, Ramakers GM, Di Lazzaro V (2010) Physiology of repetitive transcranial magnetic stimulation of the human brain. *Brain Stimulation* 3: 95-118.
- Hoss AG, Labadorf A, Beach TG, Latourelle JC, Myers RH (2016) microRNA Profiles in Parkinson's Disease Prefrontal Cortex. *Frontiers in Aging Neuroscience* 8: 36.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4: 44-57.
- Huang XJ, O'Mahony AM, Compton RG (2009) Microelectrode arrays for electrochemistry: approaches to fabrication. *Small* 5: 776-788.
- Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, Bravo HC, Davis S, Gatto L, Girke T, Gottardo R, Hahne F, Hansen KD, Irizarry RA, Lawrence M, Love MI, MacDonald J, Obenchain V, Oleś AK, Paik H, Reyes A, Shannon P, Smyth GK, Tenenbaum D, Waldron L, Morgan M (2015) Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods* 12: 115-21.
- Huys R, Braeken D, Jans D, Stassen A, Collaert N, Wouters J, Loo J, Severi S, Vleugels F, Callewaert G, Verstreken K, Bartic C, Eberle W (2012) Single-cell recording and stimulation with a 16k micro-nail electrode array integrated on a 0.18 μm CMOS chip. *Lab on a Chip* 12: 1274-1280.
- Ihaka R, Gentleman R (1996) R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5: 299-314.
- Ito S, Yeh FC, Hiolski E, Rydygier P, Gunning DE, Hottowy P, Timme N, Litke AM, Beggs JM (2014) Large-scale, high-resolution multielectrode-array recording depicts functional network differences of cortical and hippocampal cultures. *Public Library of Science One* 9: e105324.

- Jalinous R (1991) Technical and practical aspects of magnetic nerve stimulation. *Journal of Clinical Neurophysiology* 8: 10-25.
- Jönsson ME, Nelander Wahlestedt J, Åkerblom M, Kirkeby A, Malmevik J, Brattaas PL, Jakobsson J, Parmar M (2015) Comprehensive analysis of microRNA expression in regionalized human neural progenitor cells reveals microRNA-10 as a caudalizing factor. *Development* 142: 3166-3177.
- Johnstone AF, Gross GW, Weiss DG, Schroeder OH, Gramowski A, Shafer TJ (2010) Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century. *Neurotoxicology* 31: 331-350.
- Junn E, Mouradian MM (2012) MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics* 133: 142-150.
- Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR (2014) The molecular and systems biology of memory. *Cell* 157: 163-186.
- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research* 28: 27-30.
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K (2017) KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research* 45: 353-361.
- Kavanagh T, Mills JD, Kim WS, Halliday GM, Janitz M (2013) Pathway analysis of the human brain transcriptome in disease. *Journal of Molecular Neuroscience* 51: 28-36.
- Keck ME, Welt T, Müller MB, Erhardt A, Ohl F, Toschi N, Holsboer F, Sillaber I (2002) Repetitive transcranial magnetic stimulation increases the release of dopamine in the mesolimbic and mesostriatal system. *Neuropharmacology* 43: 101-109.
- Kettenmann H, Verkhratsky A. (2011) Neuroglia living nerve glue. *Fortschritte der Neurologie - Psychiatrie* 79: 588-597.
- Kettenmann H, Verkhratsky A. (2016). Glial Cells: Neuroglia. Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical. *Springer New York* ISBN 978-1-4939-3473-7: 547-578.
- Khedr EM, Kotb H, Kamel NF, Ahmed MA, Sadek R, Rothwell JC (2005) Longlasting antalgic effects of daily sessions of repetitive transcranial magnetic stimulation in central and peripheral neuropathic pain. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 76: 833-838.
- Khedr EM, Farweez HM, Islam H (2003) Therapeutic effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor function in Parkinson's disease patients. *European Journal of Neurology* 10: 567-572.
- Khedr EM, Etraby AE, Hemeda M, Nasef AM, Razek AA (2010) Long-term effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor function recovery after acute ischemic stroke. *Acta Neurologica Scandinavica* 121: 30-37.

- Kim YH, You SH, Ko MH, Park JW, Lee KH, Jang SH, Yoo WK, Hallett M (2006) Repetitive transcranial magnetic stimulation-induced corticomotor excitability and associated motor skill acquisition in chronic stroke. *Stroke* 37: 1471-1476.
- Kleinjung T, Eichhammer P, Langguth B, Jacob P, Marienhagen J, Hajak G, Wolf SR, Strutz J (2005) Long-term effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in patients with chronic tinnitus. *American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 132: 566-569.
- Kozel FA, George MS (2002) Meta-analysis of left prefrontal repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) to treat depression. *Journal of Psychiatric Practice* 8: 270-275.
- Kraushaar U, Guenther E, Hess D (2017) Addressing Functional Neurotoxicity Using the Microelectrode Array (MEA). *Stem Cell-Derived Models in Toxicology* 293-309.
- Kubota Y, Karube F, Nomura M, Kawaguchi Y (2016) The Diversity of Cortical Inhibitory Synapses. *Frontiers in Neural Circuits* 10: 27.
- Kudo K, Yamada M, Takahashi K, Nishioka G, Tanaka S, Hashiguchi T, Fukuzako H, Takigawa M, Higuchi T, Momose K, Kamijima K, Yamada M (2005) Repetitive transcranial magnetic stimulation induces kf-1 expression in the rat brain. *Life Sciences* 76: 2421-2429.
- Kuhn M, Wolf E, Maier JG, Mainberger F, Feige B, Schmid H, Bürklin J, Maywald S, Mall V, Jung NH, Reis J, Spiegelhalder K, Klöppel S, Sterr A, Eckert A, Riemann D, Normann C, Nissen C (2016) Sleep recalibrates homeostatic and associative synaptic plasticity in the human cortex. *Nature Communications* 7:12455.
- Kumar D, Bansal G, Narang A, Basak T, Abbas T, Dash D (2016) Integrating transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications. *Proteomics* 16: 2533-2544.
- Lau P, Bossers K, Janky R, Salta E, Frigerio CS, Barbash S, Rothman R, Sierksma AS, Thathiah A, Greenberg D, Papadopoulou AS, Achsel T, Ayoubi T, Soreq H, Verhaagen J, Swaab DF, Aerts S, De Strooper B (2013) Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine* 5: 1613-1634.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
- Lee JM, Wheeler VC, Chao MJ, Vonsattel JP, Pinto RM, Lucente D, Abu-Elneel K, Ramos EM, Mysore JS, Gillis T, MacDonald ME, Gusella JF, Harold D, Stone TC, Escott-Price V, Han J, Vedernikov A, Holmans P, Jones L, Kwak S, Mahmoudi M, Orth M, Landwehrmeyer GB, Paulsen JS, Dorsey ER, Shoulson I, Myers RH (2015) Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington's Disease. *Cell* 162: 516-526.

- Lefaucheur JP, André-Obadia N, Antal A, Ayache SS, Baeken C, Benninger DH, Cantello RM, Cincotta M, de Carvalho M, De Ridder D, Devanne H, Di Lazzaro V, Filipović SR, Hummel FC, Jääskeläinen SK, Kimiskidis VK, Koch G, Langguth B, Nyffeler T, Oliviero A, Padberg F, Poulet E, Rossi S, Rossini PM, Rothwell JC, Schönfeldt-Lecuona C, Siebner HR, Slotema CW, Stagg CJ, Valls-Sole J, Ziemann U, Paulus W, Garcia-Larrea L. (2014) Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). *Clinical Neurophysiology* 125: 2150-2206.
- Lehle K, Stock M, Schmid T, Schopka S, Straub RH, Schmid C (2009) Cell-type specific evaluation of biocompatibility of commercially available polyurethanes. *Journal of Biomedical Materials Research* 90: 312-318.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445: 168–176.
- Lenz M, Galanis C, Müller-Dahlhaus F, Opitz A, Wierenga CJ, Szabó G, Ziemann U, Deller T, Funke K, Vlachos A (2016) Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of inhibitory synapses. *Nature Communications* 7:10020.
- Lenz M, Platschek S, Priesemann V, Becker D, Willems LM, Ziemann U, Deller T, Müller-Dahlhaus F, Jedlicka P, Vlachos A (2015) Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of excitatory postsynapses on proximal dendrites of cultured mouse CA1 pyramidal neurons. *Brain Structure & Function* 220: 3323-3337.
- Leuchter AF, Cook IA, Feifel D, Goethe JW, Husain M, Carpenter LL, Thase ME, Krystal AD, Philip NS, Bhati MT, Burke WJ, Howland RH, Sheline YI, Aaronson ST, Iosifescu DV, O'Reardon JP, Gilmer WS, Jain R, Burgoyne KS, Phillips B, Manberg PJ, Massaro J, Hunter AM, Lisanby SH, George MS (2015) Efficacy and Safety of Low-field Synchronized Transcranial Magnetic Stimulation (sTMS) for Treatment of Major Depression. *Brain Stimulation* 8:787-794.
- Levy LM, Henkin RI (2004) Brain gamma-aminobutyric acid levels are decreased in patients with phantageusia and phantasmia demonstrated by magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Computer Assisted Tomography* 28: 721-727
- Litke AM, Bezayiff N, Chichilnisky EJ, Cunningham W, Dabrowski W, Grillo AA, Kalmar RS (2004) What does the eye tell the brain?: Development of a system for the large-scale recording of retinal output activity. *IEEE Transactions on Nuclear Science* 51: 1434-1440.
- Lin A, Li C, Xing Z, Hu Q, Liang K, Han L, Wang C, Hawke DH, Wang S, Zhang Y, Wei Y, Ma G, Park PK, Zhou J, Zhou Y, Hu Z, Zhou Y, Marks JR, Liang H, Hung MC, Lin C, Yang L (2016) The LINK-A lncRNA activates normoxic HIF1 α signalling in triple-negative breast cancer. *Nature Cell Biology* 18: 213-224.
- Lipton RB, Dodick DW, Silberstein SD, Saper JR, Aurora SK, Pearlman SH, Fischell RE, Ruppel PL, Goadsby PJ (2010) Single-pulse transcranial magnetic stimulation for acute treatment of migraine with aura: a randomised, double-blind, parallel-group, sham-controlled trial. *The Lancet. Neurology* 9: 373-380.

