

**Entwicklung von striatalen Neuronen zu
funktionellen Netzwerken *in vitro***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wiebke Fleischer

aus Leverkusen

Düsseldorf, Dezember 2006

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Hans-Peter Hartung

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Referent: Prof. Dr. Mario Siebler
Korreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn
Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2006

1	EINLEITUNG	6
1.1	Das Netzwerk bestimmt das Neuron	6
1.2	Untersuchung von Netzwerkeigenschaften mit Mikroelektroden-Arrays.....	7
1.3	Das Striatum – Schlüsselement neurodegenerativer Erkrankungen	10
1.4	Striatale Netzwerkaktivität und wodurch sie bestimmt wird	10
1.5	Fragestellung.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Zellkultur	14
2.1.1	Cryokonservierte corticale und striatale Zellen der Ratte	14
2.1.2	Präparation striataler Zellen von embryonalen und postnatalen Ratten.....	14
2.1.3	Vorbereitung der MEAs und Deckgläschen.....	16
2.2	Immunocytochemie	17
2.3	Elektrophysiologie.....	18
2.3.1	Technische Ausrüstung	18
2.3.2	Signaldetektion und Messparameter	20
2.3.3	Messprotokoll.....	21
2.4	Statistik.....	23
3	ERGEBNISSE	24
3.1	Entwicklung von neuronalen Netzwerken am Beispiel corticaler und striataler Zellen	24
3.1.1	Corticale aber nicht striatale Zellen entwickeln ein neuronales Netzwerk <i>in vitro</i> (CryoCortex / CryoStriatum)	24
3.1.2	Co-Kultivierung von corticalen und striatalen Zellen induziert keine Netzwerk-Aktivität (CryoCortex / CryoStriatum)	28
3.1.3	Sehr dichte striatale Kulturen zeigen Netzwerkaktivität (CryoStriatum)	29
3.1.4	Nur sehr dichte striatale Kulturen entwickeln neuronale Netzwerke (eStriatum / pStriatum).....	31
3.1.5	Der Entwicklungszustand der striatalen Zellen hat keinen Einfluss auf das Netzwerkverhalten (eStriatum und pStriatum vs CryoCortex).....	33

3.2	Immunocytochemische Charakterisierung striataler und corticaler Zellen	36
3.2.1	Astrocyten	36
3.2.2	Synaptophysin	39
3.2.3	GABA.....	40
3.3	Modulation der Netzwerkaktivität	42
3.3.1	Magnesium-Entzug gleicht die Netzwerkaktivität von corticalen und striatalen Zellen einander an	42
3.3.2	Der GABA-Antagonist Bicucullin steigert die Aktivität von striatalen Kulturen	45
3.3.3	Auch der GABA-Antagonist Gabazine steigert striatale Netzwerkaktivität.....	48
3.3.4	Der Kaliumkanal-Blocker Bariumchlorid zerstört die Korrelation der Netzwerkaktivität	49
3.3.5	Glutamat wirkt stärker auf corticale als auf striatale Netzwerkaktivität.....	56
3.3.6	Striatale Kulturen setzen synaptisch Glutamat frei	60
3.3.7	Dopamin bewirkt keine signifikante Veränderung striataler Netzwerkaktivität.	62
4	DISKUSSION	63
4.1	Experimentelle Methoden zur funktionellen Untersuchung neuronaler Netzwerke.....	63
4.2	Neurale Zellkulturen.....	64
4.3	Neuronale Netzwerkaktivität	65
4.4	Morphologische Netzwerkentwicklung von striatalen und corticalen Neuronen	66
4.5	Funktionelle Netzwerkentwicklung von striatalen und corticalen Neuronen	68
4.5.1	Synchrone Oszillationen	68
4.5.2	Synaptische Glutamat-Ausschüttung	69
4.5.3	Synaptische Glutamat-Rezeption	71
4.5.4	Synaptische GABA-Ausschüttung.....	72
4.5.5	Synaptische GABA-Rezeption.....	74
4.5.6	Blockade des einwärts gerichteten Kaliumgleichrichters durch Bariumchlorid.	75
4.5.7	Blockade anderer Kaliumkanäle durch Bariumchlorid.....	77
4.5.8	Dopamin-Rezeption	78
4.6	Cryokonservierung.....	79
4.7	Resümee und Ausblick.....	79

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	81
6	ABKÜRZUNGEN UND ZUSAMMENSETZUNGEN.....	82
6.1	Abkürzungen	82
6.2	Zusammensetzungen.....	84
7	LITERATURVERZEICHNIS	85
8	LEBENS LAUF	91
9	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	92
9.1	Artikel.....	92
9.2	Kurzdarstellungen.....	93
10	DANKSAGUNG	96

1 EINLEITUNG

1.1 Das Netzwerk bestimmt das Neuron

Die wenigsten isolierten Neurone feuern Aktionspotenziale. Auch wenn die Zellen selbst dafür alle Voraussetzungen erfüllen, benötigen sie für das Feuern von Aktionspotenzialen doch zwingend die synaptische Verbindung zu anderen Neuronen. Erst durch deren Einfluss gewinnt die einzelne Nervenzelle ihre Funktion. Gewissermaßen vermittelt also erst die Einbindung in ein neuronales Netz dieser Zelle die entscheidende Qualität, die sie als Neuron definiert. Die Einbettung in diese übergeordnete Struktur erfolgt auch *in vitro* spontan und selbst organisierend, ohne dass ein richtender Einfluss von außen notwendig ist. So können Zellkulturen unter gut kontrollierbaren Laborbedingungen wiedergeben, wie sich Neurone im Laufe der embryonalen Entwicklung zu höheren Organisationsformen zusammenfinden. Um sich einem Verständnis für die überaus komplexe Funktion des menschlichen Gehirns anzunähern, muss man über die Ebene einer Einzelzelle hinausgehend auch die nächst höhere Organisationsstruktur der kleinen neuronalen Netze in Augenschein nehmen. Wenn wir wissen, welche Mechanismen sie nutzen, um Informationen zu übermitteln, zu bewerten, zu speichern und auszugeben, ist der neuronale Code entschlüsselt.

Seit Luigi Galvani und Alessandro Volta die Bedeutung der Elektrochemie für die Reizweiterleitung zwischen Nerv und Muskel erkannten und Ramon y Cajal und Camillo Golgi mit der Aufklärung der morphologischen Struktur des Nervensystems begannen, hat die Neurowissenschaft zweifellos wichtige Fortschritte machen können. So klärten Alan Hodgkin und Andrew Huxley in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts die Mechanismen von Ruhe- und Aktionspotenzialen von Zellmembranen auf, während uns John Carew Eccles und Bernard Katz einem Verständnis für die synaptische Verknüpfungen zwischen Neuronen näher brachten (Hodgkin und Huxley, 1952; Eccles, 1957; Katz, 1971). Mithilfe der Patch Clamp-Technik, die in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt wurde, konnte nachgewiesen werden, dass Ionenkanäle für die elektrische Leitfähigkeit von Neuronen verantwortlich sind (Neher und Sakmann, 1976). Hierdurch wurde die Aufklärung von Wirkmechanismen neuronaler Aktivität bis auf molekulare Ebene hin möglich. Auch auf der obersten Organisationsebene des Gehirns konnten durch moderne Techniken neue Erkenntnisse gewonnen werden: Bildgebende Verfahren wie die funktionelle

Magnetresonanz-Tomographie (fMRT) oder die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und elektrophysiologische wie Elektroenzephalographie (EEG) und Magnetoenzephalographie (MEG) ermöglichten es, verschiedene kognitive Leistungen einzelnen Hirnarealen zuzuordnen und funktionelle Verbindungen aufzudecken (Gevins, Leong et al., 1995; Parsons, 2001; Loeb und Poggio, 2002).

2004 erschien in der Zeitschrift „Gehirn und Geist“ ein von elf Neurowissenschaftlern verfasstes Manifest über Gegenwart und Zukunft der Hirnforschung (Elger, Friederici et al., 2004). Die Autoren bemerkten, dass dem enormen Wissenszuwachs auf der obersten und untersten Ebene eine große Erkenntnislücke auf der mittleren Ebene gegenüberstehe. Über das Geschehen innerhalb kleinerer und größerer Zellverbände wisse man noch „erschreckend wenig“. Denn auch wenn der überwiegende Anteil neurophysiologischer Untersuchungen an Neuronen im Zellverbund durchgeführt wurde – sei es *in vivo*, an Hirnschnitten oder in Zellkultur – so lag das Augenmerk der Forscher doch meist auf Charakteristika der einzelnen Zelle, und die System-Neurophysiologie trat in den Hintergrund. Inwieweit das Verhalten dieser Zelle durch die Einbindung in ein Netzwerk geprägt wurde, und – umgekehrt – inwiefern die Manipulation der einzelnen Zelle die Funktion des Netzwerks beeinflusst, blieb bei diesen Untersuchungen unbeachtet. Dabei wird vernachlässigt, dass Netzwerke nichtlineare Systeme sind, d.h. sie sind mehr oder zumindest doch etwas anderes als die Summe seiner Teile. Auf Grund ihrer Komplexität bringen sie völlig neue Eigenschaften hervor.

1.2 Untersuchung von Netzwerkeigenschaften mit Mikroelektroden-Arrays

Um diesem Phänomen im Experiment Rechnung tragen zu können, müssen an verschiedenen Stellen des Netzwerks Elektroden appliziert und die elektrische Aktivität einzelner Zellen gleichzeitig abgeleitet werden. Dies ist mit herkömmlichen Methoden sehr aufwändig und verlangt vom Experimentator viel Zeit und Fingerspitzengefühl. Mit der Entwicklung von Mikroelektroden-Arrays (MEAs), die Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts begonnen wurde und mittlerweile auf kommerzielles Niveau ausgereift ist, wurde die Untersuchung von Netzwerkeigenschaften stark vereinfacht (Gross, Rieske et al., 1977): Nun wurden nicht mehr die Elektroden in das Netzwerk eingeführt, sondern das Netzwerk selbst auf ein Trägermaterial mit einem Gitter winziger Elektroden aufgebracht. So können

extrazelluläre Feldpotenziale von vielen verschiedenen Stellen eines neuronalen Netzwerks abgeleitet werden. Die zeitliche und räumliche Auflösung, die hiermit erreicht wird, ermöglicht die Detektion einzelner Aktionspotenziale. Mit MEAs sind allerdings nur extrazelluläre Ableitungen möglich. MEAs mit dreidimensionalen Elektroden, die sich in das Zellinnere bohren, stehen noch am Anfang ihrer Entwicklung (Trautmann, Ruther et al., 2004). Somit können mit MEAs keine Ionenströme über die Zellmembran gemessen werden, auch keine exzitatorischen oder inhibitorischen postsynaptischen Potenziale. Auch kann das Membranpotenzial nicht auf eine bestimmte Spannung eingestellt werden.

Mittlerweile gehen die Leistungsmerkmale verschiedener MEA-Typen dennoch schon über die reine Ableitung elektrischer Aktivität hinaus. MEAs verschiedener Hersteller erlauben die gleichzeitige elektrische Stimulation an mehreren Elektroden, andere messen pH oder Oxygenierung (Besl und Fromherz, 2002). Um den Zusammenhang zwischen Netzwerk-Geometrie und -Funktion zu untersuchen, gibt es Ansätze, das Neuritenwachstum auf den MEAs in gerichtete Bahnen zu lenken (Branch, Wheeler et al., 2001).

Da mittlerweile Materialien zur Herstellung von Elektroden, Isolierung und Trägermaterial gefunden wurden, die nicht cytotoxisch wirken, können Zellen auf MEAs auch für längere Zeit kultiviert werden. Durch Anpassung der Kulturbedingungen, die Verdunstung und die Gefahr durch Kontaminationen minimieren, können neuronale Zellen bis zu etlichen Monaten kultiviert werden (Potter und DeMarse, 2001). Sowohl die elektrophysiologische Aktivität von Hirnschnitten als auch von Zellkulturen kann so über lange Zeiträume hinweg beobachtet werden, wobei die Kultivierung von dissoziierten Zellen auf MEAs es erlaubt, die Entwicklung von isolierten Einzelzellen zu einem neuronalen Netzwerk morphologisch und funktionell zu untersuchen. Bisher wurden bereits Neurone des Rückenmarks, des Cortex, des Hippocampus und des Hypothalamus sowie olfaktorische und Retina-Neurone verschiedener Tierarten auf MEAs kultiviert. Dies ist allerdings nur mit Zellen von embryonalen oder neugeborenen Tieren möglich, da adulte Neurone zumeist die Fähigkeit verloren haben, neue neuronale Netzwerke zu bilden.

Die MEA-Technik ist schnell und leicht zu handhaben, daher bietet sie sich für das Screening von Substanzen auf ihre neuroaktive Wirksamkeit an. Neben zahlreichen „klassischen“ Substanzen der Elektrophysiologie, die die Funktion von Ionenkanälen oder Synapsen modulieren, unter anderem Bicucullin, NMDA, Magnesium, TTX, Serotonin, Dopamin, Strychnin und Glutamat (Gross, Harsch et al., 1997; Harsch, Ziegler et al., 1997;

Keefer, Gramowski et al., 2001; Chiappalone, Vato et al., 2003; Otto, Gortz et al., 2003; Eytan, Minerbi et al., 2004; Arnold, Hofmann et al., 2005; Krause und Jia, 2005), wurden bereits Pharmaka mit einer bekannten zentralnervösen Wirkung wie Ethanol, Fluoxetin, Lidocain und Chloroquin auf MEAs aufgebracht (O'Shaughnessy, Zim et al., 2003; Xia, Gopal et al., 2003; Xia und Gross, 2003; Otto, Kieseier et al., 2005). Ebenso wurde mit MEAs das akute neurotoxische Potenzial chemischer Verbindungen am Beispiel von Trimethylolpropan, Trimethylzinn und Hydrolyseprodukten von Sarin getestet (Gramowski, Schiffmann et al., 2000; Keefer, Gramowski et al., 2001; Pancrazio, Keefer et al., 2001; Gopal, 2003).

Durch genaue Analyse der neuronalen Aktivität nach Applikation von bekannten Substanzen, deren Wirkmechanismen gut definiert sind, hofft man, substanzspezifische Änderungen des Aktivitätsmusters erkennen zu können, die sich auf andere Substanzen übertragen lassen, um so indirekt ein Wirkprofil erstellen zu können (Gramowski, Jugelt et al., 2004). In der klinischen Forschung werden MEAs eingesetzt, um körpereigene Substanzen zu identifizieren, die eine neurologische Symptomatik bei bestimmten Stoffwechsel- oder Autoimmunerkrankungen auslösen können (Görtz, Hoinkes et al., 2004; Klusmann, Fleischer et al., 2005; Otto, Kieseier et al., 2005). Hierfür wird auch Serum und Liquor von Patienten auf MEAs getestet (Mitzner, Looock et al., 2002; Görtz, Otto et al., 2003).

Ein anderer Schwerpunkt der MEA-Forschung ist der Aufbau von Feedback-Systemen, bei denen das MEA-System mit einem Stimulus-Generator rückgekoppelt ist. Ziel ist es, ein lernfähiges Netzwerk zu erzeugen, das auf äußere Reize reagiert, sich ihnen anpasst und so mit der Umwelt kommuniziert (DeMarse, Wagenaar et al., 2001; Potter, Wagenaar et al., 2003; Potter, Wagenaar et al., 2005; Wagenaar, Madhavan et al., 2005; Cozzi, D'Angelo et al., 2006). Andere Wissenschaftler setzen MEAs als ergänzendes Instrument ein, um Erkenntnisse, die sie bei Messungen an Einzelzellen gewonnen haben, in den größeren Kontext des neuronalen Netzes einzuordnen (Pancrazio, Keefer et al., 2001; Arnold, Hofmann et al., 2005; Sergeeva, Klyuch et al., 2006). Da Zellen über längere Zeiträume auf MEAs kultiviert werden können, bietet sich diese Technik auch für Forschungszweige an, die die Entwicklung von Zellen manipulieren. So wurden embryonale Stammzellen der Maus auf MEAs zu schlagenden Cardiomyocyten differenziert (Hescheler, Halbach et al., 2004). Stammzellen können auch zu Neuronen differenziert werden und sind damit Hoffnungsträger für viele Patienten, die an neurodegenerativen Erkrankungen leiden. Bisher konnten sie aber *in vitro* noch nicht zu funktionstüchtigen Netzwerken differenziert werden.

1.3 Das Striatum – Schlüsselement neurodegenerativer Erkrankungen

Da es für neurologische Fragestellungen von besonderem Interesse ist, wurden für diese Arbeit Zellen aus dem Striatum eingesetzt, einem Hirnareal, das als Teil der Basalganglien unterhalb des Cortex liegt und mitverantwortlich für die Bewegungskontrolle ist. Was der Ausfall dieses Hirnareals für den gesamten Organismus bedeutet, sieht man sehr eindrücklich an der Huntington-Krankheit. Bei Patienten mit dieser genetisch bedingten Erkrankung kommt es aus bisher ungeklärter Ursache zu einem selektiven Absterben der Neurone im Striatum. Im Anfangsstadium der Erkrankung stehen zunächst psychische Auffälligkeiten wie erhöhte Reizbarkeit und Aggressivität, aber auch Depressionen im Vordergrund. Im weiteren Verlauf treten unwillkürliche Bewegungen von Rumpf und Extremitäten auf, oftmals verbunden mit einem leicht tänzelnden Gang, was zum im Volksmund geläufigen Namen „Veitstanz“ führte. Auch der häufigsten neurologischen Erkrankung im höheren Lebensalter, der Parkinson-Krankheit, liegt eine Störung der striatalen Funktion zugrunde. Neurone eines anderen Teils der Basalganglien, der Substantia nigra, projizieren in das Striatum und setzen dort Dopamin frei. Gehen diese Zellen zu Grunde, resultiert dies in einem Dopamin-Mangel im Striatum, der die vor allem mit Bewegungsstörungen einhergehende Parkinson-Symptomatik auszulösen scheint.

1.4 Striatale Netzwerkaktivität und wodurch sie bestimmt wird

Während die Elektrophysiologie der verschiedenen Zelltypen im Striatum auf Einzelzell-Ebene sehr gut charakterisiert ist, gibt es auf Netzwerkebene noch Klärungsbedarf. So existieren z.B. widersprüchliche Berichte darüber, ob striatale Neurone *in vitro* überhaupt Netzwerkaktivität entwickeln. Während Kowalski et al. Synapsenbildung und synchrone Spike-Bursts beobachteten, konnten Segal et al. nur dann funktionelle Synapsen in striatalen Kulturen entdecken, wenn ihnen ein geringer Anteil corticaler Neurone zugesetzt worden war (Kowalski, Crest et al., 1995; Segal, Greenberger et al., 2003). Beide Studien wurden übrigens mit herkömmlichen elektrophysiologischen Methoden und nicht mit MEAs durchgeführt. Wenn Ergebnisse von Einzelzell-Studien auch nicht eins zu eins auf das Netzwerk übertragbar sind, so stellen sie doch die Basis dar, auf der MEA-Experimente aufbauen, und geben wertvolle Hinweise auf Parameter, durch die das Netzwerk besonders bestimmt wird. So wurden für eine gezielte Charakterisierung der Aktivität striataler Netzwerke solche

Substanzen ausgewählt, die sich auch schon auf Ebene der einzelnen Zelle als relevant herausgestellt hatten.

Etwa 90 % der striatalen Neurone gehören der Gruppe der so genannten „dornigen Projektionsneuronen“ an, die den inhibitorischen Neurotransmitter GABA freisetzen. GABA bindet auf postsynaptischer Seite an Rezeptoren, die den Einstrom von Chlorid-Ionen ins Zellinnere auslösen, was eine Hyperpolarisation des Membranpotenzials zur Folge hat und das Auslösen eines Aktionspotenzials erschwert. Blockade der entsprechenden Rezeptoren, z.B. durch Bicucullin, steigert die Aktivität des postsynaptischen Neurons aber nur dann, wenn GABA im Zellsystem zur Verfügung steht. Im Cortex ist der Anteil GABAerger Neurone deutlich geringer als im Striatum, daher sollte ein GABA-Rezeptor-Blocker die Netzwerkaktivität nicht sehr stark verändern. Das Alkaloid Bicucullin blockiert selektiv eine bestimmte Klasse der GABA-Rezeptoren, die GABA_A-Rezeptoren. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich durch Applikation von Bicucullin die neuronale Netzwerkaktivität striataler Kulturen verändert.

Charakteristisch für die dicht mit dendritischen Dornen besetzten GABAergen Projektionsneurone ist, dass ihr Membranpotenzial zwei Zustände einnehmen kann – einen hyperpolarisierten „Down-State“ und einen leicht depolarisierten „Up-State“. Nur aus dem „Up-State“ heraus können Aktionspotenziale gefeuert werden. Der Übergang vom „Down“- zum „Up-State“ erfolgt bei starkem und kohärentem exzitatorischen, d.h. depolarisierenden, Einfluss. Ist dieser Einfluss zu schwach oder zeitlich nicht kohärent genug, wird er durch einen starken einwärts gerichteten Kaliumgleichrichterstrom (K_{ir}) kompensiert. Barium blockiert Kaliumkanäle, indem es sich – ähnlich wie der Natriumkanal-Blocker Tetrodotoxin – in die Pore eines Kanals setzt und ihn so für Kalium-Ionen undurchlässig macht. Barium zeigt eine hohe Affinität für Kaliumkanäle, die den K_{ir} bestimmen, blockiert aber auch unspezifisch andere Kanäle, z.B. solche, die für die Repolarisation nach dem Feuern eines Aktionspotenziales (spannungsabhängige Kaliumkanäle; K_v) verantwortlich sind.

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. Seine Ausschüttung aktiviert verschiedene Rezeptorentypen an der postsynaptischen Membran: Metabotrope Glutamat-Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptoren sind Ionenkanäle, durch deren Öffnung die Zellmembran depolarisiert wird. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass vor allem NMDA-Rezeptoren das Aktivitätsmuster neuronaler Kulturen bestimmen (Keefer, Gramowski

et al., 2001). Dockt Glutamat postsynaptisch an ionotrope Rezeptoren an, erhöht sich die Leitfähigkeit für positive Ionen, so dass Natrium und Calcium ins Zellinnere fließen und dadurch das Membranpotenzial depolarisieren. Wenn sich genügend exzitatorische postsynaptische Potenziale (EPSPs) aufsummieren, wird im postsynaptischen Neuron ein Aktionspotenzial ausgelöst, das durchs Axon weitergeleitet wird. Im adulten Gehirn erhält das Striatum allerdings exzitatorischen Input allein durch corticale Neurone, die ins Striatum projizieren und dort Glutamat ausschütten. Unter Kulturbedingungen fehlt dieser Einfluss. Um zu überprüfen, ob die striatalen Neurone *in vitro* selbst Glutamat ausschütten, wurden NMDA-Rezeptoren mit dem selektiven Antagonisten APV blockiert. Nur wenn sich Glutamat im Zellsystem befindet, sollte APV die Netzwerkaktivität beeinflussen.

Da der Neurotransmitter Dopamin für die Entstehung der Parkinson-Symptomatik eine so entscheidende Rolle spielt, interessierte auch der Einfluss von Dopamin auf die Aktivität der auf den MEA kultivierten striatalen Zellen. Dopamin wird von Zellen der Substantia nigra freigesetzt, die ins Striatum projizieren. Bisher wurden mindestens fünf Rezeptor-Subtypen charakterisiert, die in D₁-ähnliche und D₂-ähnliche Rezeptoren unterteilt werden und teils entgegengesetzte Effekte in der Zelle auslösen.

1.5 Fragestellung

Das Striatum ist ein mit anderen Hirnarealen stark verschalteter Teil der Basalganglien, der von einem hohen Anteil gleichförmiger GABAerger Zellen gebildet wird. Das Membranpotenzial dieser GABAergen dornigen Projektionsneurone fluktuiert zwischen einem hyperpolarisierten und einem leicht depolarisierten Zustand, aus dem heraus Aktionspotenziale gefeuert werden können. Die Übergangswahrscheinlichkeit zum depolarisierten Zustand kann durch die Gabe von Bariumchlorid erhöht werden, das einwärts gerichtete Kaliumgleichrichter blockiert. Exzitatorischen Einfluss erhält das Striatum *in vivo* von Afferenzen aus dem Cortex.

Ausgehend von diesen bekannten Merkmalen des Striatums sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Entwickeln striatale Zellen, die stark GABAerg geprägt sind, *in vitro* ein spontan aktives oszillatorisches Netzwerk, wie es von glutamatergen Hirnarealen (z.B. Cortex, Hippocampus) bekannt ist?

- Wie wirkt sich die Blockade von GABA-Rezeptoren auf die räumliche und zeitliche Organisation der elektrischen Aktivität striataler Netzwerke aus?
- Welchen Effekt hat Bariumchlorid und damit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für ein leicht depolarisiertes Membranpotenzial auf die striatale Netzwerkaktivität?
- Können striatale Zellen *in vitro* exzitatorischen Einfluss generieren, und was bewirkt eine zusätzliche Gabe des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden dissoziierte Zellen aus dem Striatum der Ratte auf MEAs ausgesät, über einen Zeitraum von mehreren Monaten kultiviert und währenddessen das räumliche und zeitliche Muster ihrer spontanen elektrischen Aktivität bestimmt. Um entwicklungspezifische Charakteristika einzubeziehen, wurden sowohl Zellen embryonaler (E15) als auch postnataler Wistar-Ratten (P0/P1) präpariert. Ebenso untersucht wurden striatale Zellen, die aus embryonalen Sprague-Dawley-Ratten (E18/19) gewonnen und anschließend cryokonserviert worden waren. Um die Eigenschaften dieser GABAerg geprägten Netzwerke mit glutamaterg dominierten Netzwerken zu vergleichen, wurden ebenfalls embryonale corticale Zellen auf MEAs kultiviert (E18/E19; Sprague-Dawley). Der Cortex ist bei der Ratte ebenso wie beim Menschen das größte Hirnareal und von besonderem neurophysiologischen Interesse, da er für die höheren kognitiven Leistungen verantwortlich ist. Der Anteil GABAerger Neurone und der Grad synaptischer Verschaltung innerhalb der Netzwerke wurde mithilfe der Immunocytochemie bestimmt.

Nachdem zunächst die Entwicklung der Aktivität im Laufe der Kultivierung beobachtet worden war, wurde das Aktivitätsmuster der striatalen und corticalen Netzwerke durch Applikation von neuroaktiven Substanzen moduliert, die auf Ionenkanäle wirken oder die synaptische Übertragung beeinflussen (Kaliumkanal-Blocker, GABA-Antagonisten, Glutamat-Antagonisten, Glutamat und Dopamin).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellkultur

2.1.1 Cryokonservierte corticale und striatale Zellen der Ratte

Aliquots dissoziierter Zellen aus dem Cortex (Rat Brain Cortex) und dem Striatum embryonaler Sprague-Dawley Ratten (Rat Brain Striatum; QBM Cell Science, Ottawa, Canada) wurden bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff gelagert. Jedes Aliquot enthielt vier Millionen Zellen eines gepoolten Präparationsansatzes von 80-90 Embryonen (Entwicklungstag 18-19). Durch eine 2-minütige Inkubation in 37 °C warmen Wasser wurden die Zellen aufgetaut, in ein Falcon-Tube überführt und anschließend vorsichtig und tropfenweise mit Nährmedium auf die gewünschte Zelldichte verdünnt. Durch sanftes Wiegen wurden die Zellen gleichmäßig verteilt. 125 µl bzw. 100 µl der Zellsuspension wurden als Tropfen auf die MEAs oder Deckgläschen aufgebracht, die anschließend im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte inkubiert wurden. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit 1,6 ml Nährmedium bedeckt.

2.1.2 Präparation striataler Zellen von embryonalen und postnatalen Ratten

Für die Präparation postmitotischer embryonaler Neurone wurden trächtige Wistar-Ratten am Embryonaltag 15 mit einer Überdosis des Narkosemittels Ethrane betäubt und getötet. Der Uterus mit den Embryonen wurde steril entnommen und in eine große Petrischale überführt. Nach der Dekapitation der Embryos wurde der Schädel geöffnet und das Gehirn entnommen. Ebenso wurde mit neugeborenen Ratten verfahren. Nach Entfernung der Meningen wurde ein Coronar-Schnitt an Position Bregma 1,5 gesetzt, um den äußersten, rostralen Teil des Gehirns abzutrennen. Ein zweiter Schnitt an Bregma -0,6 trennte den okzipitalen Teil des Gehirns ab. Anschließend wurde der Schnitt unter dem Biokular betrachtet. Deutlich erkennbar waren die Ventrikel, unterhalb derer sich die Striata befinden, die nur noch an der caudalen Seite mit einer feinen Pinzette vom umgebenden Gewebe abgelöst werden mussten.

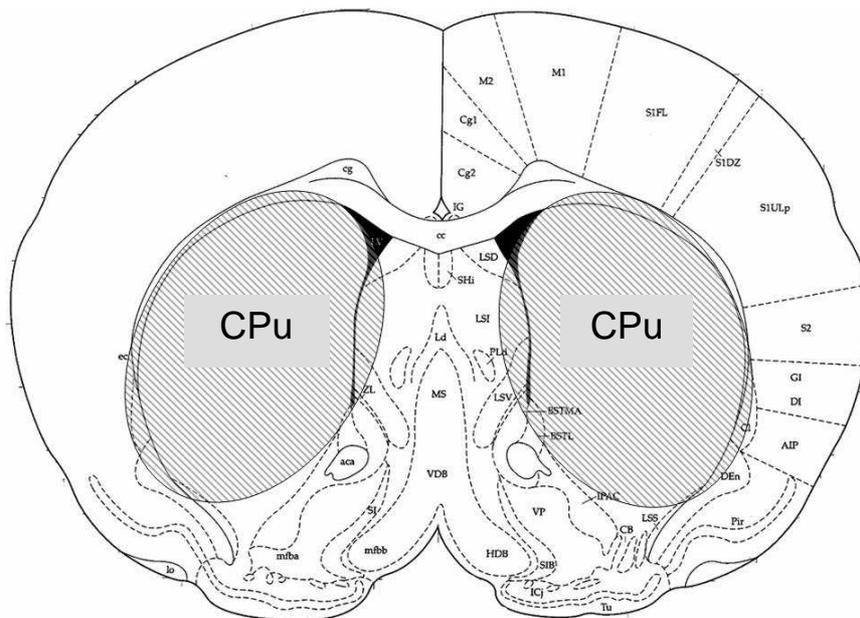


Abbildung 1: Querschnitt durch das Gehirn einer Ratte. Die schraffierten Bereiche wurden für unsere Untersuchung striataler Zellen präpariert. Das Striatum setzt sich aus dem Nucleus caudatus und dem Putamen zusammen. Da diese beiden Strukturen aber im Rattengehirn nicht wie beim Menschen räumlich voneinander getrennt sind, werden sie zum Caudate putamen (CPu) zusammengefasst. An das Putamen grenzt medial der Globus Pallidus an, der bei der Präparation nicht vom Striatum isoliert wurde (nach Paxinos and Watson: The rat brain in stereotaxic coordinates; Academic Press, San Diego, 1998).

Die Striata wurden mit PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen und anschließend mit dem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Zum Aufschluss des Gewebes wurde es in ein oder zwei mit 500 µl Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) gefüllte Reaktionsgefäße überführt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Trypsin/EDTA-Lösung vorsichtig abgesaugt und die Gewebefragmente zweimal mit PBS gewaschen. Nach einem Waschschriff mit v10-Nährmedium wurden die Gewebefragmente in diesem Medium aufgenommen und mit einer Pipette trituiert, um die Zellen zu vereinzeln. Die Gefäße wurden nun für 5 min stehen gelassen, damit sich größere Gewebereste absetzten. Diese wurden – nach Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß – mit frischem Medium erneut trituiert. Auch dieser Überstand wurde überführt, und die Zellsuspension anschließend für 5 min bei 1.600 rpm in einer Heraeus SEPATECH Biofuge 13 zentrifugiert (~ 2.000 g). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet durch sanftes Trituieren in mv10-Nährmedium aufgenommen. Zur Ermittlung der Zelldichte wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung (Sigma, Taufkirchen) verdünnt und in einer Thoma-Kammer ausgezählt. Es ergab sich eine durchschnittliche Ausbeute von 1,5 Millionen Zellen pro präpariertem Embryo. Tropfen der Zellsuspension wurden auf das Elektrodenfeld der MEAs (125 µl) und auf Deckgläschen (100 µl) aufgebracht.

Nach einer etwa vierstündigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte waren die Zellen am Boden angehaftet und die MEAs wurden mit 1,6 ml, die Deckgläschen mit 1 ml angewärmten Nährmedium bedeckt. Nach frühestens vier Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel, der ab dann zweimal in der Woche durchgeführt wurde.

2.1.3 Vorbereitung der MEAs und Deckgläschen

Glas-Deckgläschen mit einem Durchmesser von 13 mm wurden zur Sterilisation bei 180 °C für zwei Stunden gebacken und steril einzeln in die Vertiefungen eines 6-wells überführt. Die Deckgläschen wurden mit jeweils 1 ml Poly-D-Lysin (PDL; Sigma, Taufkirchen) in PBS (1 mg / ml) bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Deckgläschen in ein neues 6-well überführt, dreimal mit PBS gewaschen, mit 13 µg / ml Laminin (Sigma, Taufkirchen) in PBS bedeckt und wiederum über Nacht bei 4 °C inkubiert. Laminin ist ein Protein der extrazellulären Matrix und dient – ebenso wie PDL – der Anheftung der neuronalen Zellen auf dem Substrat und fördert zudem das Neuriten-Wachstum. Die MEAs wurden vor dem Gebrauch in destilliertem Wasser gelagert. Vor einer Aussaat wurden sie gereinigt, indem sie für 30 min in 3 %iger BM-Lösung (Biomed Labordiagnostik, Oberschleißheim) inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser abgespritzt wurden. Dies diente dem Abwaschen möglicher Zellreste und Verunreinigungen, die von der letzten Aussaat zurückgeblieben waren. Nachdem die MEAs dann gründlich mit destilliertem Wasser abgespült worden waren, erfolgte die einstündige Sterilisation in Methanol. Die einzelnen MEAs wurden anschließend unter der Sterilbank zum Abdampfen des Methanols schräg an die Unterseite einer Petrischale gelehnt. Nach dieser etwa viertelstündigen Trocknungsphase wurden sie in die Petrischalen gesetzt und in gleicher Weise wie die Deckgläschen mit PDL und Laminin beschichtet. Vor der Aussaat wurden MEAs und Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und 15 min unter der Sterilbank getrocknet, um ein Verlaufen der Zellsuspension, die als Tropfen aufgebracht wurde, zu verhindern. Anschließend wurden sie in den Brutschrank (37 °C / 5 % CO₂ / 95 % relative Luftfeuchte) überführt. Nach etwa 4 Stunden wurden pro MEA 1,6 ml und pro Deckgläschen 1 ml Nährmedium zugegeben.

