



Kortikale neuronale Netzwerke auf Multielektrodenarrays
als reduktionistischer Ansatz zur Aufklärung der
Funktionsprinzipien des zerebralen Kortex

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Tom Reimer,
aus Rostock
Rostock, 02.11.2012

Erstgutachter : Prof. Dr. rer. nat. habil. Jan Gimsa

Lehrstuhl für Biophysik, Universität Rostock

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree

Institut für Anatomie, Universität Rostock

Einreichung: 01.November 2012

Verteidigung: 24.Mai 2013

The most striking,
yet perhaps the least appreciated,
behavior of cortical networks
is their regenerative, spontaneous activity.

G. Buzàki

Is it possible to imagine a useful scheme
of information handling,
whose realization in a neuronal network
requires precisely the kind of elements
and connections which are found
in the telencephalic cortex of mammals?

V. Braitenberg

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1. Komplexität – Der zerebrale Kortex	3
1.2. Rhythmen - Native Spontanaktivität	4
1.3. Kommunikation - Prinzipien kortikaler Informationsverarbeitung	6
1.4. Reduktionistischer Ansatz – Kortikale <i>in vitro</i> -Netzwerke auf Multielektrodenarrays.....	7
1.5. Fragestellung	9
2. Materialien und Methoden.....	11
2.1. Präparation muriner Kortizes.....	11
2.2. Neuronale Zellkultur	11
2.3. Detektion von Aktionspotentialen mit Multielektrodenarrays.....	12
2.4. Immunocytochemische Färbung und konfokale Fluoreszenzmikroskopie ...	14
2.5. Korrelation von elektrischer Aktivität und Zytoarchitektur	15
2.6. Korrelation von Aktivitätsmuster und Neuronentyp	16
2.7. Blockade von elektrischer und chemischer Transmission.....	16
2.8. Stimulation mit elektrischen Feldern	17
3. Ergebnisse.....	19
3.1. Versuchsübersicht	19
3.2. Zelluläre Vielfalt in kortikalen <i>in vitro</i> -Netzwerken	20
3.3. Zusammenhang von Präparationszeitpunkt und Aktivitätsmuster.....	23
3.4. Zusammenhang von Zytoarchitektur und Aktivitätsmuster.....	26

3.5. Burst-Aktivität Parvalbumin-positiver Interneurone.....	34
3.6. Inhibitorische Interaktionen während der Spontanaktivität	37
3.7. Blockade der Gap Junctions	38
3.8. Blockade der chemischen Transmission	40
3.9. Elektrische Stimulation.....	41
4. Diskussion	43
4.1. Multielektrodenarrays und neuronale Netzwerke als System zur Untersuchung kortikaler Funktionsmechanismen?.....	43
4.2. Neurogenese und Präparationszeitpunkt.....	45
4.3. Struktur-Funktions-Beziehung.....	46
4.4. Synchrone Spontanaktivität und Interaktionen	48
4.5. Chemische und elektrische Manipulation.....	50
4.6. Elektrischer Feldeffekt und elektrisches Übersprechen als Mechanismus neuronaler Informationsverarbeitung	53
Relevanz und Ausblick.....	59
Bibliografie	V
Publikationen und Vorträge.....	XIII
Danksagung.....	XVI
Erklärung	XVII