- Lisanby SH, Belmaker RH (2000) Animal models of the mechanisms of action of repetitive transcranial magnetic stimulation (RTMS): comparisons with electroconvulsive shock (ECS). *Depression and Anxiety* 12: 178-187.
- Liu MG, Chen XF, He T, Li Z, Chen J (2012) Use of multi-electrode array recordings in studies of network synaptic plasticity in both time and space. *Neuroscience Bulletin* 28: 409-422.
- Liu L, Liu Z, Huang L, Sun Z, Ma T, Zhu S, Quan X, Yang Y, Huang J, Luo Z (2015) Pulsed magnetic field promotes proliferation and neurotrophic genes expression in Schwann cells *in vitro*. *International journal of clinical and experimental pathology* 8: 2343-2353.
- Lobo MK, Karsten SL, Gray M, Geschwind DH, Yang XW (2006) FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains. *Nature Neuroscience* 9: 443-452.
- Lomarev MP, Kanchana S, Bara-Jimenez W, Iyer M, Wassermann EM, Hallett M (2006) Placebo-controlled study of rTMS for the treatment of Parkinson's disease. *Movement Disorder* 2: 325-331.
- Luborzewski A, Schubert F, Seifert F, Danker-Hopfe H, Brakemeier EL, Schlattmann P, Anghelescu I, Colla M, Bajbouj M (2007) Metabolic alterations in the dorso-lateral prefrontal cortex after treatment with high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in patients with unipolar major depression. *Journal of Psychiatric Research*, 41: 606-615.
- Lucas J, Czisny L, Gross G (1986) Adhesion of cultured mammalian central nervous system neurons to flame-modified hydrophobic surfaces. *In vitro Cellular & Developmental Biology* 22: 37-43.
- Maccione A, Gandolfo M, Zordan S, Amin H, Di Marco S, Nieuws T, Angotzi GN, Berdondini L (2015) Microelectronics, bioinformatics and neurocomputation for massive neuronal recordings in brain circuits with large scale multielectrode array probes. *Brain Research Bulletin* 119: 118-126.
- Maes OC, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM (2009) MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Current Genomics* 10:154-168.
- Mahmud M, Vassanelli S (2016) Processing and Analysis of Multichannel Extracellular Neuronal Signals: State-of-the-Art and Challenges. *Frontiers in Neuroscience* 10:248.
- Malito E, Hulse RE, Tang WJ (2008) Amyloid beta-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 2574-2585.
- Mansur CG, Fregni F, Boggio PS, Riberto M, Gallucci-Neto J, Santos CM, Wagner T, Rigonatti SP, Marcolin MA, Pascual-Leone A (2005) A sham stimulation-controlled trial of rTMS of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Neurology* 64:1802-1804.

- Mantovani A, Simpson HB, Fallon BA, Rossi S, Lisanby SH (2010) Randomized sham-controlled trial of repetitive transcranial magnetic stimulation in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 13: 217-227.
- Martin JL, Barbanoj MJ, Schlaepfer TE, Thompson E, Pérez V, Kulisevsky J (2003) Repetitive transcranial magnetic stimulation for the treatment of depression. Systematic review and meta-analysis. *British Journal of Psychiatry* 182: 480–491.
- Massobrio P, Tessadori J, Chiappalone M, Ghirardi M (2015) In vitro studies of neuronal networks and synaptic plasticity in invertebrates and in mammals using multielectrode arrays. *Neural Plasticity* 2015: 196195.
- Mathur A, Loskill P, Shao K, Huebsch N, Hong S, Marcus SG, Marks N, Mandegar M, Conklin BR, Lee LP, Healy KE (2015) Human iPSC-based cardiac microphysiological system for drug screening applications. *Scientific Report* 5:8883.
- Matsumura R, Yamamoto H, Niwano M, Hirano-Iwata A (2016) An electrically resistive sheet of glial cells for amplifying signals of neuronal extracellular recordings. *Applied Physics Letters* 108: 023701.
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *Journal of Neurophysiology* 54: 782-806.
- Medina FJ, Túnez I (2013) Mechanisms and pathways underlying the therapeutic effect of transcranial magnetic stimulation. *Reviews in the Neurosciences* 24: 507-525.
- Medina-Fernández FJ, Luque E, Aguilar-Luque M, Agüera E, Feijóo M, García-Maceira FI, Escribano BM, Pascual-Leone Á, Drucker-Colín R, Túnez I (2017) Transcranial magnetic stimulation modifies astrocytosis, cell density and lipopolysaccharide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Life Sciences* 169: 20-26.
- Mertens J, Marchetto MC, Bardy C, Gage FH (2016) Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience* 17: 424-437.
- Meyer JF (2008a) MEA supported cortical cultures as a novel tool in Alzheimer's research. *MEA Meeting 2008*, Reutlingen, 222-225.
- Meyer JF (2008b). Tissue-specific neurotoxicity of cytostatic and aesthetic drugs. *MEA-Meeting 2008* Reutlingen, 211-214.
- Meyer JF, Wolf B, Gross GW (2009) Magnetic stimulation and depression of mammalian networks in primary neuronal cell cultures. *IEEE Transactions in Biomedical Engineering* 56: 1512-1523.
- Miñones-Moyano E, Porta S, Escaramís G, Rabionet R, Iraola S, Kagerbauer B, Espinosa-Parrilla Y, Ferrer I, Estivill X, Martí E (2011) MicroRNA profiling of Par-

- kinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Human Molecular Genetics* 20: 3067-3078.
- Molofsky AV, Krencik R, Ullian EM, Tsai HH, Deneen B, Richardson WD, Barres BA, Rowitch DH (2012) Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & Development* 26: 891-907.
- Moorefield B (2015) Lnc-ing BCAR4 to metastasis. *Nature Structural & Molecular Biology* 22: 36.
- Morris KV, Mattick JS (2014) The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews. Genetics* 15: 423-437.
- Moumni L, Betuing S, Caboche J (2013) Multiple Aspects of Gene Dysregulation in Huntington's Disease. *Frontiers in Neurology* 4:127.
- Mouse Genome Sequencing Consortium (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-562.
- Müller HW (2008) Neural Degeneration and Repair: Gene Expression Profiling, Proteomics and Systems Biology. *Wiley-Blackwell* Weinheim, ISBN: 978-3-527-31707-3.
- Müller MB, Toschi N, Kresse AE, Post A, Keck ME (2000) Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology* 23: 205-215.
- Müller J, Ballini M, Livi P, Chen Y, Radivojevic M, Shadmani A, Viswam V, Jones IL, Fiscella M, Diggelmann R, Stettler A, Frey U, Bakkum DJ, Hierlemann A (2015) High-resolution CMOS MEA platform to study neurons at subcellular, cellular, and network levels. *Lab on a Chip* 15: 2767-2780.
- Nardone R, Höller Y, Tezzon F, Christova M, Schwenker K, Golaszewski S, Trinkä E, Brigo F (2015) Neurostimulation in Alzheimer's disease: from basic research to clinical applications. *Neurological Sciences* 36: 689-700.
- Nagarah JM, Stowasser A, Parker RL, Asari H, Wagenaar DA (2015). Optically transparent multi-suction electrode arrays. *Frontiers in Neuroscience* 9: 384.
- Obien ME, Deligkaris K, Bullmann T, Bakkum DJ, Frey U (2015) Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Frontiers in Neuroscience* 8: 423.
- Odawara A, Saitoh Y, Alhebshi AH, Gotoh M, Suzuki I (2014) Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443: 1176-1181.
- Odawara A, Katoh H, Matsuda N, Suzuki I (2016) Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture. *Scientific Reports* 6: 26181.