2.2 Immunocytochemie

Parallel zur Kultivierung auf MEAs wurden Zellen für immunocytochemische Untersuchungen auf PDL- und Laminin-beschichtete Deckgläschen ausgesät, die in den Vertiefungen eines Multiwells eingelegt waren. Zu Zeitpunkten, wenn die Kulturen auf den MEAs spontane Spike-Aktivität zeigten, wurden diese fixiert. Die Deckgläschen wurden hierzu in eine mit feuchtem Whatman-Papier und Parafilm ausgelegte Petrischale überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 15 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Zum Nachweis des kleinen Moleküls GABA wurde eine abgewandelte Fixierungsmethode verwandt, die einen höheren Vernetzungsgrad bewirkt. Hierfür wurden die Zellen für 5 min mit 4 % PFA und 0,3 % Glutardialdehyd und anschließend 20 min mit 1 M Ethanolamin inkubiert. Ethanolamin dient zur Absättigung noch freier Aldehydgruppen, die den Antikörper unspezifisch binden könnten. Auch bei Doppelfärbungen von GABA und anderen Antigenen, die z.B. der Bestimmung des GABAergen Zellanteils dienen, wurde diese Fixierungsmethode gewählt. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläschen für 30 min mit 10 % Ziegen Serum und 0,03 % Triton X100 (Sigma, Taufkirchen) in PBS inkubiert.

Die Reaktion mit dem Erstantikörper – oder bei Doppelfärbungen mit den beiden Erstantikörpern – erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Antikörper wurden in den folgenden Verdünnungen eingesetzt. Auch die Inkubation mit den betreffenden Zweitantikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C.

- Mouse anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody (Chemicon, Temecula, USA): 1:1000
- Rabbit polyclonal antiserum cocktail to neurofilaments (Biotrend, Köln): 1:250
- Monoclonal anti-synaptophysin IgG (Sigma, Taufkirchen): 1:50
- rabbit anti-GABA antibody (Sigma, Taufkirchen): 1:1000
- monoclonal Anti-MAP2 (microtubule associated protein) antibody (Sigma, Taufkirchen): 1:500
- Goat-anti-mouse IgG-FITC (Southern Biotech, Birmingham, USA): 1:100
- Rhodamine Red-X goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, USA): 1:1000

Als Negativkontrolle dienten Deckgläschen mit Zweit- aber ohne Erstantikörper. Nach einer Zellkernfärbung mit DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol; Boehringer, Mannheim) wurden die Deckgläschen mit Citifluor (Electron Microscopy Sciences, Hartfield, USA) eingedeckelt und bei 4 °C gelagert. Die Auswertung der immunocytochemischen Färbungen erfolgte mit dem Nikon Eclipse TE 200 Fluoreszenzmikroskop. Zufällig ausgewählte Gesichtsfelder wurden zuerst fotografiert und anschließend mit Hilfe der Lucia Software computerunterstützt ausgewertet.

2.3 Elektrophysiologie

2.3.1 Technische Ausrüstung

Zur Ableitung extrazellulärer Potenziale wurden die Zellen auf der Glasoberfläche von Mikroelektroden-Arrays (MEAs; Multichannel Systems, Reutlingen) mit 59 Messelektroden und einer Erdelektrode kultiviert (Abbildung 2). Die 30 µm großen Elektroden bestehen aus einer Titan/Titannitrid-Legierung, die Isolationsschicht aus Siliciumnitrid (SiN). Die Elektroden sind in einer 1,6 mm² großen, quadratischen 8x8-Matrix mit einem Abstand von jeweils 200 µm voneinander angeordnet (Abbildung 3).

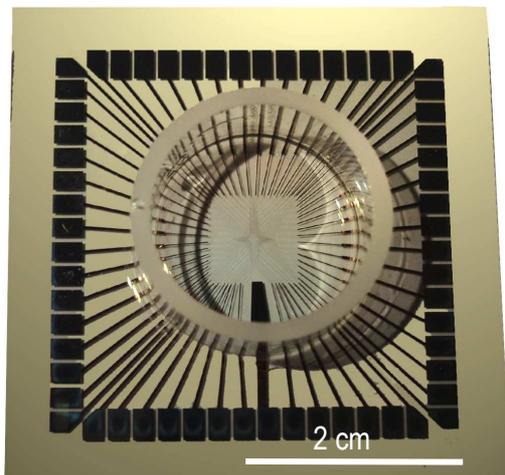
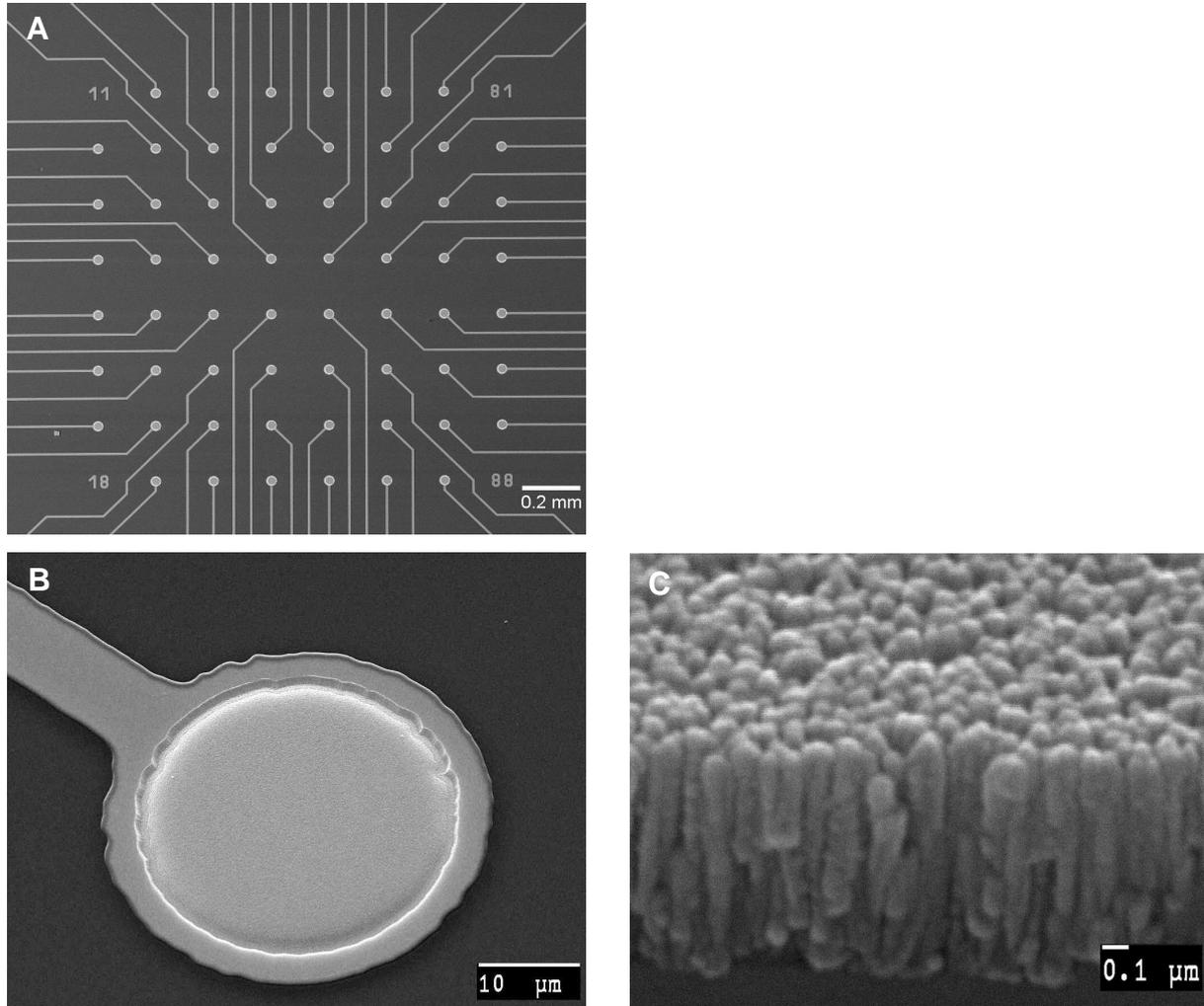


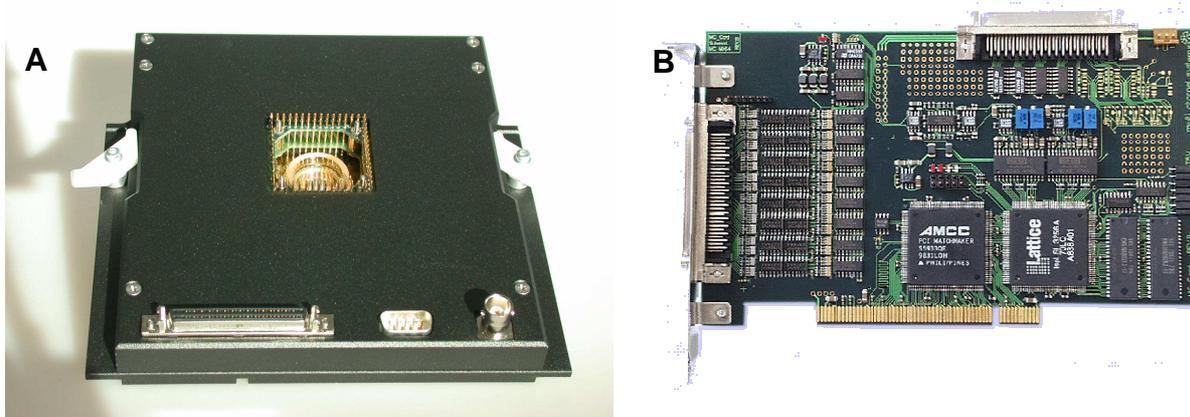
Abbildung 2: Mikroelektroden-Array (MEA) von Multichannel Systems (Reutlingen). Sechzig mit Siliciumnitrid isolierte Ableitbahnen aus Titan führen zu den Kontaktplättchen, auf die nach Einspannen in den MEA-Verstärker die Abnehmer aufsetzen. Das Elektrodenfeld befindet sich in der Mitte des sternförmigen Musters, das in der Mitte des MEAs erkennbar ist. Bei der Aussaat wird hier ein Tropfen der Zellsuspension appliziert. Der Glasring, der auf dem MEA befestigt ist, ermöglicht die Zugabe von Nährmedium oder Badlösung.

Abbildung 3: A) Das zentrale Elektrodenfeld mit den 60 Titannitrid-Elektroden des MEAs, die in einem Abstand von 200 μm lokalisiert sind. (B) Der Durchmesser einer einzelnen Elektrode beträgt 30 μm . (C) Titannitrid ist in Säulen organisiert. Die daraus resultierende große Oberfläche gewährleistet eine gute Signalauflösung.



Jeder Elektrode ist eine Nummer zugeordnet, die ihrer vertikalen und horizontalen Position innerhalb der Matrix entspricht. In den vier Eckpositionen mit den Nummern 11, 18, 81 und 88 befinden sich keine Elektroden. Jeder Elektrode ist ein einzelner Messkanal (Channel) zugeordnet. Leiterbahnen aus Titan führen zu Kontaktplatten, auf die die Abnehmer des Verstärkers nach Einspannen des MEAs in die Messapparatur aufsetzen. Der mit einer integrierten Heizplatte ausgestattete Verstärker ist durch ein Kabel mit der MC-Card verbunden, die an das Mainboard eines handelsüblichen PCs angeschlossen wird und mit einer Abtastrate von 25 kHz arbeitet (Abbildung 4). Signale wurden mit der Software MCRack (Multichannel Systems; Reutlingen) visualisiert und aufgenommen.

Abbildung 4: A) Die Rohdaten der 60 Elektroden werden amplifiziert durch den Vor- und Filter-Verstärker. MEAs werden direkt in den Verstärker eingesetzt. B) Die MC-Card (Multichannel Systems, Reutlingen) wird an das Mainboard eines handelsüblichen PCs angeschlossen und kann von sechzig Kanälen simultan aufnehmen. Sie konvertiert analoge Signale in Echtzeit in digitale Datenströme bei einer Abtastrate von 25 kHz.



2.3.2 Signaldetektion und Messparameter

Die nachgeschaltete Analyse und Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm SpAnNer (Result, Tönisvorst). Da die Elektroden ein unterschiedlich starkes Grundrauschen aufweisen können, wurde für jeden Kanal während einer 10 %igen „Lernphase“ zum Beginn jeder Messung die jeweilige Spikeschwelle individuell bestimmt. Die Spikeschwelle entspricht dem Achtfachen der Standardabweichung der durchschnittlichen Rauschamplitude während der Lernphase. Nur solche Signale wurden als Spike gewertet, die eine maximale Breite von 2 ms nicht überschritten und eine Refraktärzeit von 4 ms einhielten. Bursts sind Gruppen von schnell aufeinander folgenden Spikes. Ein Entropie-basierter Algorithmus wurde zur Burst-Erkennung eingesetzt. Eine minimale Entropie von 5 war Voraussetzung für eine Gruppe von mindestens drei Spikes, um als Burst erkannt zu werden. Die Zahl der spontanen Spikes und Bursts wurde über alle Elektroden gemittelt.

Weitere Parameter, die im Folgenden zur Beschreibung der spontanen Netzwerkaktivität und ihrer Modulation durch neuroaktive Substanzen verwendet werden, sind die durchschnittliche Amplitude der Aktionspotenziale, die Burst-Dauer und die durchschnittliche Anzahl von Spikes, die einen Burst ausmachen. Um das räumlich-zeitliche Organisationsmuster der spontanen Aktivität zu beschreiben, wurde der Anteil von Spikes, die Teil eines Bursts waren (im Gegensatz zu einzelnen Spikes), ausgewertet. Das Unterteilen der Messungen in „Bins“ von 100 ms Dauer diente dazu, die Gleichförmigkeit von Spike-Aktivität

über alle Elektroden hinweg zu charakterisieren. Ein hoher Anteil von Bins mit keiner Aktivität („leere Bins“) deutet entweder auf generell schwache Aktivität hin oder auf eine hohe Konzentration der Spikes innerhalb weniger Bins. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn alle Spikes nur in auf allen Elektroden synchronen Bursts organisiert sind (ein Burst umfasst in der Regel zwei bis drei Bins von 100 ms Länge).

Der Parameter Cohen's Kappa misst die Koinzidenz der Spike-Aktivität auf zwei Elektroden, die über die zufallsbedingte Koinzidenz hinausgeht. Auch für die Berechnung dieses Parameters wurden die Messungen in Bins von 100 ms Länge unterteilt. Theoretisch kann Kappa Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen. Ein Wert von 1 beschreibt maximale Koinzidenz. Bei einer Anzahl von Koinzidenzen, die bei rein zufällig verteilten Spikes auftreten würde, beläuft sich Kappa auf 0 . Wenn weniger Koinzidenzen auftauchen, als nach der Feuerrate der beiden Kanäle zu erwarten gewesen wäre (Spikes sich also eher zu vermeiden scheinen), nimmt Cohen's Kappa negative Werte an. Für N Paare von aktiven Elektroden, werden $N \cdot (N-1)/2$ verschiedene Kappa-Werte berechnet. Um die Verteilung von Kappa über den ganzen Neurochip zu beschreiben, wurde der Mittelwert m_k aus den Kappa-Werten für die einzelnen Elektrodenpärchen bestimmt.

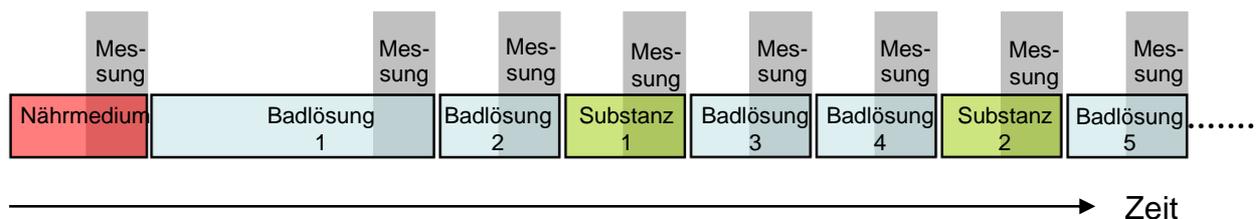
2.3.3 Messprotokoll

Die Neurochips wurden wenige Tage nach Aussaat der Zellen zum ersten Mal in die Messapparatur eingespannt und die elektrische Aktivität in Nährmedium zwei bis drei Minuten abgeleitet und aufgenommen. Dies wurde im weiteren Verlauf der Kultivierung mehrfach wiederholt, um das Entstehen eines funktionellen neuronalen Netzwerks zu dokumentieren.

Um die Effekte von Substanzen auf die neuronale Netzwerkaktivität zu untersuchen, wurden Messreihen in Standard-Badlösung durchgeführt. Diese Badlösung mit standardisierten Ionenkonzentrationen ist mit einem HEPES/NaOH-Puffer auf einen physiologischen pH-Wert von $7,4$ eingestellt, der – anders als Nährmedium – auch ohne Begasung mit CO_2 stabil bleibt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle für die Experimente benötigten Chemikalien bei Sigma (Taufkirchen) erworben. Für die Messreihen wurden solche Neurochips verwendet, die auf vielen Kanälen Aktivität zeigten und kleine Zeitintervalle zwischen synchronen Bursts aufwiesen (kurze Interburst-Intervalle). Nachdem der Neurochip in die Messapparatur eingespannt worden war, wurde eine Messung

durchgeführt, dann das Nährmedium abgenommen und die Zellen mehrmals mit 1 ml Badlösung gewaschen.

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Messprotokolls zur Untersuchung einer Substanzwirkung auf die neuronale Netzwerkaktivität.



Nach einer etwa zwanzigminütigen Adaptionsphase wurde die erste zwei- bis dreiminütige Kontrollmessung gestartet. Daraufhin wurde die Badlösung ausgetauscht und eine zweite Kontrollmessung aufgenommen, um zu kontrollieren, ob die Aktivität ein stabiles Plateau erreicht hatte. Da der Flüssigkeitsaustausch auf dem MEA zu Artefakten führt, wurden die Aufnahmen immer erst ~30 Sekunden nach Zugabe der Flüssigkeit gestartet. Nach diesen zwei Kontrollmessungen erfolgte die erste Messung mit Substanz in einer bestimmten Konzentration, gefolgt von zwei weiteren Kontrollmessungen und der nächsten Messung in einer anderen Konzentration oder mit einer anderen Substanz (Abbildung 5). Die jeweils zwei Kontrollmessungen dienten dazu, die Stabilität des Aktivitätsmusters zu bestimmen und so abschätzen zu können, ob eine eventuelle Änderung der Aktivität tatsächlich auf Substanzapplikation zurückzuführen oder nur Ausdruck der intrinsischen Variabilität des Netzwerkes war. Substanzeffekte werden im Folgenden immer angegeben im Vergleich zum Mittelwert der vorhergehenden und nachfolgenden Kontrollmessung. Eine Messreihe dauerte bis zu zwei Stunden. Anschließend wurde die Badlösung wieder gegen Nährmedium ausgetauscht, der MEA aus der Messapparatur gelöst und in einer Petrischale stehend zurück in den Brutschrank gestellt. Die Zellen auf den MEAs konnten mehrmals vermessen werden, und die Aktivität blieb über mehrere Wochen hinweg stabil.

2.4 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, verstehen sich Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung. Der Student's t-Test wurde verwendet, um die statistische Signifikanz von Unterschieden zu bestimmen. Bei einer Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ für den Fehler erster Art wurden Unterschiede als signifikant gewertet.

Wären Spike unabhängig voneinander zufällig verteilt, so ließe sich die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Anzahl von Spikes innerhalb eines Zeitintervalls (Bin) bei gegebener Spikefrequenz mithilfe der Poisson-Verteilung berechnen:

$$p_{\lambda}(\kappa) = \frac{\lambda^{\kappa}}{\kappa!} e^{-\lambda}$$

Wobei κ die Anzahl der Spikes pro Bin darstellt und λ die erwartete Anzahl von Spikes pro Bin (Spikefrequenz). Die Wahrscheinlichkeit für einen Bin ohne Spikes ($\kappa=0$) beträgt demzufolge: $p_{\lambda}(0) = e^{-\lambda}$

3 ERGEBNISSE

3.1 Entwicklung von neuronalen Netzwerken am Beispiel corticaler und striataler Zellen

3.1.1 Corticale aber nicht striatale Zellen entwickeln ein neuronales Netzwerk *in vitro* (CryoCortex / CryoStriatum)

CryoCortex und CryoStriatum wurden aus Sprague-Dawley-Ratten an den Embryonaltagen 18 und 19 präpariert. Beide Zelltypen werden tiefgefroren in der gleichen Zelldichte (4×10^6 / ml) geliefert. Standardmäßig wurden die Cortex-Zellen in einer Dichte von 100.000 Zellen / cm^2 auf MEAs und Deckgläschen ausgesät. Da nach Herstellerangaben 80-90 % der Cryo-Zellen in den ersten Tagen nach Aussaat absterben, waren die effektiven Zelldichten nach mehreren Tagen in Kultur vermutlich deutlich niedriger als die Aussaatdichten. Innerhalb weniger Stunden nach Aussaat hafteten die Zellen fest auf der Oberfläche, und die Neurone begannen Ausläufer zu bilden. Nach wenigen Tagen in Kultur konnte bei CryoCortex eine deutliche morphologische Vernetzung beobachtet werden. Damit einher ging das Feuern erster vereinzelter Aktionspotenziale (Spikes) auf wenigen Elektroden. Im Verlaufe der weiteren Kultivierung erhöhte sich sowohl die Spike-Frequenz als auch die Anzahl der Elektroden, von denen Aktivität detektiert wurde. Nach etwa einer Woche in Kultur akkumulierten auf manchen Elektroden die Spikes zu Bursts. Nach etwa zwei bis drei Wochen *in vitro* bildeten sich Zell-Cluster, und das Aktivitätsmuster änderte sich drastisch: nun feuerten die Neurone des ganzen Netzwerkes synchrone Spikes-Bursts. Alle aktiven Elektroden, auch weit voneinander entfernt liegende, waren darin eingebunden. Der maximale Abstand zwischen zwei Elektroden auf den hier verwendeten MEAs beträgt 1,72 mm. Die Synchronisierung der Burst-Ereignisse innerhalb des neuronalen Netzes kann noch über diese maximal messbare Distanz hinausgehen. Zeitlich zwischen diesen synchronen Bursts gelegen, konnte man auch unkorrelierte Aktivität beobachten, zum überwiegenden Teil als einzelne, nicht in Bursts gebundene Spikes. Der Anteil unkorrelierter Aktivität nahm im weiteren Verlauf der Kultivierung ab, während die Frequenz der synchronen Bursts zunahm.

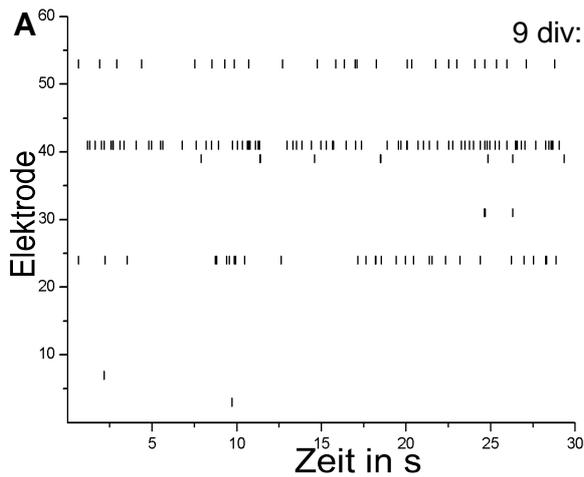
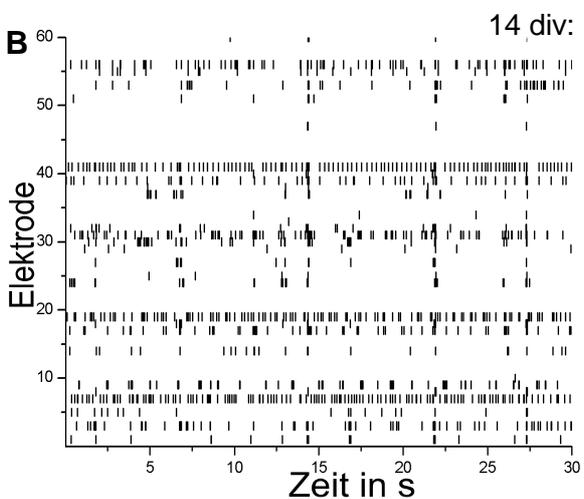


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Entwicklung eines funktionalen neuronalen Netzes anhand embryonaler striataler Zellen in Kultur (eStriatum).

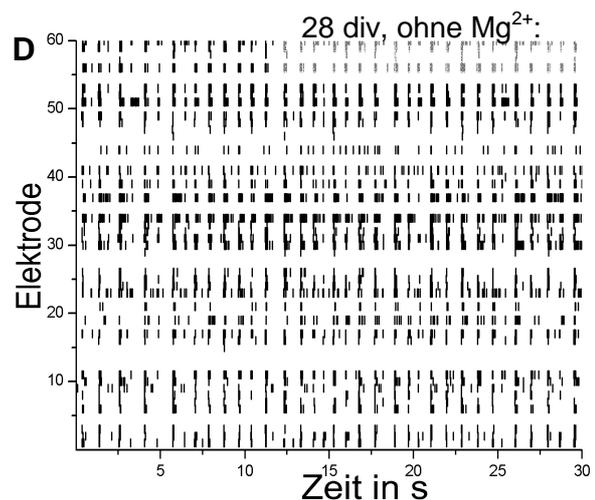
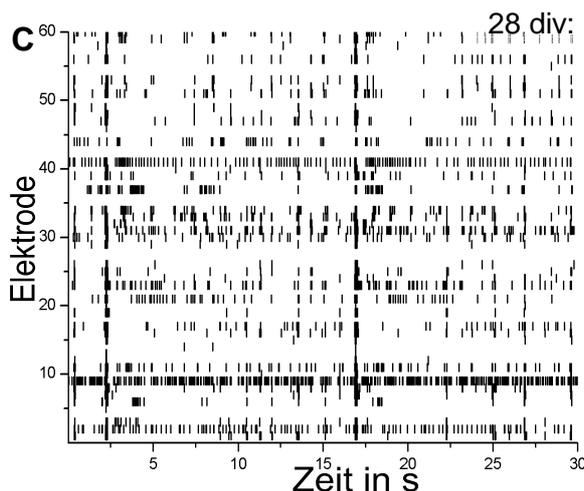
A) Spikeraster-Plot der elektrischen Aktivität von eStriatum-Zellen nach 9 div. Während eines Messfensters von 30 Sekunden wurde von sieben Elektroden Aktivität abgeleitet. Die Aktivität war nicht zwischen den Elektroden korreliert und wies unterschiedliche und unregelmäßige Frequenzen auf.



B) Nach 14 div wurde von deutlich mehr Elektroden des gleichen MEAs Aktivität abgeleitet, und die Spike-Frequenz hatte zugenommen. Mehrmals sah man kurze Spike-Bursts, die synchron über das gesamte Netzwerk gefeuert wurden. (Zeitpunkte: 6 s, 14 s, 22 s, 27 s)

(Zeitpunkte: 6 s, 14 s, 22 s, 27 s)

C) Noch höhere Spike-Raten wurden nach 28 div gemessen, und die Korrelation der Aktivität auf den verschiedenen Elektroden nahm zu. Synchrone Bursts waren häufiger zu sehen. Manche umfassten nur einen Teil, andere das komplette Netzwerk. Zwischen diesen synchronen Ereignissen feuerten viele Neurone noch einzelne Spikes, die zeitlich nicht mit anderen aktiven Zentren des Netzwerks korreliert waren.



D) Austausch des Nährmediums mit einer magnesiumfreien Badlösung nach 28 div veränderte das Aktivitätsmuster des Netzwerkes. Bild C) zeigt die elektrische Aktivität des Netzwerkes unter Nährmedium und Bild D) nach Auswaschen mit magnesiumfreier Badlösung. Nahezu alle Spikes waren nun in synchronen und rhythmisch oszillierenden Bursts organisiert. Der Anteil unkorrelierter Aktivität hatte stark abgenommen. Dieser Zustand wurde auch nach längerer Kultivierungszeit unter Nährmedium erreicht, bei eStr-Zellen allerdings erst nach Monaten.

Dieses Schema der Entwicklung neuronaler Netzwerkaktivität, beginnend mit einzelnen Spikes hin zu synchronen Spike-Bursts, war allen in dieser Arbeit untersuchten Zelltypen gemein und ist in Abbildung 6 am Beispiel von Spikeraster-Plots embryonaler striataler Zellen (eStriatum) gezeigt. Allerdings hing das Tempo dieser Entwicklung stark vom Zelltyp und der eingesetzten Zelldichte ab. Das durch synchrone Bursts und „stumme“ Interburst-Intervalle gekennzeichnete Aktivitätsmuster blieb über mehrere Monate hinweg stabil.

Zur quantitativen Beschreibung des Netzwerkverhaltens der CryoCortex-Zellen wurden 13 repräsentative Messungen mit insgesamt 371 „aktiven“ Elektroden ausgewählt, die zwischen Tag 22 und 123 *in vitro* aufgenommen worden waren (Tabelle 1, Abbildung 7). Durchschnittlich waren 29 ± 12 Elektroden „aktiv“, und die mittlere Spike-Amplitude der 74.284 registrierten Aktionspotenziale belief sich auf $57,7 \pm 29,9 \mu\text{V}$.

Ein Burst bestand durchschnittlich aus $8,4 \pm 3,3$ Spikes. Die überwiegende Mehrheit aller Spikes ($86 \pm 8 \%$) war in Bursts organisiert. Das Muster von kurzen Episoden mit hoher Aktivität (Bursts) und längeren Perioden mit keiner Aktivität während der Interburst-Intervalle lässt sich am hohen Anteil leerer Bins ablesen. Bei Unterteilung der Messungen in Abschnitte von 100 ms Länge, waren $89 \pm 5 \%$ dieser Bins leer, d.h. innerhalb der Zeitspanne wurde kein Spike registriert. Bei 74.284 Spikes in 17.400 Bins läge die Wahrscheinlichkeit, dass leere Bins detektiert würden, bei nur 1,4 %, wenn die Ereignisse rein zufällig, also Poisson-verteilt, gewesen wären. Die niedrige Standardabweichung zeigt, dass dieses Aktivitätsmuster bei allen Messungen sehr ähnlich war.

Der hier verwendete Parameter Cohen's Kappa dient als Indikator für die Gleichförmigkeit der Aktivität auf den verschiedenen Elektrodenpaaren. Er ist gleich 1, wenn innerhalb eines Zeitintervalls (Bin) auf verschiedenen Elektroden das gleiche Ereignis stattfindet: entweder Aktionspotenziale auf allen Kanälen oder kein Aktionspotenzial auf allen Kanälen. Bei den ausgewählten CryoCortex-Messungen wies Cohen's Kappa einen Wert von $0,56 \pm 0,13$ auf, der eine hohe und homogene Korrelation der Aktivität über alle Elektrodenpärchen abbildet.

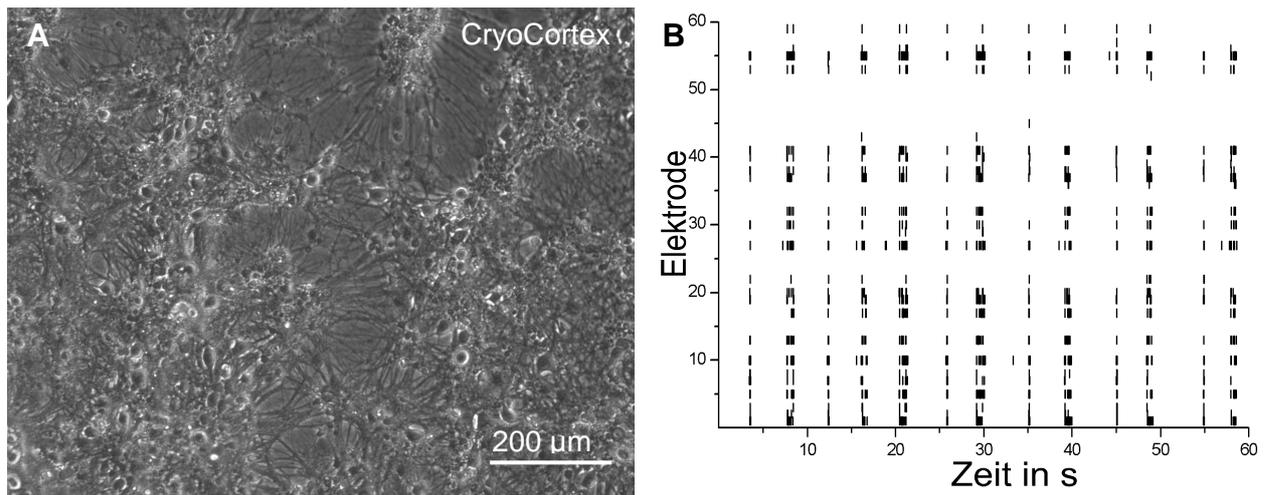


Abbildung 7: A) CryoCortex-Zellen nach 32 div, ausgesät in einer Dichte von $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$. Man erkennt, dass die Zellen Cluster bildeten, die durch zahlreiche Neuritenstränge miteinander verbunden waren. B) Spikeraster-Plot der elektrischen Aktivität von CryoCortex-Zellen nach 26 div, die ebenfalls in einer Dichte von $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ auf einem MEA ausgesät worden waren. Die Aktivität war in oszillierenden synchronen Spike-Bursts organisiert.

CryoStriatum aus fünf Vials unterschiedlicher Chargen wurden auf insgesamt 19 MEAs ebenfalls in einer Dichte von $100.000 \text{ Zellen} / \text{cm}^2$ ausgesät. Obwohl die Überlebensrate der Zellen nicht niedriger als bei den corticalen Cryo-Zellen zu sein schien, war nur von 9 MEAs Aktivität ableitbar. Zwei dieser MEAs zeigten nach 4 Wochen simultane Burst-Aktivität, die restlichen MEAs über die gesamte Kultivierungszeit nur unkorrelierte Aktivität auf bis zu acht Elektroden (Abbildung 9 A und B). Nach 70 Tagen in Kultur konnte keine Aktivität mehr gemessen werden. Immunofärbungen zeigten, dass die Mehrzahl der CryoStriatum-Neurone auch nach mehreren Wochen in Kultur nur ein bis zwei kurze starke Neuriten formten, die keinen Kontakt zu benachbarten Neuronen hatten.

Für eine quantitative Auswertung wurden sechs Messungen ausgewählt, die von sechs verschiedenen MEAs zwischen den Tagen 12 und 50 *in vitro* aufgenommen wurden. Allerdings repräsentieren diese Messungen nicht das typische Verhalten von CryoStriatum-Zellen, da von der Mehrzahl der CryoStriatum-MEAs keine Aktivität abgeleitet werden konnte (Tabelle 1). Insgesamt wurde von 48 Elektroden Aktivität registriert. Pro Messung waren nur 8 ± 5 Elektroden „aktiv“. Die durchschnittliche Amplitude der 9.486 detektierten Spikes belief sich auf $68,8 \pm 22,1 \mu\text{V}$. Ein Burst beinhaltete $5,7 \pm 2,2$ Spikes. $37 \pm 27 \%$ der Spikes waren in Bursts integriert, die allerdings nicht über alle Elektroden synchronisiert waren. Die hohe Standardabweichung ist darauf zurückzuführen, dass der Anteil der Spikes in Bursts zwischen den Extremwerten 5 % und 85 % schwankte.