Abbildungsverzeichnis

Abb.1	MEA-Glas-Neurochip	12
Abb.2	Detektion der nativen Spontanaktivität	13
Abb.3	Elektrische Stimulation	17
Abb.4	Versuchsübersicht	18
Abb.5	Neuronale Zellkultur	20
Abb.6	Immunozytochemische Markierung von Interneuronen.....	21
Abb.7	Axonale Verzweigung Parvalbumin-positiver Interneurone	21
Abb.8	Zusammenhang von Präparationszeitpunkt und Aktivitätsmuster.....	22
Abb.9	Unterschiede zwischen den Aktivitätsmustern in Abhängigkeit vom Präparationszeitpunkt	24
Abb.10	Netzwerk mit zahlreichen GABAergen Interneuronen	26
Abb.11	Netzwerk mit zahlreichen Parvalbumin-positiven Interneuronen.....	27
Abb.12	Netzwerk ohne Interneurone	28
Abb.13	Netzwerk das kaum Parvalbumin-positive Interneurone enthält	29
Abb.14	Netzwerk das ebenfalls kaum Parvalbumin-positive Neurone enthält...	30
Abb.15	Netzwerk mit zahlreichen GABAergen Interneuronen	31
Abb.16	Axone Parvalbumin-positiver Interneurone bedecken große Oberflächenbereiche	33
Abb.17	Zuordnung Parvalbumin-positiver Interneurone zu ihrem Aktivitätsmuster.....	34
Abb.18	Einzelne Elektroden bedeckt mit zahlreichen Axonen	34
Abb.19	Kreuzkorrelation	35
Abb.20	Burst-induzierte Inhibition.....	37
Abb.21	Blockade der Gap Junctions mit Mefloquin	38
Abb.22	Blockade der chemischen synaptischen Transmission.....	39
Abb.23	Aktivitätsmuster vor und nach elektrischer Stimulation	41
Abb.24	Vergleich der Dichte des nativen Kortex und kortikalen <i>in vitro</i> - Netzwerken	42
Abb.25	Elektrische Interaktionen zwischen Interneuronen und Pyramidenzellen.....	54

Tabellenverzeichnis

Tab.1	Zur immunozytochemischen Markierung verwendete Antikörper sowie die jeweils angewendete Verdünnung in PBS	15
Tab.2	Während der Detektion der elektrischen Aktivität und während der Kultivierung angewendete Stimulationsparameter	18
Tab.3	Zuordnung der Anzahl Parvalbumin-positiver sowie GABAerger Interneurone zum Aktivitätsmuster des jeweiligen Netzwerks	33

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, den Funktionsprinzipien des außerordentlich komplexen nativen zerebralen Kortex mit Hilfe eines reduktionistischen Ansatzes – der Untersuchung kortikaler, neuronaler Netzwerke kultiviert auf Glas-Neurochips – näher zu kommen. Die Netzwerke dienen als Modellsystem für den Kortex und erlauben Rückschlüsse auf dessen Funktion. Mit den Methoden der neuronalen Zellkultur, der elektrischen Messung mit Multielektrodenarrays (MEAs), der chemischen und elektrischen Manipulation, der immunozytochemischen Färbung und der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie wurde der Zusammenhang von zellulärer Struktur (Zytoarchitektonik) und elektrischer Spontanaktivität kortikaler Netzwerke analysiert. Die chemische und die elektrische synaptische Transmission wurden blockiert, um ihre Rolle während der Spontanaktivität zu klären. Außerdem wurde versucht, die Netzwerke mit elektrischen Feldern zu beeinflussen. Die Arbeit führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Die zelluläre Vielfalt des nativen Kortex ist auch *in vitro* existent.
2. Der Tag der Präparation embryonaler Kortexes hat Einfluss auf das Aktivitätsmuster der Spontanaktivität.
3. Die Charakteristika der Spontanaktivität sind von der Zytoarchitektonik der Netzwerke abhängig.
4. Die synchrone Burst-Aktivität stammt von Parvalbumin-positiven Interneuronen.
5. Die synchrone Burst-Aktivität kann die kontinuierliche Spike-Aktivität von Pyramidenzellen inhibieren.
6. Die Blockade der Gap Junctions und der chemischen synaptischen Transmission verändert die Netzwerkaktivität.
7. Die verwendeten externen elektrischen Felder haben kaum Auswirkungen auf die Morphologie und die Spontanaktivität der Netzwerke.
8. Eine neue Theorie zur kortikalen Informationsverarbeitung zeigt die mögliche Bedeutung des elektrischen Feldeffektes und des elektrischen Übersprechens bei der neuronalen Kommunikation.