- Ohata S, Alvarez-Buylla A (2016) Planar Organization of Multiciliated Ependymal (E1) Cells in the Brain Ventricular Epithelium. *Trends in Neurosciences* 39: 543-551.
- Oliveri M, Koch G, Torriero S, Caltagirone C (2005) Increased facilitation of the primary motor cortex following 1 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation of the contralateral cerebellum in normal humans. *Neuroscience Letters* 376: 188-193.
- Pacheco-Quinto J, Herdt A, Eckman CB, Eckman EA (2013) Endothelin-converting enzymes and related metalloproteases in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 33: 101-110.
- Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL (2008) The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience* 28: 14341-14346.
- Papageorgiou IE, Lewen A, Galow LV, Cesetti T, Scheffel J, Regen T, Hanisch UK, Kann O (2016) TLR4-activated microglia require IFN- γ to induce severe neuronal dysfunction and death in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 212-217.
- Park ST, Kim J (2016) Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *International Neuropsychology Journal* 20: 76-83.
- Pasquinelli AE (2012) MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews. Genetics* 13: 271-282.
- Pendry JB, Schurig D, Smith DR (2006) Controlling electromagnetic fields. *Science* 312: 1780-1782.
- Peng H, Zheng H, Li L, Liu J, Zhang Y, Shan B, Zhang L, Yin Y, Liu J, Li W, Zhou J, Li Z, Yang H, Zhang Z. (2012). High-frequency rTMS treatment increases white matter FA in the left middle frontal gyrus in young patients with treatment-resistant depression. *Journal of Affective Disorders* 136: 249-257.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: e36.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26: 509-515.
- Pfaffl MW (2010) The ongoing evolution of qPCR. *Methods* 50: 215-216.
- Ponomarev ED, Veremeyko T, Weiner HL (2013) MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia* 61: 91-103.
- Potter SM, DeMarse TB (2001) A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of Neuroscience Methods* 110: 17-24.

- Poulin JF, Tasic B, Hjerling-Leffler J, Trimarchi JM, Awatramani R (2016) Disentangling neural cell diversity using single-cell transcriptomics. *Nature Neuroscience* 19: 1131-1141.
- Price L, Wilson C, Grant G (2016) Blood–Brain Barrier Pathophysiology following Traumatic Brain Injury. In: Laskowitz D, Grant G (2016) *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. Boca Raton (FL): *CRC Press/Taylor and Francis Group* Chapter 4.
- Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M (2012) MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews. Genetics* 13: 358-369.
- Prokop S, Miller KR, Drost N, Handrick S, Mathur V, Luo J, Wegner A, Wyss-Coray T, Heppner FL (2015) Impact of peripheral myeloid cells on amyloid- β pathology in Alzheimer's disease-like mice. *The Journal of Experimental Medicine* 212: 1811-1818.
- Puthanveetil SV, Monje FJ, Miniaci MC, Choi YB, Karl KA, Khandros E, Gawinowicz MA, Sheetz MP, Kandel ER (2008) A new component in synaptic plasticity: upregulation of kinesin in the neurons of the gill-withdrawal reflex. *Cell* 135: 960-973.
- Quinn EM, McManus R. Quality Control and Analysis of NGS RNA Sequencing Data (2015) *Methods in Molecular Biology* 1326: 217-232.
- Qureshi IA, Mehler MF (2012) Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 13: 528-541.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.
- Rabey JM, Dobronevsky E, Aichenbaum S, Gonen O, Marton RG, Khaigrekht M (2013) Repetitive transcranial magnetic stimulation combined with cognitive training is a safe and effective modality for the treatment of Alzheimer's disease: a randomized, double-blind study. *Journal of neural transmission* 120: 813-819.
- Ranck JB (1975) Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain research* 98: 417-440.
- Ridding MC, Rothwell JC (2007) Is there a future for therapeutic use of transcranial magnetic stimulation? *Nature Reviews Neuroscience* 8: 559-567.
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research* 43: e47.
- Rossini PM, Burke D, Chen R, Cohen LG, Daskalakis Z, Di Iorio R, Di Lazzaro V, Ferreri F, Fitzgerald PB, George MS, Hallett M, Lefaucheur JP, Langguth B, Matsumoto H, Miniussi C, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Paulus W, Rossi S,

- Rothwell JC, Siebner HR, Ugawa Y, Walsh V, Ziemann U (2015) Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord, roots and peripheral nerves: Basic principles and procedures for routine clinical and research application. An updated report from an I.F.C.N. Committee. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 126: 1071-1107.
- Rotem A, Moses E (2008) Magnetic Stimulation of One-Dimensional Neuronal Cultures. *Biophysical Journal* 94: 5065–5078.
- Roth BJ, Basser PJ (1990) A model of the stimulation of a nerve fiber by electromagnetic induction. *IEEE Transactions on Bio-medical Engineering* 37: 588-597.
- Rothwell JC (2012) Clinical applications of noninvasive electrical stimulation: problems and potential. *Clinical EEG and Neuroscience* 43: 209-214.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sampson SM, Rome JD, Rummans TA (2006) Slow-frequency rTMS reduces fibromyalgia pain. *Pain Medicine* 7: 115–118.
- Sanchez-Vives MV, McCormick DA (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nature Neuroscience* 3: 1027-1034.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Simons M, Nave KA (2015) Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8: a020479.
- Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Krüger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanoock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature Genetics* 41: 1308-1312.
- Selinger JV, Pancrazio JJ, Gross GW (2003) Measuring synchronization in neuronal networks for biosensors applications. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 675–683.

- Shaban H, O'Connor R, Ovsepian SV, Dinan TG, Cryan JF, Schellekens H (2017) Electrophysiological approaches to unravel the neurobiological basis of appetite and satiety: use of the multielectrode array as a screening strategy. *Drug Discovery Today* 22: 31-42.
- Siebner H, Ziemann U (2007) Das TMS-Buch - Handbuch der transkraniellen Magnetstimulation. *Springer Medizin Verlag* Heidelberg, ISBN: 9783540719045.
- Siebner HR, Rossmeier C, Mentschel C, Peinemann A, Conrad B (2000) Short-term motor improvement after sub-threshold 5-Hz repetitive transcranial magnetic stimulation of the primary motor hand area in Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience* 178: 91–94.
- Shan D, Chen L, Wang D, Tan YC, Gu JL, Huang XY (2006) The G protein G-alpha-13 is required for growth factor-induced cell migration. *Developmental Cell* 10: 707-718.
- Sharma N, Singh AN (2016) Exploring Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Journal of clinical and diagnostic research* 10: 1-6.
- Sheinerman KS, Umansky SR (2013) Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7:150.
- Smeyne M, Smeyne RJ (2002) Method for culturing postnatal substantia nigra as an *in vitro* model of experimental Parkinson's disease. *Brain Research - Brain Research Protocols* 9: 105-111.
- Smyth GK (2005) Limma: linear models for microarray data. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor* (ed. Gentleman et al.) 397–420.
- Solé-Padullés C, Bartrés-Faz D, Junqué C, Clemente IC, Molinuevo JL, Bargalló N, Sánchez-Aldeguer J, Bosch B, Falcón C, Valls-Solé J (2006) Repetitive transcranial magnetic stimulation effects on brain function and cognition among elders with memory dysfunction. A randomized sham-controlled study. *Cerebral Cortex* 16: 1487–1493.
- Spira ME, Hai A (2013) Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nature Nanotechnology* 8: 83-94.
- Spitzer NC (2015) Neurotransmitter Switching? No Surprise. *Neuron* 86: 1131-1144.
- Spruston N (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews Neuroscience* 9: 206-221.
- Spurlock CF 3rd, Crooke PS 3rd, Aune TM (2016) Biogenesis and Transcriptional Regulation of Long Noncoding RNAs in the Human Immune System. *The Journal of Immunology* 197: 4509-4517.
- Stock M, Kirchner B, Waibler D, Cowley DE, Pfaffl MW, Kuehn R (2012) Effect of magnetic stimulation on the gene expression profile of *in vitro* cultured neural cells. *Neuroscience Letters* 526: 122-127.

- Stock M, Young M, Pezeares O, Waibler D, Pfaffl MW, Kuehn R (in preparation a) Pathology focused metabolic pathway analytics based on micro array data of magnetic stimulated *in vitro* cultured neural cells.
- Stock M, Kirchner B, Waibler D, Pfaffl MW, Kuehn R (in preparation b) Post-transcriptional regulations of miRNAs of magnetic stimulated *in vitro* cultured neural cells.
- Takahashi R, Imai Y (2003) Pael receptor, endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 250: 25-29.
- Takasuna K, Asakura K, Araki S, Ando H, Kazusa K, Kitaguchi T, Kunimatsu T, Suzuki S, Miyamoto N (2017) Comprehensive *in vitro* cardiac safety assessment using human stem cell technology: Overview of CSAHi HEART initiative. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 83: 42-54.
- Takeuchi N, Chuma T, Matsuo Y, Watanabe I, Ikoma K (2005) Repetitive transcranial magnetic stimulation of contralesional primary motor cortex improves hand function after stroke. *Stroke* 36: 2681–2686.
- Talelli P, Greenwood RJ, Rothwell JC (2007) Exploring theta burst stimulation as an intervention to improve motor recovery in chronic stroke. *Clinical Neurophysiology* 118: 333–342.
- Tan CL, Plotkin JL, Venø MT, von Schimmelmann M, Feinberg P, Mann S, Handler A, Kjems J, Surmeier DJ, O'Carroll D, Greengard P, Schaefer A (2013) MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. *Science* 342: 1254-1258.
- Tang R, Zhang G, Weng X, Han Y, Lang Y, Zhao Y, Zhao X, Wang K, Lin Q, Wang C (2016) *In vitro* Assessment Reveals Parameters-Dependent Modulation on Excitability and Functional Connectivity of Cerebellar Slice by Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation. *Nature - Scientific Report* 6: 23420.
- Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T, Bertagnolli D, Goldy J, Shapovalova N, Parry S, Lee C, Smith K, Bernard A, Madisen L, Sunkin SM, Hawrylycz M, Koch C, Zeng H (2016) Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nature Neuroscience* 19: 335-346.
- Taylor SF, Bhati MT, Dubin MJ, Hawkins JM, Lisanby SH, Morales O, Reti IM, Sampson S, Short EB, Spino C, Watcharotone K, Wright J (2017) A naturalistic, multi-site study of repetitive transcranial magnetic stimulation therapy for depression. *Journal of Affective Disorders* 208: 284-290.
- Tidball AM, Parent JM (2016) Concise Review: Exciting Cells: Modeling Genetic Epilepsies with Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 34: 27-33.
- Trümbach D, Prakash N (2015) The conserved miR-8/miR-200 microRNA family and their role in invertebrate and vertebrate neurogenesis. *Cell and Tissue Research* 359: 161-177.