62 ± 23 % der 100 ms langen Bins waren leer, also ohne Aktivität. Dieser relative hohe Wert ist aber weniger wie im Fall von CryoCortex auf eine Bündelung der Aktionspotenziale in kurze Zeitintervalle zurückzuführen, sondern vor allem auf eine generell schwächere Aktivität. Die 9.486 Spikes verteilten sich über eine Messdauer von 780 s. Somit läge bei einer Poisson-Verteilung die Wahrscheinlichkeit für leere Bins bei immerhin 30 %. Die Korrelation – über eine rein zufällige Korrelation hinaus – zwischen den Elektroden war relativ schwach, ablesbar am geringen Wert für Cohen's Kappa ($0,11 \pm 0,17$). Zugabe der GABA-Antagonisten Bicucullin und Zink oder des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat konnte keine Aktivität in „stillen“ MEAs induzieren.

3.1.2 Co-Kultivierung von corticalen und striatalen Zellen induziert keine Netzwerk-Aktivität (CryoCortex / CryoStriatum)

Da striatale Neurone *in vivo* exzitatorischen Input von Projektionsneuronen aus dem Cortex erhalten, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob corticale Neurone *in vitro* die striatalen Neurone zum Feuern anregen können. Segal et al. (2003) berichteten, dass striatale Zellen nur dann dendritische Dornen und funktionelle Synapsen bilden, wenn sie mit einem kleinen Anteil corticaler Zellen co-kultiviert werden. Zugabe von Glutamat ins Medium genügt nicht, um diesen Effekt auszulösen.

Co-Kulturen von CryoStriatum ($100.000 / \text{cm}^2$) mit unterschiedlichen Konzentrationen von CryoCortex (5 – 50 %) zeigten nur geringe spontane Spike-Aktivität (Abbildung 8). Die Aktivität von Co-Kulturen mit einem höheren Anteil corticaler Zellen (≥ 25 %) war durch seltene und kurze korrelierte Bursts auf relativ wenigen Elektroden gekennzeichnet, die von Einzelspike-Aktivität umgeben waren, ähnlich dem Aktivitätsmuster sehr dünn ausgesäeter corticaler Kulturen (Tabelle 1; vier Messungen von zwei verschiedenen MEAs mit 7.472 Spikes auf 31 Elektroden: 60 ± 15 % der Spikes in Bursts; Cohen's Kappa von $0,31 \pm 0,27$; $6,3 \pm 2,1$ Spikes in einem Burst; 72 ± 13 % der 4.800 Bins waren leer).

Immunofärbungen zeigten, dass die Morphologie der CryoStriatum-Neurone nicht sichtbar durch den Einfluss corticaler Neurone in der Co-Kultur verändert wurde. Beide Zelltypen waren durch Form, Neuritenbildung und Intensität der GABA-Anfärbung zu unterscheiden. Es ließ sich allerdings ebenso wenig eine Vernetzung der beiden Zelltypen untereinander beobachten wie eine veränderte Morphologie der striatalen Neurone im Vergleich zu Mono-Kulturen.

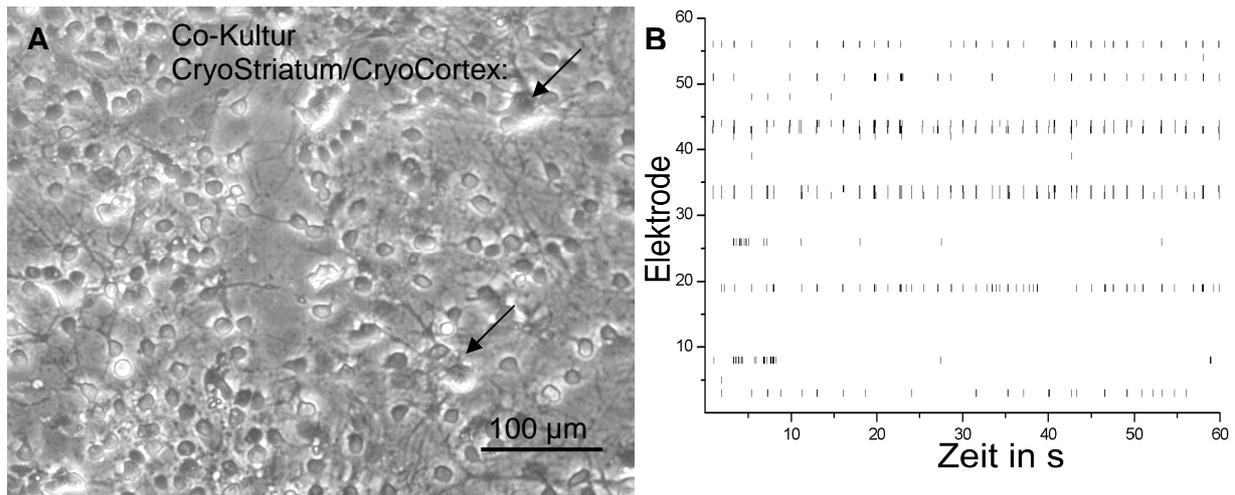


Abbildung 8: Co-Kultur von CryoStriatum mit einem Anteil von 30 % CryoCortex nach 22 div mit einer Zelldichte von $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$. Die Zellen erschienen relativ homogen verteilt, und die Neuritenbildung war deutlich schwächer ausgeprägt als in rein corticalen Kulturen. Pfeile zeigen beispielhaft zwei corticale Zellen, die etwas größer sind als striatale Zellen und eine stärkere Lichtbrechung aufweisen.

B) Der Spikeraster-Plot einer Co-Kultur von CryoStriatum mit einem Anteil von 25 % CryoCortex nach 29 div zeigte nur auf relativ wenigen Elektroden Aktivität. Diese war überwiegend in synchronen Spike-Bursts organisiert, wobei die Bursts jeweils nur aus wenigen Spikes bestanden.

3.1.3 Sehr dichte striatale Kulturen zeigen Netzwerkaktivität (CryoStriatum)

Auf jeweils vier MEAs wurde CryoStriatum in höheren Dichten von 2.5 und $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ ausgesät. Drei der vier MEAs mit $2,5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ zeigten nach drei Wochen synchrone Burst-Aktivität auf bis zu 20 Elektroden mit bis zu mehreren Minuten langen Interburst-Intervallen und zwei der vier MEAs mit $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$, allerdings erst nach vier Wochen in Kultur (Abbildung 9 C und D). Von den restlichen drei MEAs wurde nur unkorrelierte Aktivität abgeleitet. Die quantitative Auswertung von fünf Messungen mit verschiedenen MEAs nach 27 div ergab Werte, die denen der dünner ausgesäten aktiven CryoStriatum-MEAs sehr stark ähnelten. Lediglich Cohen's Kappa war etwas höher (Tabelle 1).

Eine noch höhere Aussaatdichte der CryoStriatum-Zellen war nicht möglich, da Cryo-Zellen laut Herstellerangaben keine Zentrifugation überleben und somit die vorgegebene Zellkonzentration von $4 \times 10^6 / \text{ml}$ (entsprechend einer Aussaatdichte von $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$) nicht überschritten werden konnte. Die Aussaat mit unverdünnter Zellsuspension ($5 \times 10^5 / \text{cm}^2$) führte vermutlich deshalb nicht zu einer höheren Ausbeute von MEAs mit synchronen Bursts als bei einer halb so hohen Dichte von $2,5 \times 10^5 / \text{cm}^2$, da das Einfriermedium möglicherweise cytotoxisch wirkte und somit weniger Zellen überlebten. Immunofärbungen zeigten, dass

CryoStriatum bei diesen hohen Aussaatdichten kompakte Cluster mit bis zu 150 Zellen formte (einschließlich Gliazellen), die durch wenige lange und kräftige Axon-Bündel miteinander verbunden waren.

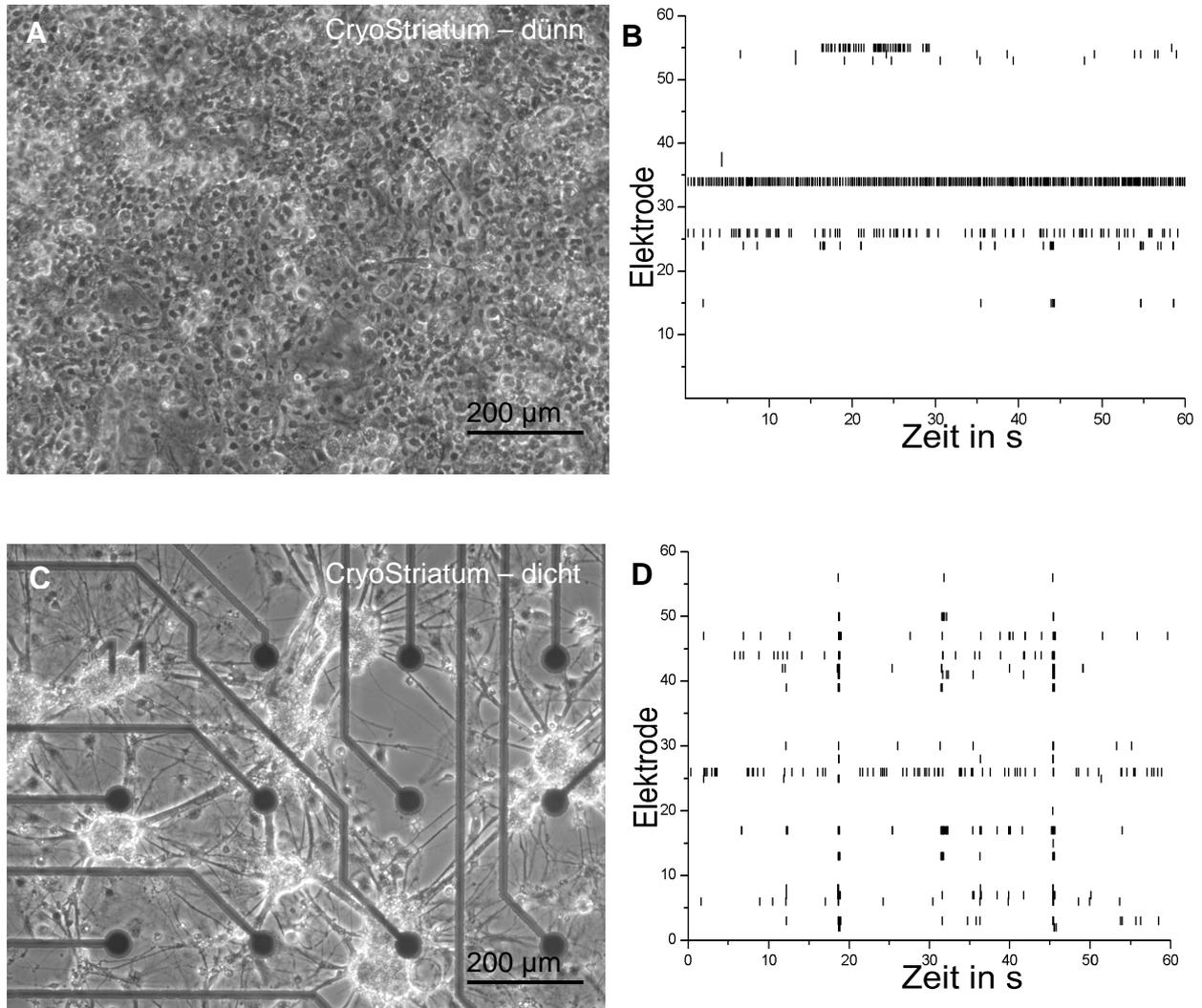


Abbildung 9: Einfluss der Aussaatdichte auf die Morphologie und elektrische Aktivität von CryoStriatum.

A) CryoStriatum-Zellen, in einer Dichte von $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ ausgesät, waren nach 22 div gleichmäßig verteilt. B) Wie der Spikeraster-Plot einer MEA-Messung von in gleicher Dichte ausgesätem CryoStriatum nach 29 div zeigt, wurden nur von wenigen Elektroden Spikes registriert, deren Verteilung zwischen den Elektroden stark variierte.

C) Die lichtmikroskopische Aufnahme von CryoStriatum nach 23 div in einer Dichte von $2,5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ zeigte deutlich voneinander getrennte Zell-Cluster, die durch lange und kräftige Neuritenbündel verbunden waren. D) Der Spikeraster-Plot von in hoher Dichte ($2,5 \times 10^5 / \text{cm}^2$) ausgesätem CryoStriatum nach 27 div zeigt elektrische Aktivität auf deutlich mehr Elektroden. Die Zellen feuerten zudem gelegentliche über das Netzwerk synchrone Spike-Bursts. Zwischen diesen Bursts wurden unkorrelierte Spikes registriert.

Zelltyp und -dichte	Messungen	Zahl der Spikes pro Burst	Burst-Dauer	Anteil Spikes in Bursts	Anteil leerer Bins	Cohen's Kappa
CryoStriatum dünn ($1 \times 10^5/\text{cm}^2$)	(n=6; 780s Messzeit; 9486 Spikes auf 48 Elektroden; 12-50 div)	5,7 (± 2,2)	298 ms (± 329 ms)	37 % (± 27 %)	62 % (± 23 %)	0,11 (± 0,17)
CryoStriatum dicht ($2,5\text{-}5 \times 10^5/\text{cm}^2$)	(n=5; 600s Messzeit; 5401 Spikes auf 60 Elektroden; 27 div)	6,2 (± 1,2)	164 ms (± 59 ms)	36 % (± 23 %)	60 % (± 24 %)	0,27 (± 0,13)
CryoStr/CryoCx-CoKultur (25-50 % CryoCx)	(n=4; 480s Messzeit; 7520 Spikes auf 31 Elektroden; 29-41 div)	6,3 (±2,1)	207 ms (± 55 ms)	60 % (± 15 %)	72 % (± 13 %)	0,31 (± 0,27)
CryoCortex ($1 \times 10^5/\text{cm}^2$)	(n=13; 1740s Messzeit; 74284 Spikes auf 371 Elektroden; 22-123 div)	8,4 (± 3,3)	144 ms (± 42 ms)	86 % (± 8 %)	89 % (± 5 %)	0,56 (± 0,13)
Signifikanz	CryoStr dünn vs. CryoStr dicht	p = 0,6	p = 0,37	p = 0,9	p = 0,9	p = 0,1
	CryoStr dünn vs. CryoCortex	p = 0,05	p = 0,3	p = 0,005	p = 0,03	p < 0,001

Tabelle 1: Die quantitative Analyse von dünn und dichter ausgesäten CryoStriatum-Zellen offenbarte keine signifikanten Unterschiede in den ausgewerteten Parametern, wohingegen sich CryoCortex in solchen Parametern deutlich von beiden CryoStriatum-Gruppen unterschied, die die räumliche und zeitliche Organisation der Netzwerkaktivität beschreiben. Der Anteil von Spikes in Bursts, von Bins ohne Spikes sowie der Wert Cohen's Kappa war in corticalen Kulturen jeweils höher (Binbreite jeweils: 100 ms).

3.1.4 Nur sehr dichte striatale Kulturen entwickeln neuronale Netzwerke (eStriatum / pStriatum)

Der Einfluss einer noch höheren Aussaatdichte auf die Ausbildung funktioneller Netzwerke durch striatale Neurone ließ sich nicht mit Cryo-Zellen untersuchen, da diese keine Zentrifugation überleben. Deshalb wurden für die folgenden Experimente frisch präparierte Neurone aus dem Striatum von Wistar-Ratten eingesetzt. Da die Überlebensrate nach der Aussaat bei diesen Zellen deutlich höher lag als in den Cryo-Kulturen, sind die „effektiven“ Zelldichten nicht eins zu eins übertragbar. Um den Einfluss des Entwicklungszustandes auf die

elektrophysiologische Aktivität zu untersuchen, wurden sowohl Zellen von embryonalen (E15; eStriatum) als auch von neugeborenen Wistar-Ratten (pStriatum) präpariert.

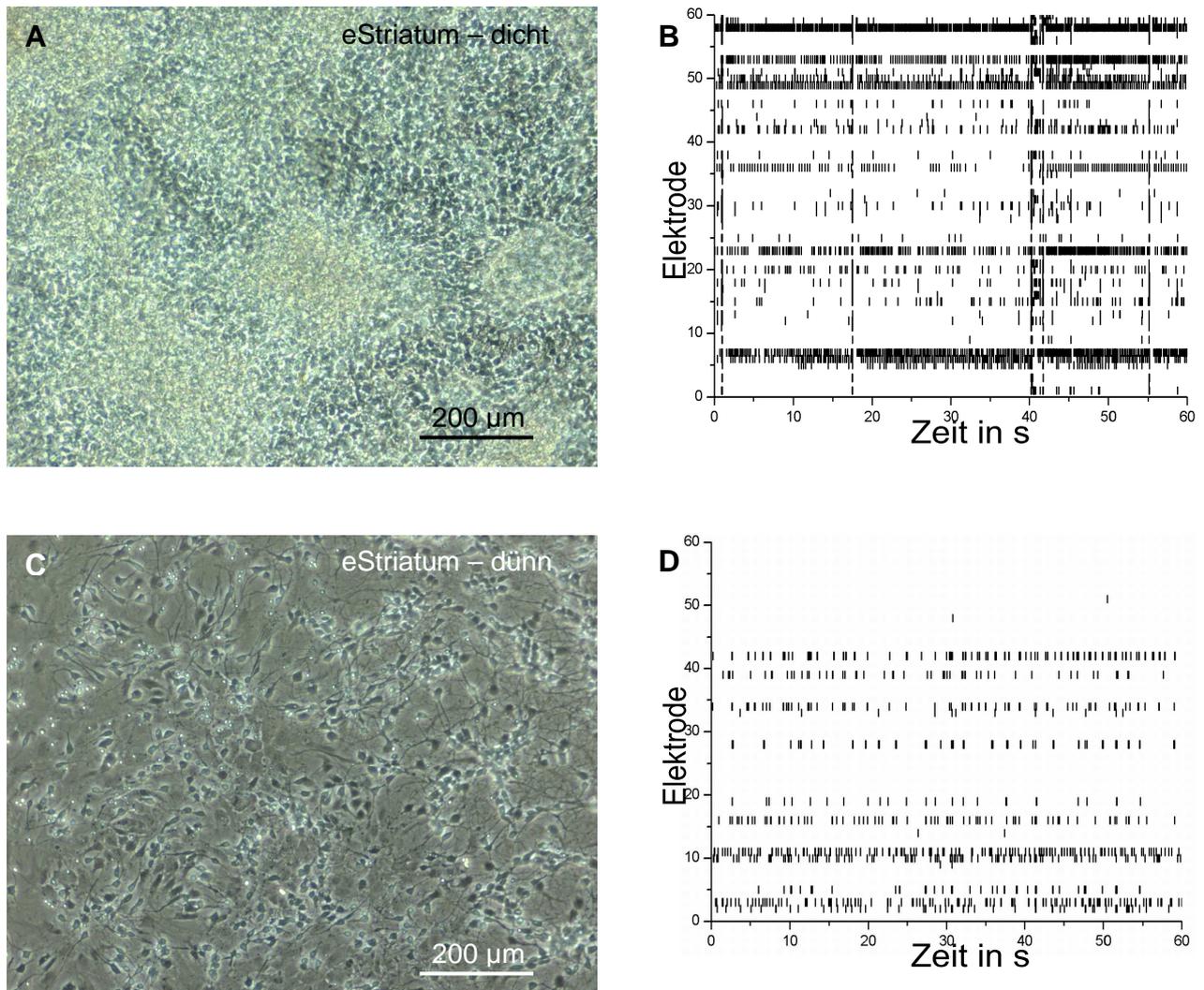


Abbildung 10: A) Phasenkontrast-Aufnahme von eStriatum-Zellen in einer Dichte von $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ nach 9 div. Die Zellen waren so dicht gepackt, dass sie die Oberfläche des Deckgläschens komplett bedeckten. Dennoch war eine leichte Tendenz zur Clusterbildung erkennbar. B) Der Spikeraster-Plot zeigt das Aktivitätsmuster von eStriatum mit einer Dichte von $10 \times 10^5 / \text{cm}^2$ nach 27 div. Neben Einzel-Spike-Aktivität auf vielen Elektroden erkennt man auch synchrone Burst-Ereignisse, die das gesamte Netzwerk umfassen.

C) Eine homogene Verteilung ohne Clusterbildung zeigten eStriatum-Zellen, die in einer Dichte von $2,5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ausgesät worden waren (9 div). D) Auf dem Spikeraster-Plot von eStriatum in gleich niedriger Dichte nach 17 div erkennt man Einzel-Spike-Aktivität, aber keine synchronen Spike-Bursts.

Sowohl eStriatum und pStriatum zeigten, wenn sie in einer Dichte von $0.5 - 2 \times 10^6 / \text{cm}^2$ ausgesät worden waren, in Immunofärbungen eine starke Tendenz zur Bildung von Zell-Clustern, die durch kräftige axonale Bündel verbunden waren. Synchrone Spike-Bursts wurden nach etwa zwei Wochen gefeuert (Abbildungen 10 A und B; 11 A, B). Geringere Aussaatdichten führten zu einem Aktivitätsmuster ohne jegliche Korrelation zwischen den Elektroden ($2,5 \times 10^4 / \text{cm}^2$) oder verzögerten das Auftreten synchroner Bursts um eine weitere Woche ($1 \times 10^5 / \text{cm}^2$; Abbildung 10 C und D). Immunofärbungen zeigten, dass eStriatum-Zellen bei einer Aussaatdichte von $2,5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ kaum Cluster bildeten, sondern homogen verteilt waren. Vergleichbar mit den in geringer Dichte ausgesäten CryoStriatum-Kulturen hatten die Neurone nur kurze Neuriten und waren kaum miteinander verbunden. Noch dünnere Aussaatdichten ($1 \times 10^4 / \text{cm}^2$) führten zum Absterben der Zellen.

3.1.5 Der Entwicklungszustand der striatalen Zellen hat keinen Einfluss auf das Netzwerkverhalten (eStriatum und pStriatum vs CryoCortex)

Die Entwicklung der elektrophysiologischen Aktivität von eStriatum und pStriatum, die in einer Dichte von $0.5 - 2 \times 10^6 / \text{cm}^2$ ausgesät worden waren, begann nach 3-4 Tagen mit einzelnen Spikes auf wenigen Kanälen, ging nach zwei Wochen in synchrone Burst-Aktivität über und war bis zu zwei Monaten messbar (Abbildung 10 B und 11 B). Die maximale Aktivität mit Bursts auf bis zu 50 Kanälen war nach etwa drei Wochen erreicht. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen eStriatum und pStriatum feststellen, weder bezüglich der Entwicklung noch der Organisation ihrer elektrischen Aktivität (Tabelle 2).

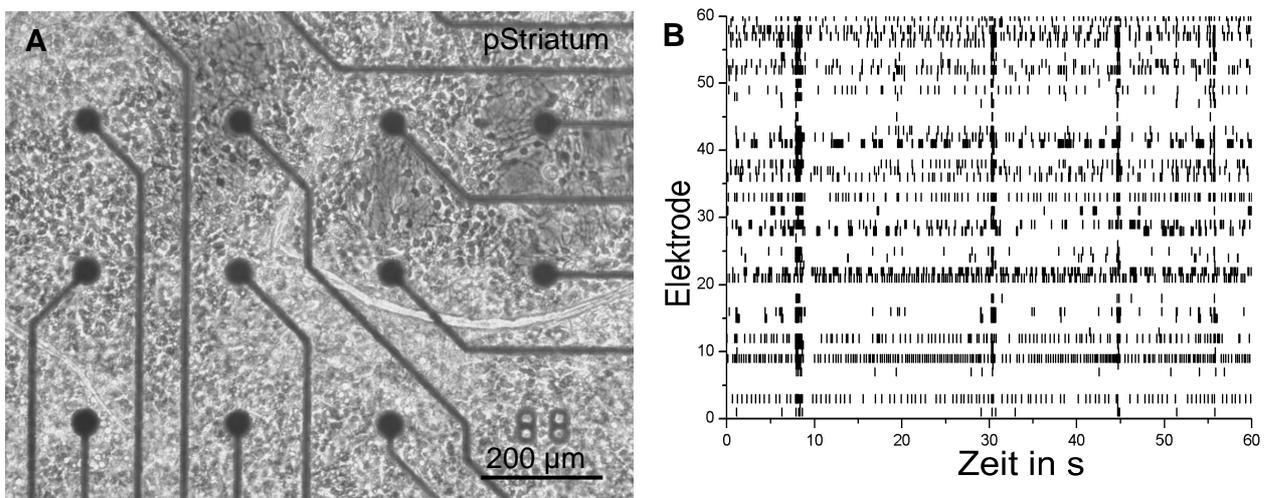


Abbildung 11: A) Postnatal gewonnene striatale Zellen (pStriatum) nach 15 div. Auch hier bildeten sich bei einer hohen Aussaatdichte von $10 \times 10^5 / \text{cm}^2$ dreidimensionale Cluster-Strukturen. B) Neben im Netzwerk synchronisierten Bursts zeigt der Spikeraster-Plot noch unkorrelierte Einzel-Spike-Aktivität auf zahlreichen Elektroden ($10 \times 10^5 / \text{cm}^2$, 10 div).

Die Auswertung von jeweils 13 repräsentativen Messungen zeigt, dass sowohl die Spike-Amplitude (eStriatum: $51,6 \pm 24,6 \mu\text{V}$; pStriatum: $43,9 \pm 17,7 \mu\text{V}$) als auch die Burst-Dauer (eStriatum: $202 \pm 108 \text{ ms}$; pStriatum: $363 \pm 364 \text{ ms}$) und die Zahl der Spikes in einem Burst (eStriatum: $8,9 \pm 3,7$; pStriatum: $7,1 \pm 2,2$) ähnlich hoch ausfielen. Es fiel auf, dass beide striatalen Zelltypen auch nach mehreren Wochen in Kultur im Gegensatz zu CryoCortex unkorrelierte Aktionspotenziale feuerten, die nicht in Bursts organisiert waren. Ablesbar ist dies am vergleichsweise niedrigen Anteil von Spikes, die Teil von Bursts waren (eStriatum: $63 \pm 19\%$; pStriatum: $51 \pm 24\%$). Die Kombination von hoher Burst-Aktivität und unkorrelierten Spikes während der Interburst-Intervalle führte zu einem geringen Prozentsatz von Bins ohne Aktivität (eStriatum: $50 \pm 31\%$; pStriatum: $48 \pm 31\%$).

Eine zufällige Verteilung der Spikes (Poisson-Verteilung) hätte dennoch in beiden Fällen eine viel geringere Wahrscheinlichkeit für leere Bins erwarten lassen (eStriatum: $p = 9,7 \times 10^{-18}$ bei 82.271 Spikes in 2.110 s; pStriatum: $1,8 \times 10^{-10}$ bei 56.545 Spikes in 2.520 s). Das stark unterschiedliche Verhalten von Elektrodenpaaren schlägt sich nieder in Cohen's Kappa-Werten, die deutlich unter denen von CryoCortex liegen (eStriatum: $0,33 \pm 0,18$; pStriatum: $0,31 \pm 0,25$; CryoCortex: $0,56 \pm 0,13$). Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahm der Anteil der einzelnen Spikes in den striatalen Kulturen zwar immer weiter ab, erreichte aber nur selten das Niveau von CryoCortex.

Die eStriatum- und pStriatum -Messungen unterschieden sich auch untereinander stark in der Organisation der Aktivität, erkennbar an den hohen Standardabweichung in den Kategorien „Anteil Spikes in Bursts“ und „Leere Bins“ im Vergleich zu CryoCortex. Anscheinend ist das Aktivitätsmuster mit synchronen Spike-Bursts und „stillen“ Interburst-Intervallen ein sehr stabiler Zustand, der auch von striatalen Zellen während ihrer Entwicklung angestrebt, aber von corticalen Zellen leichter erreicht wird.

Zelltyp	Messungen	Spike-Amplitude	Zahl der Spikes pro Burst	Burst-Dauer	Anteil Spikes in Bursts	Anteil leerer Bins	Cohen's Kappa
pStriatum	(n=13; 2.520s Messzeit; 56.545 Spikes auf 421 Elektroden; 10-24 div)	43,9 μV (\pm 17,7 μ V)	7,1 (\pm 2,2)	363 ms (\pm 364 ms)	51 % (\pm 24 %)	48 % (\pm 31 %)	0,31 (\pm 0,25)
eStriatum	(n= 13; 2.100s Messzeit; 82.271 Spikes auf 344 Elektroden; 14-41 div)	51,6 μV (\pm 24,6 μ V)	8,9 (\pm 3,7)	202 ms (\pm 108 ms)	63 % (\pm 19 %)	50 % (\pm 31 %)	0,33 (\pm 0,18)
Cryo-Cortex	(n=13; 1.740s Messzeit; 74.284 Spikes auf 371 Elektroden; 22-123 div)	57,7 μV (\pm 29,9 μ V)	8,4 (\pm 3,3)	144 ms (\pm 42 ms)	86 % (\pm 8 %)	89 % (\pm 5 %)	0,56 (\pm 0,13)
Signifikanz	pStr vs CryoCx	p = 0,17	p = 0,25	p = 0,05	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,005
	pStr vs eStr	p = 0,38	p = 0,14	p = 0,15	p = 0,21	p = 0,87	p = 0,89

Tabelle 2: Zwischen den embryonal (eStriatum) und postnatal (pStriatum) gewonnenen striatalen Zellen ließ sich in keinem der ausgewählten elektrophysiologischen Parameter ein signifikanter Unterschied feststellen. Auch CryoCortex und pStriatum unterschieden sich lediglich in solchen Parametern deutlich, die die räumliche und zeitliche Organisation der elektrischen Aktivität beschreiben. So war der Anteil von Spikes, die in Bursts eingebunden sind, bei CryoCortex deutlich höher als in den striatalen Kulturen. Bei der Unterteilung der Messungen in Bins von 100 ms Dauer, lag der Anteil von Bins, die trotz hoher Aktivität keinen Spike beinhalteten, bei CryoCortex bei fast 90 %, bei den striatalen Kulturen nur bei etwa 50 %. Dies zeigt, dass sich bei CryoCortex kurze Phasen sehr hoher Aktivität mit solchen abwechselten, in denen im gesamten Netzwerk keine Aktionspotenziale gefeuert wurden. In striatalen Kulturen waren diese Phasen, die keinerlei Aktivität aufwiesen, seltener. Cohen's Kappa spiegelt die Ähnlichkeit von Aktivitätsmustern auf unterschiedlichen Kanälen wieder (Binbreite: 100 ms). Der höhere Wert von Kappa bei CryoCortex im Vergleich zu den striatalen Kulturen zeigt eine höhere Gleichförmigkeit der Aktivität im gesamten Netzwerk an.

3.2 Immunocytochemische Charakterisierung striataler und corticaler Zellen

3.2.1 Astrocyten

Alle Zellkulturen waren Mischkulturen aus Neuronen und Gliazellen. Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen den Astrocyten-Marker GFAP (glial fibrillary acidic protein) und gegen Neurofilamente zeigten für alle Zelltypen ein Verhältnis von Neuronen zu Astrocyten von ungefähr 1:1. Die Immunofärbungen wurden durchgeführt zu Zeitpunkten, wenn parallele Ansätze auf MEAs elektrische Aktivität aufwiesen. Obwohl Astrocyten in den hier untersuchten Kulturen im Gegensatz zu den postmitotischen Neuronen teilungsfähig waren, zeigten Zeitreihen mit CryoCortex-Zellen, dass sich Astrocyten über etwa drei Wochen vermehrten und ab diesem Zeitpunkt nur noch ihre Morphologie veränderten (Abbildung 12). CryoCortex wies einen Astrocyten-Anteil von $54 \pm 7\%$ ($n = 7$; 36 und 39 div; Abbildung 14 A) auf. Ähnliche Werte wurden für CryoStriatum ($53 \pm 9\%$; $n = 9$; 36 und 37 div; Abbildung 14 B), eStriatum ($52 \pm 9\%$; $n = 6$; 26 div; Abbildung 14 C) und pStriatum ($57 \pm 12\%$; $n = 17$; 9 and 19 div; Abbildung 14 D) bestimmt.

Abbildung 12 (nächste Seite): Doppelfärbungen gegen das Astrocyten-spezifische Protein GFAP (glial fibrillary acidic protein; grün) und den Neuronen-Marker Neurofilament (rot) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung von CryoCortex. Nach 4 div war der Anteil von Astrocyten noch sehr gering, und die Neurone wiesen nur wenige Neuriten auf (A). Nach 18 div waren schon deutlich mehr und längere Neuriten gebildet worden, während sich die Anzahl der Astrocyten leicht erhöht hatte. (B) Nach 39 div hatten die Neurone ein dichtes Netzwerk entwickelt mit vielen Neurofilament-immunreaktiven Axonen, während die Astrocyten sich um die neuronalen Zell-Cluster gelegt und ihre Morphologie verändert hatten. GFAP akkumulierte nun in Teilbereichen des Zellkörpers (C). Weitere Kultivierungszeit bewirkte keine deutliche morphologische Veränderung des Netzwerks mehr. Die Immunofärbung nach 67 div zeigte ein ähnliches Bild wie nach 39 div (D). E) Doppelfärbung gegen die Intermediärfilamente GFAP (grün) und Neurofilament (rot) von CryoCortex nach 32 div in einer stärkeren Vergrößerung. Deutlich sind die von den Clustern neuronaler Zellen ausgehenden Neurofilament-positiven Axone zu erkennen. Die Astrocyten bedecken mit ihren GFAP-haltigen Ausläufern diese Cluster.