Die Ergebnisse zeigen, dass das System aus Netzwerk und Neurochip für die Aufklärung grundlegender Eigenschaften kortikaler Neurone und Netzwerke erfolgreich genutzt werden kann. Die Separation der Aktivitätsmuster von Interneuronen und Pyramidenzellen ist ein entscheidender Schritt, der zum Verständnis neuronaler Interaktionen beiträgt. Die Grundlage für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen ist die Kenntnis der geschädigten Struktur. So haben die Ergebnisse dieser Arbeit neben der Bedeutung für die neurobiologische Grundlagenforschung ebenso Relevanz für die Neurologie.

1. Einleitung

1.1. Komplexität – Der zerebrale Kortex

Der zerebrale Kortex, die Großhirnrinde ist der Teil des Säugetier-Nervensystems, dessen Funktionsweise trotz jahrhundertelanger intensiver Forschung bis heute zum größten Teil unbekannt ist. Die enorme Dichte, die Diversität und morphologische Komplexität der Zellen und ihrer langen Ausläufer erschweren eine genaue Untersuchung. Im Kortex der Maus sind bis zu 25 verschiedene Neuronentypen unterscheidbar (Cajal 1852-1934, DeFelipe 2002, Wang *et al.* 2006, Molnar *et al.* 2006). Cajal leistete Pionierarbeit bei der morphologischen Charakterisierung kortikaler Neurone (DeFelipe 2010). V. Braitenberg vereinfachte bei der Suche nach den Funktionsprinzipien des Kortex die Klassifizierung der Neurone und unterschied nur noch drei Haupttypen: Pyramidenzellen, Sternzellen und Martinottizellen (Braitenberg *et al.* 1998).

Mit immunozytochemischen Markierungen lassen sich heute mehrere Interneuronen-Typen untereinander und von Pyramidenzellen unterscheiden (Makram *et al.* 2004, Brown *et al.* 2009, Kawaguchi *et al.* 2002, Fonseca *et al.* 1993). Interneurone nutzen den Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und können mit Antikörpern gegen diesen Transmitter markiert werden. Die größte Gruppe kortikaler Interneurone, die Basket-Zellen, sind zusammen mit Chandelier-Zellen mit Antikörpern gegen das Calcium-Binde-Protein Parvalbumin identifizierbar (Xu *et al.* 2010). Trotz dieser Fortschritte ist es bisher nicht gelungen, die außerordentlich komplexe Struktur des Kortex zu entwirren. Das Fehlen von Neuronentyp-spezifischen Markern erschwert die Analyse.

Ansätze, die zahlreichen intrakortikalen Verknüpfungen der verschiedenen Neuronentypen sowie die Zytoarchitektonik *in vivo* zu analysieren, wie z.B. die Szentagothai'schen Verküpfungsschemata oder die Versuche, kortikale Schaltkreise mit Hilfe von neuen Elektronenmikroskopie-Techniken zu rekonstruieren, führten bis heute eher zu Modellen als zu Evidenzen (Szentagothai 1989, Helmstaedter *et al.* 2008, Briggman *et al.* 2006). Die Dichte der stark verzweigten Axone und Dendriten, der zahlreichen Synapsen und Zellkörper verhindern eine genaue Zuordnung von Struktur zu Funktion. Im Kortex der Maus beträgt die Dichte der Axone, die den größten Teil des neuronalen Volumens darstellen, 4.1 km/mm^3 , die Anzahl der Neurone $1,0 \times 10^7$ im gesamten Kortex (Braitenberg *et al.* 1998, Schüz *et al.* 1989).

Die generelle funktionelle Struktur und die Komponenten aus denen sie aufgebaut ist, sind überall im Kortex gleich – Pyramidenzellen und Nicht-Pyramidenzellen (zum größten Teil Interneurone) sind in 6 Schichten angeordnet. Pyramidenzellen sind exzitatorisch und projizieren mittels Kommissuren, Projektions- und Assoziationsfasern auch in entfernte kortikale und subkortikale Areale. Sie bilden untereinander etwa 75% sämtlicher kortikaler Synapsen (Braitenberg *et al.* 1998). Interneurone sind inhibitorisch und besitzen zum größten Teil lokale, stark verzweigte Axone. Die Wechselwirkungen zwischen beiden Neuronentypen gelten als Grundlage der Funktion des Kortex (Eccles 1984). Es ist nicht bekannt, wie eine Minderheit an Interneuronen, sie machen etwa 20% aller kortikalen Neurone aus, die große Überzahl an Pyramidenzellen (80%) „in Schach“ hält (Braitenberg *et al.* 1998, Buzàki 2006).