- Ueyama E, Ukai S, Ogawa A, Yamamoto M, Kawaguchi S, Ishii R, Shinosaki K (2011) Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 65: 77-81.
- Valluy J, Bicker S, Aksoy-Aksel A, Lackinger M, Sumer S, Fiore R, Wüst T, Seffer D, Metge F, Dieterich C, Wöhr M, Schwarting R, Schratt G (2015) A coding-independent function of an alternative Ube3a transcript during neuronal development. *Nature Neuroscience* 18: 666-673.
- Van Guilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Bio Techniques* 44: 619-626.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: RESEARCH0034.
- Vynck M, Trypsteen W, Thas O, Vandekerckhove L, De Spiegelare W (2016) The Future of Digital Polymerase Chain Reaction in Virology. *Molecular Diagnosis and Therapy* 20: 437-447.
- Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, Anastasopoulos IL, Maniou S, Karathanou K, Kalfakakou D, Fevgas A, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG (2014) DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Research* 43: D153-159.
- Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD (2015) DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Research* 43: W460-466.
- Vucic S, Ziemann U, Eisen A, Hallett M, Kiernan MC (2013) Transcranial magnetic stimulation and amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiological insights. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 84: 1161-1170.
- Waibler D (2002) TEMO - Neue Therapieverfahren mit peripherer Magnetstimulation. *Medtronic*, München.
- Waibler D, Langguth B, Milnik V, Kühlmorgen J, Kienle M, Zschorlich V, Siebner H (2007) Diagnostik und Therapieabläufe mit Hilfe der Magnetstimulation in Theorie und Praxis. *Medtronic*, Frankfurt.
- Waibler D, Reuter W, Kühlmorgen JF, Milnik V, Kienle M, Zschorlich V (2009) Magnetstimulation in der orthopädischen und neurologischen Rehabilitation. *Alpine Biomed*, Castrop-Rauxel.
- Waibler D, Stock M, Kienle M (2014) Magnetstimulation in der therapeutischen Anwendung. *MagVenture*, München.
- Warburton A, Savage AL, Myers P, Peeney D, Bubb VJ, Quinn JP (2015) Molecular signatures of mood stabilisers highlight the role of the transcription factor REST/NRSF. *Journal of Affective Disorders* 172: 63-73.

- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-862.
- Witusik M, et al (2008) Successful elimination of non-neural cells and unachievable elimination of glial cells by means of commonly used cell culture manipulations during differentiation of GFAP and SOX2 positive neural progenitors (NHA) to neuronal cells. *BMC Biotechnology* 19: 56.
- Wu C, Gopal KV, Moore EJ, Gross GW (2014) Antioxidants L-carnitine and D-methionine modulate neuronal activity through GABAergic inhibition. *Journal of neural transmission* 121: 683-693.
- Xing Z, Lin A, Li C, Liang K, Wang S, Liu Y, Park PK, Qin L, Wei Y, Hawke DH, Hung MC, Lin C, Yang L (2014) lncRNA directs cooperative epigenetic regulation-downstream of chemokine signals. *Cell* 159: 1110-1125.
- Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA (2013) Progress in MicroRNA Delivery. *Journal of controlled release* 172: 962-974.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience* 36: 11929-11947.
- Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, Vogel H, Steinberg GK, Edwards MS, Li G, Duncan JA 3rd, Cheshier SH, Shuer LM, Chang EF, Grant GA, Gephart MG, Barres BA (2016) Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* 89: 37-53.
- Zhida S, Wenze N, Meng-Lu L, Yuhua Z, Chun-Li Z (2014) *In vivo* conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. *Nature Communications* 5: 3338.

8. Wissenschaftliche Mitteilungen

Publikationen (peer reviewed), die aus der vorliegenden Promotionsarbeit hervorgingen:

- Stock M, Young M, Waibler D, Pezeares O, Pfaffl MW, Kuehn R (in preparation a) Pathology focused metabolic pathway analytics based on micro array data of magnetic stimulated *in vitro* cultured neural cells.
- Stock M, Kirchner B, Waibler D, Pfaffl MW, Kuehn R (in preparation b) Post transcriptional regulations of miRNAs of magnetic stimulated *in vitro* cultured neural cells.
- Stock M, Kirchner B, Waibler D, Cowley DE, Pfaffl MW, Kuehn R (2012) Effect of magnetic stimulation on the gene expression profile of *in vitro* cultured neural cells. *Neuroscience Letters* 526: 122-127.
- Lehle K, Stock M, Schmid T, Schopka S, Straub RH, Schmid C (2009) Cell-type specific evaluation of biocompatibility of commercially available polyurethanes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 90: 312-318.
- Dryia C, Schmid T, Stock M, Schopka S, Schmid C, Lehle K (2008) Cell-Type Specific Evaluation of the Biocompatibility of Polyurethanes used as a Base Material for Ventricular Assist Devices. *International Journal of Artificial Organs* 31: 625.

Weitere Publikationen (peer reviewed):

- Schmid T, Schiller W, Spiegel K, Stock M, Liepsch D, Hirzinger G, Oertel H, Welz A (2006) Optimization of Ventricle-Shaped Chambers for the Implantable DLR Assist Device. *Journal of Biomechanics* 39: 250.
- Schmid T, Stock M, Donisi S, Schiller W, Liepsch D, Hirzinger G, Welz A, Oertel H (2005) Development and Verification of Ventricle-Shaped Chambers for the DLR Assist Device. *International Journal of Artificial Organs* 28: 875.

Vorträge und Poster-Präsentationen:

- Stock M, Waibler D, Kienle M (2014) Magnetstimulation in der therapeutischen Anwendung. *MagVenture*, München.
- Stock M (2012) Anwendung der Magnetstimulation in der Neurorehabilitation. *MagVenture*, Erkelenz.
- Stock M, Waibler D, Haase A, Gross G, Pfaffl M, Kühn R (2010) Cell Response after Magnetic Stimulation. *CNNS, UNT*, Dallas, Texas.
- Stock M, Waibler D, Gross G, Pfaffl M, Kühn R (2010) Gene Expression Profiling after Magnetic Stimulation of Murine Neuronal Cells. *CNNS, UNT*, Dallas, Texas.
- Stock M, Waibler D, Haase A, Gross G, Pfaffl M, Kühn R (2009, 2010) Zellantwort nach Magnetstimulation auf morphologischer, elektrophysiologischer und genetischer Basis. *Lange Nacht der Wissenschaft*, IMETUM, Garching.
- Waibler D, Reuter W, Stock M, Köhlmorgen JF, Milnik V, Kienle M, Zschorlich V (2009) Magnetstimulation in der orthopädischen und neurologischen Rehabilitation. *Reha-Workshop Alpine BioMed*, Castrop-Rauxel.
- Hänggi D, Stock M, Galdeano J, Affeld K, Steiger HJ, Liepsch D (2007) Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie e.V. (DGNC). Leipzig, 26.-29.04.2007. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House.
- Kienle M, Langguth B, Milnik V, Siebner H, Stock M, Völtzke V, Waibler D, Zschorlich V (2006) Rehabilitation und Sportmedizin-Grundlagen der Magnetstimulation. *Medtronic*, Frankfurt a. Main.
- Stock M, Liepsch D, Topakli L, Coli L (2006) Flow visualisation studies with different dialysis catheters in a model of the vena cava superior and the right atrium in variant positions. *Journal of Biomechanics*, München 39: 249.
- Schmid T, Schiller W, Spiegel K, Stock M, Liepsch D, Hirzinger G, Oertel H, Welz A (2006) Optimization of Ventricle-Shaped Chambers for the Implantable DLR Assist Device Abstracts 5th World Congress of Biomechanics, *Journal of Biomechanics*, München 39: 250.
- Hänggi D, Stock M, Galdeano J, Affeld K, Steiger HJ, Liepsch D (2006) Visualization of basic flow pattern in a subarachnoid hemorrhage model and mea-

surement of influence due to variant kinetic applications. *Journal of Biomechanics*, München 39: 368.