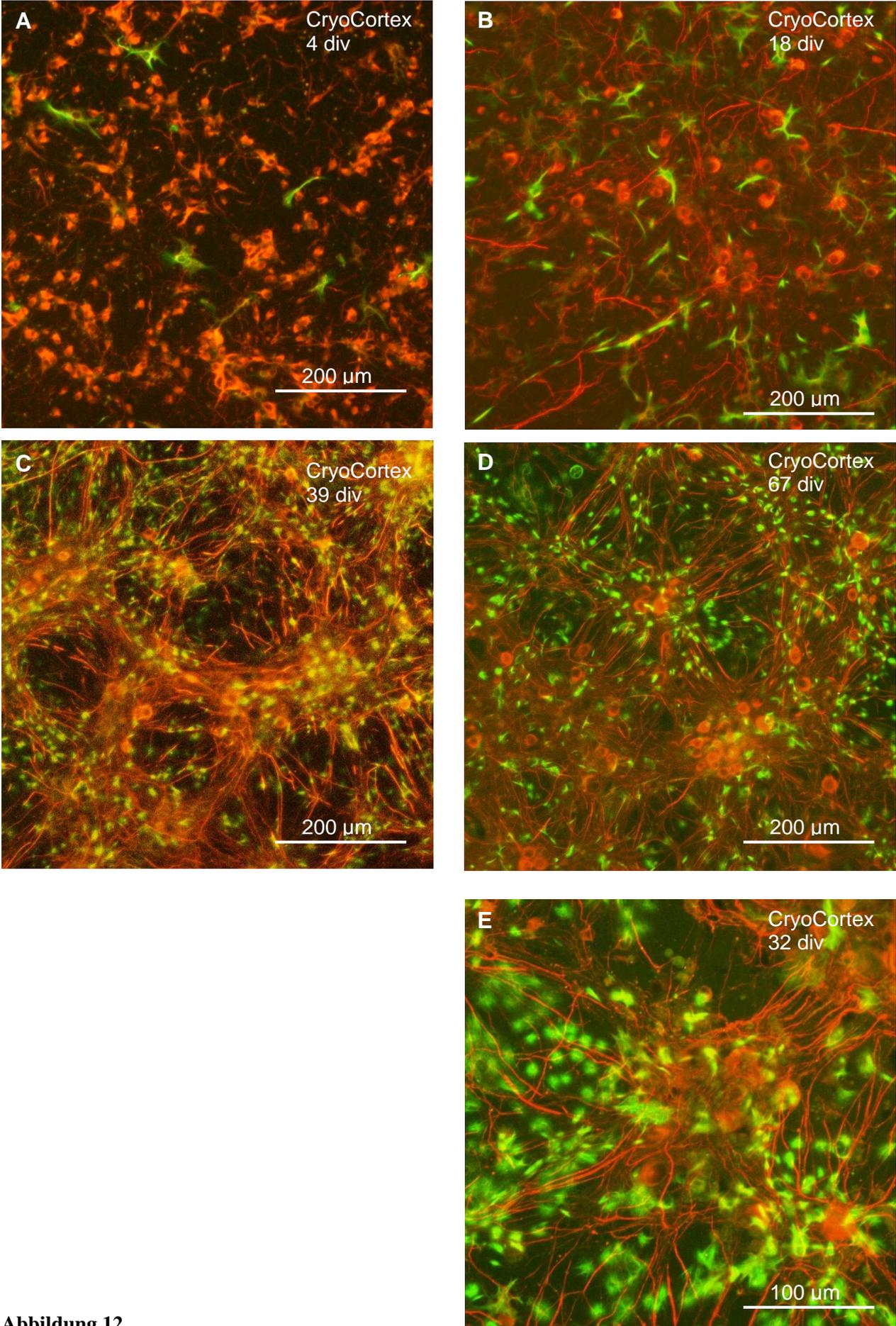


Abbildung 12

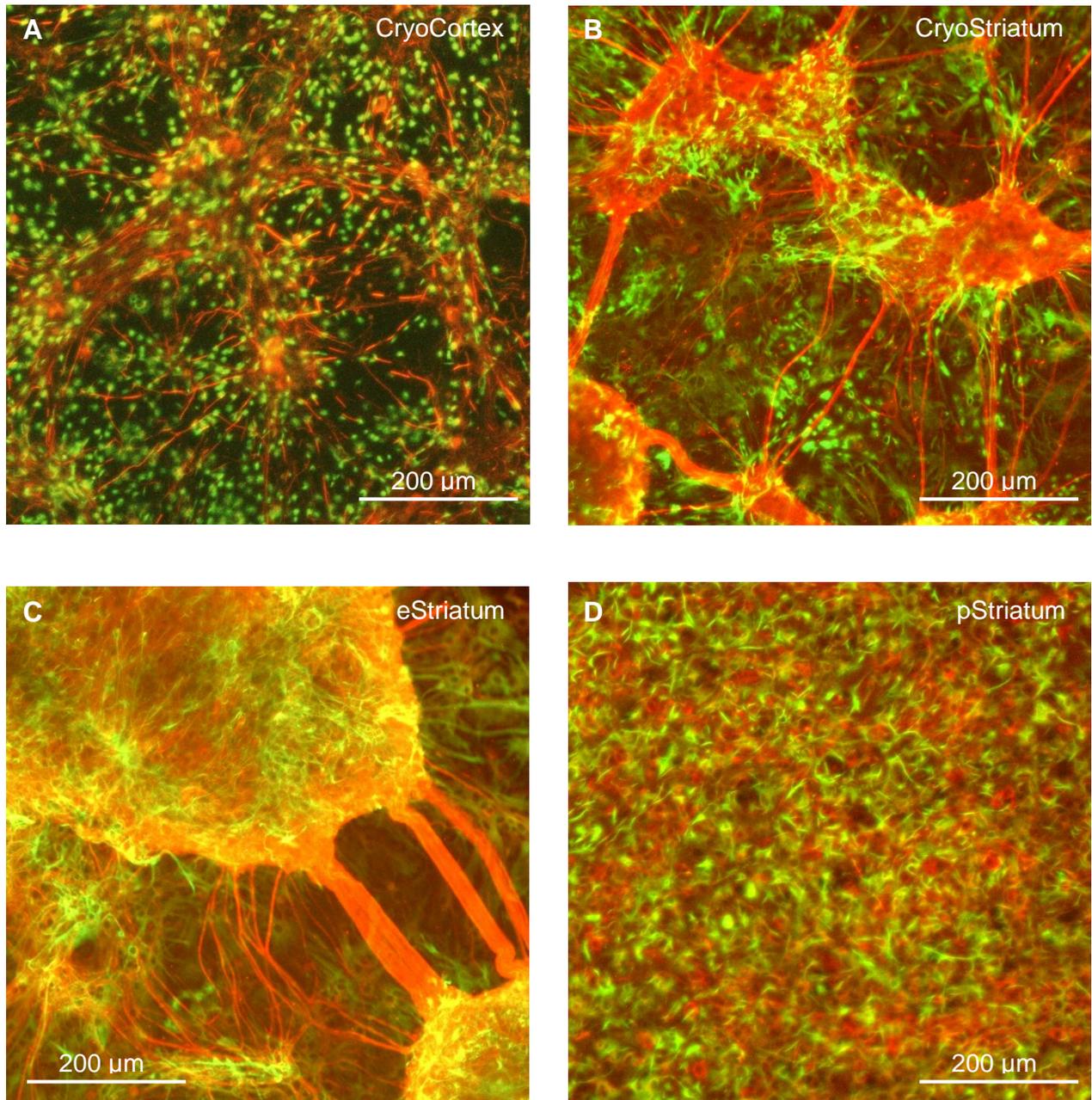
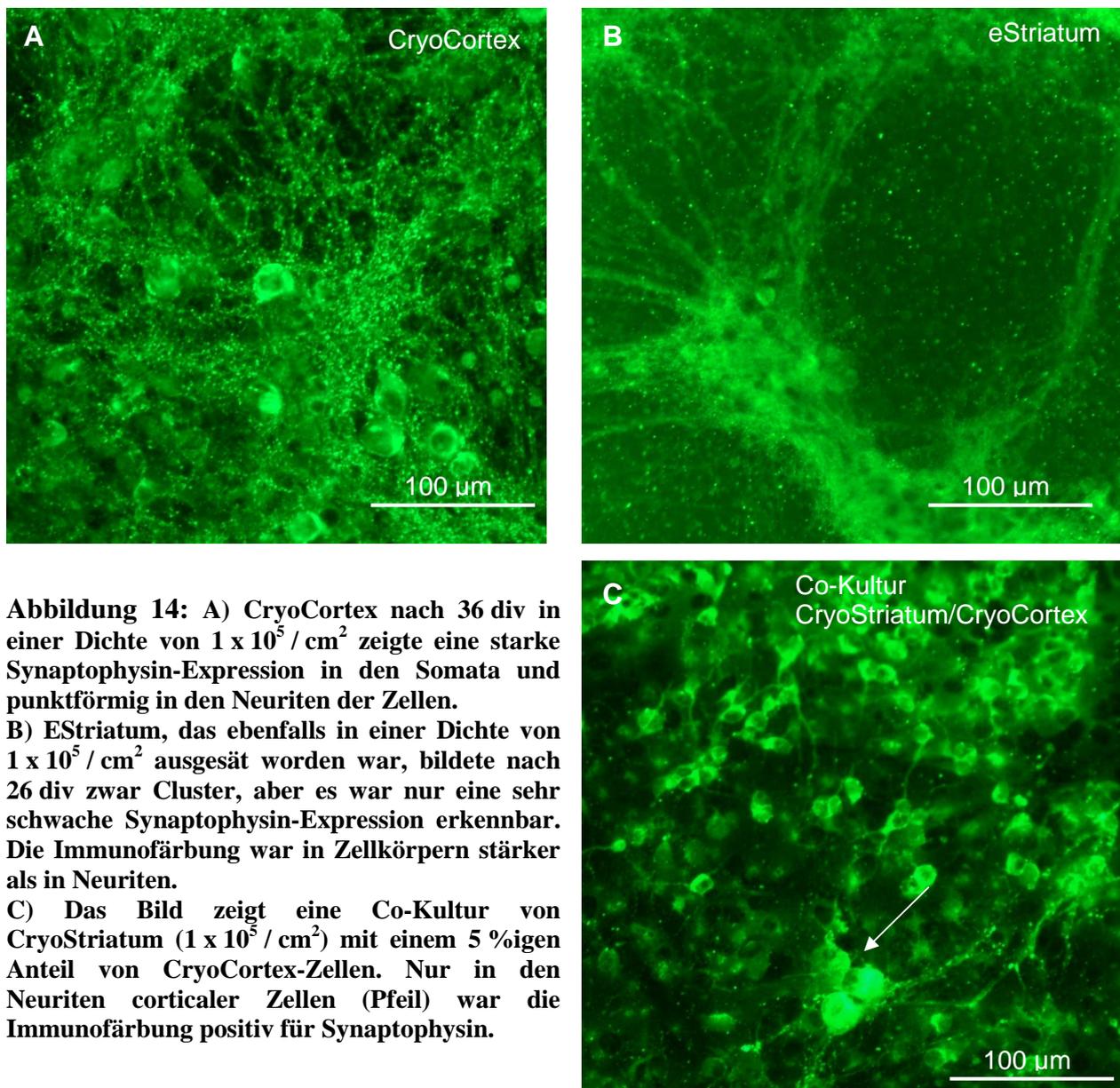


Abbildung 13: Doppelfärbungen des Astrocyten-Markers GFAP (grün) und des neuronalen Proteins Neurofilament (rot) zeigten, dass alle untersuchten Zelltypen in etwa gleiche Anteile von Neuronen und Astrocyten aufwiesen. A) CryoCortex nach 46 div ($1 \times 10^5 / \text{cm}^2$), B) CryoStriatum nach 27 div, ($5 \times 10^5 / \text{cm}^2$), C) eStriatum nach 26 div ($10 \times 10^5 / \text{cm}^2$) und pStriatum nach 9 div ($10 \times 10^5 / \text{cm}^2$).

3.2.2 Synaptophysin

Das Glycoprotein Synaptophysin ist in präsynaptischen Vesikeln lokalisiert und an der Modulation synaptischer Aktivität beteiligt. Es ließ sich in allen corticalen Kulturen nachweisen (Abbildung 14 A), aber nur in den Axon-Bündeln und Zell-Clustern von striatalen Kulturen mit hoher Dichte (CryoStriatum: $\geq 2,5 \times 10^5 / \text{cm}^2$; eStriatum: $\geq 1 \times 10^5 / \text{cm}^2$; Abbildung 14 B). In Co-Kulturen von CryoStriatum mit CryoCortex war Synaptophysin nur in den corticalen Zellarealen lokalisiert (Abbildung 14 C). Die Synaptophysin-Färbung war in CryoCortex-Kulturen immer intensiver als in striatalen Kulturen, auch wenn diese sehr dicht ausgesät worden waren.



3.2.3 GABA

Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen den neuronalen Marker MAP2 und gegen den Neurotransmitter GABA dienten zur Abschätzung des Anteils inhibitorischer Neurone in den verwendeten Kulturen. Für CryoCortex wurde so ein Anteil GABAerger Neurone von $20 \pm 11 \%$ ermittelt ($n = 5$; 36 and 39 div; Abbildung 15 A). Ähnliche Werte ergaben sich auch für CryoStriatum ($22 \pm 18 \%$; $n = 13$; 36 and 37 div; Abbildung 15 C und D) und eStriatum ($25 \pm 13 \%$; $n = 41$; 19 div; Abbildung 15 E und F). Der Anteil GABA-positiver Neurone in pStriatum-Kulturen lag höher ($51 \pm 18 \%$; $n = 11$, 9 and 19 div; Abbildung 15 B).

Diese Werte sollten allerdings als grobe Schätzungen betrachtet werden, da die Auszählung durch die Bildung dreidimensionaler Strukturen wie den kompakten Zell-Clustern in striatalen Kulturen mit hoher Zelldichte stark erschwert wurde. Daher wurden nur Kulturen mit niedriger Zelldichte für die Auswertung herangezogen, obwohl der Anteil GABAerger Neurone innerhalb der striatalen Zell-Cluster deutlich höher lag als in Arealen mit vereinzelt Neuronen.

Abbildung 15 (nächste Seite): Doppelfärbungen des Neuronenmarkers MAP2 (microtubule associated protein 2; grün) und des inhibitorischen Neurotransmitters GABA (rot) zeigten spezifische Unterschiede in der Netzwerkausbildung zwischen den einzelnen Gewebetypen aber auch bei verschiedenen Aussaatdichten der striatalen Kulturen. MAP2 ist bevorzugt in Zellkörpern und Dendriten, seltener in Axonen lokalisiert.

A) In CryoCortex-Kulturen (25 div; $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$) waren distinkte GABAerge Neurone zu erkennen, die etwa ein Fünftel der Gesamtpopulation ausmachten.

B) Die dicht ausgesäten pStriatum-Kulturen bildeten große Zell-Cluster (26 div; $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$). Dabei zeigte ein Großteil der Neurone, die in diese Cluster eingebunden waren, eine nur schwache GABA-Expression, während bei Zellen, die nicht Teil dieser Cluster waren, der Anteil GABAerger Neurone geringer, die Immunfärbung dafür aber deutlich stärker ausfiel.

C) Dünn ausgesäte CryoStriatum-Zellen (36 div, $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$) wiesen nur wenige und kurze Neuriten auf und waren daher kaum vernetzt. Nur wenige Zellen waren positiv für GABA, zeigten aber eine sehr starke Immunfärbung.

D) In dichten CryoStriatum-Kulturen (27 div, $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$) waren fast alle Neurone in Cluster eingebunden und zeigten durchweg nur eine schwache GABA-Expression.

E) Dünne eStriatum-Kulturen (19 div, $2,5 \times 10^4 / \text{cm}^2$) zeigten ein ähnliches Bild wie dünne CryoStriatum-Zellen: eine sehr schwache Vernetzung und distinkte GABAerge Neurone.

F) Dicht ausgesätetes eStriatum (26 div, $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$) ähnelte in seiner Erscheinung pStriatum. Fast alle Neurone zeigten eine lediglich schwache GABA-Expression und waren in Cluster eingebunden.

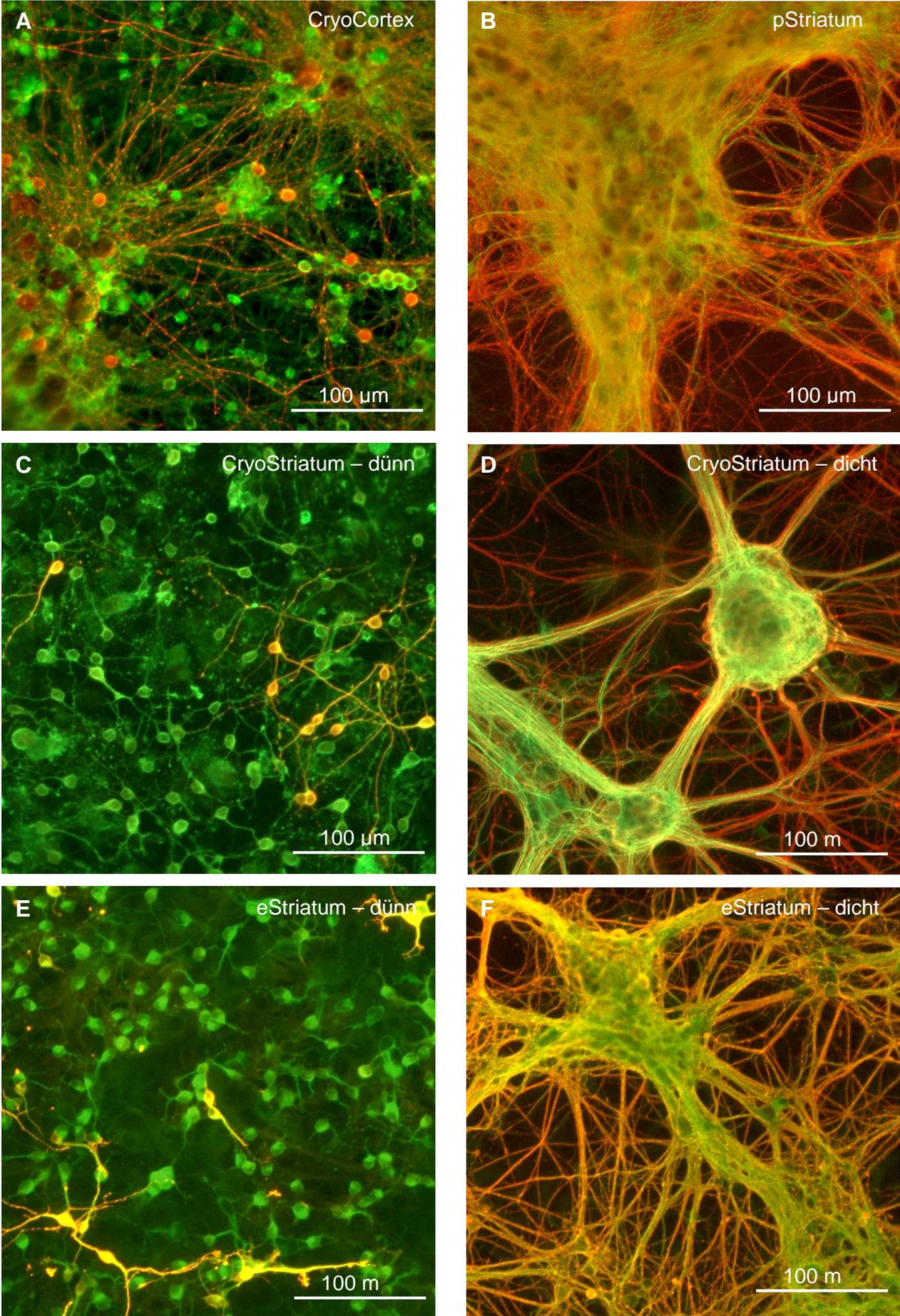


Abbildung 15

3.3 Modulation der Netzwerkaktivität

3.3.1 Magnesium-Entzug gleicht die Netzwerkaktivität von corticalen und striatalen Zellen einander an

Magnesium moduliert die synaptische Effizienz und greift in die durch den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat vermittelte Erregung postsynaptischer Neurone ein, indem es bestimmte Glutamat-Rezeptoren, so genannte NMDA-Rezeptoren, blockiert. Dieser Magnesium-Block wird *in vivo* durch eine überschwellige Depolarisation der Zellmembran aufgehoben. Ist im umgebenden Medium kein Magnesium vorhanden, werden NMDA-Rezeptoren leichter aktivierbar. Durch den Entzug von Magnesium wurde das Aktivitätsmuster von pStriatum und eStriatum deutlich verändert, während es auf CryoCortex nur einen geringen Effekt hatte (Tabelle 3).

Es wurden jeweils zehn Messungen unter Neurobasal-Medium und die zehn nachfolgenden Messungen unter magnesiumfreier Badlösung ausgewertet: Die unkorrelierten einzelnen Spikes, die eStriatum und pStriatum während der Interburst-Intervalle feuerten, wurden durch den Magnesium-Entzug unterdrückt (Abbildung 16). Somit nahm sowohl der Anteil Spikes in Bursts deutlich zu (pStriatum: von 54 ± 22 % auf 88 ± 5 %; eStriatum: von 62 ± 18 % auf 81 ± 10 %) als auch der Anteil leerer Bins (pStriatum: von 49 ± 31 % auf 87 ± 9 %; eStriatum: von 31 ± 22 % auf 71 ± 9 %). Die stärkere Gleichförmigkeit der Aktivität auf den Elektroden schlug sich auch in einem höheren Cohen's Kappa-Wert nieder (pStriatum: von $0,35 \pm 0,23$ auf $0,49 \pm 0,14$; eStriatum: von $0,29 \pm 0,11$ auf $0,41 \pm 0,13$).

In den Messungen von CryoCortex war die Aktivität schon unter Nährmedium so stark korreliert wie die striatalen Kulturen nach Magnesium-Entzug. Die Inkubation mit magnesiumfreier Standard-Badlösung führte bei manchen Parametern zu einer leichten Abnahme (Anteil Spikes in Bursts: von 83 ± 12 % auf 71 ± 13 %; Leere Bins: von 73 ± 27 % auf 75 ± 7 %; Cohen's Kappa: von $0,48 \pm 0,13$ auf $0,38 \pm 0,05$). Möglicherweise ist dieses Phänomen aber auf eine Schwäche der Analyse zurückzuführen, da mit dem Mediumwechsel oftmals eine Verringerung der Spike-Amplitude einherging. Dies könnte dazu geführt haben, dass einige Spikes unter die Spikeschwelle des Analyseprogramms fielen und einige Bursts nicht mehr als solche detektiert werden konnten. Mit bloßem Auge war keine Abnahme der Korrelation zu beobachten. Der Entzug von Magnesium scheint die synaptische Effizienz der striatalen Kulturen

auf einen Level zu erhöhen, der mit einer „Gleichschaltung“ der Zellen einhergeht und das die corticalen Netzwerke bereits in Magnesium-haltigem Medium erreichen.

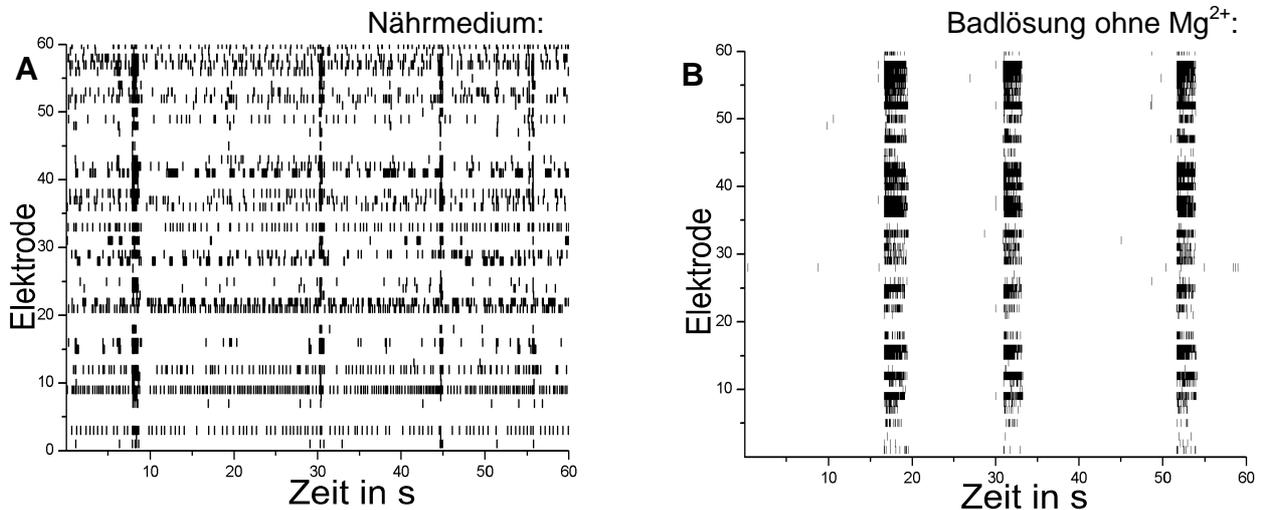


Abbildung 16: Der Wechsel von Nährmedium auf magnesiumfreie Badlösung bewirkte eine deutliche Veränderung in der Organisation der Netzwerkaktivität.

A) Unter Nährmedium zeigte pStriatum nach 8 dv synchrone Spike-Bursts, die von unkorrelierten, einzelnen Aktionspotenzialen umgeben waren.

B) Nach Magnesiumentzug (rechts) waren nahezu alle Spikes in Bursts eingebunden, die vom ganzen Netzwerk synchron gefeuert wurden.

	Medium	Anteil Spikes in Bursts	Anteil leerer Bins	Cohen's Kappa
pStriatum (8-24 div; n=10; 1.920 s Messzeit)	Nährmedium (36.923 Spikes auf 319 Elektroden)	54 % (± 22 %)	49 % (± 31 %)	0,35 (± 0,23)
	Magnesiumfreie Badlösung (37.442 Spikes auf 323 Elektroden)	88 % (± 5 %)	87 % (± 9 %)	0,49 (± 0,14)
Signifikanz:		p < 0,001	p = 0,003	p = 0,096
eStriatum (14-41 div; n=10; 1.620 s Messzeit)	Nährmedium (95.215 Spikes auf 398 Elektroden)	62 % (± 18 %)	31 % (± 22 %)	0,29 (± 0,11)
	Magnesiumfreie Badlösung (84.460 Spikes auf 350 Elektroden)	81 % (± 10 %)	71 % (± 9 %)	0,41 (± 0,13)
Signifikanz:		p = 0,023	p < 0,001	p = 0,017
CryoCortex (22-84 div; n=10; 1.800 s Messzeit)	Nährmedium (127.041 Spikes auf 400 Elektroden)	83 % (± 12 %)	73 % (± 27 %)	0,48 (± 0,13)
	Magnesiumfreie Badlösung (88.652 Spikes auf 370 Elektroden)	71 % (± 13 %)	75 % (± 7 %)	0,38 (± 0,05)
Signifikanz		p = 0,046	p = 0,826	p = 0,022

Tabelle 3: Magnesiumentzug bewirkte in solchen Kulturen, in denen der Anteil in Bursts eingebundener Spikes unter Nährmedium gering gewesen war, einen deutlichen Anstieg dieses Parameters. Dass die Bursts zeitgleich im ganzen Netzwerk gefeuert wurden und dazwischen kaum Aktivität registriert wurde, kann man am hohen Anteil leerer Bins ablesen. Cohen's Kappa beschreibt die Gleichförmigkeit der Spikeverteilung auf den verschiedenen Elektroden, die nach Magnesiumentzug in solchen Kulturen deutlich höher war, die unter Nährmedium nur eine schwache Korrelation der Netzwerkaktivität gezeigt hatten.

3.3.2 Der GABA-Antagonist Bicucullin steigert die Aktivität von striatalen Kulturen

Das Alkaloid Bicucullin blockiert selektiv eine bestimmte Klasse der GABA-Rezeptoren, nämlich die GABA_A-Rezeptoren. Für die Untersuchungen wurden neben CryoCortex noch Zellen von frisch präparierten Striata der embryonalen und postnatalen Wistar-Ratte (eStriatum und pStriatum) verwendet, die in einer so hohen Dichte ausgesät worden waren, dass synchrone Burst-Aktivität abgeleitet werden konnte. In beiden striatalen Zell-Kulturen verdoppelte 50 µM Bicucullin die Spike-Zahl (pStriatum: $1,99 \pm 0,71$; $n = 11$; $p < 0,001$; eStriatum: $1,84 \pm 1,06$; $n = 11$; $p = 0,03$; Abbildung 17), während es in den corticalen Kulturen keinen Effekt auf die Spike-Zahl hatte ($1 \pm 0,4$; $n = 12$; $p = 0,98$; Abbildung 17). Die Erhöhung der Spike-Zahl beruhte nicht auf einer höheren Burst-Frequenz (pStriatum: $1,09 \pm 0,35$; $p = 0,42$; eStriatum: $0,82 \pm 0,51$; $p = 0,26$), sondern auf einer größeren Anzahl von Spikes innerhalb eines Bursts (pStriatum: $1,92 \pm 0,39$; $p < 0,001$; eStriatum: $3,09 \pm 1,3$; $p < 0,001$; Abbildung 19).

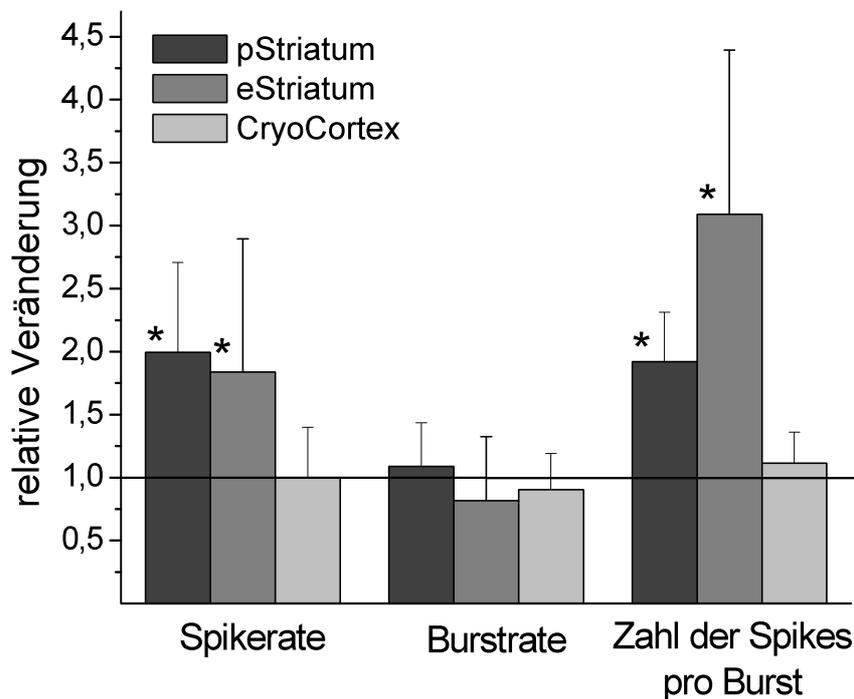


Abbildung 17: Der GABA_A-Antagonist Bicucullin in einer Konzentration von 50 µM steigerte die Spikerate der striatalen Kulturen pStriatum und eStriatum, aber nicht die von CryoCortex. Die Aktivierung wurde von einer Erhöhung der Spike-Anzahl innerhalb eines Bursts begleitet, während die Burst-Frequenz unverändert blieb. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an.

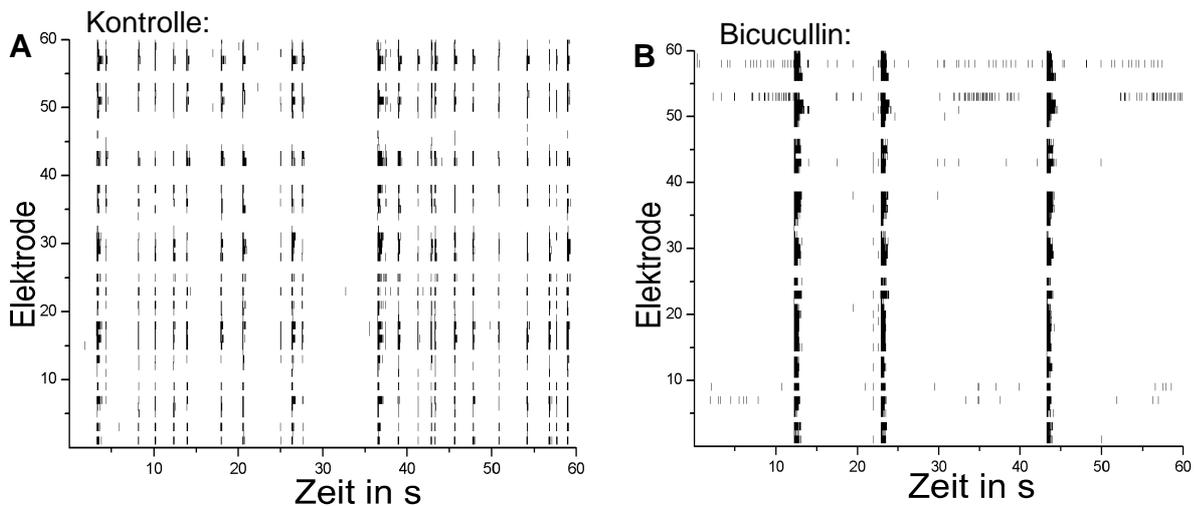


Abbildung 18: Spikeraster-Plot einer Messung von eStriatum nach 35 div unter Kontrollbedingungen (A) und nach Applikation von 50 μ M Bicucullin (B). Die Dauer der Bursts, ebenso wie die der Interburst-Intervalle nahm deutlich zu.

Wurde unter Kontrollbedingungen in den elf Messungen von pStriatum ein Burst durchschnittlich von $10,8 \pm 2,7$ Spikes gebildet, so waren es nach Applikation von Bicucullin $20,2 \pm 4,3$ ($p < 0,001$; Abbildung 19 A). Ein vergleichbarer Effekt war in den eStriatum Messungen zu sehen: unter Kontrollbedingungen bildeten $7,4 \pm 2,2$ Spikes einen Burst, nach Applikation von 50 μ M Bicucullin waren es $22,5 \pm 9,5$ Spikes ($p < 0,001$). In corticalen Kulturen beeinflusste Bicucullin weder die Burst-Frequenz ($0,91 \pm 0,29$; $p = 0,28$) noch die Anzahl der Spikes in einem Burst ($1,11 \pm 0,25$; $p = 0,14$). Ohne Bicucullin bildeten im Durchschnitt $11,4 \pm 4,4$ Spikes einen Burst, danach $12,2 \pm 3,6$ ($p = 0,38$). Abzulesen ist dieser Effekt auch an der Burst-Dauer, die sich in den striatalen Kulturen unter Bicucullin im Schnitt verdoppelte (pStriatum: $1,74 \pm 0,63$; $p = 0,003$; eStriatum: $2,15 \pm 0,99$; $p = 0,003$; Abbildung 19 B und C), aber in corticalen Kulturen unverändert blieb ($1,16 \pm 0,55$; $p = 0,34$). Dauerte in pStriatum-Messungen ein Burst unter Kontroll-Bedingungen durchschnittlich 173 ± 48 ms (eStriatum: 172 ± 53 ms), so verlängerte er sich unter Bicucullin auf 285 ± 80 ms ($p = 0,002$; eStriatum: 335 ± 98 ms; $p = 0,002$). CryoCortex-Kulturen hatten vor Applikation von Bicucullin eine Burstdauer von 249 ± 129 ms und danach von 266 ± 144 ms ($p = 0,71$).