1.2. Rhythmen - Native Spontanaktivität

Es gibt zwei Arten von elektrischer Aktivität, die in neuronalen Netzwerken untersucht werden können: die spontane Aktivität und die durch einen Stimulus evozierte Aktivität. Die spontane Aktivität stellt den größten Teil der elektrischen Aktivität des Kortex dar. Sie wird ununterbrochen, auch bei Abwesenheit von Umweltreizen, intrakortikal generiert und durch sensorische Eingänge perturbiert. Phänomene wie Bewusstsein, Denkvermögen und Kreativität basieren möglicherweise auf ihr, doch ist ihre genaue Bedeutung nicht bekannt (Varela *et al.* 2001). G. Buzàki schreibt dazu: "The most striking, yet perhaps the least appreciated, behavior of cortical networks is their regenerative, spontaneous activity." und "Understanding the self-organizing ability of the brain is the most interesting challenge in science." (Buzàki 2006).

Kortikale Aktivität ist gekennzeichnet durch verschiedene Rhythmen bzw. Oszillationen verschiedener Frequenzen. Die mittels EEG (Elektroenzephalographie) detektierbaren Oszillationen werden abhängig von ihrer Frequenz in verschiedene Frequenzbänder unterteilt. So zählen Oszillationen von 4-19 Hz zum θ -Frequenzband, von 10-30 Hz zum β -Frequenzband, von 30-80 Hz zum γ -Frequenzband und von 80-200 Hz zu den schnellen Oszillationen (Buzàki *et al.* 2004, Buzàki 2006). Die Methoden zur Detektion dieser Aktivität wie beispielsweise EEG und MEG (Magnetoenzephalographie) sind ungenau in ihrer zeitlichen und räumlichen Auflösung, so dass die Ursache bzw. die genaue Herkunft der verschiedenen Aktivitätsformen unbekannt bleibt.

Gleichzeitige Messungen von zahlreichen einzelnen Neuronen sind notwendig, um die Aktivität ihrem Ursprung zuzuordnen und kortikale Schaltkreise verstehen zu können. Mit implantierbaren Multielektrodenarrays (Maynard *et al.* 1997, Normann 2007, Jones *et al.* 1992) oder Multielektroden Arrays für die Zellkultur sind diese Messungen möglich. Trotzdem sind die zelluläre Struktur kortikaler Netze, die Bedeutung und die Ursachen der von ihnen generierten elektrischen Spontanaktivität bis heute weitgehend unbekannt. Eine Separation interneuronaler Aktivitätsmuster von pyramidalen Mustern bzw. eine Korrelation detektierter Aktivität zum Neuronentyp würde zum Verständnis des Verhaltens der Netzwerke beitragen.

Synchrone Bursts, das zeitliche Clustering von Aktionspotentialen, sind typisch für die spontane Aktivität von *in vitro*-Netzwerken und wurden in Vertebraten und Invertebraten beobachtet (Gross 1994, Cohen *et al.* 1988, Legendy *et al.* 1985). Aktionspotentiale (Spikes) treten dabei in schneller Abfolge nahezu synchron an verschiedenen Orten eines Netzwerks auf. Diese Abfolgen werden durch Perioden ohne Aktivität unterbrochen. Der Ort der Entstehung und demzufolge die Richtung der Ausbreitung können von Burst zu Burst variieren (Maeda *et al.* 1995). Das synchrone Bursten gilt als charakteristisch für kortikale *in vitro*-Netzwerke (Kamioka *et al.* 1996, Gross *et al.* 1999, Wagenaar *et al.* 2006, Pelt *et al.* 2004, Jimbo 2007). Bursts, die über mehrere Sekunden andauern und durch Ruheperioden getrennt sind, werden als Superbursts bezeichnet. Plötzlich auftretende Bursts, die die Mehrheit der Neurone eines Netzwerks erfassen und über mehrere Sekunden andauern, werden als Netzwerkbursts bezeichnet. Die Aktivität eines Netzwerkbursts endet nicht abrupt, wie die Aktivität normaler Bursts und Superbursts, sondern die Frequenz der Aktionspotentiale nimmt mit zunehmender Dauer des Netzwerkbursts ab. Wird in der Literatur vorrangig die synchrone Burst-Aktivität neuronaler *in vitro*-Netze beschrieben, so ist die Aktivität dieser Netzwerke doch weitaus vielfältiger.