- Schmid T, Stock M, Donisl S, Schiller W, Liepsch D, Laschka B, Hirzinger G, Welz A, and Oertel H (2005) Development and verification of ventricle-shaped chambers for the DLR assist device. *The international Journal of Artificial Organs*, Bologna 28: 875.

9. Anhang

9.1 Protokoll zur experimentellen Vorgehensweise mit neuronalen Zellkulturen auf MEA im Neuroversuchstand des Neurolabors, IMETUM, Garching.

I. Generelle Hinweise

Zur Durchführung der gesamten Vorbereitung, der Experimente und des Abbaus muss der Betreuende eine Zugangsberechtigung mit entsprechender Einweisung zum Reinraum-Labor, Werkstofflabor und Neurolabor erhalten haben. Die jeweiligen Bestimmungen sind stets zu befolgen und werden durch eventuelle gegenteilige Anweisungen in dieser Anleitung nicht außer Kraft gesetzt. Bei eventuellen Unklarheiten sind stets die zuständigen Fachkräfte zu kontaktieren.

II. Durchführung

a) Abholung der Zellkultur aus dem Reinraum-Bereich Neurobiologie

- Vor Entnahme aus dem Inkubator Mundschutz und Schutzärmel anlegen, letztere mit Natriumhyperchlorid einreiben.
- Im Inkubator liegen die Nervenzellkulturen oben und Tumore unten.
- Es ist stets auf die Beschriftungen der Petrischalen zu achten!
- Die Nummerierung (wichtig für Populationsvektordarstellung) von Doppelkammer-Chips beginnt mit der Ziffer 5, die der Einfachkammer-Chips MMEP4 mit 4.
- Bei Nutzung des Arbeitstisches UV-Licht anschalten (20-60 Minuten laufen lassen!), währenddessen keinesfalls in das Licht sehen!
- Arbeitstisch mit Natriumhyperchlorid reinigen und mit Ethanol nachwischen.
- Mikroskop vor und nach Benutzung mit Alkohol abwischen.

b) Vorbereitungen im Arbeitsbereiches im Werkstofflabor

- Das UV-Licht zur Sterilisation des Arbeitsbereichs anschalten. (Währenddessen sollte dort nicht gearbeitet werden.)
- Nitril-Handschuhe anziehen und mit Ethanol desinfizieren.

Folgende Aufbauten und Werkzeuge sind bereit zu halten und bei Bedarf selbst zu reinigen:

- Zellkammer
 - Kappe für Kammer
 - O-Ring
 - Zebra-Strips (Fujipolo, Cranford, NJ,USA)
 - ggf. Silikonfett
 - autoklavierte Pinzetten
 - Wattestäbchen
 - Transferpipetten ggf. im Reinraum
 - Autoklaviertes Filterpapier
 - Natriumhyperchlorid
 - Ethanol
-
- Gummidichtung (O-Ring) mit Pinzette in Unterseite der Kammer einsetzen, ggf. vorher mit Silikonfett einfetten. Nicht berühren!
 - Chip aus Petrischale mit Pinzette auf Filterpapier legen um Wasser abzutrocknen.
 - Chip zentriert auf Kammer legen. Kammer nur an den Seiten berühren, wobei das Glas vollständig auf dem Gummiring aufliegen muss, sonst besteht Bruchgefahr beim Festschrauben der Kammer!
 - 2 ml Medium vom Rand der Kammer abpipettieren (1-2 mm Resthöhe).
 - Latexring abnehmen, Kammer aufsetzen und möglichst eben und gleichmäßig festschrauben.
 - Abgenommenes Medium teilweise zurückgeben (bis zur unteren Kante der Kammer).
 - Kappe der Kammer aufstecken.
 - Medium mit Filterpapierstücken am Rand der Kammer möglichst vollständig abtupfen (seitlich dazwischen schieben).
 - Kontakte der Messkammer mit Ethanol getränkten Wattestäbchen reinigen.
 - Zebra-Strips (Kontaktstreifen) ebenso reinigen und auf die Kontakte aufbringen.

c) Inbetriebnahme im Faraday'schen Käfig

- Verstärkerplatine aufstecken und vorsichtig und nicht zu fest auf Mikroskop-Tisch mittels Schraubchen fixieren. Schrauben der Kammer nachziehen.
- Gaszufuhr-Regelung (Haupthahn und Dosierhahn) für medizinische Luft und CO₂ öffnen. Die Zuläufe für Gas und Wasser befinden sich in Küvetten mit Natriumhyperchlorid zur Desinfektion, jedoch nicht in der Flüssigkeit selbst! Das abgestandene H₂O zunächst ablaufen lassen (hohe Geschwindigkeit, z.B. 1 ml/min an der Pumpe einstellen), den Anschluss der Begasungskammer mit autoklaviertem Wasser spülen und reinigen.
- Zufuhr an den Flaschen selbst öffnen und die Zusammensetzung auf 8% CO₂ und 92% medizinische Luft mittels Feineinsteller justieren. Auf unterschiedliche Skalierungen achten!
- Nachfüllen der Wasserspritzen mit autoklaviertem Wasser nach Abklemmen des Schlauchs mittels länglicher Nadeln.
- Volumenstrom auf 200 µl/h an der Perfusionspumpe einstellen.
- Konnektierung für Hauptverstärker anbringen.
- Abschirmfolie um Wasserleitung, Kammer und Faraday'schen Käfig als elektrische Erdung festlegen.
- Beide Temperaturfühler einsetzen.
- Filterbank anschalten.
- Stromversorgungen sowie Plexon-Verstärker in Betrieb nehmen.

d) Bedienung der Plexon Software

- 'Plexon Server' starten.
- 'Plexon MEA Sort Client' öffnen.
- Unter 'Settings' die 'Waveform' auf 1400 µs und den 'Pre-threshold' auf 300 µs einstellen, anschließend 'Settings' minimieren.
- Es ist eine Rauschamplitude von 200–400 mV zu erwarten. Bei dauerhafter Überschreitung dieser kann von einem Defekt der entsprechenden Elektrode ausgegangen werden.
- Unter 'Settings' lässt sich die Gesamtverstärkung 'Gain' einstellen. Diese sollte bei ca. 10.000 liegen.

- Der 'threshold' lässt sich über Anklicken der entsprechenden Spalte auf allen Kanälen gleichzeitig setzen. Ein sinnvoller Wert ist hier erfahrungsgemäß '-17'.
- Unter 'Register Global' sollte die Betrachtungszeit auf die maximalen 1,4 ms eingestellt werden.
- Wichtig: Das 'Setting'-Fenster darf nur minimiert und nicht geschlossen werden!

e) Abbau der Zellkultur

- Netzteile und Heizung ausschalten
- Bei kontaminiertem Medium, Pilzbefall (Schimmel) oder Bakterien (Medium milchig, gelblich oder anders verfärbt; kleine vibrierende Punkte im Mikroskop sichtbar) den Chip mit Natriumhyperchlorid behandeln.
- Kultur und Medium entsprechend den Sicherheitsvorschriften entsorgen!
- Kappe der Zellkammer mit Ethanol reinigen. (Isopropanol würde nicht komplett verdampfen!)
- Chips auslösen und zur Reinigung im Reinraum abgeben.
- O-Ring herausnehmen und diesen, die Kammer selbst und alle sonstigen Teile reichlich mit demineralisiertem Wasser ausspülen. Indirekt spülen, da durch hohen Wasserdruck die Elektrodenstruktur auf dem Chip beschädigt werden kann! Alle Teile der Kammer (außer dem Chip selbst!) mit ca. 10%-Deconnex 12PA (VWR) Lösung und danach zusätzlich doppelt in entmineralisiertem H₂O für je 15 Min. bei 60-70 °C im Ultraschallbad reinigen. Zwischen den Reinigungsgängen mit entmineralisiertem H₂O ausspülen, insbesondere die Zuläufe!