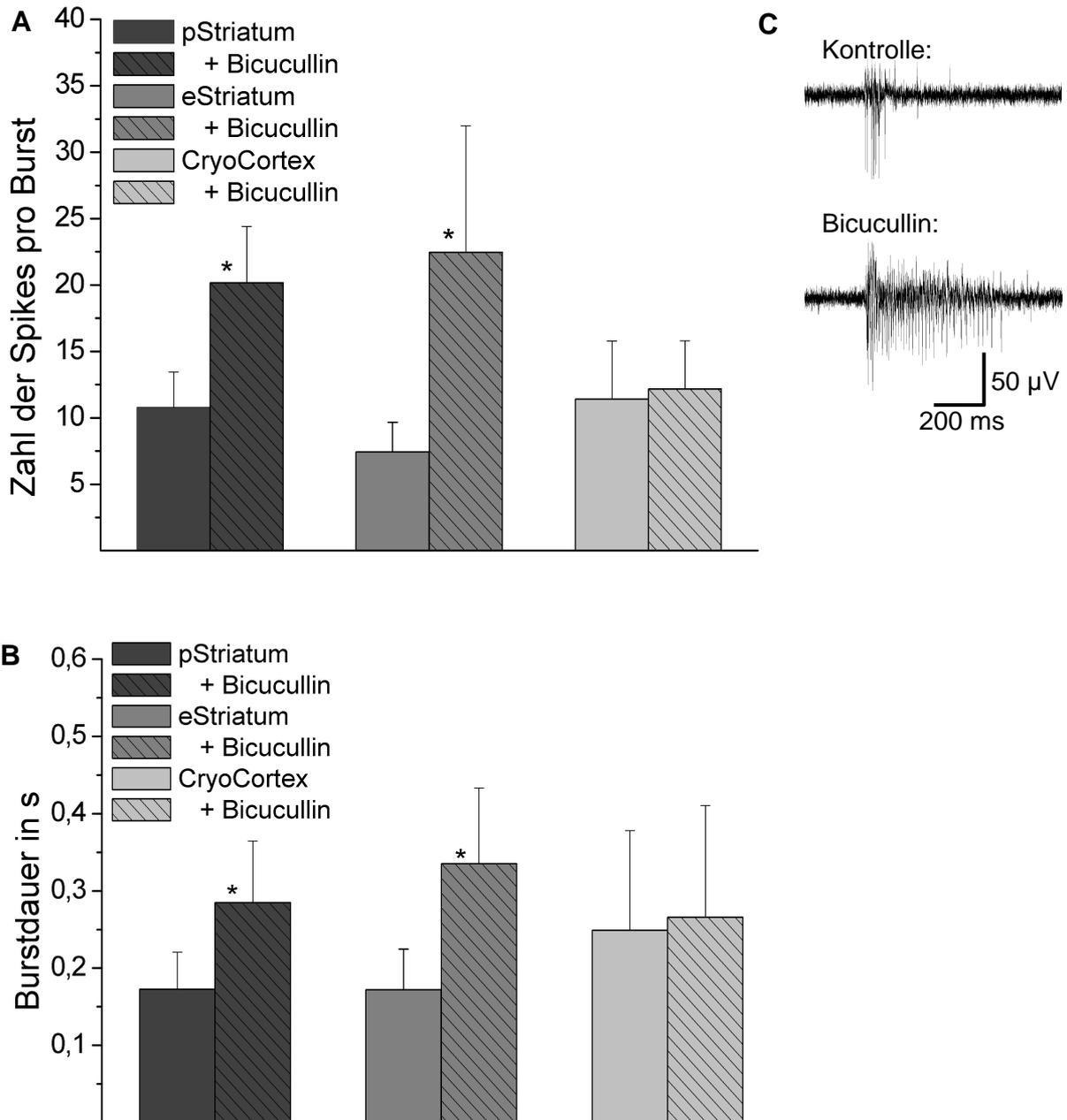


Abbildung 19: Bicucullin erhöhte in striatalen Kulturen die durchschnittliche Zahl der Spikes pro Burst (A) und die durchschnittliche Dauer eines Bursts (B). Bursts von CryoCortex zeigten keine signifikanten Unterschiede. Sternchen geben signifikante Veränderungen an. C) Signalspuren einer einzelnen Elektrode (eStriatum, 20 div) unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 50 µM Bicucullin. Die Burstdauer nahm unter Bicucullin deutlich zu.

Darüber hinaus hatte Bicucullin einen „ordnenden“ Effekt auf die Netzwerkaktivität. So erhöhte es z.B. bei allen drei Kulturen den Anteil von Spikes, die in die Überstruktur eines Bursts eingebunden waren. Bicucullin unterdrückte Einzel-Spike-Aktivität. Deutlich war dieser Effekt allerdings nur in Kulturen, die unter Kontrollbedingungen einen recht geringen Anteil in Bursts

organisierter Spikes aufwiesen. So gehörten in eStriatum-Messungen 79 ± 13 % der Spikes zu Bursts, nach Applikation von Bicucullin aber 94 ± 3 % ($p < 0,001$). In pStriatum stieg der Anteil in Bursts eingebundener Spikes nur von 93 ± 3 % auf 96 ± 2 % ($p = 0,01$) und in CryoCortex von 86 ± 11 % auf 87 ± 6 % ($p = 0,69$). Mit dem höheren Anteil zu Bursts gehörigen Spikes ging ein Anstieg des Parameters Cohen's Kappa einher, der ein Maß für die Korrelation zwischen der Aktivität auf verschiedenen Elektroden darstellt. So steigerte Bicucullin den durchschnittlichen Cohen's Kappa-Wert für eStriatum von $0,43 \pm 0,04$ auf $0,60 \pm 0,07$ (pStriatum: $0,61 \pm 0,06$ vs $0,62 \pm 0,06$; CryoCortex: $0,43 \pm 0,07$ vs $0,43 \pm 0,06$). Bei der Unterteilung der Messungen in einzelne Bins von 100 ms Länge steigerte Bicucullin in eStriatum und CryoCortex den Anteil von Bins, in denen kein einziges Aktionspotenzial gefeuert wurde (eStriatum: 85 ± 11 % vs 78 ± 9 %; $p = 0,03$; CryoCortex: 82 ± 8 % vs 80 ± 8 %; $p = 0,005$), hatte aber keinen Einfluss auf den Anteil leerer Bins in pStriatum (91 ± 7 % vs 92 ± 3 %; $p = 0,08$).

3.3.3 Auch der GABA-Antagonist Gabazine steigert striatale Netzwerkaktivität

Der GABA_A-Antagonist Gabazine (SR 95531) soll eine höhere Potenz und höhere Spezifität aufweisen als Bicucullin (Ito, Koshihara et al., 1992; Uchida, Cestari et al., 1996). Gabazine ($10 \mu\text{M}$) modulierte die Netzwerkaktivität in ähnlicher Weise wie Bicucullin: Die Burstdauer und die Anzahl der Spikes pro Burst nahm zu (Burstdauer: $1,82 \pm 0,57$; Anzahl der Spikes pro Burst: $1,99 \pm 1,18$). Aufgrund der wenigen Experimente mit Gabazine ($n = 3$) waren diese Veränderungen aber nicht signifikant ($p = 0,13$ und $p = 0,28$).

3.3.4 Der Kaliumkanal-Blocker Bariumchlorid zerstört die Korrelation der Netzwerkaktivität

Barium blockiert Kaliumströme, indem es sich in die Pore eines Kanals setzt und ihn für Kalium-Ionen undurchlässig macht. Kaliumkanäle sind sowohl für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials (Kalium-einwärts-Gleichrichterkanäle; K_{ir}) als auch für die Repolarisation nach dem Feuern eines Aktionspotenziales (spannungsabhängige Kaliumkanäle; K_v) verantwortlich.

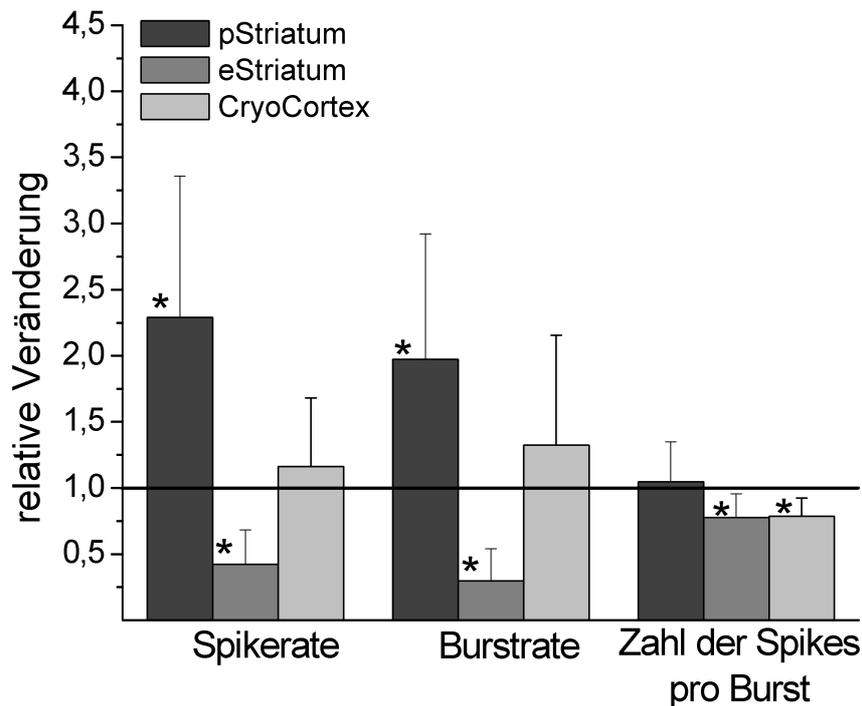


Abbildung 20: In einer Konzentration von 500 μ M steigerte der Kaliumkanal-Blocker Bariumchlorid die Spike- und Burstrate in pStriatum, inhibierte aber die Spikerate von eStriatum und hatte nur einen schwachen Effekt auf die Netzwerkaktivität von CryoCortex. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an.

Die Spikerate von pStriatum wurde durch 500 μ M Bariumchlorid mehr als verdoppelt ($2,29 \pm 1,07$; $n = 10$; $p = 0,004$), was vor allem auf einer Erhöhung der Burstfrequenz zurückzuführen war ($1,97 \pm 0,95$; $p = 0,01$; Abbildungen 20; 21 A und B). Die durchschnittliche Anzahl der Spikes, die einen Burst bilden, blieb unverändert ($1,05 \pm 0,3$; $p = 0,63$).

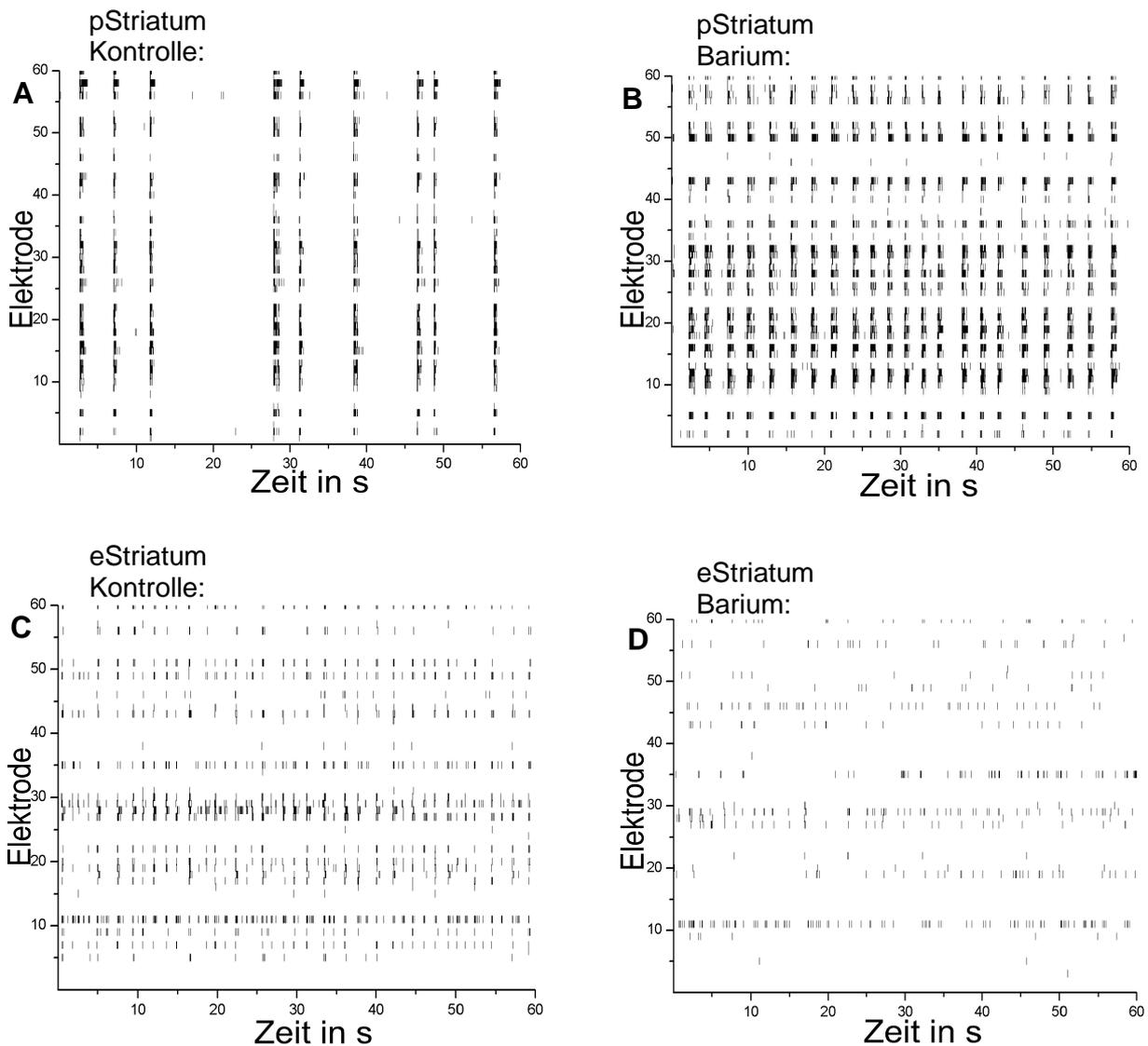


Abbildung 21: MEA-Messung von pStriatum nach 10 div unter Kontrollbedingungen (A) und nach Zugabe von 500 μ M Bariumchlorid (B). Man erkennt eine deutliche Zunahme der Burstfrequenz. Netzwerkaktivität von eStriatum (30 div) vor (C) und nach der Applikation von Bariumchlorid (D). Die Spikerate nahm deutlich ab, ebenso wie die Korrelation der Aktivität auf den einzelnen Elektroden.

Allerdings verlängerte sich das Zeitintervall zwischen zwei Spikes innerhalb eines Bursts durch Barium von durchschnittlich 31 ± 18 ms auf 41 ± 20 ms ($p < 0,001$; Abbildungen 22 und 23). In corticalen Kulturen war keine Aktivierung durch Barium zu beobachten ($1,05 \pm 0,3$; $n = 10$; $p = 0,63$). Auch die Interspike-Intervalle innerhalb von Bursts blieben unverändert (33 ± 15 ms vs 34 ± 16 ms; $p = 0,826$).

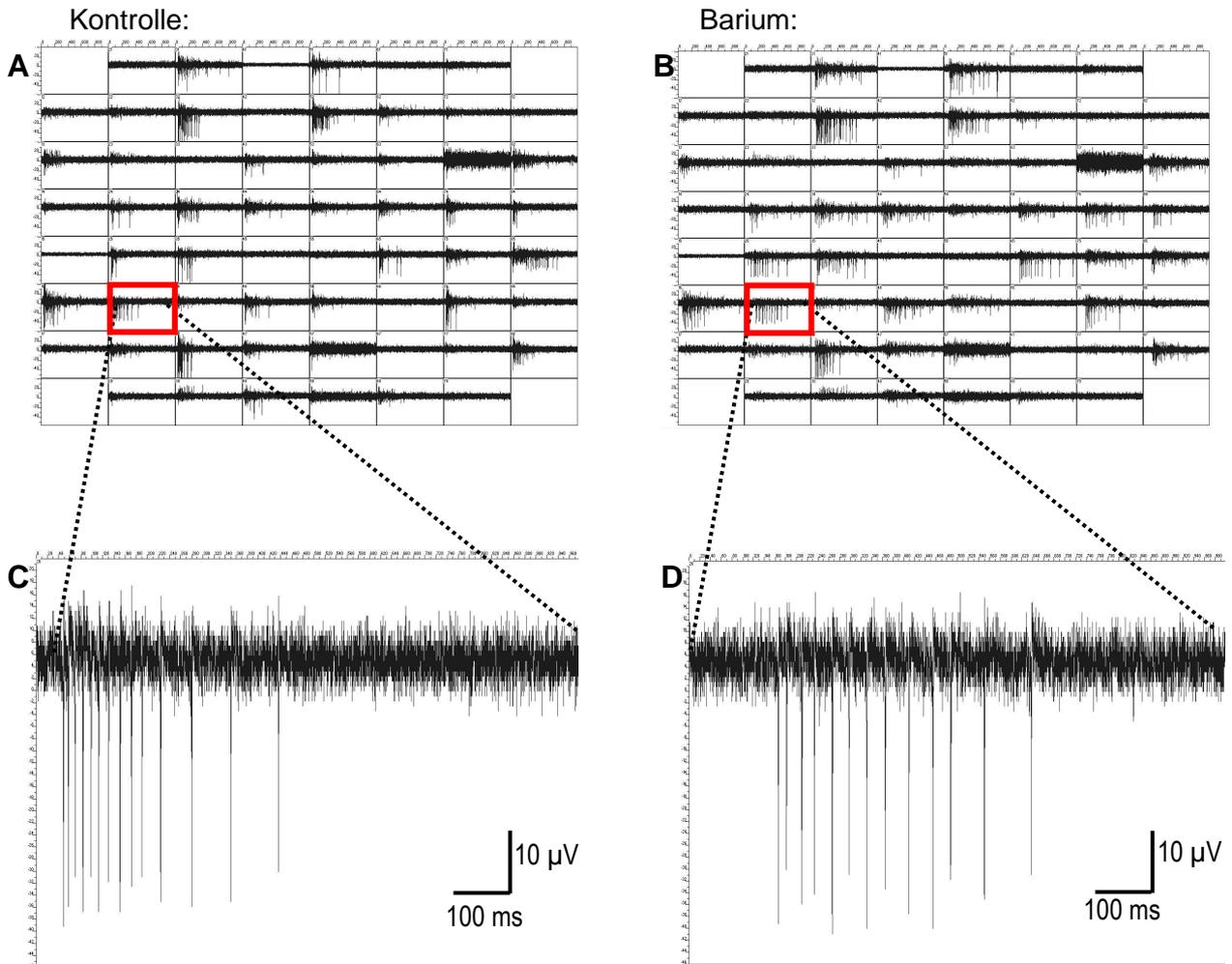
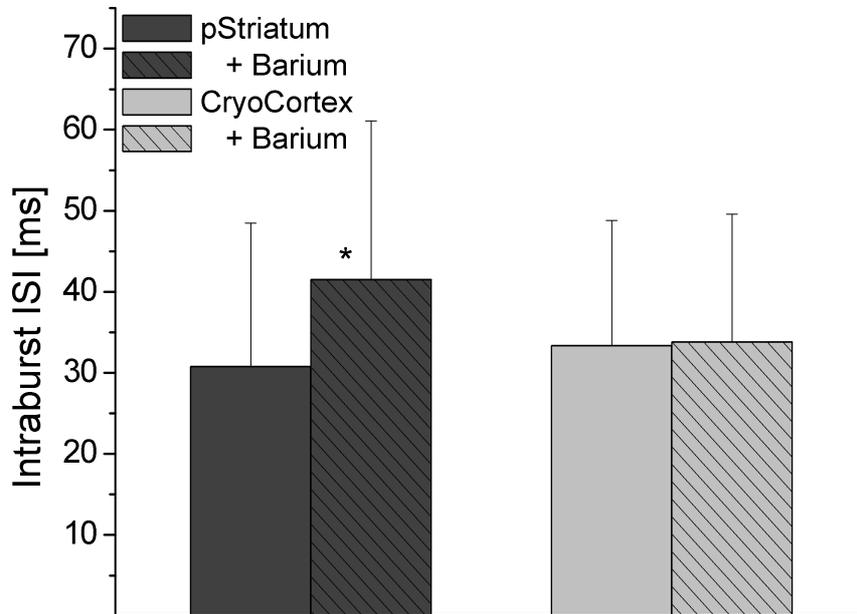


Abbildung 22: Bildschirmfotos der von den sechzig Elektroden des MEAs detektierten elektrischen Aktivität während eines Zeitfensters von einer Sekunde. Jedes kleine Fenster gibt das Signal einer einzelnen Elektrode wieder. Im unteren Abschnitt ist das Signal einer Elektrode (rot umrahmt) vergrößert dargestellt (C und D). Bildschirmfoto A wurde während einer Messung mit pStriatum unter Kontrollbedingungen aufgenommen. Foto B zeigt die Aktivität des gleichen pStriatum-MEAs nach Applikation von 500 μ M Bariumchlorid. Die Bursts erscheinen unter Barium nicht so kompakt wie zuvor, die Burstdauer ist länger, und die Intraburst-ISIs sind größer.

Abbildung 23: Barium steigerte die Netzwerkaktivität von pStriatum und verlängerte gleichzeitig die Intraburst-ISIs. Keinen Effekt auf die Intraburst-ISIs hatte Barium bei CryoCortex, dessen Spontanaktivität nicht durch die Substanz aktiviert wurde. Eine Aussage über die Intraburst-ISIs von eStriatum ist nicht sinnvoll, da unter Barium kaum noch Bursts detektiert wurden. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an.



Interessanterweise wirkte Barium auf eStriatum-Kulturen nicht aktivierend, sondern inhibierend ($0,42 \pm 0,26$; $n = 14$; $p < 0,001$; Abbildungen 20; 21 C und D). Diese Inhibition ging einher mit einer Zerstörung des synchronen Burst-Musters. Waren unter Kontrollbedingungen $69 \pm 17 \%$ der Spikes in Bursts organisiert, so waren es unter Barium nur noch $34 \pm 18 \%$ ($p < 0,001$). Dementsprechend sank auch das Maß für die Korrelation zwischen den Elektroden, Cohens's Kappa ($0,35 \pm 0,08$ vs $0,12 \pm 0,08$; $p < 0,001$; Abbildung 24 A), und der Anteil leerer Bins ($72 \pm 13 \%$ vs $62 \pm 21 \%$; $p = 0,02$; Abbildung 24 B). Eine Untersuchung der Auswirkung von $500 \mu\text{M}$ auf die Intraburst-Interspike-Intervalle von eStriatum erschien nicht sinnvoll, weil das Burst-Muster in den meisten Fällen nicht mehr existent war.

Die allmähliche Aufhebung des synchronen Burst-Musters war allerdings auch in CryoCortex und pStriatum zu sehen, wo Barium entweder keinen oder einen aktivierenden Effekt hatte. Auch hier erniedrigte sich die Rate der Spikes, die Teil von Bursts waren (CryoCortex: $85 \pm 10 \%$ vs $71 \pm 18 \%$; $p = 0,002$; pStriatum: $88 \pm 7 \%$ vs $77 \pm 10 \%$; $p = 0,002$), die Werte für Cohen's Kappa waren kleiner (CryoCortex: $0,43 \pm 0,08$ vs $0,38 \pm 0,07$; $p = 0,01$; pStriatum: $0,50 \pm 0,08$ vs $0,29 \pm 0,10$; $p < 0,001$; Abbildung 24 A) ebenso wie der Anteil leerer Bins (CryoCortex: $85 \pm 6 \%$ vs $74 \pm 10 \%$; $p = 0,002$; pStriatum: $85 \pm 12 \%$ vs $57 \pm 16 \%$; $p < 0,001$; Abbildung 24 B). Eine leichte Aktivierung konnte in eStriatum und pStriatum durch geringere

Barium-Konzentrationen von 100 μM und 200 μM erzielt werden (100 μM : $1,26 \pm 0,22$; $n = 8$; $p = 0,01$; 200 μM : $1,20 \pm 0,40$; $n = 5$; $p = 0,31$). Bei beiden Konzentrationen war aber ebenfalls eine Veränderung des Burst-Musters zu beobachten: der Anteil der Spikes, die Teil von Bursts waren, sank (100 μM : $0,88 \pm 0,14$; 200 μM : $0,77 \pm 0,06$) ebenso wie Cohen's Kappa (100 μM : $0,58 \pm 0,06$; $p < 0,001$; 200 μM : $0,51 \pm 0,02$; $p < 0,001$) und der Anteil leerer Bins (100 μM : $0,74 \pm 0,21$; $p = 0,003$; 200 μM : $0,72 \pm 0,17$; $p = 0,02$). In pStriatum-Kulturen konnten auch Barium-Konzentrationen bis zu 2 mM keine Inhibition der Netzwerkaktivität auslösen.

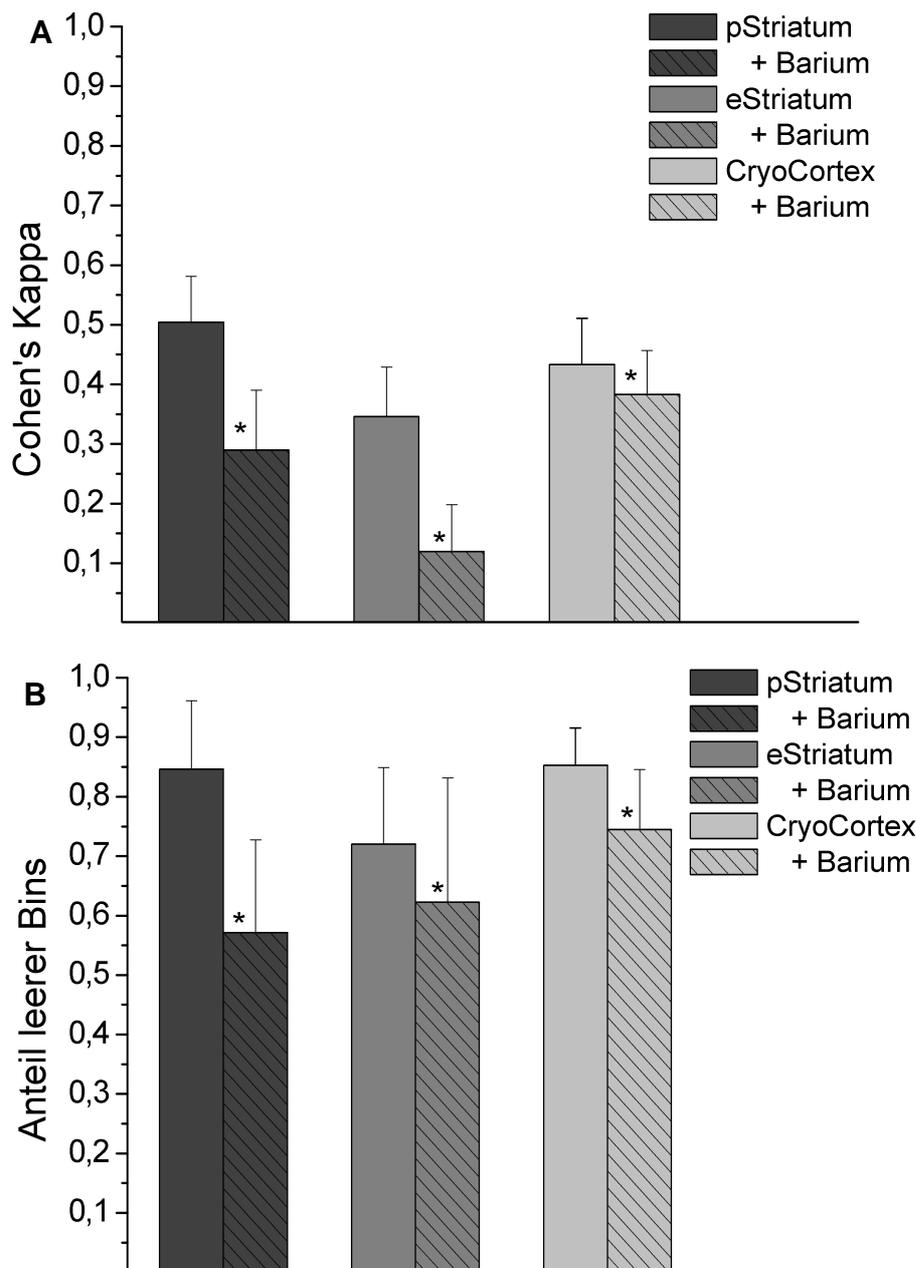


Abbildung 24: Barium beeinträchtigte bei allen untersuchten Zelltypen die Korrelation der Netzwerkaktivität. Cohen's Kappa nahm nach der Inkubation mit Barium ab (A), ebenso wie der Anteil leerer Bins (B; Binbreite jeweils 100 ms). Dies lässt sich vor allem auf den höheren Anteil unkorrelierter Einzel-Spike-Aktivität zurückführen. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an.

Da Kaliumströme auch für die Repolarisation des Membranpotenzials nach dem Feuern eines Aktionspotenziales verantwortlich sind, wurde untersucht, ob die relativ unspezifische Blockade von Kaliumkanälen durch Barium sich auch auf den zeitlichen Verlauf eines Aktionspotenziales auswirkt, oder genauer gesagt auf die von MEAs gemessene Änderung des Feldpotenziales. Da die Kaliumströme während der Repolarisationsphase des Aktionspotenziales maximal sind, war ein Effekt von Barium eigentlich in einer späteren Phase des Aktionspotenziales zu erwarten. Von Kalium-Blockern wie z.B. TEA (Tetraethylammonium) und 4-AP (4-Aminopyridin) ist bekannt, dass sie die Aktionspotenziale „weiten“, weil sie die Repolarisation verzögern. Die Amplitude des Aktionspotenzials beeinflussen sie nicht.

Ob ein Spike in der extrazellulären Ableitung einen positiven oder negativen Peak hat, hängt übrigens vom Ort der Detektion ab: Aktionspotenziale, die am Soma des Neurons aufgenommen werden, können einen positiven Peak haben, axonale Spikes haben immer einen negativen (Claverol-Tinture und Pine, 2002). Die Amplitude des Signals hängt von der Zellregion ab, von der abgeleitet wird (höhere Amplituden am Axonhügel als an passiven Dendriten) und von der Distanz zwischen Zelle und Elektrode.

Für die Analyse wurden fünf Messungen (zuzüglich vorhergehender Kontrollmessung) von pStriatum ausgewertet, die durch Barium deutlich aktiviert wurden. In der Regel werden in Kulturen mit hoher Zelldichte, wie sie für diese Untersuchung verwendet wurden, von einer Elektrode die Spikes von mehreren Zellen oder Axonen detektiert. Da diese Überlagerung von Spikes mit unterschiedlichem Ursprung eine Auswertung der Form des Signals erschweren würde, wurden pro Messung zwei Kanäle ausgewertet, die jeweils nur Aktionspotenziale von einer einzigen Zelle detektierten (erkennbar an einheitlicher Form und Amplitude des Signals). Nur bei zwei der insgesamt zehn ausgewerteten Elektroden war nach Applikation von Barium eine Veränderung der Spike-Form erkennbar. In beiden Fällen nahm die Peak-to-Peak-Amplitude ab ($33,6 \pm 7,9 \mu\text{V}$ vs $42,4 \pm 7,0 \mu\text{V}$; $p < 0,001$ und $36,5 \pm 4,1 \mu\text{V}$ vs $47,4 \pm 5,0 \mu\text{V}$; $p < 0,001$; Abbildung 25), während die Spike-Breite erhalten blieb. Auch bei den anderen acht ausgewerteten Elektroden sah man keine Veränderung der Repolarisationsphase.

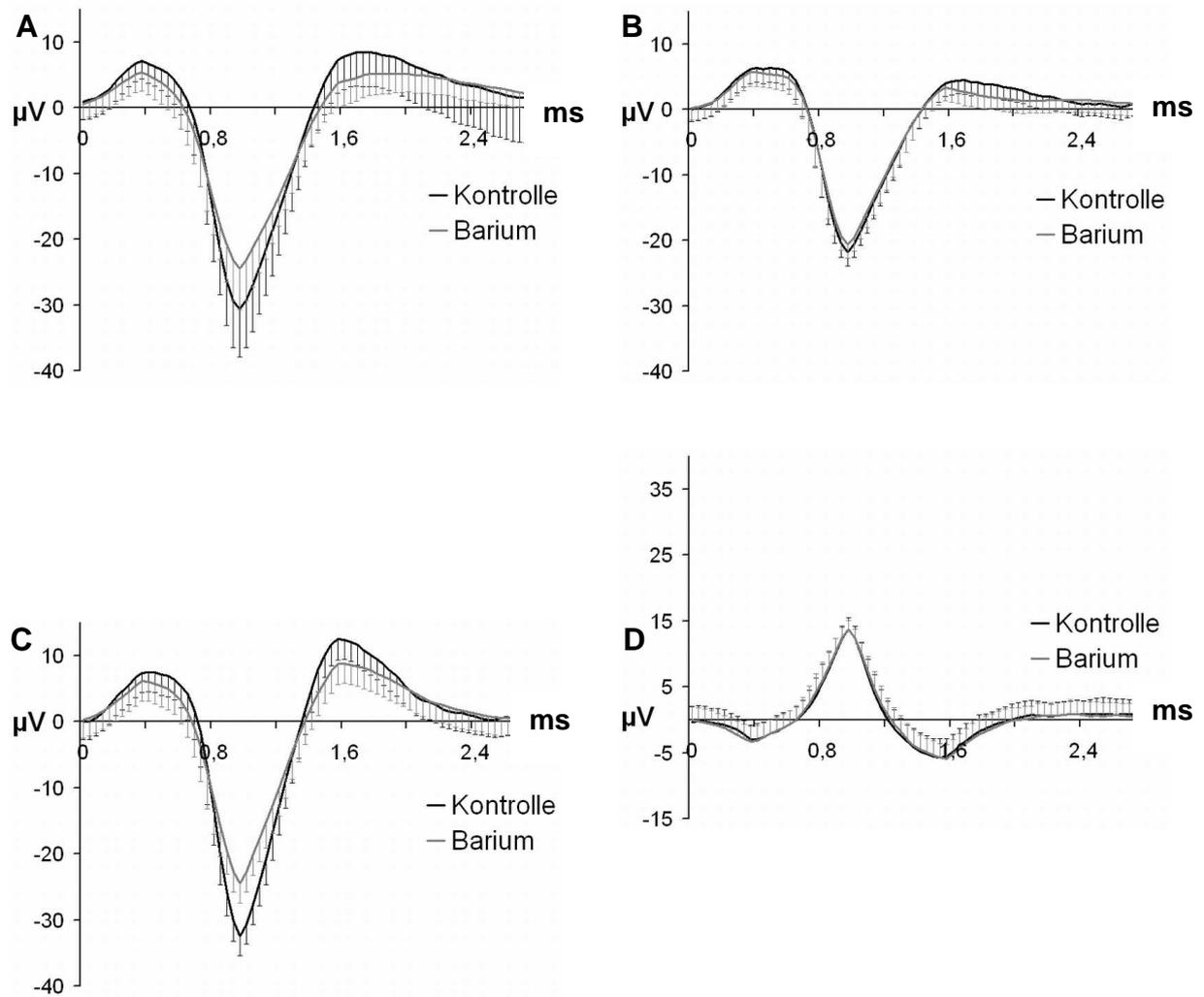


Abbildung 25: Durchschnittliche Wellenformen von Spikes einer pStriatum-Messung, bei der Barium stark aktivierend gewirkt hatte. Es wurden Elektroden mit möglichst einheitlicher Wellenform der registrierten Spikes für die Analyse ausgewählt und dann die mittlere Wellenform aller Spikes abgebildet. A und C zeigen zwei Beispiele für eine im Vergleich zur Kontrollmessung (durchgezogene Linie) verringerte Spike-Amplitude nach Barium-Applikation (gestrichelte Linie). Bei B und D konnte keine Veränderung der Spike-Amplitude festgestellt werden. Keiner der ausgewählten Kanäle zeigte einen Einfluss von Barium auf die Spikebreite.

3.3.5 Glutamat wirkt stärker auf corticale als auf striatale Netzwerkaktivität

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. Seine Ausschüttung aktiviert verschiedene Rezeptorentypen an der postsynaptischen Membran: Metabotrope Glutamat-Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptoren sind Ionenkanäle, durch deren Öffnung die Zellmembran depolarisiert wird. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass vor allem NMDA-Rezeptoren verantwortlich sind für das charakteristische synchrone Burst-Muster von neuronalen Kulturen (Keefer, Gramowski et al., 2001).

Zugabe von Glutamat in einer Konzentration von 100 μM inhibierte komplett jegliche Spike-Aktivität von CryoCortex ($n = 4$), hatte aber keinen Einfluss auf die Spikerate von pStriatum ($0,96 \pm 0,53$; $n = 11$; $p = 0,87$; Abbildung 26). An der hohen Standardabweichung sieht man allerdings, dass die einzelnen Chips sehr unterschiedlich auf die Glutamat-Zugabe reagierten. Während die Aktivität eines Chips auf das Doppelte anstieg (1,92), sank die eines anderen auf die Hälfte der Ausgangsaktivität (0,42). Bei eStriatum war die Reaktion auf 100 μM Glutamat eindeutiger: die Spikerate sank bei allen 10 MEAs deutlich ($0,08 \pm 0,07$; $n = 10$; $p < 0,001$; Abbildung 26).