III. Zusammenfassung der wichtigsten Einstellungen

- Volumenstrom Reinstwasser während dem Experiment: 200 µl/h
- Volumenstrom Reinstwasser zwischen den Experimenten: 40 µl/h
- Optimale Osmolarität des Mediums: 300-320 mOsmol/kg
- Temperatur auf PC Anzeige: 36 °C (niedrigerer Wert, da Messung leicht verfälscht)
- Volumenstrom medizinische Luft: 92 ml/min

- Volumenstrom CO₂: 8 ml/min
- pH-Wert bei ca. 7,4

9.2 Statistische Analyse der Microarray Daten - Programmierung in R

#Microarray: Magnetic Field Stimulated Mouse Neural Stem Cells

#####

#A) Statistically Analysis of Microarray (LIMMA, Linear Model for Microarray Analysis in R)

##1. Install/Load Initial Package Set

```
source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
```

```
biocLite("oligo")          ## A package to analyze oligonucleotide arrays expression/SNP/tiling/exon) at probe-level. It currently support Affymetrix (CEL files) and NimbleGenarrays (XYS files).
```

```
biocLite("pd.mogene.1.0.st.v1")  ## Platform Design Info for Affymetrix MoGene-1_0-st-v1; This package is to be used in conjunction with the oligo package.
```

```
biocLite("mogene10sttranscriptcluster.db")  ## Affymetrix Mouse Gene 1.0-ST Array Transcriptcluster Revision 8 annotation data (chip mogene10sttranscriptcluster) assembled using data from public repositories.
```

```
biocLite("limma")          ##Load After rma() is completed
                           ##Data analysis, linear models and differential expression for microarray data.
```

```
library(oligo)
library(pd.mogene.1.0.st.v1)
library(mogene10sttranscriptcluster.db)
```

##2. Set/Check Working Directory (The Working Directory MUST contain the raw data in .CEL format and the Phenotype Data (design matrix/ targets.txt) file)

A) Lab Computer

```
setwd("C:/Users/AG MolZoo/Desktop/MouseArray/Marc/Limma(R)/Data and
Target File")
```

```
getwd()    ## Ensure that the directory is set correctly
```

B) Home PC (Desktop)

```
setwd("C:/Users/control1/Desktop/MouseArray/Marc/Limma(R)/Data and
Target File")
```

```
getwd()    ## Ensure that the Directory is set correctly
```

##3. Read in the CEL files and Phenotype Data txt files

```
##(SideNote): Affymetrix microarray data formats: Family of file
formats used for the storage and exchange of microarray
data and meta information.
#-->CEL files store a raster of intensity values of individual
probes.
    #The CEL file stores the results of the intensity
calculations on the pixel values of the DAT file.
    #This includes an intensity value, standard
deviation of the intensity, the number of pixels used
to calculate the intensity value,
    #a flag to indicate an outlier as calculated by the
algorithm and a user defined flag indicating
the feature should be excluded from future analysis.
#CHP files contain processed information about probe
sets.
#CDF files describe which probes are part of which probe
set.
#GIN files store the gene names associated with each
probe set.
#PSI files store probe set names and the number of probe
pairs in a probe set.
```

##3.1 Import PhenoData as an AnnotatedDataFrame

```
##-->The Phenotype Data (PhenoData) is a Table in tab-
delimited text format which describes the experimental conditions
for each of the arrays (Also known as Target File)
    #Each chip should be given a unique name or number (in
the Name column)
    #The Affymetrix CEL file name should be listed for each
chip in the FileName column
    #The Target column tells limma or affyImGUI which chips
are replicates
```

##-->It is important that the Cel filenames in the Name column match the Cel filenames in the directory, as the phenodata will be used to read in the CEL files in the next step.

In this first step, the Phenodata is read in as an AnnotatedDataFrame(Class Containing Measured Variables (expr.Set) and their Meta-Data Description(Phenodata))

```
pd<- read.AnnotatedDataFrame("./targets.txt") ##Create an instance of
classAnnotatedData
Frame by reading a file
pd
```

##3.2 Import Cel files based on rownames of the PhenoData

```
data<- read.celfiles(rownames(pData(pd))) ##Reads CEL
files.
data
```

##3.3 Combine phenoData(pd) with data

```
phenoData(data) <- pd
phenoData(data)
```

##4. Preliminary Exploratory Data Analysis

##4.1 Histograms (Visualize the distribution of the intensities in each array of the dataset)

##-->Used to visualise the spread of data and compare and contrast probe intensity between the arrays of the dataset

##The x-axis represents probe density level and the y-axis indicates probe intensity.

##There are a number of inferences that can be made from these plots

##1) a bimodal distribution in the raw data is often indicative of array containing a spatial artifact

##2) an array which is shifted to the right often has abnormally high background interference

```
hist(data, main="Raw/Pre-processed Microarray Data")
## Histogram of preprocessed data (Visualizes all arrays
in one graph)
```

##4.2 Boxplots (Visualize the distribution of the intensities in each array of the dataset)

##Description: A boxplot is a convenient means by which to compare the probe intensity levels

##between the arrays of a dataset. Either end of the box represents the upper and lower quartile.
 ## The line in the middle of the box represents the median.
 ##Horizontal lines, connected to the box by “whiskers”, indicate the largest and smallest values not considered outliers. Outliers are values that lie more than 1.5 times the interquartile range from the first of third quartile (the edges of the box);
 ##they are represented by a small circle.
 ##If one or more arrays have intensity levels which are drastically different from the rest of the arrays, this may indicate a problem with these arrays.
 ##These kinds of problems can however sometimes be corrected by normalization.
 ## For microarray data, these graphs are always constructed using log₂ transformed probe intensity
 ##values, as the graph would be virtually unreadable using raw values.

```
boxplot(data, main="Raw/Pre-processed Microarray Data")
```

##4.3 M-A plots using raw/ unnormalized data

##--> An MA plot is an application of a Bland–Altman plot for visual representation of two channel DNA microarray gene expression data
 ##which has been transformed onto the M (log ratios) and A (mean average) scale.

##Microarray data is often normalized within arrays to control for systematic biases in dye coupling and hybridization efficiencies,
 ##as well as other technical biases in the DNA probes and the print tip used to spot the array.[1]

##By minimizing these systematic variations, true biological differences can be found.

##-->To determine whether normalization is needed, one can plot Cy5 (R) intensities against Cy3 (G) intensities and see whether the slope of the line is around 1

##For Affymetrix chips, there is only one channel on each array, so the only meaningful way to define M (the log ratio) is to compare each chip to pseudo-median reference chip.

```
par(mfrow=c(3,2)) ## par can be used to set or query graphical parameters. Parameters can be set by specifying them as arguments to par in tag = value form, or by passing them as a list of tagged values.
```

```
MAplot(data) ## Creates an MA-plot with color coding for control spots.
```

##4.4 Visualize Cel File Image (Check for technical problems such as spots or lines of fluorescent background)

```
image(data[,Ncel]) ## Select specific array
image(data[,1])    ## Select first array (#1) for visualization
```

##5. Summarizing Expression Values: Normalization and Background Correction (Pre-processing)

##--> Pre-processing

##Before any kind of microarray data can be analysed for differential expression
 ##several steps must be taken. Raw data must be quality assessed to ensure its
 ##integrity. Unprocessed raw data will always be subject to some form of technical
 ##variation and thus must be preprocessed to remove as many unwanted sources of
 ##variation as is possible, to ensure that results are of the highest attainable level
 ##of accuracy. Ideally, the data being assayed should be preprocessed using several
 ##different methods, the results of which should be compared to identify which
 ##method is of the highest level of suitability. The most appropriate method should
 ##then be used to preprocess the raw data before differential expression analysis.

##Background Correction

##The first step is generally to background correct the intensity reading for each
 ##spot. Background fluorescence can arise from many sources, such as non-specific
 ##binding of labeled sample to the array surface, processing effects such as deposits
 ##left after the wash stage or optical noise from the scanner. There is always
 ##some level of background noise, even if nothing but sterile water is labeled and
 ##hybridized to the array, some fluorescence will still be picked up by the scanner.

##Normalization

##The next stage is normalization. The purpose of this step is to adjust data for technical
 ##variation, as opposed to biological differences between the samples. There
 ##will always be slight discrepancy between the hybridization processes for each array

##and these variations tend to lead to scaling differences between the overall ##fluorescence intensity levels of various arrays. For example the quantity of RNA ##in a sample, the amount of time for which a sample spends hybridizing or the ##volume of a sample can all introduce significant variance. Even subtle physical ##differences between arrays or between the scanners used to read arrays can have ##an effect. ##Put simply, normalization ensures that when comparing expression levels of ##different arrays, that we are, as much as is possible, comparing like with like. ##Studies have shown that the normalization method used has a significant difference ##on final differential expression levels, so it is vital to choose an appropriate method.

##5.1 RMA Method (Robust Multi-Array Analysis)

##--> RMA is an academic alternative to Affymetrix algorithms for converting probe ##level data to gene expression measures. This method is distinct from Affymetrix ##methods in that it completely ignores the MM probe readings; the inventors of ##the algorithm claim that the MM probes introduce more noise and that, while ##acknowledging that these probes do provide useful information, have not, at the ##time of publication of the method, found a productive way to use it. ##The methods works by adjusting for background noise on a raw intensity scale, ##which does not lead to negative background corrected values. The log2 transformed ##value of each background corrected PM probe is obtained and these values ##are normalized using quantiles normalization, which was developed by Bolstad *et al.*, (2003). ##Robust multi-array analysis is then carried out on the quantiles.

```
allgene<- rma(data)      ## Robust Multichip Average preprocessing
                          methodology. This strategy allows back
                          ground subtraction, quantile normalization
                          and summarization (via median-polish).

print(allgene)         ## Gives a summary
```

```
head(exprs(allgene))    ## Expression set table
```

##5.2 Exploratory Analysis: Comparing Raw Data Vs. Processed Data (RMA)

##5.2.1 Boxplots

```
par(mfrow=c(2,1))
boxplot(data, main="Raw/Pre-processed Microarray Data")
      ## Boxplot of Raw Data
boxplot(allgene, main="Processed Microarray Data")
      ## Boxplot of RMA processed Data
```

##5.2.2 Histograms

```
par(mfrow=c(3, 3))    ##NOT WORKING
hist(data, main="Raw/Pre-processed Microarray Data")
      ## Histogram of Raw Data
hist(allgene, main="Processed Microarray Data")
      ## Histogram of RMA processed Data
```

##5.2.3 M-A plots

```
par(mfrow=c(2,6))
MAplot(data)          ## Creates an MA-plot using the Raw Data
MAplot(allgene)       ## Creates an MA-plot using the RMA
                      processed Data
```

##6. Importing/Creating Annotation file from mogene10sttranscriptcluster.db and removing/ getting rid of Control Probes

##6.1 Load the "control annotations" (mogene10stCONTROL) and "Array Tools" package

```
data(mogene10stCONTROL, package="ArrayTools")
```

##6.2 Create a Vector (rids; Reference IDs) containing all AffyIDs (rownames of expression set allgene)

```
rids<- rownames(exprs(allgene))
      ## Retrieve or set the row or column names
      of a matrix-like object rids
```

##6.3 Create Annotation Vectors from mogene10sttranscriptcluster.db using the rids object (Vector of AffyIDS)

```
## mget searches for each rowid in mogene10sttranscriptcluster.db
(which is an Affy probe identifier, e.g. 10608724 which corresponds to
NM_008818)
## unlist turns the list into a vector
```

```
## Note: To list the objects available in the annotation package
```

```
ls("package:mogene10sttranscriptcluster.db")
--> The ls function lists the R objects in your current
working environment.
```

```
ac<- unlist(mget(rids, mogene10sttranscriptclusterACCNUM,
ifnotfound=NA))
en<- unlist(mget(rids, mogene10sttranscriptclusterENTREZID,
ifnotfound=NA))
gn<- unlist(mget(rids, mogene10sttranscriptclusterGENENAME,
ifnotfound=NA))
sm<- unlist(mget(rids, mogene10sttranscriptclusterSYMBOL,
ifnotfound=NA))
```

```
an<- cbind(id=rids,          ## create annotation file
           GeneName=gn,
           Symbol=sm,
           Accession=ac,
           EntrezID=en)
```

##6.4 Remove/ Get Rid of Control Probes from Annotation File

```
## Variable "an" is a matrix with all the annotation data within
## an[,1] %in% mogene10stCONTROL[,1] selects those rows that are
not control probes
## so here we are getting rid of the control probe
```

```
ann<- an[!(an[,1] %in% mogene10stCONTROL[,1]),]
           ## Annotation File without Control
           Probes
gene<- allgene[!(an[,1] %in% mogene10stCONTROL[,1])]
           ## Expression Set without Control
           Probes
```

##7. Limma (modified t-test; eBayes function)

```
##Limma is a package for the analysis of gene expression
microarray data, especially the use of linear
#models for analyzing designed experiments and the
assessment of differential expression.
#Limma provides the ability to analyze comparisons
between many RNA targets simultaneously.
```

```
#It has features which make the analyses stable even for
experiments with small number
#of arrays—this is achieved by borrowing information
across genes. The normalization and
#exploratory data analysis functions are for two-color spotted
microarrays. The linear model
#and differential expression functions apply to all micro-
arrays including Affymetrix and other
#single-channel microarray experiments
```

##7.1 Load Limma Library

```
library(limma)
```

#7.2 Design Matrix

```
##The design matrix indicates which RNA samples (Treatment or
Control) have been applied to each array
```

```
fac<- factor(pd$Target, levels=c("R","T"))
design<- model.matrix(~fac)
colnames(design) <- c("T", "R vs T")
```

##7.3 Fitting Linear Model

```
fit<- lmFit(gene, design)      ##Fit linear model for each gene given
a series of arrays
```

##7.4 Calculate Differential Expression (Bayes Shrinkage of Standard Error)

```
#Given a series of related parameter estimates and standard
errors, compute moderated t-statistics,
#moderated F-statistic, and log-odds of differential expression by
empirical Bayes shrinkage of the
#standard errors towards a common value.
```

```
##These functions is used to rank genes in order of evidence for
differential expression. They use an
#empirical Bayes method to shrink the probe-wise sample
variances towards a common value and
#to augmenting the degrees of freedom for the individual
variances (Smyth 2004).
```

```
fit<- eBayes(fit)
```

##7.5 Save All Results

```
results<- topTable(fit,coef=2, genelist=ann, number="infin")
## Create topTable with all results
```

```
tmpnam<- colnames(results)           ## create Vector with Column names
tmpnam[1] <- "affyID"                 ## Change ID to "AffyID"
colnames(results) <- tmpnam           ## Add modified Colname vector to
                                      results
write.table(results, file="results.xls", sep="\t", row.names=F,
col.names=T, quote=F)                ## Write results to excel file
```

```
#####
#####
```

9.3 Programmablauf und Struktur der Microarray-Daten der verwendeten Microarrays Affymetrix Mouse GeneChip® 1.0 ST in DAVID – Funktionelle Annotation

#B) DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis (Web-based Service)

#####

##1. Create a list of significant genes (AffyID's)

#--> Open the "results" excel file (from Step (A)6.5) and use the filter function to filter genes based on their p-value (Set to 0.05 or 0.001 sign. level)

##2. Go to the DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis website and start analysis

#2.1 david.abcc.ncifcrf.gov

#2.2 Click on "Start Analysis" Tab

#2.3 Select the "Upload" tab in the blue right side bar (top left)

#2.3.1 In step 1 of upload, copy the significant genes (AffyID's) from the filtered excel file and paste them into the upload data field (Step 1A: Paste a list)

#2.3.2 In step 2 of upload, select "Affymetrix Exon Gene ID"

#2.3.3 In Step 3 of upload, select gene list

#2.4 Select the "Background" tab in the blue right side bar (top right)

#2.4.1 Select Affymetrix Exon Background, Mogene1-0-st-v1

#--> Once gene list and background are entered selected, the analysis should complete automatically

#####

#C) Pathview: pathway based data integration and visualization (R)

#####

```
##-> maps and renders user data on relevant pathway graphs. All users need
is to supply
## their gene or compound data and specify the target pathway. Pathview
automatically downloads the pathway
## graph data, parses the data, maps user data to the pathway, and renders
pathway graph with the mapped
## data. Although built as a stand-alone program, pathview may seamlessly
integrate with pathway and gene
## set (enrichment) analysis tools for a large-scale and fully automated
analysis pipeline.7
```

##1. Install/Load Initial Package Set

```
source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite("pathview")

library(pathview)
```

##2. Set/Check Working Directory (The Working Directory MUST contain txt)

A) Lab Computer

```
setwd("C:/Users/AG MolZoo/Desktop/MouseArray/Martin/Pathway Analysis/
PathViewR/Rsession")

getwd() ## Ensure that the directory is set correctly
```

B) Home PC (Desktop)

```
setwd("C:/Users/control1/Desktop/MouseArray/Martin/Pathway Analysis/
PathViewR/Rsession")

getwd() ## Ensure that the directory is set correctly
```

##3. Import Data (Text File) as Dataframe and Convert to Matrix

```
##->The txt file must contain 2 columns, the first with AffyIDs and the second
with the LogFC values
```

##NOTE: The first column/row (AffyID) can not contain a header, in other words, field A1 must remain BLANK

##3.1 Read-in Data as DataFrame

```
data<- read.table(file="data.txt") ## Reads a file in table format and creates a
data frame from it, with cases corresponding
to lines and variables to fields in the file.
data ## Ensure data has been correctly read-in
class(data) ## Ensure data is of class DataFrame
```

##3.2 Convert DataFrame to Matrix

```
Mdata<- as.matrix(data) ## as.matrix attempts to turn its argument
into a matrix
is.matrix(Mdata) ## Outputs logical response
Mdata
```

##4. Data Visualization (Kegg Pathways)

```
pv.out<- pathview(
    gene.data = Mdata[, 1], # Pathview is a tool set for pathway
                           based data integration and
                           visualization
    pathway.id = "00590", # either vector (single sample) or a
                           matrix-like data (multiple sample).
                           Vector should be numeric with gene
                           IDs as names or it may also be
                           character of gene IDs. Character vec-
                           tor is treated as discrete or count data.
                           Matrix-like data structure has genes
                           as rows and samples as columns
    species = "mmu", # character, the KEGG pathway ID,
                     usually 5 digit, may also include the 3
                     letter KEGG species code
                     # character, either the kegg code,
                     scientific name or the common name
                     of the target species. This applies to
                     both pathway and gene.data or
                     cpd.data. When KEGG ortholog path
                     way is considered, species="ko". De
                     fault species="hsa", it is equivalent to
                     use either "Homo sapiens" (scientific
                     name) or "human" (common name)
    out.suffix = "ircdata", # character, the suffix to be added
                             after the pathway name as part of the
                             output graph file
    kegg.native = T,
    same.layer = T)
```

Relevant /Significantly Enriched KEGG pathway ID´s (Step B / DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis (Web-based Service))

## Parkinson's Disease##	pathway.id = "05012"
## Alzheimer's Disease##	pathway.id = "05010"
## Huntington's Disease##	pathway.id = "05016"
## Smooth Muscle Contraction##	pathway.id = "04270"
## Arachidonic Acid Metabolism##	pathway.id = "00590"