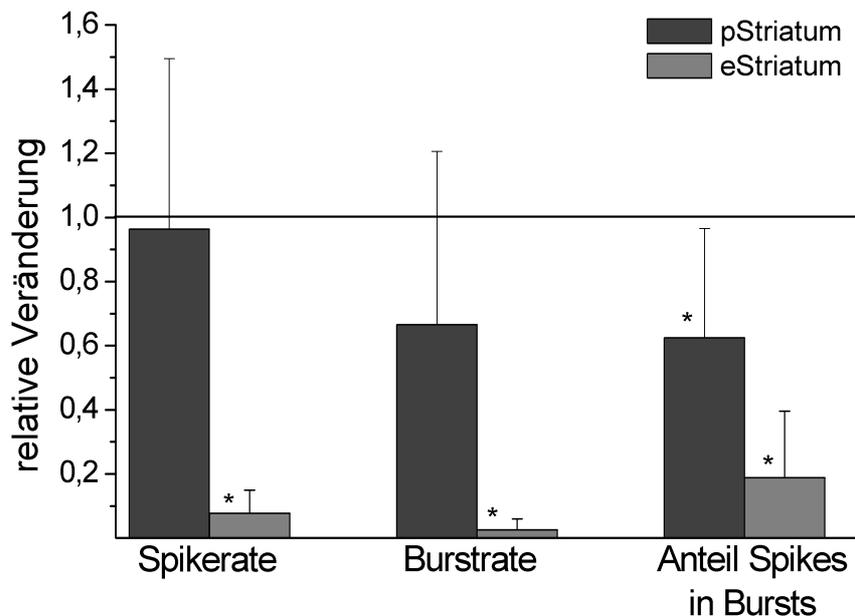


Abbildung 26: Glutamat in einer Konzentration von 100 μM blockierte die Netzwerkaktivität von CryoCortex komplett, inhibierte eStriatum stark und hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Spike- oder Burstrate von pStriatum. In beiden striatalen Kulturen nahm der Anteil in Bursts eingebundener Spikes ab. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an.

Ähnlich wie Barium bewirkte Glutamat einen Zerfall des synchronen Burst-Musters (Abbildung 27 C und D). In pStriatum-Kulturen sank der Anteil in Bursts organisierter Spikes von $89 \pm 18 \%$ auf $52 \pm 25 \%$ ($p = 0,005$), bei eStriatum sogar von $73 \pm 13 \%$ auf $14 \pm 15 \%$ ($p \leq 0,001$; Abbildung 28). Damit einhergehend sanken auch die Werte für den Parameter Cohen's Kappa (pStriatum: $0,53 \pm 0,08$ vs $0,24 \pm 0,13$; $p < 0,001$; eStriatum: $0,40 \pm 0,07$ vs $0,03 \pm 0,04$; $p < 0,001$) und der Anteil leerer Bins (pStriatum: $81 \pm 10 \%$ vs $41 \pm 18 \%$; $p < 0,001$; eStriatum: $81 \pm 8 \%$ vs $56 \pm 40 \%$; $p = 0,08$). Die hohe Standardabweichung beim Anteil leerer Bins für eStriatum nach Glutamat-Zugabe ist darauf zurückzuführen, dass einige MEAs sehr stark inhibiert wurden. Ein vergleichsweise hoher Anteil leerer Bins spiegelt in diesem Fall nur die schwache Gesamt-Aktivität, aber nicht eine hohe Korrelation der Aktivität wider.

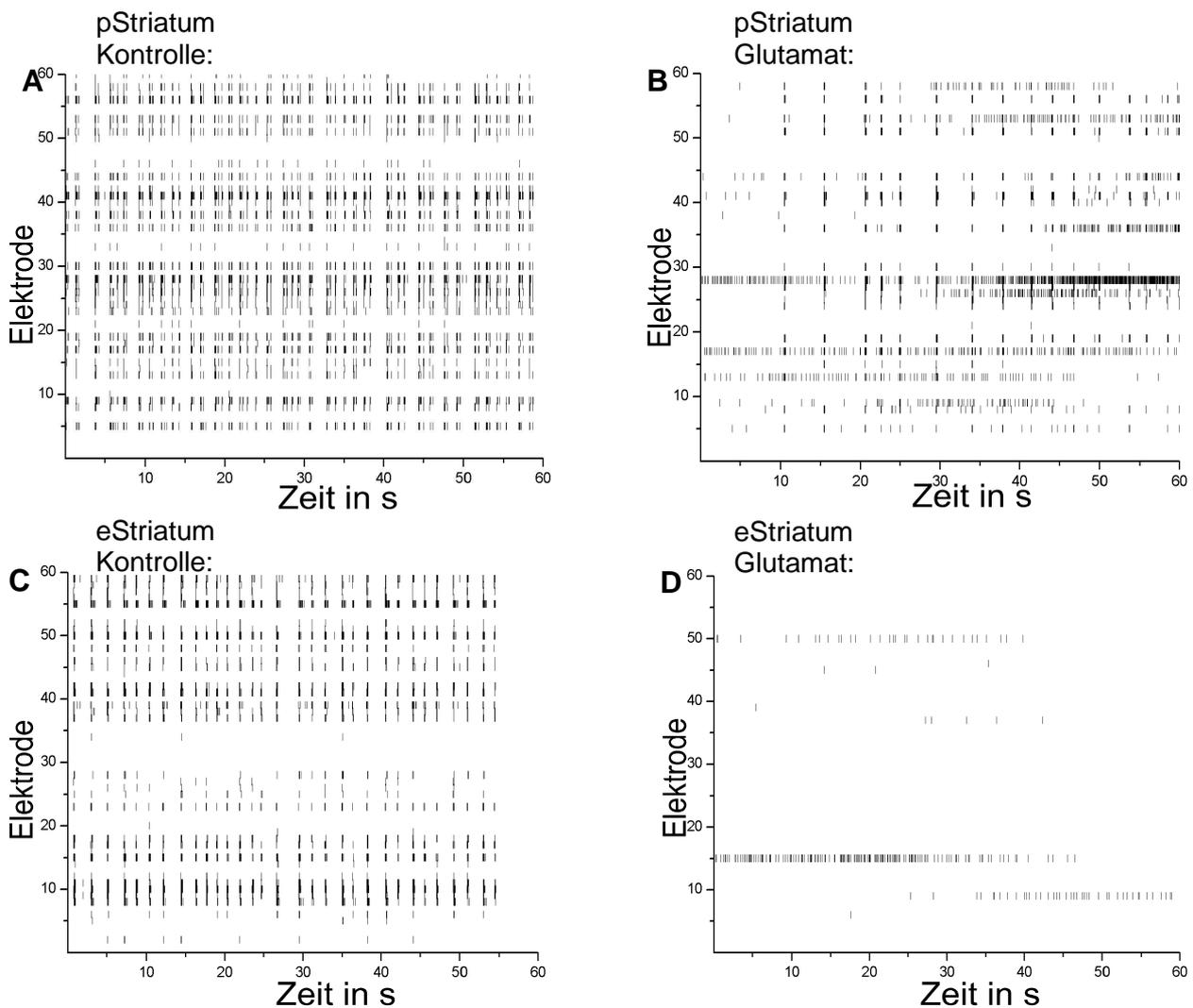


Abbildung 27: Spikeraster-Plots von pStriatum vor (A) und nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ Glutamat (B). Der Anteil nicht in Bursts eingebundener Spikes wurde durch Glutamat stark erhöht, aber es waren noch synchrone Spike-Bursts vorhanden. Anders bei eStriatum, wo Glutamat im Vergleich zur Kontrollmessung (C) die Spikerate deutlich inhibierte und die Korrelation der Netzwerkaktivität vollkommen auflöste (D).

Insgesamt wiesen die Messreihen mit Glutamat eine sehr schlechte Reversibilität auf. So waren von den elf Messungen mit pStriatum nur drei Messungen reversibel, d.h. eine Inhibition der Netzwerkaktivität konnte durch Auswaschen der Substanz wieder aufgehoben werden (eine reversible Aktivierung trat nicht auf). In zwei Messungen war die Aktivität nach Auswaschen noch schwächer als unter Substanz. Und in über der Hälfte der Messungen ($n = 6$) steigerte Glutamat zwar im Vergleich zur ersten Kontrollmessung die Spikerate, die Kontrollmessung nach Auswaschen der Substanz wies aber eine noch höhere Spike-Zahl auf. Im Vergleich zur ersten Kontrollmessung statt zu den umgebenden, bewirkte Glutamat daher eine leichte (allerdings nicht signifikante) Aktivierung der Spikerate ($1,41 \pm 1,15$ statt $0,96 \pm 0,53$). Der gleiche Effekt der mangelnden Reversibilität war auch in eStriatum-Kulturen zu beobachten. Hier fiel die Inhibition noch deutlicher aus, wenn die Messungen nur in Bezug zur ersten Kontrolle gesetzt wurden ($0,06 \pm 0,06$ statt $0,08 \pm 0,07$). Denn bei neun der zehn Messungen wies der Chip in der zweiten Kontrollmessung noch weniger Aktivität auf als unter Glutamat.

Niedrigere Konzentrationen von Glutamat auf eStriatum

Niedrigere Glutamat-Konzentrationen (20 und 50 μM) bewirkten keine Inhibition der Spikerate von eStriatum, allerdings auch keine Aktivierung (20 μM : $1,04 \pm 0,20$; $n = 8$; $p = 0,57$; 50 μM : $0,99 \pm 0,28$; $n = 5$; $p = 0,92$). Auch keiner der anderen hier untersuchten Parameter zeigte eine deutliche Veränderung.

Höhere Konzentrationen von Glutamat auf pStriatum

Glutamat in Konzentrationen von 500 μM und 1 mM auf pStriatum-Kulturen inhibierte die Spikerate (500 μM : $0,72 \pm 0,32$; $n = 9$; $p < 0,001$; 1 mM: $0,39 \pm 0,26$; $n = 9$; $p < 0,001$) ebenso wie die Burstrate (500 μM : $0,42 \pm 0,29$; $n = 9$; $p = 0,03$; 1 mM: $0,04 \pm 0,02$; $n = 9$; $p < 0,001$). Bei 1 mM Glutamat nahm der Anteil in Bursts organisierter Spikes deutlich ab ($57 \pm 18\%$ vs $15 \pm 11\%$; $n = 9$; $p < 0,001$). Bei beiden Konzentrationen sank die Korrelation zwischen den Elektroden, abzulesen am Parameter Cohen's Kappa (500 μM : $0,19 \pm 0,11$ vs $0,41 \pm 0,10$; $n = 9$; $p = 0,006$; 1 mM: $0,04 \pm 0,05$ vs $0,34 \pm 0,13$; $n = 9$; $p < 0,001$). Ebenso nahm der Anteil leerer Bins ab (500 μM : $26 \pm 27\%$ vs $46 \pm 8\%$; $n = 9$; $p = 0,04$; 1 mM: $18 \pm 28\%$ vs $51 \pm 16\%$; $n = 9$; $p = 0,01$).

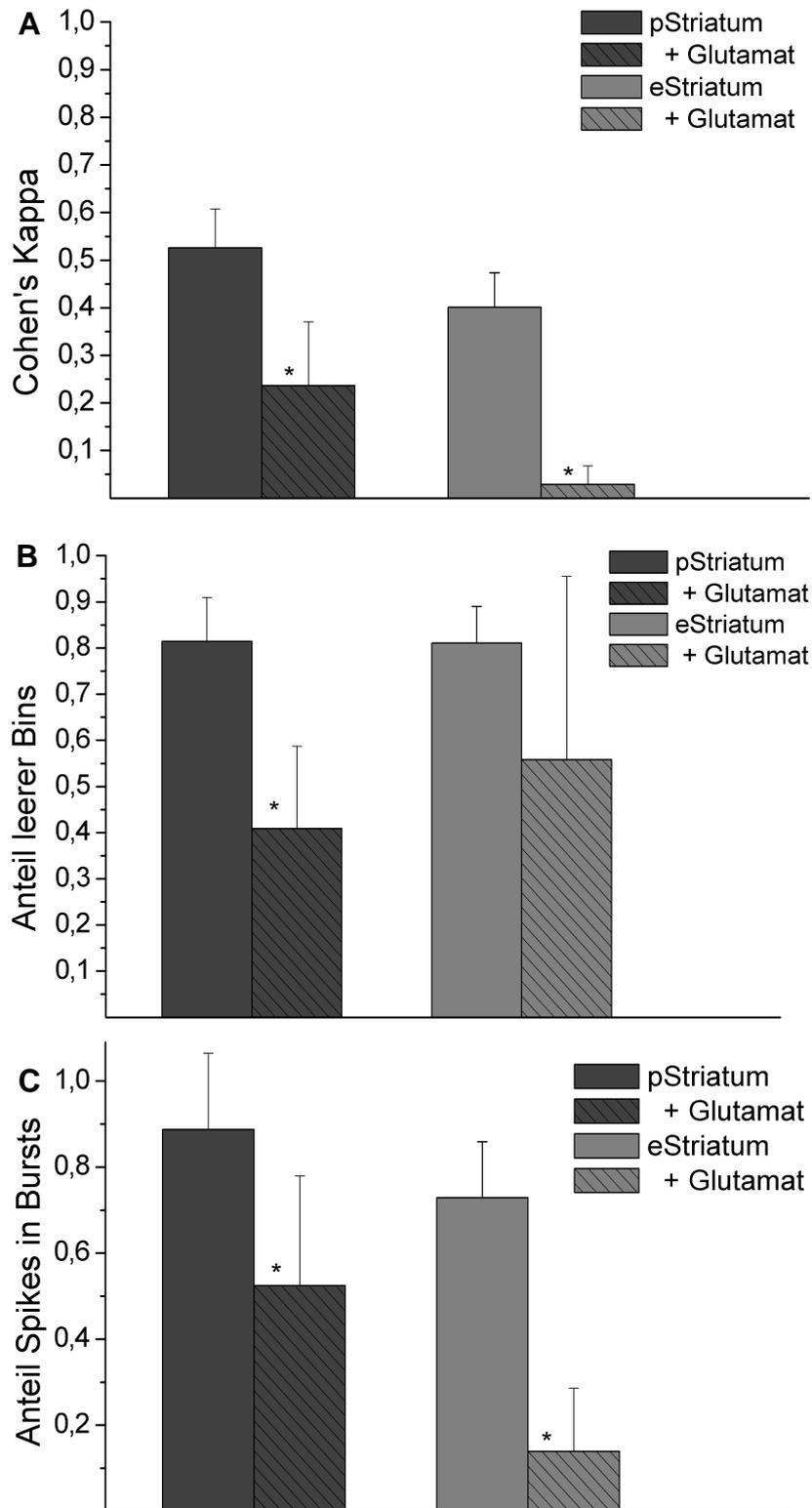


Abbildung 28: Die Zugabe von 100 μ M Glutamat erniedrigte Cohen's Kappa als Indikator für die Korrelation der Aktivität auf unterschiedlichen Elektroden (A) sowie den Anteil leerer Bins (B; Binbreite jeweils 100 ms) und den Anteil in Bursts organisierter Spikes (C). Der Effekt fiel in den beiden ersten Parametern bei eStriatum stärker aus als bei pStriatum. Der Anteil leerer Bins war in eStriatum unter Glutamat relativ hoch, da die Gesamtaktivität sehr schwach war. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an.

3.3.6 Striatale Kulturen setzen synaptisch Glutamat frei

Durch Zugabe des NMDA-Rezeptor-Antagonisten APV (D,L-2-amino-5-phosphonovalerinsäure) konnte gezeigt werden, dass sowohl CryoCortex als auch die beiden striatalen Zelltypen intrinsisch Glutamat freisetzen. In einer Konzentration von 20 μ M reduzierte APV die Spikerate auf 16 ± 16 % des Kontrollwertes in eStriatum ($n = 4$; $p = 0,002$), auf 29 ± 15 % in pStriatum ($n = 4$; $p = 0,003$) und auf 34 ± 30 % in CryoCortex ($n = 4$; $p = 0,02$; Abbildung 29). Im Gegensatz zu der inhibierenden Wirkung von Glutamat und Barium blieb unter APV das synchrone Burst-Muster intakt, lediglich die IBIs verlängerten sich (Abbildung 30). Erst wenn nur noch etwa 25 % der Ausgangsaktivität vorhanden waren, dominierte der Anteil von Einzel-Spike-Aktivität.

Abbildung 29: Der NMDA-Rezeptor-Antagonist APV (20 μ M) inhibierte die Spike- und Burstrate aller Zelltypen in etwa gleichem Maße. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle an.

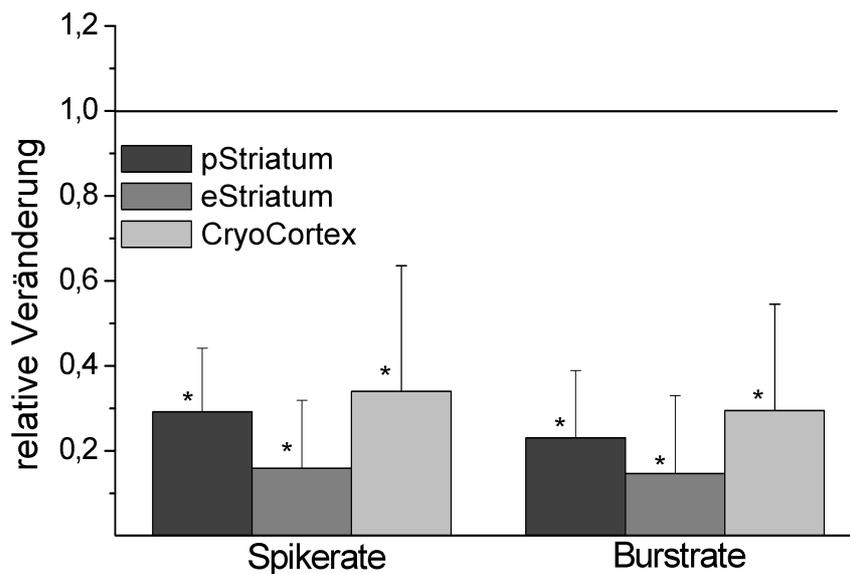
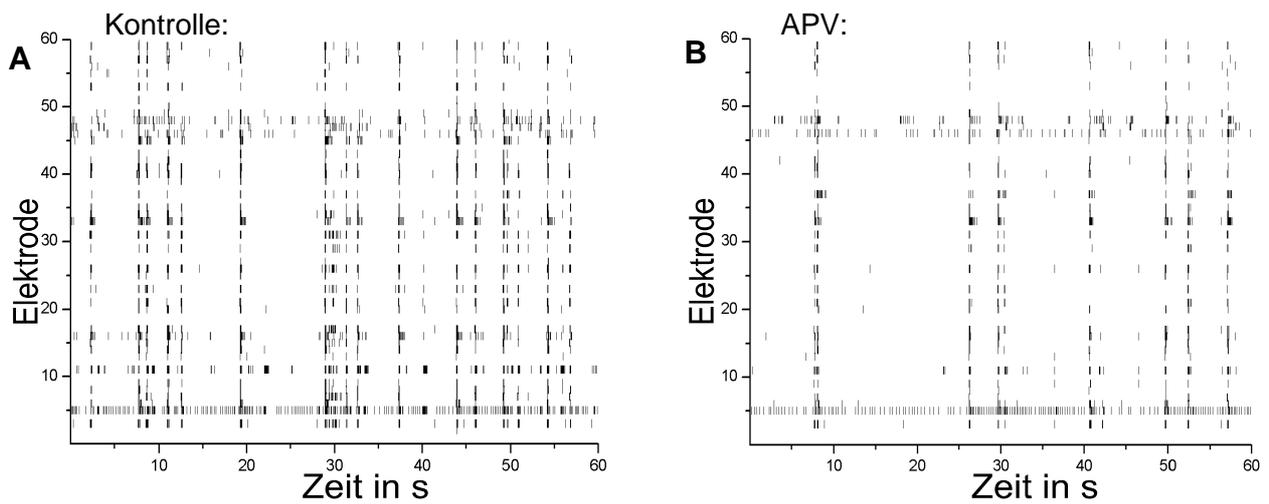


Abbildung 30: Die Inhibition der Netzwerkaktivität durch APV ging bei allen untersuchten Zelltypen mit einer geringeren Burstfrequenz, aber nicht mit einer verminderten Korrelation der Netzwerkaktivität einher. Die Spikeraster-Plots zeigen beispielhaft Messungen von eStriatum vor (A) und nach Applikation von 20 μ M APV (B).



3.3.7 Dopamin bewirkt keine signifikante Veränderung striataler Netzwerkaktivität

Der Neurotransmitter Dopamin wird von Zellen der Substantia nigra freigesetzt, die ins Striatum projizieren. Durch das Absterben dieser dopaminergen Zellen und den daraus resultierenden Dopamin-Mangel im Striatum kommt es zur Ausbildung einer Parkinson-Symptomatik, die vor allem durch Bewegungsstörungen gekennzeichnet ist.

Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Dopamin ließ keinen einheitlichen Effekt auf die neuronale Netzwerkaktivität erkennen, weder auf corticalen noch auf striatalen Zellen. Dopamin bewirkte in striatalen Kulturen manchmal eine leichte Aktivierung der Zellen, allerdings war dieser Effekt oft nach Auswaschen nicht reversibel oder dauerte nur wenige Sekunden an. Beispielhaft ist hier eine Messung striataler Zellen (pStriatum) dargestellt, bei der 50 μM Dopamin eine ähnliche Wirkung zeigte wie Glutamat in ähnlich hohen Konzentrationen, indem es die Korrelation zwischen den Elektroden auflöste und das Muster von synchronen Bursts in Richtung unkorrelierter Einzel-Spike-Aktivität verschob (Abbildung 31). Leider ließ sich dieser Effekt nicht eindeutig reproduzieren. Aber dieser einzelne Versuch zeigt, dass unser Modell-System sensitiv für Dopamin ist, wenn der Wirkmechanismus auch schwer zu quantifizieren ist.

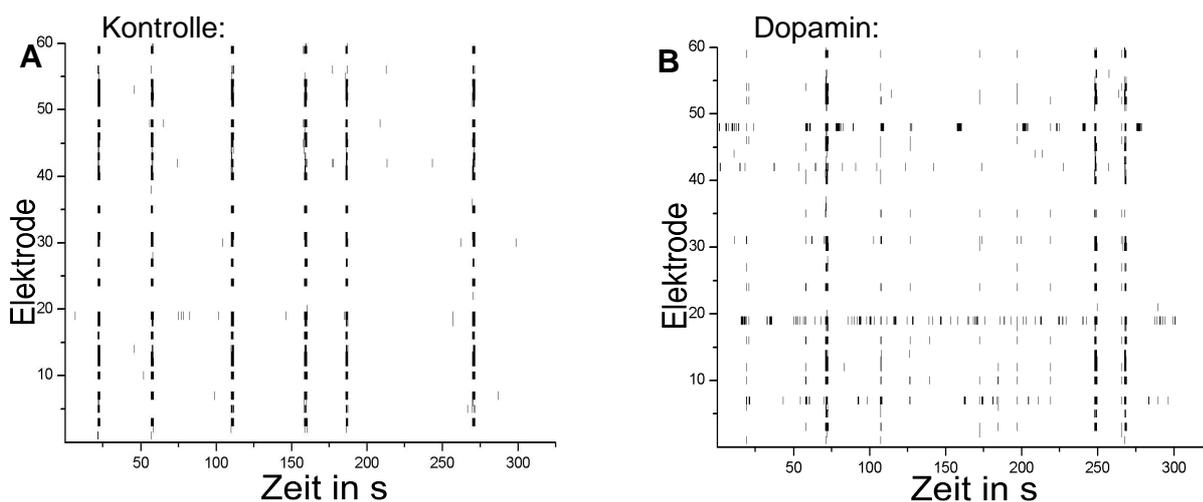


Abbildung 31: Messung der Netzwerkaktivität von pStriatum, bei der 50 μM Dopamin im Vergleich zur Kontrollmessung (A) eine leichte Steigerung der Spikerate bewirkte, gleichzeitig aber auch die Korrelation der Aktivität auf den einzelnen Elektroden schwächte (B).

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit, die auch in einer wissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlicht wird, wurde mithilfe von Multielektroden-Arrays (MEAs) die funktionelle Entwicklung kleiner Netzwerke aus striatalen und corticalen Neuronen beobachtet und analysiert (Fleischer, Sergeeva et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass auch Neurone mit einem hohen Anteil GABAerger Zellen *in vitro* ein oszillierendes Netzwerk mit synchronen Spike-Bursts entwickeln. Um funktionell und morphologisch zu vernetzen, mussten die striatalen Zellen allerdings ein Vielfaches der von corticalen Zellen dafür benötigten Dichte aufweisen (ca. 50x). Die Zugabe von GABA-Antagonisten zerstörte die rhythmische Oszillation nicht, sondern verstärkte noch die Korrelation der Aktivität innerhalb des Netzwerks. Im Gegensatz dazu verminderte der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat die Gleichförmigkeit der Aktivität auf den einzelnen Elektroden und inhibierte in höheren Dosen die Aktivität. Embryonal gewonnene striatale Zellen (eStr) zeigten eine höhere Empfindlichkeit für die inhibierende Wirkung des Glutamats als postnatal gewonnene Zellen (pStr). Auch der Kaliumkanal-Blocker Bariumchlorid schwächte die Korrelation der Aktivität, wobei hier die entwicklungspezifischen Unterschiede zwischen den beiden striatalen Zelltypen noch deutlicher zutage traten als bei Glutamat: Während Barium die Netzwerkaktivität von pStr steigerte, unterdrückte es die von eStr fast vollständig. Die Aktivität beider Zelltypen wurde durch Zugabe eines NMDA-Rezeptor-Antagonisten inhibiert – ein Indiz dafür, dass striatale Neurone *in vitro* präsynaptisch Glutamat ausschütten.

4.1 Experimentelle Methoden zur funktionellen Untersuchung neuronaler Netzwerke

Bedeutende Fortschritte wurden in den letzten Jahren auf dem Weg zum Verständnis der Hirnfunktion gemacht, einerseits auf dem Niveau einzelner Nervenzellen und andererseits dank moderner Bildgebungsverfahren wie PET (Positronen-Emissions-Tomographie) oder fMRT (funktionelle Kernspintomographie) auf der Ebene größerer Hirnareale. Über die mittlere Ebene – das Zusammenspiel von hunderten oder tausenden Neuronen – weiß man nur wenig. Dieses Verbindungsglied ist aber entscheidend, um die Funktion des Nervensystems in seiner Gesamtheit nicht nur beschreiben, sondern auch erklären zu können.

Verschiedene experimentelle Ansätze versuchen, diese Lücke zu schließen: Die Applikation von Mikroelektroden in das Gehirn eines Säugetieres ist dabei sicher die direkteste Methode, um die Funktionsweise kleiner neuronaler Netze zu untersuchen. Sie ist allerdings extrem aufwändig, ethisch fragwürdig und ermöglicht nicht, das „Entstehen“ eines neuronalen Netzes zu beobachten. Dies ist auch nicht mit Ableitungen an Hirnschnitten möglich, jedoch sind die Experimente leichter durchzuführen und besser zu kontrollieren als in der *in vivo*-Situation. Da aber bei der Präparation von Schnitten Afferenzen und Efferenzen zu umgebenden Hirnregionen gekappt werden, wird von Kritikern eingewandt, dass Hirnschnitte nicht die Situation im Gehirn widerspiegeln und mit ihnen eine pathologische Situation untersucht wird. Die stärkste Abstraktion zu der *in vivo*-Situation stellen vermutlich neuronale Zellkulturen dar, da bei dieser Methode alle bestehenden Verbindungen zwischen den Zellen komplett zerstört werden. Die elementaren Funktionen der Zellen bleiben dennoch erhalten, und die Experimente lassen sich gut kontrollieren und reproduzieren. Zellkulturen bieten zudem die Möglichkeit, das Entstehen eines neuronalen Netzes zu beobachten, weil sich einzelne Zellen allmählich in einer übergeordneten Struktur zusammenfinden. Besonders gut lässt sich dies mithilfe von MEAs bewerkstelligen, da die Methode nicht-invasiv ist und die gleichen Zellen monatelang kontrolliert werden können.

4.2 Neurale Zellkulturen

Neben Neuronen finden sich im Nervensystem noch andere Zelltypen, vor allem Gliazellen. Diese sind den Neuronen zahlenmäßig 10:1 überlegen und machen etwa die Hälfte des Hirnvolumens aus. In der Vergangenheit wurden Gliazellen vor allem passive Stützfunktionen zugeschrieben, aber in den letzten Jahren mehrten sich Hinweise, dass Gliazellen auch aktiv in die Informationsweiterleitung eingebunden sind (Fields und Stevens-Graham, 2002; Perea und Araque, 2006). Sowohl die hier benutzten frisch präparierten als auch die cryokonservierten Zellen stellen Mischkulturen aus Neuronen und glialen Zellen dar. Kurz nach Aussaat stellten Neurone den größten Anteil der Zellen, aber da Gliazellen im Gegensatz zu Neuronen noch teilungsfähig sind, nahm deren Anteil im Lauf der Kultivierung weiter zu, bis in allen Kulturen ein stabiles Verhältnis von 50:50 erreicht war. Vorhergehende Versuche mit neuronalen Monokulturen hatten gezeigt, dass diese eine deutlich schlechtere Überlebensrate aufweisen als Mischkulturen und dass nach längerer Kultivierungszeit auch in den „reinen“ Neuronen-Kulturen eine relativ hohe Anzahl von Gliazellen nachweisbar war. Das B27/Neurobasal-Medium, das in dieser Studie eingesetzt wurde, reduziert im Vergleich

zu serumhaltigen Nährmedien deutlich das Astrocyten-Wachstum, so dass die Neurone nicht von glialen Zellen überwuchert wurden (Brewer, Torricelli et al., 1993).

4.3 Neuronale Netzwerkaktivität

Erst wenn sie synaptischen Kontakt zu umgebenden Neuronen haben und exzitatorischen Input erhalten, feuern die meisten Neurone Aktionspotenziale. Nach ein paar Tagen in Kultur wurden von allen Gewebetypen vereinzelte Aktionspotenziale an verschiedenen Punkten auf dem MEA detektiert. Im Laufe der weiteren Kultivierung zeigten sich auf manchen Elektroden erste Bursts von Aktionspotenzialen. Nach etwa zwei Wochen in Kultur (abhängig von Zelltyp und Aussaatdichte) wurden von mehreren benachbarten Elektroden synchrone Bursts detektiert, die schließlich nach etwa drei Wochen den gesamten MEA, also das komplette Netzwerk, umfassten. Zunächst zeigten sich zwischen diesen synchronen Bursts noch einzelne Aktionspotenziale, aber dieser Anteil unkorrelierter Aktivität nahm während der Kultivierungszeit immer weiter ab, während die Burst-Frequenz zunahm. Letztendlich waren nahezu alle Aktionspotenziale in synchrone und rhythmisch wiederkehrende Bursts eingebunden. Dieser Zustand blieb über mehrere Monate hinweg stabil.

Diese Beobachtungen decken sich mit einer bereits 1949 durch den Psychologen Donalds Hebb aufgestellten Theorie, die sowohl die embryonale Hirnentwicklung als auch die Codierung von Erinnerungen zu erklären versucht: Verbindungen zwischen Neuronen bilden sich zunächst zufällig, aber nur synaptische Verknüpfungen zwischen solchen Neuronen werden verstärkt, die gleichzeitig Aktionspotenziale feuern. Neurone, die unkorreliert feuern, werden aus dem Netz ausgeschlossen, indem die synaptischen Verbindungen gekappt werden. Mittlerweile konnte auch bestätigt werden, dass korrelierte Aktivität zu „long term potentiation“ oder „long term depression“ führen kann und somit wohl eine Rolle bei Gedächtnisleistungen spielt (Holmgren und Zilberter, 2001).

Dabei ist die Synchronität von neuronaler Aktivität *in vivo* oft mit einer rhythmischen Oszillation verbunden, die nach ihrer Frequenz unterteilt wird in Alpha- (8-13 Hz), Theta- (3,5-7 Hz), Delta- (0,5-3,5 Hz) und Gamma-Oszillationen (30-70 Hz) (Basar, Basar-Eroglu et al., 1999). Vor allem die Gamma-Oszillationen werden als Mechanismus diskutiert, wie das Gehirn höhere kognitive Funktionen vollbringt. Auf der anderen Seite sind synchrone Oszillationen auch mit neurologischen Erkrankungen wie Epilepsie oder Parkinson assoziiert.

Die in dieser Untersuchung eingesetzten *in vitro*-Kulturen zeigten ebenfalls synchrone Oszillationen, allerdings meist nur in einer Frequenz von 1 Hz. Wenn in striatalen Kulturen Oszillationen einsetzten, dann zunächst mit einer extrem langsamen Frequenz ($< 0,01$ Hz), die sich im Verlauf der Kultivierung steigerte. Frequenzen höher als 1 Hz waren nur selten zu beobachten.

4.4 Morphologische Netzwerkentwicklung von striatalen und corticalen Neuronen

Striatale Neurone zeigten in dieser Arbeit starke Netzwerkaktivität, gekennzeichnet durch Oszillationen synchroner Spike-Bursts. Dies bestätigt Berichte von Kowalski et al., die Synapsenbildung und synchrone Spike-Bursts in striatalen Netzwerken *in vitro* beobachteten (Kowalski, Crest et al., 1995). Allerdings entwickelten sich synchrone Oszillationen nur, wenn die Zellen in sehr hoher Dichte ausgesät worden waren ($5-10 \times 10^5 / \text{cm}^2$). Andernfalls wurden nur einzelne und unkorrelierte Aktionspotenziale gefeuert. Corticale Zellen hingegen erreichten einen Netzwerk-Zustand mit synchroner Oszillation auch bei deutlich niedrigerer Zelldichte ($\sim 2 \times 10^4 / \text{cm}^2$, abhängig von der Überlebensrate der Cryo-Zellen). Parallele Immunofärbungen zeigten, dass die schlechte funktionelle Vernetzung der striatalen Zellen in geringer Dichte mit unzureichender morphologischer Vernetzung einherging: Die Neurone waren homogen verteilt und wiesen nur wenige und kurze Neuriten auf. Die Expression des in synaptischen Vesikeln lokalisierten Glycoproteins Synaptophysin, das die synaptische Aktivität moduliert, war in dünnen Kulturen nicht nachweisbar.

Auffällig war, dass das Erscheinen von synchroner Aktivität in Kulturen höherer Zelldichte mit dem Zusammenschluss von Neuronen zu größeren Clustern einherging, die etwa hundert Zellen einschlossen und durch dicke und lange Axon-Bündel miteinander verbunden waren, während striatale Neurone in geringer Dichte nur sehr kurze Neuriten aufwiesen. Somit schien sich durch die Entstehung des Netzwerkes auch die Morphologie der einzelnen Zelle verändert zu haben. Synchrone Bursts wurden nicht nur innerhalb der Zell-Cluster detektiert, die Korrelation der Aktivität ging weit darüber hinaus und umfasste sämtliche Zell-Cluster innerhalb des Elektrodenfelds. Die Synaptophysin-Expression fiel allerdings auch in den Kulturen mit hoher Dichte deutlich schwächer aus als in corticalen Zellen.