#####

9.4 Genexpressionsdaten

9.4.1 Genexpressionsregulationen der miRNA für vierfach-A Stimulation im Vergleich zur Referenzgruppe

Gene symbol	t.test	p.value	$\Delta\Delta\text{Ct}$	quadruple A treatment vs control
hsa let 7a	-0,27194	0,78892	0,02271	0,98438
hsa let 7e	-2,18338	0,04578	0,20783	0,86584
hsa let 7c	-0,44221	0,66267	0,03023	0,97927
hsa miR 125b	0,29639	0,76973	-0,01291	1,00899
hsa miR 128a	-3,14356	0,00833	1,28866	0,40933
hsa miR 132	-1,59867	0,12429	0,56148	0,6776
hsa miR 133b	-2,8688	0,01045	1,74201	0,29895
hsa miR 184	-0,5078	0,61696	0,112	0,92531
hsa miR 200a	-4,37477	0,00045	1,12183	0,45951
hsa miR 204	-2,28052	0,0423	0,45272	0,73066
hsa miR 212	-3,30255	0,00671	0,56952	0,67384
hsa miR 328	-0,9273	0,36412	0,0337	0,97691
hsa miR 9	-2,45888	0,02669	0,27496	0,82647
hsa miR 10a	0,6093	0,55225	-0,05115	1,03609
hsa miR 10b	0,75351	0,45948	-0,38512	1,30597
mmu let 7a	-0,33062	0,74473	0,01291	0,99109
mmu let 7c-1	-0,12028	0,90568	0,01859	0,9872
mmu miR 124a	-2,83718	0,01398	0,83797	0,55943
mmu miR 134	-0,32137	0,75264	0,03363	0,97696
mmu miR 294	-0,95658	0,34928	0,10994	0,92663
mmu miR 298	-2,08616	0,05191	0,19966	0,87075
mmu miR 495	-3,48269	0,0023	0,33294	0,79392

9.4.2 Genexpressionsregulationen der miRNA für vierfach-B Stimulation im Vergleich zur Referenzgruppe

Gene symbol	t.test	p.value	$\Delta\Delta\text{Ct}$	quadruple B treatment vs control
hsa let 7a	0,05336	0,95809	-0,00475	1,0033
hsa let 7c	-0,68531	0,50082	0,0532	0,9638
hsa let 7e	-1,91857	0,06815	0,10083	0,93249
hsa miR 9	1,18394	0,25406	-0,12134	1,08774
hsa miR 10a	-1,44762	0,17054	0,12719	0,91561
hsa miR 10b	2,92253	0,00894	-1,36734	2,57995
hsa miR 125b	0,91091	0,37262	-0,04631	1,03262
hsa miR 128a	-1,79495	0,09741	0,7254	0,60483

hsa miR 132	-0,6288	0,53712	0,17562	0,88538
hsa miR 133b	-3,76701	0,00122	1,94613	0,25951
hsa miR 184	-2,24113	0,03982	0,43275	0,74085
hsa miR 200a	-7,66593	0	1,76759	0,2937
hsa miR 204	-1,88413	0,07297	0,49718	0,70849
hsa miR 212	-3,10319	0,00954	0,48579	0,71411
hsa miR 328	-0,18125	0,85896	0,01452	0,98999
mmu let 7a	-1,11636	0,27735	0,04631	0,96841
mmu let 7c-1	-1,03564	0,31383	0,14456	0,90466
mmu miR 124a	-2,23115	0,04487	0,78846	0,57896
mmu miR 134	3,18654	0,00539	-0,2463	1,18616
mmu miR 294	-2,41288	0,02694	0,4096	0,75283
mmu miR 298	0,10238	0,91945	-0,00808	1,00562
mmu miR 495	0,29989	0,7688	-0,05262	1,03714

9.4.3 Genexpressionsregulationen der miRNA für vierfach-B Stimulation im Vergleich zu vierfach-A Stimulation

Gene symbol	t.test	p.value	$\Delta\Delta Ct$	quadruple A treatment vs quadruple B treatment
hsa let 7a	0,25434	0,80161	-0,02745	1,01921
hsa let 7c	-0,28942	0,7751	0,02297	0,9842
hsa let 7e	1,11467	0,28254	-0,107	1,07699
hsa miR 10a	-1,55388	0,13452	0,17834	0,88372
hsa miR 10b	2,42265	0,02471	-0,98223	1,97551
hsa miR 125b	0,679	0,50478	-0,0334	1,02342
hsa miR 128a	1,00497	0,32584	-0,56326	1,4776
hsa miR 132	1,28554	0,2153	-0,38586	1,30664
hsa miR 133b	-0,30228	0,76542	0,20412	0,86807
hsa miR 184	-2,02471	0,05777	0,32075	0,80065
hsa miR 200a	-2,13352	0,0445	0,64576	0,63916
hsa miR 204	-0,24706	0,80912	0,04446	0,96965
hsa miR 212	0,3634	0,71981	-0,08373	1,05976
hsa miR 328	0,2353	0,81742	-0,01918	1,01338
hsa miR 9	2,86287	0,0091	-0,3963	1,31613
mmu let 7a	-1,04841	0,30625	0,0334	0,97712
mmu let 7c-1	-0,69772	0,49279	0,12596	0,91639
mmu miR 124a	0,11147	0,91229	-0,04951	1,03492
mmu miR 134	2,35107	0,02932	-0,27993	1,21413
mmu miR 294	-1,80715	0,08885	0,29966	0,81244
mmu miR 298	1,99075	0,06	-0,20774	1,15488
mmu miR 495	2,11062	0,05145	-0,38556	1,30636

9.4.4 Targetgenvalidierung nach Stimulation A (einfach)

Gene symbol	t.test	p.value	$\Delta\Delta Ct$	foldchange
Meox2	-2.4283	0.0180	0.3201	0.8010
Calm4	-1.8739	0.0678	0.5021	0.7061
IL1a	1.8490	0.0690	-0.1681	1.1236
Psenen	1.2332	0.2220	-0.0531	1.0375
Nae1	1.2294	0.2270	-1.0671	2.0952
Actb	-1.2181	0.2276	0.0644	0.9563
Rnf103	-1.1406	0.2580	0.0731	0.9506
Gal	-1.0333	0.3089	0.5294	0.6928
Aph1a	0.9328	0.3546	-0.0594	1.0420
Bace1	-0.9070	0.3678	0.0673	0.9545
Mfab2	-0.8915	0.3765	0.0422	0.9711
Ubeg2g2	0.8383	0.4048	-0.0542	1.0383
Bcl2l1	-0.7850	0.4354	0.0361	0.9753
Calm3	0.7717	0.4429	-0.0403	1.0284
Psen1	0.7374	0.4634	-0.0387	1.0272
Gfap	-0.6789	0.4999	0.0718	0.9514
Mme	0.6323	0.5294	-0.0516	1.0364
Gap43	-0.6030	0.5486	0.0421	0.9712
Snca	-0.5568	0.5797	0.0302	0.9793
Gga3	0.4577	0.6487	-0.4552	1.3709
Crh	0.3871	0.6999	-0.0254	1.0177
St6gal1	0.3830	0.7032	-0.0198	1.0138
IL3	0.3095	0.7579	-0.0690	1.0490
Pink1	-0.1397	0.8893	0.0023	0.9984
Lrp1	0.1150	0.9089	-0.0023	1.0016
Abcb1a	-0.0777	0.9383	0.0056	0.9961
IL6	-0.0654	0.9481	0.0102	0.9930

9.4.5 Genexpression der Microarrays Alzheimer Disease 96 StellARay™ und Neurodegeneration 96 StellARay™

Vergleich der C_q s der behandelten und der Referenzkulturen der identischen Gene des Alzheimer- und des Neurodegeneration-qPCR-Arrays

Alzheimer Disease		gene symbol	Neurodegeneration	
mean C_q control	mean C_q treatment		mean C_q control	mean C_q treatment
17,71	17,58	ApoE	17.90	17,71
19,94	19,79	App	19.69	19,71
24,26	23,97	Bace1	23,76	23,90

22,63	22,33	Bdnf	22,17	22,20
26,64	26,43	Casp3	26,36	26,30
26,20	25,95	Casp6	25,83	25,95
23,18	23,04	Gsk3b	23,07	22,63
24,32	24,19	Ide	24,57	24,65
22,44	22,19	Lrp1	22,01	21,91
22,81	22,64	Mapt	22,63	22,89
30,88	30,36	Mme	29,73	29,14
24,67	24,38	Nae1	24,31	24,27
23,82	23,63	Nestn	23,22	23,29
24,55	24,58	Psen1	24,39	24,48
36,23	35,97	Psen2	37,18	37,27
23,31	23,35	Psenen	22,91	23,07
24,27	23,92	Snea	23,65	24,43

9.5 Acknowledgement

Das Projekt "Zellantwort nach Magnetstimulation" (Cell Response after magnetic Stimulation, CRAMS) wurde von der Kurt-Eberhart-Bode-Stiftung unter dem Aktenzeichen – T 122/19642/2009/kg – gefördert.

Die Magnetstimulatoren mit adaptiven Spulengeometrien wurden durch die Firma MagVenture, Dänemark, für die wissenschaftlichen Experimente zur Verfügung gestellt.