Segal et al. berichteten, dass striatale Zellen *in vitro* nur dann dendritische Dornen und damit funktionelle Synapsen bildeten, wenn sie mit einem kleinen Anteil corticaler Zellen co-kultiviert wurden (Segal, Greenberger et al., 2003). Erst durch die Anwesenheit von Cortex-Zellen konnten Spontanaktivität und Calcium-Ströme in den striatalen Neuronen ausgelöst werden. Diese Beobachtungen ließen sich in den hier dargestellten Untersuchungen nicht bestätigen. Dicht ausgesäte Striatum-Kulturen wurden auch ohne Cortex-Zellen spontan aktiv, und bei dünn ausgesäten konnten auch mitkultivierte corticale Zellen kein Neuritenwachstum induzieren. Die Spontanaktivität solcher Co-Kulturen glich der von dünnen corticalen Kulturen, und auch Synaptophysin wurde nur in den corticalen Neuriten nachgewiesen.

Corticale Zellen zeigten also eine weitaus höhere Tendenz zur Vernetzung als striatale. In der Literatur findet man keinen Hinweis darauf, dass Neurone im Cortex und im Striatum unterschiedlich dicht sein könnten. In beiden Fällen liegt die Packungsdichte in etwa bei $50.000 / \text{mm}^3$. Allerdings ist das Striatum *in vivo* in viele Schaltkreise mit anderen Hirnarealen eingebunden und weist bei der Ratte mehr als 90 % Projektionsneurone auf. Somit werden sehr viele synaptische Kontakte zu Neuronen aus anderen Hirnarealen gebildet, wenngleich die axonalen Kollateralen auch symmetrische Synapsen zwischen den einzelnen Projektionsneuronen bilden (Gerfen, 1988). Die überwiegende Mehrheit der Synapsen im Cortex verbindet Pyramidenzellen untereinander. Diese gehören zu den Interneuronen und machen 85 % der Neurone im Cortex aus. Hier gibt es also überwiegend gleichartige Verbindungen zwischen gleichartigen Zellen, und der Cortex kommuniziert vor allem mit sich selber (Nieuwenhuys, 1994). Möglicherweise benötigen striatale Zellen also den efferenten Kontakt zum Globus Pallidus, zur Substantia nigra und anderen Hirnarealen, um sich auch untereinander effektiv vernetzen zu können.

Striatale und corticale Zellen zeigten in dieser Untersuchung deutliche gewebespezifische Unterschiede in der Netzbildung, während sich entwicklungspezifische Unterschiede zwischen embryonal und postnatal gewonnenen Zellen aus dem Striatum nicht feststellen ließen. Sowohl eStriatum als auch pStriatum vernetzten sich morphologisch, wenn sie in ausreichender Dichte ausgesät worden waren, und zeigten synchrone Spike-Bursts.

4.5 Funktionelle Netzwerkentwicklung von striatalen und corticalen Neuronen

4.5.1 Synchrone Oszillationen

Damit Neurone in einem Netzwerk synchron feuern, müssen sie eine Mindestanzahl von synaptischen Verknüpfungen untereinander bilden. Aber um ein funktionelles Netzwerk geprägt von synchronen Spike-Bursts zu bilden, ist dies alleine nicht ausreichend. Auch die Art der synaptischen Verknüpfung ist entscheidend. Die Präsynapse muss einen exzitatorischen Neurotransmitter freisetzen, für den an der Postsynapse Rezeptoren vorhanden sind.

Die Kopplung zwischen Prä- und Postsynapse ist entscheidend für die Aufrechterhaltung einer regelmäßigen Oszillation. Keefer et al. zeigten, dass sie bei Netzwerken von Rückenmarksneuronen, die auf MEAs kultiviert worden waren, durch Disinhibition mit Antagonisten für GABA_A- und Glycin-Rezeptoren sowie Antagonisten gegen AMPA-Rezeptoren ein synchrones Bursten aller Neurone induzieren konnten (Keefer, Gramowski et al., 2001). Diese Oszillation, die allein über NMDA-Rezeptoren vermittelt wurde, war extrem regelmäßig und stabil. Wurden hingegen NMDA-Rezeptoren blockiert und exzitatorischer Input über AMPA-Rezeptoren weitergegeben, so traten die synchronen Bursts weniger regelmäßig auf. Nachdem die Oszillation einmal initiiert war, ließ sie sich weder durch diverse Rezeptor-Antagonisten zerstören noch durch Substanzen, die elektrische Synapsen, die „Afterhyperpolarization“, die Rezeptor-Desensitivierung oder die Neurotransmitter-Freisetzung blockieren. Allerdings zerstörte die Zugabe von NMDA (20-50 μ M) die periodische Oszillation, wahrscheinlich da das fragile Wechselspiel zwischen Prä- und Postsynapse zerstört wurde. Die Autoren vermuten, dass die Erschöpfung präsynaptischer Glutamat-Pools (RRP: readily releasable pools) für die Beendigung eines Burst-Ereignisses verantwortlich ist. Die Zeit, die benötigt wird, diese Pools wieder zu füllen, bestimmt das Interburst-Intervall.

Auch Puopolo und Belluzzi berichteten, dass Netzwerk-getriebene oszillatorische Aktivität NMDA-abhängig ist (Puopolo und Belluzzi, 2001). Sie benutzten akute Schnitte des Riechkolbens, der eine besonders hohe Dichte an NMDA-Rezeptoren aufweist. Durch Disinhibition mit dem GABA_A-Antagonisten Bicucullin oder durch Magnesiumentzug konnte eine rhythmische Oszillation mit geringer Frequenz induziert werden. Der AMPA/Kainat-

Rezeptor-Antagonist NBQX konnte den Rhythmus nicht beeinflussen, daher spielen diese Glutamat-Rezeptoren wohl eine untergeordnete Rolle bei der Muster-Generierung. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Magnesiumentzug die Korrelation der elektrischen Aktivität in den striatalen Kulturen verstärkte und das Feuern vereinzelter Spikes während der Interburst-Intervalle unterdrückte. In corticalen Kulturen, bei denen die Korrelation bereits unter Nährmedium sehr hoch war, hatte Magnesiumentzug dagegen nur einen geringen Effekt.

4.5.2 Synaptische Glutamat-Ausschüttung

Damit ein Netzwerk oszillieren kann, müssen sowohl exzitatorische Neurotransmitter freigesetzt werden als auch die entsprechenden Rezeptoren vorliegen. Für corticale Neurone ist dies vielfach belegt, aber striatale Neurone *in vivo* erhalten exzitatorischen Input aus dem Cortex und generieren ihn nicht selbst. Striatale Neurone schütten vor allem GABA aus, aber auch Acetylcholin, Substanz P, Enkephalin, Somatostatin und andere Neurotransmitter (Kawaguchi, 1997). Die Produktion von Glutamat durch das Striatum selbst ist bisher nicht eindeutig belegt. Nur eine einzige Veröffentlichung berichtet, dass striatale Neurone in Kultur exzitatorische postsynaptische Potenziale aufwiesen, die empfindlich gegen den AMPA/Kainat-Rezeptor-Antagonisten NBQX waren (Dubinsky, 1989). Eventuell schütten striatale Zellen Glutamat nur in einer frühen Phase ihrer Entwicklung aus und stellen dies im adulten Zustand ein. Dass sich während der Entwicklung die Zusammensetzung der Neurotransmitter im Nervensystem verändert, ist bekannt, allerdings wurde dies noch nicht für das Striatum belegt (Benitez-Diaz, Miranda-Contreras et al., 2003; Herlenius und Lagercrantz, 2004). Man weiß aber, dass sich im Striatum der Ratte zumindest die Expression der Glutamat-Rezeptoren im Laufe der Entwicklung deutlich verändert (Hurst, Cepeda et al., 2001). Zudem belegen frühere Studien, dass die Expression von Neurotransmittern oder für deren Synthese relevante Proteine in striatalen Zellkulturen durch neurotrophe Faktoren initiiert werden kann (Mizuno, Carnahan et al., 1994; Ventimiglia, Mather et al., 1995; Ivkovic und Ehrlich, 1999). Dies spricht dafür, dass die vermutete Glutamat-Freisetzung in den hier geschilderten Experimenten ein *in vitro*-Artefakt sein könnte.

Allerdings zeigen die Basalganglien einschließlich des Striatums auch *in vivo* eine starke Neuroplastizität, um sich an Veränderungen anzupassen. So kann in frühen Stadien der Parkinson-Erkrankung der Dopamin-Mangel bis zu einem 80 %igen Abfall noch ausgeglichen werden, ohne dass es zu einer ausgeprägten Symptomatik kommt. Erst wenn etwa die Hälfte

der Dopamin-produzierenden Zellen eingegangen ist, zeigen sich erste Krankheitszeichen. Man vermutet die kompensatorischen Mechanismen zunächst innerhalb (z.B. Hochregulation von D₂-Rezeptoren), später dann auch außerhalb der Basalganglien (Bezard, Gross et al., 2003). Nach Einsetzen der Symptomatik stellt die Medikation mit L-DOPA eine sehr effektive Therapie da, die allerdings nach 5- bis 10-jähriger Anwendung ihre Wirksamkeit verliert. Es kommt zu einer allmählichen Desensitivierung (gekennzeichnet durch „on-off“-Phänomene, Dyskinesien), für die unter anderem D₁-Rezeptoren verantwortlich gemacht werden (Verhagen Metman, 2002). Es ist allerdings nicht ganz klar, ob diese Langzeitkomplikationen durch L-DOPA selbst ausgelöst werden oder nur das unaufhaltsame Fortschreiten der Krankheit widerspiegeln.

Wie viele Neurone in den untersuchten Kulturen Glutamat freisetzen, wurde nicht mit immunocytochemischen Methoden überprüft. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Anteil in den corticalen Kulturen höher liegt als in den striatalen, auch wenn dies als wahrscheinlich angesehen werden kann. Ein geringerer Anteil glutamaterger Zellen in den striatalen Kulturen würde erklären, warum die Zellen in den hier vorgestellten Experimenten so dicht gepflanzt werden mussten, damit sich Netzwerkaktivität zeigte. Nur so hätten die Neurone ausreichend exzitatorischen Input von benachbarten Zellen erhalten. Auch die morphologischen Unterschiede der Zellen bei dünner und dichter Aussaat könnten darauf zurückzuführen sein, dass der einzelnen Zelle bei dünner Aussaat nicht ausreichend Glutamat zur Verfügung stand. Frühere Studien haben gezeigt, dass Glutamat einen großen Einfluss auf die Entwicklung striataler Zellen *in vivo* und *in vitro* hat (Luk, Kennedy et al., 2003). Die morphologische und funktionelle Entwicklung von Neuronen ist eng gekoppelt. So verhindert die Blockade der Spontanaktivität durch Zugabe entweder von TTX- oder AMPA/Kainat-Rezeptor-Antagonisten ins Nährmedium das Auswachsen axonaler Verzweigungen in organotypischen Schnitten (Uesaka, Hirai et al., 2005). Der Übergang von homogen verteilten Zellen mit kurzen Neuriten, die nur unkorrelierte Aktionspotenziale feuerten, zu einem Netzwerk mit Zell-Clustern und synchroner Burst-Aktivität erfolgte in dieser Untersuchung nicht sukzessive mit steigender Zelldichte, sondern abrupt ab einer gewissen Dichte, bei der ein bestimmter Schwellenwert überschritten wurde. Diese Schwelle könnte z.B. an Rezeptoren gebundenes Glutamat darstellen, das benötigt wird, um die Netzbildung auszulösen.

4.5.3 Synaptische Glutamat-Rezeption

Durch Applikation des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat wurde in den hier beschriebenen Versuchen die Netzwerkaktivität nicht gesteigert, sondern inhibiert, was zunächst überraschen mag. Die Messungen wurden allerdings in magnesiumfreier Badlösung durchgeführt, d.h. alle NMDA-Rezeptoren waren aktiv und konnten präsynaptisch freigesetztes Glutamat registrieren, so dass die Wahrscheinlichkeit für ein postsynaptisch gefeuertes Aktionspotenzial zunahm. Da das Zusammenspiel zwischen präsynaptisch freigesetztem Glutamat und postsynaptischen NMDA-Rezeptoren verantwortlich ist für die regelmäßige Oszillation des Netzwerks mit synchronen Bursts, führte die externe Zugabe von Glutamat zu einer Über-Aktivierung der Zellen, die dieses labile Gleichgewicht beeinträchtigte und damit die Aktivität zerstörte (Keefer, Gramowski et al., 2001). Nur innerhalb eines sehr engen Konzentrationsbereiches wirkte Glutamat aktivierend: Die Burst-Frequenz nahm zu, während die Burst-Dauer abnahm. Höhere Glutamat-Konzentrationen führten zu einem höheren Anteil nicht in Bursts eingebundener Spikes und beeinträchtigten die Korrelation der Aktivität zwischen den Elektroden. Unter noch höheren Konzentrationen wurde zunächst das synchrone Burst-Muster zugunsten von Einzelspike-Aktivität zerstört – wobei einige Neurone zu tonischen Spikes angeregt wurden – und letztendlich jegliche Aktivität komplett unterdrückt. Dieser Ablauf galt für alle untersuchten Zelltypen in gleicher Weise, allerdings mit unterschiedlicher Sensitivität. Corticale Kulturen reagierten am empfindlichsten auf Glutamat, so dass schon eine Konzentration von 100 μM die Aktivität vollkommen inhibierte. Unter der gleichen Konzentration feuerten eStriatum-Kulturen noch vereinzelte Aktionspotenziale, während die Aktivität von pStriatum nahezu unverändert blieb. Erst ab einer Konzentration von 1 mM Glutamat wurde die Aktivität von pStriatum ähnlich stark, aber nicht komplett inhibiert. Striatale Zellen, die zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung präpariert worden waren, zeigten also eine höhere Empfindlichkeit für Glutamat. Da eStriatum und pStriatum in gleicher Dichte ausgesät worden waren und morphologisch ähnlich stark vernetzt waren, liegen diese unterschiedlichen Sensitivitäten wohl auf der Einzelzellebene begründet, z.B. in einem abweichenden Rezeptorbesatz.

Der wirksame Konzentrationsbereich von Glutamat variierte allerdings nicht nur zwischen den verschiedenen Zelltypen, sondern weniger stark auch zwischen den einzelnen untersuchten Netzwerken eines einzigen Zelltyps. So wurden einige Netzwerke von pStriatum durch 100 μM Glutamat aktiviert, andere inhibiert. Faktoren, die bestimmen, ob und in welcher Form eine Konzentration wirksam ist, sind vor allem die Dichte der Zellen im

Netzwerk und der Grad ihrer Vernetzung, der Anteil inhibitorischer im Vergleich zu exzitatorischen Neuronen und der Rezeptorbesatz.

Alle Messreihen mit Glutamat zeigten im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen eine schlechte Reversibilität, d.h. nach Auswaschen kehrte die Netzwerkaktivität nicht wieder in den Ausgangszustand vor Substanzapplikation zurück. Hatte Glutamat die Spikerate im Vergleich zur ersten Kontrollmessung erhöht, so lag sie nach Auswaschen meist noch höher. Hatte Glutamat inhibiert, wies die zweite Kontrollmessung eine noch niedrigere Spikerate auf. Vermutlich kam es unter der etwa 5-minütigen Applikation von Glutamat zu einer Reaktion der Zellen, die eine Sensitivierung zur Folge hatte, wodurch sie empfindlicher für das innerhalb des neuronalen Systems präsynaptisch freigesetzte Glutamat wurden. Ein möglicher Mechanismus, über den eine solche Sensitivierung der Neurone vermittelt werden könnte, stellt die Langzeit-Potenzierung (LTP) dar, bei der wiederholte Depolarisationen einer Zelle die Wahrscheinlichkeit für die Erregung einer postsynaptischen Zelle erhöhen. Die Langzeit-Potenzierung wird durch NMDA-Rezeptoren vermittelt und wurde für den Hippocampus, Cortex und das Cerebellum, aber auch für das Striatum beschrieben (Pisani, Centonze et al., 2005; Akopian und Walsh, 2006). Ein postsynaptischer Calcium-Strom, der durch Öffnung der NMDA-Kanäle hervorgerufen wurde, führt zum verstärkten Einbau und zur leichteren Erregbarkeit von Glutamat-Rezeptoren (Luscher, Nicoll et al., 2000). Erst eine Kombination aus MEA- und Einzelzell-Messungen kann Aufschluss darüber geben, ob ein solcher Mechanismus auch in unseren Netzwerken wirksam war.

4.5.4 Synaptische GABA-Ausschüttung

Im adulten Striatum stellen GABAerge mittelgroße dornige Projektionsneurone (medium-sized spiny projection neurons) den mit Abstand größten Anteil der Neuronenpopulation, etwa 90 – 95 % (Kawaguchi, 1997). Die verbleibenden Interneurone gliedern sich auf in zwei große Gruppen, von denen die eine Acetylcholin und die andere GABA freisetzt. Die Versuche dieser Untersuchung konnten allerdings nicht bestätigen, dass fast alle oder zumindest alle Projektionsneurone der Striatum-Kulturen GABA exprimieren. So waren zwar etwa 90 % der Neurone in allen striatalen Kulturen identisch in Größe und Form, aber nur eine Minderzahl von ihnen war immunopositiv für GABA. Doppelfärbungs-Experimente zeigten, dass nur etwa 20 – 25 % der Neurone von CryoStriatum, eStriatum und CryoCortex und etwa 50 % von pStriatum GABAerg waren. Der unterschiedliche Anteil GABAerger Zellen in eStriatum bzw. CryoStriatum und pStriatum könnte ein Indikator für das

Entwicklungsstadium sein, denn Untersuchungen von Fiszman et al. bestätigen, dass der Anteil GABAerger Zellen während der embryonalen Entwicklung allmählich zunimmt (Fiszman, Behar et al., 1993). Sie bestimmten den Anteil GABAerger Zellen im sich entwickelnden Striatum der Ratte auf 3 % (E13) bzw. 6 % (E14) und bei adulten Zellen auf 90 %.

Der Entwicklungszustand schien aber nicht der einzige Faktor zu sein, der mit der GABA-Expression korrelierte: So befanden sich in Zell-Clustern, die häufig in den sehr dichten striatalen Kulturen auftraten, deutlich mehr GABAerge Zellen als in homogen verteilten Kulturen mit geringerer Zelldichte. Auch wenn dieses Phänomen so bisher nicht in der Literatur beschrieben wurde, weiß man doch, dass die Zelldichte einen starken Einfluss hat auf Genexpression und Signalkaskaden von Neuronen (Dus, Canu et al., 1997; Parnas und Linial, 1997). Sonnewald et al. fanden eine Diskrepanz zwischen der Menge an GABA in ihren Zellkulturen und der Anzahl Zellen, die das zur GABA-Synthese notwendige Enzym Glutamat Decarboxylase (GAD) exprimieren. Sie vermuten, dass GABA nach der Synthese in Zellen verteilt wird, die keine eigene GAD besitzen (Sonnewald, Olstad et al., 2004). Träfe diese Vermutung auch auf unsere Kulturen zu, so hätte die erhöhte Zelldichte nicht eine GAD-Expression in vorher GAD-negativen Zellen bewirkt, sondern lediglich die „Umverteilung“ von GABA, die erst durch die räumliche Nähe der Zellen möglich geworden war. Dies würde auch erklären, warum die Immunofärbung von GABA-positiven Zellen in den dünnen Kulturen immer intensiver war als in den dichten. Durch GABA-Transporter wäre eine Wiederaufnahme des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt in die Zellen möglich.

Der relativ hohe Anteil GABAerger Neurone im Striatum behinderte nicht die Ausbildung synchroner Oszillation. Man hätte erwarten können, dass die GABA-Ausschüttung Spontanaktivität komplett unterdrückt, da sie einen hyperpolarisierenden Chlorid-Einstrom in die Postsynapse auslöst. In der Tat zeigen Projektionsneurone in Schnitten des Striatums, bei denen der corticale Input abgetrennt wurde, eine extrem geringe Spontanaktivität. Daher werden in der Regel Schnitte verwendet, die das Striatum mehr oder weniger im Kontext der umliegenden Hirnareale belassen, bzw. organotypische Kulturen, die Striatum, Cortex und Substantia nigra umfassen. In den hier verwendeten striatalen Kulturen genügte der exzitatorische Einfluss des intrinsischen Glutamats, um Spontanaktivität trotz des hohen Anteils GABAerger Zellen zu ermöglichen. Dies stützt die Theorie, dass die „Stille“ von striatalen Neuronen nicht auf einer GABA-induzierten Inhibition beruht (Wilson, 1995).

4.5.5 Synaptische GABA-Rezeption

Aber auch wenn GABA die oszillatorische Aktivität nicht unterbindet, so moduliert sie sie doch. Nach Blockade der GABA_A-Rezeptoren mit Bicucullin, wodurch der hyperpolarisierende Effekt des Chlorid-Einstroms eingeschränkt wird, stieg die Feuerrate der striatalen Netzwerke deutlich an. In corticalen Kulturen, die nur wenig GABA freisetzen, war kein Effekt erkennbar. Die Disinhibition mit Bicucullin verstärkte in den striatalen Kulturen die Korrelation der Aktivität, ablesbar am Parameter Cohen's Kappa und dem Anteil leerer Bins. Auch an hippocampalen Neuronen wurde bereits demonstriert, dass Bicucullin die synaptische Effizienz erhöht und die Netzwerkaktivität von eher unkorreliertem Feuern zu periodischen und synchronen Bursts anregen kann, ähnlich der Musteränderung, die wir nach Magnesiumentzug beobachtet haben (Arnold, Hofmann et al., 2005). Auch dort trat der Effekt am deutlichsten zutage bei Kulturen, die zuvor nur eine schwache Korrelation gezeigt hatten.

Bicucullin verlängerte in den striatalen Kulturen zudem die Burst-Dauer und erhöhte die Zahl der Spikes pro Burst. Ein Mechanismus, der dafür verantwortlich sein könnte, ist die auch in striatalen Projektionsneuronen beobachtete „spike afterhyperpolarization“ (AHP). Diese nach Feuern eines Aktionspotenziales durch Calcium-aktivierte Kaliumkanäle ausgelöste Hyperpolarisierung der Zellmembran erschwert das Auslösen eines erneuten Aktionspotenziales und ist durch Bicucullin (20-50 μM) blockierbar (Shi und Rayport, 1994). Mit dem MEA-Messsystem lässt sich das Membranpotenzial leider nicht direkt bestimmen (s. Barium-Abschnitt), so dass diese These nicht überprüft werden konnte.

Der inhibitorische Neurotransmitter GABA spielt also eine Rolle bei der Termination eines Burst-Ereignisses, weniger bei der Initiation. Aber auch nach der Blockade der GABA_A-Rezeptoren durch Bicucullin fanden Bursts spätestens nach 500 ms ein Ende, so dass die GABA-Rezeption nicht alleine für die Termination entscheidend sein kann. Auch corticale Kulturen mit einem geringen Anteil GABAerger Zellen weisen „stille“ Interburst-Intervalle auf. Das Ende eines Bursts wird vermutlich auch ausgelöst durch die Erschöpfung präsynaptisch verfügbarer Glutamat-Pools (Keefer, Gramowski et al., 2001). GABA führt nur zu einem früheren Ende des Bursts. Auffallend war, dass die längere Burst-Dauer in den striatalen Kulturen nach Bicucullin-Gabe mit einer Verlängerung der Interburst-Intervalle einherging. Dies lässt sich vielleicht dadurch erklären, dass in einem Netzwerk ohne Disinhibition GABA zu einem „vorzeitigen“ Ende der Bursts führt, also bevor die Glutamat-

Vesikel komplett entleert wurden. Somit sind sie auch schneller wieder aufgefüllt, um einen neuen Burst zu initiieren.

4.5.6 Blockade des einwärts gerichteten Kaliumgleichrichters durch Bariumchlorid

In den hier vorgestellten Experimenten erhöhte der relativ unspezifische Kaliumkanal-Blocker Barium die Netzwerkaktivität, allerdings nur bei postnatal gewonnen striatalen Kulturen. Die Aktivierung ging aber anders als bei Bicucullin nicht mit einer Verlängerung der Burst-Dauer, sondern mit einer Erhöhung der Burst-Frequenz einher. Außerdem beeinträchtigte Barium ähnlich wie Glutamat die Korrelation der Aktivität über das Netzwerk hinweg, unabhängig davon, ob sie angeregt wurde wie in den postnatalen oder inhibiert wie in den embryonalen striatalen Kulturen. Der Zerfall des Bursts-Musters kann also sowohl einen aktivierten als auch einen inhibierten Zustand der Netzwerkaktivität begleiten. Umgekehrt ist eine Schwächung der Spikerate nicht unbedingt an einen Zerfall des Burstmusters gekoppelt. Der Natriumkanalblocker TTX und der Neurotransmitter GABA inhibieren die Netzwerkaktivität durch Verlängerung der Interburst-Intervalle, während der Anteil in Bursts organisierter Spikes erhalten bleibt (Otto, Gortz et al., 2003).

In Projektionsneuronen des Striatums ist ein einwärts gerichteter Kaliumgleichrichter besonders markant ausgeprägt, der das Membranpotenzial in einem hyperpolarisierten „Down-State“ hält. Erst durch starken exzitatorischen Einfluss entlang des Dendritenbaumes wird der Kaliumgleichrichter deaktiviert und das Membranpotenzial in einen leicht depolarisierten „Down-State“ versetzt, von dem aus Aktionspotenziale gefeuert werden können, aber nicht gefeuert werden müssen. Das Membranpotenzial springt zurück zum „Down-State“, wenn der synaptische Input unter ein Level fällt, von dem aus der Kaliumgleichrichter wieder aktiviert werden kann (Wilson und Kawaguchi, 1996). Dieser Mechanismus ist verantwortlich für den Phasenübergang von stillen Interburst-Intervallen zu ausgeprägten Bursts in striatalen Neuronen *in vivo*. Wird der Kaliumgleichrichter blockiert, erleichtert dies den Übergang vom „Down“- in den „Up-State“, der dadurch häufiger erfolgt. Somit werden auch Aktionspotenziale wahrscheinlicher, was im Einklang mit den hier beschriebenen Beobachtungen steht. Bariumchlorid (500 μM) verdoppelte die Spikefrequenz bei pStriatum, hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die Spikerate von corticalen Zellen. Zwar ist auch für Neurone des Cortex ein Übergang des Membranpotenzials vom „Down“- zum „Up-State“ beschrieben, vermutlich ist er aber weniger stark ausgeprägt als in striatalen Neuronen (Cowan und Wilson, 1994).

Tepper und Trent berichten, dass der Kaliumgleichrichter bei Ratten erst ab einem Alter von mehreren Tagen exprimiert wird und nach drei Wochen ein Plateau erreicht (Tepper, Sharpe et al., 1998). Somit wäre auch kein Barium-Effekt in den in dieser Untersuchung eingesetzten pStriatum-Kulturen zu erwarten gewesen, da diese am Tag P1 präpariert worden waren. Allerdings wurden die Zellen erst nach mehreren Wochen in Kultur vermessen, so dass sie im Brutschrank vielleicht den Reifezustand älterer Zellen erreicht haben könnten. Da sich eStriatum durch Barium nicht aktivieren ließ, scheinen embryonale Zellen diesen Zustand auch nach noch längerer Kultivierungszeit nicht erreichen zu können. Zum Zeitpunkt der Präparation (E15) ist dafür eventuell noch der Einfluss umgebender Hirnareale notwendig. Vielleicht wird der Kalium-einwärts-Gleichrichterkanal in den Neuronen des embryonalen Entwicklungszustands noch nicht oder nicht im gleichen Umfang exprimiert wie im postnatalen Stadium, so dass deshalb keine aktivierende Wirkung von Barium beobachtet werden konnte. Dies erklärt aber lediglich, warum die Zellen „nicht“ aktiviert wurden und nicht, warum sie inhibiert wurden.

Eine mögliche Erklärung für diese Inhibition ist, dass synchronen Burst-Ereignissen ein starker und kohärenter synaptisch vermittelter exzitatorischer Input vorausgehen muss. Bariumchlorid wirkt nicht besonders spezifisch und blockiert vermutlich auch auswärts gerichtete Kaliumströme. Durch die Blockade von Kaliumkanälen wird die Wahrscheinlichkeit für das Feuern eines einzelnen Aktionspotenziales erhöht, da das Membranpotenzial depolarisiert wird, es werden aber auch Regelmechanismen außer Kraft gesetzt, die die Kohärenz der Aktivität kontrollieren. Die daraus resultierende Inkohärenz des synaptischen Inputs, sichtbar auch am größeren Anteil nicht in Bursts eingebundener Spikes, bewirkt letztendlich eine Inhibition der Netzwerkaktivität, da sich die Wahrscheinlichkeit für die Initiation eines Burst-Ereignisses verkleinert. Periodische Bursts in neuronalen Kulturen werden nicht durch spezifische „Schrittmacher-Neurone“ kontrolliert, sondern resultieren aus zeitlicher und räumlicher Summation eines kontinuierlichen und zufälligen Hintergrunds von synaptischem Input (Maeda, Robinson et al., 1995). Dieser synaptische Input besteht dabei nicht nur aus präsynaptischen Aktionspotenzialen, sondern auch aus postsynaptischen Depolarisationen ausgelöst durch auch im Ruhezustand geöffnete NMDA-Kanäle oder durch Miniatur-EPSCs (exzitatorische postsynaptische Ströme) (Robinson, Kawahara et al., 1993). Die elektrische Kopplung schien in den embryonalen striatalen Kulturen generell schwächer zu sein als in den postnatalen oder corticalen, da trotz der Öffnung von NMDA-Kanälen durch Magnesium-Entzug immer noch ein hoher Anteil von nicht in Bursts eingebundenen Spikes registriert und ein niedriger Wert für Cohen's Kappa bestimmt wurde. Dies machte sie

anfälliger für Barium als pStriatum, dessen Netzwerkaktivität zwar unkorrelierter wurde, aber nicht vollkommen zusammenbrach. Bei pStriatum konnte Barium auch in hohen Konzentrationen bis 2 mM die Aktivität nicht unterdrücken. Barium blockiert wahrscheinlich vorzugsweise den einwärts gerichteten Kaliumgleichrichter, der den Übergang vom „Down“ zum „Up“-State bestimmt, aber weniger Einfluss auf das Feuern einzelner Aktionspotenziale hat. Erst dann, wenn diese Kanäle nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden sind, blockiert Barium solche Kaliumkanäle, die die Wahrscheinlichkeit für das Feuern eines einzelnen Neurons erhöhen und es so aus dem Kontext des Netzwerks herausreißen.

4.5.7 Blockade anderer Kaliumkanäle durch Bariumchlorid

Die Vermutung, dass Barium relativ unspezifisch Kaliumströme blockiert, indem es sich in die Pore der Kanäle setzt, sollte überprüft werden, indem man sich eine typische Eigenschaft von Kaliumkanal-Blockern zunutze machte: Einzelzell-Messungen haben gezeigt, dass die Blockade von Kaliumkanälen zu einem „Aufweiten“ der Wellenform eines Aktionspotenzials führt, da Kaliumströme vor allem für die Repolarisationsphase am Ende eines Aktionspotenziales verantwortlich sind. Zur Auswertung wurden pStriatum-Messungen herangezogen, bei denen Barium einen deutlich aktivierenden Effekt gehabt hatte. Aber ein Einfluss von Barium auf die Spikeform war nicht nachweisbar: die Spikebreite war vor und nach Barium-Applikation jeweils identisch.

Eine Wirkung von Barium auf auswärts gerichtete Kaliumströme war in diesem System entweder nicht vorhanden oder aber – was der wahrscheinlichere Fall ist – nicht nachweisbar, da mit MEAs keine direkte Potenzialdifferenz zwischen Innen- und Außenseite der Zellmembran gemessen werden kann. Auch eine Änderung der extrazellulären Kalium-Konzentration hatte übrigens keinen Einfluss auf die Spikeform (Daten nicht gezeigt). Offenbar entsprechen die in diesem System gemessenen Feldpotenzialänderungen nicht dem Aktionspotenzial, wie es durch „whole-cell“-Messungen mit Glasmikroelektroden bestimmt wird. Die bei pStriatum nachgewiesenen längeren Intraburst-ISIs unter Barium könnten allerdings auf verlängerte Refraktärzeiten hindeuten. Dies würde durchaus für einen Effekt von Barium auf auswärts gerichtete Kaliumströme sprechen, da diese für die Repolarisation der Zellmembran nach einem Aktionspotenzial verantwortlich sind. Zumindest im Herzmuskel wurde bereits gezeigt, dass Barium sowohl die absolute als auch die relative Refraktärzeit verlängert (Wu, Su et al., 1999; Varma, Qi et al., 2002).

Die geringfügig kleinere Amplitude der Aktionspotenziale, die in einigen Fällen beobachtet wurde, könnte auf einen Effekt von Bariumchlorid auf Natriumströme schließen lassen, aber eine andere Erklärung ist wahrscheinlicher: Wenn zwei aktive Neurone in gleicher Entfernung von der Elektrode liegen und ähnliche Spikeformen haben, sind sie schwierig voneinander zu diskriminieren und werden eventuell nur als einzelnes Neuron gewertet. Hätten die Aktionspotenziale des einen Neurons eine geringfügig kleinere Amplitude und wäre dieses Neuron durch Barium stärker aktiviert worden als das benachbarte, so könnte dies schon zu einer im Mittel kleineren Amplitude führen. Außerdem sieht man in Abbildung 25, dass die Standardabweichung der Amplitude schon unter Kontrollbedingungen relativ groß war, entweder weil Signale von verschiedenen Zellen registriert wurden oder einfach die Grenzen der Auflösungsgenauigkeit des MEA-Systems erreicht waren.

4.5.8 Dopamin-Rezeption

Aus medizinischer Sicht ist die Wirkungsweise von Dopamin auf die Aktivität striataler Zellen von besonderer Bedeutung, da die Symptomatik der Parkinson-Erkrankung vor allem auf einem Absterben dopaminerger Zellen in der Substantia nigra beruht, die in das Striatum projizieren und dort Dopamin freisetzen. Bisher wurden mindestens fünf Dopamin-Rezeptor-Subtypen charakterisiert, die in D₁- und D₂-ähnliche Rezeptoren unterteilt werden und an G-Proteine gekoppelt sind. Dopamin-Rezeptoren modulieren die neuronale Erregbarkeit, indem sie die Eigenschaften einer Vielzahl von unterschiedlichen spannungsabhängigen Ionenkanälen verändern und in die synaptische Übertragung eingreifen. Diese Vielzahl von teils entgegengerichteten Effekten erklärt vermutlich, warum es zum Teil widersprüchliche Aussagen darüber gibt, ob Dopamin exzitatorisch oder inhibitorisch wirkt (Nicola, Surmeier et al., 2000). Aktivierung von D₁-Rezeptoren durch Stromzufuhr (current injection) scheint die Spike-Aktivität eher zu erniedrigen, während sie durch Aktivierung von D₂-Rezeptoren erhöht wird.

Auch die Versuche dieser Untersuchung konnten keinen eindeutigen, reproduzierbaren Effekt von Dopamin auf die Netzwerkaktivität striataler Kulturen belegen. Die Ausprägung und Stärke der von Dopamin hervorgerufenen Antwort schien stark von der individuellen Ausprägung des untersuchten Netzwerks abzuhängen. Tendenziell schien Dopamin eher aktivierend zu wirken, wie es Abbildung 31 zeigt, obwohl auch entgegengesetzte Effekte eintraten. Bei sehr komplexen Mechanismen, wie sie durch Dopamin ausgelöst werden, sind kleine neuronale Netze, deren Zusammensetzung und Vernetzungsgrad nicht genau

standardisiert sind, vielleicht keine angemessenen Modelle. Um den Einfluss von Dopamin oder eines Dopamin-Mangels auf die Funktion des Striatums zu untersuchen, sind sie womöglich zu weit von der *in vivo*-Situation entfernt.

4.6 Cryokonservierung

Cryokonservierte Neurone bieten gegenüber frisch präparierten Zellen den Vorteil, dass keine Tierhaltung notwendig ist und die komplizierte Präparation entfällt. Experimente können so ohne lange Planungsphase und aufwändige Vorarbeiten durchgeführt werden. Neben Zellen des Cortex, des Striatums, des Hippocampus und des Rückenmarks der embryonalen Ratte, sind mittlerweile auch Neurone der embryonalen Maus erhältlich, die auch schon auf MEAs getestet wurden (Otto, Fleischer et al., 2006). Da die cryokonservierten Zellen von 80-90 Embryonen stammen, spielen individuelle Unterschiede eine weniger große Rolle, was der Reproduzierbarkeit der Experimente zugute kommt. Nichtsdestotrotz darf das Einfrieren natürlich nicht die Eigenschaften der Zellen beeinflussen. Mehrjährige Erfahrungen in diesem Labor sowohl mit cryokonservierten als auch mit frisch präparierten Zellen aus dem Cortex und dem Striatum haben gezeigt, dass beide Typen sich weder in morphologischen noch in funktionellen Merkmalen unterscheiden (Otto, Gortz et al., 2003). Auch der Hersteller der Cryo-Zellen, QBM Cell Science, gibt an, dass er keine Veränderungen der Zelleigenschaften durch den Prozess des Einfrierens feststellen konnte.

4.7 Resümee und Ausblick

MEAs, auf denen neurale Zellen kultiviert werden, bieten die Möglichkeit, das Entstehen eines neuronalen Netzes über einen Zeitraum von mehreren Monaten zu beobachten. So konnte gezeigt werden, dass die Tendenz zur funktionellen Vernetzung bei striatalen Neuronen deutlich schwächer ausgeprägt ist als bei Neuronen aus dem Cortex. Durch Applikation von Pharmaka wurden sowohl gewebe- als auch entwicklungspezifische Merkmale der Zellen bestimmt. Zukünftige Untersuchungen von striatalen Zellen auf MEAs sollten versuchen, stärker der Wirkungsweise des Neurotransmitters Dopamin innerhalb neuronaler Netzwerke auf den Grund zu gehen. Die Übertragung von an Einzelzellen gewonnenen Erkenntnissen auf die MEA-Technik ist möglich, z.B. durch den Einsatz rezeptor-spezifischer Agonisten und Antagonisten. Auch wäre es denkbar, Neurone aus der

Substantia nigra mit striatalen Kulturen zu kokultivieren und so direkt ihre Interaktion zu beobachten.

Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen die Chancen, aber auch die Grenzen der MEA-Technik. Denn einerseits bietet sie die Möglichkeit, elektrisch aktive Zellen über einen langen Zeitraum zu beobachten. Herkömmlichen Untersuchungsmethoden mit Glasmikroelektroden hat sie voraus, dass die Zellen bei der Messung nicht zerstört werden, und so das gleiche Netzwerk mit den gleichen Neuronen mehrmals untersucht werden kann statt eines parallelen Ansatzes, der sich in Zelldichte und -zusammensetzung unterscheiden könnte. Die MEA-Technik ist so schnell und leicht anzuwenden, dass auch große Substanz-Bibliotheken auf ihre neuroaktive Wirkung hin untersucht werden können. Sowohl synaptisch wirksame Substanzen als auch Modulatoren von Ionenkanälen sind mit dieser Methode nachweisbar.

Andererseits werden zur Aufklärung genauer Wirkmechanismen immer noch präzisere Methoden benötigt. So konnte im Rahmen dieser Untersuchung z.B. nicht festgestellt werden, ob ein Kaliumkanal-Blocker die Wellenform eines Aktionspotenzials verändert oder einen Einfluss auf das Membranpotenzial hat. Da sich die verwendeten Netzwerke nicht nur aus gleichartigen Zellen zusammensetzen und auch der Grad der Vernetzung unterschiedlich sein kann, wird die Untersuchung einer neuroaktiven Substanz problematisch, wenn sie teils divergente Effekte in den Zellen auslöst. Je nach Ausprägung des Netzwerkes kann das Pendel in die eine oder die andere Richtung ausschlagen und zu widersprüchlichen Ergebnissen führen. Einzelzelluntersuchungen zeigen meist weniger große Schwankungen.

Diese Arbeit hat aber auch gezeigt, dass nicht nur Charakteristika der Einzel-Zelle das Netzwerk bestimmen, sondern auch umgekehrt Netzwerkparameter das Verhalten der einzelnen Zelle beeinflussen. So bestimmt z.B. der Grad der Vernetzung, ob eine Zelle tonische Aktionspotenziale feuert oder Spike-Bursts. Daher müssen auch die Ableitungen von einzelnen Zellen kritisch betrachtet werden, wenn keine Netzwerkparameter in die Analyse einbezogen werden. Zudem kann die Präzision einer Methode in die Irre führen, wenn sie Effekte an einer einzelnen Zelle misst, die so schwach ausgeprägt sind, dass sie im Zellverband unterschwellig und damit wirkungslos bleiben. Letztendlich kann uns aber die Kombination von Untersuchungen der einzelnen Zelle, des Netzwerkes und der Interaktion zwischen Netzwerken ein komplettes Bild vermitteln über die komplexe Funktion des zentralen Nervensystems.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Oszillationen neuronaler Netzwerke sind Kennzeichen neurologischer Erkrankungen wie Epilepsie oder Parkinson. Mit der Kultivierung von dissoziierten Neuronen auf Mikroelektroden-Arrays (MEAs) ist es erstmals möglich geworden, die funktionelle Entwicklung eines neuronalen Netzes *in vitro* über einen langen Zeitraum zu verfolgen. Bisherige Untersuchungen mit Neuronen aus dem Cortex, Hippocampus und Rückenmark zeigten, dass sie nach ausreichender Kultivierungszeit spontan synchrone und rhythmisch oszillierende Spike-Bursts feuerten, die stark glutamaterg getrieben waren. Im adulten Corpus Striatum schütten 90 – 95 % der Neurone den inhibitorischen Neurotransmitter GABA aus, während exzitatorischer Input allein durch glutamaterge Afferenzen anderer Hirnareale vermittelt wird. In der folgenden Arbeit sollte geklärt werden, ob striatale Neurone auf MEAs spontan aktive und oszillierende Netzwerke bilden. Histiotypische Eigenschaften sollten bestimmt und ihr Einfluss auf die neuronale Netzwerkaktivität untersucht werden.

Sowohl Zellen des embryonalen (eStriatum) als auch des postnatalen Striatums (pStriatum) der Ratte ließen sich auf MEAs kultivieren. In starker Abhängigkeit von der Zelldichte entwickelten sie entweder seltene und nur unkorrelierte spontane Spike-Aktivität ($\leq 2.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$) oder aber regelmäßig oszillierende Spike-Bursts ($> 5 \times 10^5 / \text{cm}^2$). In dünnen Kulturen ließ sich lediglich ein Anteil von 20 % (eStriatum) bis 50 % (pStriatum) GABAerger Neurone bestimmen, in dichten Kulturen lag er deutlich höher. Dort verdoppelte der GABA-Antagonist Bicucullin ($50 \mu\text{M}$) die Spikerate beider striataler Zelltypen durch eine Verlängerung der Burstdauer, hatte aber keinen Effekt auf die Aktivität corticaler Zellen. Blockade des NMDA-Rezeptors durch APV ($20 \mu\text{M}$) bewirkte eine deutliche Reduktion der elektrischen Aktivität, was auf eine Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat innerhalb der striatalen Netzwerke schließen lässt. Dass sich elektrophysiologische Parameter striataler Neurone während der embryonalen Entwicklung verändern, konnte durch die Applikation des Kaliumkanal-Blockers Bariumchlorid ($500 \mu\text{M}$) gezeigt werden: Während es die Spikerate von pStriatum durch eine erhöhte Burstfrequenz aktivierte, schwächte und desynchronisierte es die Netzwerkaktivität von eStriatum.

Histiotypische Eigenschaften striataler Neurone spiegeln sich in ihrer elektrischen Aktivität auf MEAs wider. Als oszillierende Netzwerke stellen sie Modellsysteme dar für Oszillationen *in vivo* und könnten Ausgangspunkt sein für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

6 ABKÜRZUNGEN UND ZUSAMMENSETZUNGEN

6.1 Abkürzungen

4-AP: 4-Aminopyridin

AHP: Afterhyperpolarization (Nachhyperpolarisationspotenzial)

AMPA: Alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure

APV: D,L-2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure

CPu: Caudate Putamen

CryoCortex: Cryokonservierte Neurone des Cortex embryonaler (E18/E19) Ratten

CryoStriatum: Cryokonservierte Neurone des Striatums embryonaler (E18/E19) Ratten

DAPI: 4,6-Diamidino-2-phenylindol

div: Days *in vitro* (Tage in Kultur)

E15: Embryonaltag 15

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

EEG: Elektroenzephalographie

EPSC: excitatory postsynaptic current (exzitatorischer postsynaptischer Strom)

EPSP: excitatory postsynaptic potential (exzitatorisches postsynaptisches Potenzial)

eStriatum: Neurone des Striatums embryonaler (E15) Ratten

FCS: Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)

FITC: Fluorescein Isothiocyanat

fMRT: funktionelle Magnetresonanz-Tomographie

GABA: γ -Aminobuttersäure

GAD: Glutamat Decarboxylase

GFAP: glial fibrillary acidic protein (gliales fibrilläres saures Protein)

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethanschwefelsäure

Hz: Hertz

IBI: Interburst-Intervall

IgG: Immunglobulin G

ISI: Interspike-Intervalle

K_{ir} : einwärts gerichteter Kaliumgleichrichterstrom

K_v : spannungsabhängiger Kaliumstrom

L-DOPA: L-3,4-Dihydroxyphenylalanin

LTP: Long-term potentiation (Langzeit-Potenzierung)

MAP2: Microtubule-associated protein2 (Mikrotubuli assoziiertes Protein 2)

MEA: Mikroelektroden-Array

MEG: Magnetenzephalographie

NBQX: 1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo(f)chinoxalin-7-sulfonamid

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat

P0: Postnataler Tag 0 (Tag der Geburt)

PBS: Phosphate buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

PDL: Poly-D-Lysin

PET: Positronen-Emissions-Tomographie

PFA: Paraformaldehyd

pStriatum: Neurone des Striatums postnataler (P0) Ratten

Rpm: Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)

TEA: Tetraethylammonium

vs: versus

6.2 Zusammensetzungen

Nährmedium:	Neurobasalmedium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) + B27-Supplement (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) + 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) + 0,5 mM L-Glutamin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)
mv10-Nährmedium:	Minimal Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen, ohne L-Glutamin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) + 10 % FCS (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) + 30 mM Glucose (Sigma, Taufkirchen) + 2 mM L-Glutamin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) + 2,5 mg Insulin (Sigma, Taufkirchen) + 10 mM HEPES (Sigma, Taufkirchen)
Standard-Badlösung:	150 mM NaCl (Sigma, Taufkirchen) + 10 mM HEPES (Sigma, Taufkirchen) auf pH 7,4 titriert mit NaOH + 4 mM K ₂ CO ₃ (Sigma, Taufkirchen) + 2 mM CaCl ₂ (Sigma, Taufkirchen) + 10 mM D-Glucose (Sigma, Taufkirchen)

7 Literaturverzeichnis

- Akopian, G. and J. P. Walsh (2006). "Pre- and postsynaptic contributions to age-related alterations in corticostriatal synaptic plasticity." Synapse **60**(3): 223-238.
- Arnold, F. J., F. Hofmann, et al. (2005). "Microelectrode array recordings of cultured hippocampal networks reveal a simple model for transcription and protein synthesis-dependent plasticity." J Physiol **564**(Pt 1): 3-19.
- Basar, E., C. Basar-Eroglu, et al. (1999). "Are cognitive processes manifested in event-related gamma, alpha, theta and delta oscillations in the EEG?" Neurosci Lett **259**(3): 165-8.
- Benitez-Diaz, P., L. Miranda-Contreras, et al. (2003). "Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex." Dev Neurosci **25**(5): 366-74.
- Besl, B. and P. Fromherz (2002). "Transistor array with an organotypic brain slice: field potential records and synaptic currents." Eur J Neurosci **15**(6): 999-1005.
- Bezard, E., C. E. Gross, et al. (2003). "Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated." Trends Neurosci **26**(4): 215-21.
- Branch, D. W., B. C. Wheeler, et al. (2001). "Long-term stability of grafted polyethylene glycol surfaces for use with microstamped substrates in neuronal cell culture." Biomaterials **22**(10): 1035-47.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, et al. (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." J Neurosci Res **35**(5): 567-76.
- Chiappalone, M., A. Vato, et al. (2003). "Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications." Biosens Bioelectron **18**(5-6): 627-34.
- Claverol-Tinture, E. and J. Pine (2002). "Extracellular potentials in low-density dissociated neuronal cultures." J Neurosci Methods **117**(1): 13-21.
- Cowan, R. L. and C. J. Wilson (1994). "Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex." J Neurophysiol **71**(1): 17-32.
- Cozzi, L., P. D'Angelo, et al. (2006). "Encoding of Time-varying Stimuli in Populations of Cultured Neurons." Biol Cybern **94**(5): 335-49.
- DeMarse, T. B., D. A. Wagenaar, et al. (2001). "The neurally controlled animat: Biological brains acting with simulated bodies." Auton. Robots **11**: 305-310.
- Dubinsky, J. M. (1989). "Development of inhibitory synapses among striatal neurons in vitro." J Neurosci **9**(11): 3955-65.

- Dus, L., N. Canu, et al. (1997). "NMDA receptor modulation by a conditioned medium derived from rat cerebellar granule cells." Eur J Neurosci **9**(12): 2668-76.
- Eccles, J. C. (1957). "The Physiology of Nerve Cells."
- Elger, C. E., A. D. Friederici, et al. (2004). "Das Manifest." Gehirn&Geist **6**.
- Eytan, D., A. Minerbi, et al. (2004). "Dopamine-induced dispersion of correlations between action potentials in networks of cortical neurons." J Neurophysiol **92**(3): 1817-24.
- Fields, R. D. and B. Stevens-Graham (2002). "New insights into neuron-glia communication." Science **298**(5593): 556-62.
- Fiszman, M. L., T. Behar, et al. (1993). "GABAergic cells and signals appear together in the early post-mitotic period of telencephalic and striatal development." Brain Res Dev Brain Res **73**(2): 243-51.
- Fleischer, W., O. A. Sergeeva, et al. (2006). "Dissociated striatal neurons develop an electrophysiologically active network." Brain Res (submitted).
- Gerfen, C. R. (1988). "Synaptic organization of the striatum." J Electron Microsc Tech **10**(3): 265-81.
- Gevins, A., H. Leong, et al. (1995). "Mapping cognitive brain function with modern high-resolution electroencephalography." Trends Neurosci **18**(10): 429-36.
- Gopal, K. V. (2003). "Neurotoxic effects of mercury on auditory cortex networks growing on microelectrode arrays: a preliminary analysis." Neurotoxicol Teratol **25**(1): 69-76.
- Görtz, P., A. Hoinkes, et al. (2004). "Implications for hyperhomocysteinemia: not homocysteine but its oxidized forms strongly inhibit neuronal network activity." J Neurol Sci **218**(1-2): 109-14.
- Görtz, P., F. Otto, et al. (2003). Establishing Dissociated Neuronal Cultures as Biosensors for Neuroactive Substances in Acute Encephalopathy. 29th Göttingen Neurobiology Conference, Goettingen.
- Gramowski, A., K. Jugelt, et al. (2004). "Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays." Eur J Neurosci **19**(10): 2815-25.
- Gramowski, A., D. Schiffmann, et al. (2000). "Quantification of acute neurotoxic effects of trimethyltin using neuronal networks cultured on microelectrode arrays." Neurotoxicology **21**(3): 331-42.
- Gross, G. W., A. Harsch, et al. (1997). "Odor, drug and toxin analysis with neuronal networks in vitro: extracellular array recording of network responses." Biosens Bioelectron **12**(5): 373-93.

- Gross, G. W., E. Rieske, et al. (1977). "A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro." Neurosci. Lett. **6**: 101-106.
- Harsch, A., C. Ziegler, et al. (1997). "Strychnine analysis with neuronal networks in vitro: extracellular array recording of network responses." Biosens Bioelectron **12**(8): 827-35.
- Herlenius, E. and H. Lagercrantz (2004). "Development of neurotransmitter systems during critical periods." Exp Neurol **190 Suppl 1**: S8-21.
- Hescheler, J., M. Halbach, et al. (2004). "Determination of electrical properties of ES cell-derived cardiomyocytes using MEAs." J Electrocardiol **37 Suppl**: 110-6.
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "Movement of sodium and potassium ions during nervous activity." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **17**: 43-52.
- Holmgren, C. D. and Y. Zilberter (2001). "Coincident spiking activity induces long-term changes in inhibition of neocortical pyramidal cells." J Neurosci **21**(20): 8270-7.
- Hurst, R. S., C. Cepeda, et al. (2001). "Delayed postnatal development of NMDA receptor function in medium-sized neurons of the rat striatum." Dev Neurosci **23**(2): 122-34.
- Ito, Y., T. Koshiba, et al. (1992). "Characterization of antagonistic activity and binding properties of SR 95531, a pyridazinyl-GABA derivative, in rat brain and cultured cerebellar neuronal cells." Synapse **10**(4): 326-33.
- Ivkovic, S. and M. E. Ehrlich (1999). "Expression of the striatal DARPP-32/ARPP-21 phenotype in GABAergic neurons requires neurotrophins in vivo and in vitro." J Neurosci **19**(13): 5409-19.
- Katz, B. (1971). "Quantal mechanism of neural transmitter release." Science **173**(992): 123-6.
- Kawaguchi, Y. (1997). "Neostriatal cell subtypes and their functional roles." Neurosci Res **27**(1): 1-8.
- Keefer, E. W., A. Gramowski, et al. (2001). "NMDA receptor-dependent periodic oscillations in cultured spinal cord networks." J Neurophysiol **86**(6): 3030-42.
- Keefer, E. W., A. Gramowski, et al. (2001). "Characterization of acute neurotoxic effects of trimethylolpropane phosphate via neuronal network biosensors." Biosens Bioelectron **16**(7-8): 513-25.
- Klusmann, A., W. Fleischer, et al. (2005). "Influence of D-arabitol and ribitol on neuronal network activity." J Inherit Metab Dis **28**(6): 1181-3.
- Kowalski, C., M. Crest, et al. (1995). "Emergence of a synaptic neuronal network within primary striatal cultures seeded in serum-free medium." Neuroscience **64**(4): 979-93.
- Krause, M. and Y. Jia (2005). "Serotonergic modulation of carbachol-induced rhythmic activity in hippocampal slices." Neuropharmacology **48**(3): 381-90.

- Loeb, C. and G. F. Poggio (2002). "Neural substrates of memory, affective functions, and conscious experience." Adv Anat Embryol Cell Biol **166**: 1-111.
- Luk, K. C., T. E. Kennedy, et al. (2003). "Glutamate promotes proliferation of striatal neuronal progenitors by an NMDA receptor-mediated mechanism." J Neurosci **23**(6): 2239-50.
- Luscher, C., R. A. Nicoll, et al. (2000). "Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane." Nat Neurosci **3**(6): 545-50.
- Maeda, E., H. P. Robinson, et al. (1995). "The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons." J Neurosci **15**(10): 6834-45.
- Mitzner, S., J. Loock, et al. (2002). "Improvement in central nervous system functions during treatment of liver failure with albumin dialysis MARS--a review of clinical, biochemical, and electrophysiological data." Metab Brain Dis **17**(4): 463-75.
- Mizuno, K., J. Carnahan, et al. (1994). "Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons." Dev Biol **165**(1): 243-56.
- Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.
- Nicola, S. M., J. Surmeier, et al. (2000). "Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens." Annu Rev Neurosci **23**: 185-215.
- Nieuwenhuys, R. (1994). "The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology." Anat Embryol (Berl) **190**(4): 307-37.
- O'Shaughnessy, T. J., B. Zim, et al. (2003). "Acute neuropharmacologic action of chloroquine on cortical neurons in vitro." Brain Res **959**(2): 280-6.
- Otto, F., W. Fleischer, et al. (2006). "Characterization of cryopreserved mouse cortex neurons on microelectrode arrays - The mouse neurochip." Brain Research (submitted).
- Otto, F., P. Gortz, et al. (2003). "Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on microelectrode arrays." J Neurosci Methods **128**(1-2): 173-81.
- Otto, F., B. C. Kieseier, et al. (2005). "The pentapeptide QYNAD does not inhibit neuronal network activity." Can J Neurol Sci **32**(3): 344-8.
- Pancrazio, J. J., E. W. Keefer, et al. (2001). "Neurophysiologic effects of chemical agent hydrolysis products on cortical neurons in vitro." Neurotoxicology **22**(3): 393-400.
- Parnas, D. and M. Linal (1997). "Culture density regulates both the cholinergic phenotype and the expression of the CNTF receptor in P19 neurons." J Mol Neurosci **8**(2): 115-30.
- Parsons, L. M. (2001). "Exploring the functional neuroanatomy of music performance, perception, and comprehension." Ann N Y Acad Sci **930**: 211-31.

Perea, G. and A. Araque (2006). "Synaptic information processing by astrocytes." J Physiol Paris **99**(2-3): 92-7.

Pisani, A., D. Centonze, et al. (2005). "Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease." Mov Disord **20**(4): 395-402.

Potter, S. M. and T. B. DeMarse (2001). "A new approach to neural cell culture for long-term studies." J Neurosci Methods **110**(1-2): 17-24.

Potter, S. M., D. A. Wagenaar, et al. (2005). Closing the loop: Stimulation feedback systems for embodied MEA cultures. Advances in network electrophysiology using multi-electrode arrays. M. Taketani and M. Baudry. New York, Springer.

Potter, S. M., D. A. Wagenaar, et al. (2003). Long-term Bidirectional Neuron Interfaces for Robotic Control, and In Vitro Learning Studies. 25th Annual International Conference of the IEEE, Cancun.

Puopolo, M. and O. Belluzzi (2001). "NMDA-dependent, network-driven oscillatory activity induced by bicuculline or removal of Mg²⁺ in rat olfactory bulb neurons." Eur J Neurosci **13**(1): 92-102.

Robinson, H. P., M. Kawahara, et al. (1993). "Periodic synchronized bursting and intracellular calcium transients elicited by low magnesium in cultured cortical neurons." J Neurophysiol **70**(4): 1606-16.

Segal, M., V. Greenberger, et al. (2003). "Formation of dendritic spines in cultured striatal neurons depends on excitatory afferent activity." Eur J Neurosci **17**(12): 2573-85.

Sergeeva, O. A., B. P. Klyuch, et al. (2006). "P2Y receptor mediated excitation in the posterior hypothalamus." Eur J Neurosci **24**(5): 1413-26.

Shi, W. X. and S. Rayport (1994). "GABA synapses formed in vitro by local axon collaterals of nucleus accumbens neurons." J Neurosci **14**(7): 4548-60.

Sonnewald, U., E. Olstad, et al. (2004). "First direct demonstration of extensive GABA synthesis in mouse cerebellar neuronal cultures." J Neurochem **91**(4): 796-803.

Tepper, J. M., N. A. Sharpe, et al. (1998). "Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies." Dev Neurosci **20**(2-3): 125-45.

Trautmann, A., P. Ruther, et al. (2004). Fabrication of Out-of-Plane Electrodes for Intracellular Potential Measurements on Living Adherent Cells. 4th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays, Reutlingen.

Uchida, I., I. N. Cestari, et al. (1996). "The differential antagonism by bicuculline and SR95531 of pentobarbitone-induced currents in cultured hippocampal neurons." Eur J Pharmacol **307**(1): 89-96.

Uesaka, N., S. Hirai, et al. (2005). "Activity dependence of cortical axon branch formation: a morphological and electrophysiological study using organotypic slice cultures." J Neurosci **25**(1): 1-9.

Varma, P., X. Qi, et al. (2002). "Combination IK1 and IKr channel blockade: no additive lowering of the defibrillation threshold." Can J Physiol Pharmacol **80**(1): 22-30.

Ventimiglia, R., P. E. Mather, et al. (1995). "The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro." Eur J Neurosci **7**(2): 213-22.

Verhagen Metman, L. (2002). "Recognition and treatment of response fluctuations in Parkinson's disease: review article." Amino Acids **23**(1-3): 141-5.

Wagenaar, D. A., R. Madhavan, et al. (2005). "Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation." J Neurosci **25**(3): 680-8.

Wilson, C. J. (1995). The contribution of cortical neurons to the firing pattern of striatal spiny neurons. Models of information processing in the basal ganglia. J. C. Houk, J. L. Davis and D. G. Beiser. Cambridge, MIT Press: 29-50.

Wilson, C. J. and Y. Kawaguchi (1996). "The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons." J Neurosci **16**(7): 2397-410.

Wu, M. H., M. J. Su, et al. (1999). "Electrophysiological profile after inward rectifier K channel blockade by barium in isolated rabbit hearts. Altered repolarization and unmasked decremental conduction property." Europace **1**(2): 85-95.

Xia, Y., K. V. Gopal, et al. (2003). "Differential acute effects of fluoxetine on frontal and auditory cortex networks in vitro." Brain Res **973**(2): 151-60.

Xia, Y. and G. W. Gross (2003). "Histotypic electrophysiological responses of cultured neuronal networks to ethanol." Alcohol **30**(3): 167-74.

8 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Wiebke Fleischer
Geburtsdatum: 1974-01-07
Geburtsort: Leverkusen
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1984 – 1993 Werner-Heisenberg-Gymnasium in Leverkusen

Abschluss: Abitur

Studium:

1993/10 – 1998/10 Studium der Biologie an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Schwerpunkte: Biologische Chemie, Molekularbiologie,
Organische Chemie

1998/10 – 1999/10 Diplomarbeit im Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Titel: „Regulation der Insulinempfindlichkeit bei humanen
Skelettmuskelzellen“

Abschluss: Diplom

Berufliche Laufbahn:

2000/01 – 2000/06 Traineeprogramm „Presse- und Öffentlichkeitsarbeit“
2000/07 – 2001/12 Mitarbeiter der Unternehmenskommunikation der
Bayer AG in Leverkusen

seit 2002/04 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Neurologischen Klinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorf, den

.....

9 VERÖFFENTLICHUNGEN

9.1 Artikel

- Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on microelectrode arrays.
Otto, F., Görtz, P., Fleischer, W., Siebler, M.
J Neurosci Methods, 2003 Sep 30; 128(1-2):173-81.
- Implications for hyperhomocysteinemia: not homocysteine but its oxidized forms strongly inhibit neuronal network activity.
Görtz, P., Hoinkes, A., Fleischer, W., Otto, F., Schwahn, B., Wendel, U., Siebler, M.
J Neurol Sci., 2004 Mar 15; 218(1-2):109-14.
- Neuronal network properties of human teratocarcinoma cell line-derived neurons.
Görtz, P., Fleischer, W., Rosenbaum, C., Otto, F., Siebler, M.
Brain Res., 2004 Aug 20; 1018(1):18-25.
- Influence of D-arabitol and ribitol on neuronal network activity.
Klusmann, A., Fleischer, W., Waldhaus, A., Siebler, M., Mayatepek, E.
J Inherit Metab Dis. 2005; 28(6):1181-3.
- P2Y receptor mediated excitation in the posterior hypothalamus.
Sergeeva, O. A., Klyuch, B. P., Fleischer, W., Eriksson, K., Korotkova, T. M., Siebler, M., Haas, H. L.
Eur J Neurosci. 2006; 24(5): 1413-26
- Dissociated striatal neurons develop an electrophysiologically active network.
Fleischer, W., Sergeeva, O. A., Siebler, M.
Brain Res (submitted)
- Characterization of cryopreserved mouse cortex neurons on microelectrode arrays – The mouse neurochip.
Otto, F., Fleischer, W., Krantis, A., Siebler, M.
Brain Res (submitted)

9.2 Kurzdarstellungen

Substrate Integrated MicroElectrode Array (SIMEA) 2003, 3rd International Meeting, Denton, Texas, 2003

- Establishing Dissociated Neuronal Cultures as Biosensors for Neuroactive Substances in Acute Encephalopathy
Görtz, P., Otto, F., Fleischer, W., Hoinkes, A., Siebler, M.

82nd Annual Meeting Deutsche Physiologische Gesellschaft, Bochum, 2003

- Sensitivity of cryopreserved cortical neurons to neuroactive substances
Otto, F., Görtz, P., Fleischer, W., Siebler, M.

5th Congress of the German Neuroscience Society and 29th Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen, 2003

- Impact of homocysteine metabolites on neuronal network activity detected with microelectrode arrays
Hoinkes, A., Fleischer, W., Otto, F., Görtz, P., Schwahn, B., Wendel, U., Siebler, M.
- Neurophysiological characterization of cryopreserved rat cortical neurons on microelectrode arrays
Otto, F., Fleischer, W., Görtz, P., Siebler, M.

17. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für pädiatrische Stoffwechselstörungen, Fulda, 2003

- In welchem Maß beeinträchtigen Homocystein-Metabolite die Spontanaktivität neuronaler Netzwerke? Untersuchungen mittels Mikroelektroden-Arrays und Schlussfolgerungen für neurologische Störungen von Homocystinuriepatienten
Hoinkes, A., Fleischer, W., Otto, F., Görtz, P., Schwahn, B., Wendel, U., Siebler, M.

Neuro-Visionen (Perspektiven in Nordrhein-Westfalen), Düsseldorf, 2003

- Neurochips as biosensors to screen neuroactive substances in clinical and basic research
Görtz, P., Fleischer, W., Otto, F., Hoinkes, A., Siebler, M.

Substrate Integrated MicroElectrode Array (SIMEA) 2004, 4th International Meeting, Reutlingen

- Rat Brain Cortical and Striatal CryoCells on Microelectrode Arrays
Görtz, P., Fleischer, W., Otto, F., Siebler, M.
- Potential Applications of Neuronal Networks on MEAs
Siebler, M., Görtz, P., Otto, F., Fleischer, W.

Neuro-Visionen 2 (Perspektiven in Nordrhein-Westfalen), Düsseldorf, 2004

- From neurons to networks: Classification of Neuronal Network Properties of Cultured Striatal and Cortical Cells
Fleischer, W., Görtz, P., Sergeeva, O. A., Otto, F., Staines, W., Siebler, M.

Neuroscience 2004, SfN 34th Annual Meeting, San Diego, Kalifornien

- Cryopreserved rat cortical cells on microelectrode arrays (MEA): A neurochip biosensor for fast screening
Krantis, A., Staines, W. A., Otto, F., Görtz, P., Fleischer, W., Theiss, S., Siebler, M.

83th Annual Meeting Deutsche Physiologische Gesellschaft, Leipzig, 2004

- Differences between neuronal network activity of human neurons derived from a teratocarcinoma cell line (hNT) and cortical neurons of rat
Görtz, P., Fleischer, W., Otto, F., Siebler, M.

84th Annual Meeting Deutsche Physiologische Gesellschaft, Göttingen, 2005

- From neurons to networks: Neuronal Network Properties of Cryopreserved Striatal and Cortical Cells
Fleischer, W., Sergeeva, O. A., Görtz, P., Otto, F., Siebler, M.

Neuro-Visionen 3 (Perspektiven in Nordrhein-Westfalen), Düsseldorf, 2005

- Oszillation und Synchronisation striataler Neurone
Fleischer, W. und Siebler, M.

Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses 2005, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Entwicklung striataler Neurone zu funktionellen Netzwerken
Fleischer, W., Sergeeva, O. A., Siebler, M.

35th Meeting of the European Histamine Research Society, Delphi, Griechenland, 2006

- P2Y Receptor Mediated Excitation in the Posterior Hypothalamus
Sergeeva, O. A., Klyuch, B. P., Fleischer, W., Eriksson, K., Korotkova, T. M., Siebler, M., Haas, H. L.

Substrate Integrated MicroElectrode Array (SIMEA) 2006, 5th International Meeting, Reutlingen

- Striatal neurons develop oscillating neuronal networks *in vitro*
Fleischer, W., Sergeeva, O. A., Siebler, M.
- Impact of glutaric acid and 3-hydroxy-glutaric acid on Neuronal Network Activity detected with Microelectrode Arrays: Implications for Neurological Disturbance in Glutaric Aciduria Type I
Schröter, A., Fleischer, W., Klusmann, A., Siebler, M.
- Pharmacological properties of identified histaminergic neurons versus whole-MEA responses in primary posterior hypothalamic cultures.
Sergeeva, O. A., Fleischer, W., Siebler, M., Haas, H. L.
- Cryopreserved mouse and rat cortical neurons on MEAs: Different electrophysiological properties?
Otto, F., Fleischer, W., Siebler, M.

10 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mario Siebler, auf dessen Initiative diese Arbeit zurückgeht und der sie auch in schweren Zeiten stets mit (fast) unerschütterlichem Optimismus vorangetrieben hat.

Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn als Vertreter der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät möchte ich herzlich dafür danken, dass er sich die Zeit genommen hat, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen und sich in die Thematik einzuarbeiten.

Den Mitarbeiter des Neurochip-Labors, Dr. Philipp Görtz, Dr. Frauke Otto und Dipl.-Phys. Stephan Theiss, danke ich für Anregung, Diskussion, Unterstützung, Zerstreuung und Kritik. Besonders am Herzen liegt es mir, PD Dr. Olga Sergeeva zu danken, die mir nicht nur in wissenschaftlicher, sondern vor allem in menschlicher Hinsicht eine extreme Stütze war. Es ist schön, wenn man Hilfe nicht erbitten muss, sondern sie angeboten bekommt. Auch Brigida Ziegler war mir eine ebenso liebenswerte wie tatkräftige Hilfe, auf die ich immer zählen konnte. Den übrigen Mitarbeitern des Neurochemischen Labors sei gedankt für eine nette und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, für stete Diskussionsbereitschaft, für Besuche im Krankenhaus und viele leckere Naschereien. Den vielen anderen Passanten, die das Neurochip-Labor im Laufe meiner Zeit hier durchschritten haben – seien es Doktoranden oder Zivildienstleistende –, danke ich für ihre Fröhlichkeit und Geduld meinen Launen gegenüber.

Meiner Mutter, hinter der ein sehr schweres Jahr liegt, möchte ich danken, dass sie mir immer eine Anlaufstelle war, wenn ich dem Rest der Welt aus dem Wege gehen wollte.

Nicht vergessen möchte ich meine Freunde, allen voran Dipl. Biol. Julia Langohr, die es geschafft haben, mich während meiner Krankheit und den nachfolgenden Therapien aufzubauen und ins Leben zurückzuholen. Ich danke euch!

Meinem verstorbenen Vater werfe ich fröhliche Grüße zu. Ich weiß, dass er sich sehr mit mir gefreut hätte.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 2006-12-11

Wiebke Fleischer