Die Herkunft und Funktion synchroner neuronaler Aktivität sind weitgehend unklar. Wahrnehmung, Erinnerung sowie Kognition könnten mit ihr in Verbindung stehen (Varela *et al.* 2001, Cantero *et al.* 2005, Engel *et al.* 2001, Gray *et al.* 1989). Synchrone Aktivität im γ -Frequenzbereich ist außerdem für die Wahrnehmung von Musik von Bedeutung (Bhattacharya *et al.* 2001).

1.3. Kommunikation - Prinzipien kortikaler Informationsverarbeitung

Das Zusammenspiel verschiedener Neuronentypen ist für die Informationsverarbeitung ausschlaggebend. Hemmung und Erregung müssen in Balance wechselwirken. Für die dafür notwendigen Interaktionen gibt es verschiedene Mechanismen. Signale können auf chemischem Weg über die Ausschüttung von Transmittersubstanzen an der chemischen Synapse von Neuron zu Neuron übertragen werden. Diese Art der Interaktion ist Kalzium-abhängig. Seit der Entdeckung der chemischen Transmission, der synaptischen Veränderungen, die durch das Lernen entstehen (Loewi 1921, Dale 1965, Eccles 1976, Kandel 2001), bzw. der synaptischen Plastizität werden fast alle neuen Forschungsergebnisse ausschließlich mit dem Blick auf die chemische synaptische Transmission diskutiert (Krnjevic 1986, 2005).

Neben dieser Art der Signalübertragung ist die rein elektrische Übertragung über Gap Junctions möglich. Gap Junctions sind spezialisierte Zellkontakte, die, anders als chemische Synapsen, eine verzögerungsfreie, elektrotonische, interzelluläre Kommunikation bzw. Signalübertragung ermöglichen. Sie bestehen aus Kanalbildenden Membranproteinen, den Connexinen (Fukuda 2007, Rozental *et al.* 2000). Im Kortex verknüpfen Gap Junctions vor allem GABAerge und Parvalbumin-exprimierende inhibitorische Interneurone (Fukuda *et al.* 2003, Tamas *et al.* 2000). Gap Junctions bilden die Grundlage für schnelle Oszillationen, synchrone Aktivität und rhythmische Aktivität im γ -Frequenzbereich (Galarreta *et al.* 1999, Gibson *et al.* 1999, Traub *et al.* 2004, LeBeau *et al.* 2003). Synchrone Aktivität ist für die native Spontanaktivität charakteristisch. Elektrische Synapsen zwischen Interneuronen könnten für ihre Ausbreitung von Bedeutung sein.

Neben der Signaltransmission an chemischen und elektrischen Synapsen gibt es weitere Mechanismen interneuronaler Kommunikation. Dazu zählen das elektrische Übersprechen (ephaptic transmission) und der elektrische Feld-Effekt, die jedoch wenig Beachtung finden und deren Bedeutung bei der Signaltransmission im Kortex weitgehend ungeklärt ist (Jefferys 1995). Elektrisches Übersprechen ist die elektrische Kopplung zwischen dicht beieinander liegenden neuronalen Kompartimenten ohne die Beteiligung von Synapsen. Das extrazelluläre elektrische Feld, das durch die Ionenbewegungen während eines Aktionspotentials entsteht, kann die Erregbarkeit benachbarter Membranen beeinflussen und somit erregend oder hemmend wirken (Faber *et al.*

1989). Relativ große extrazelluläre Felder, die z.B. durch die gemeinsame Aktivität neuronaler Gruppen entstehen, können noch effektiver die Erregbarkeit neuronaler Membranen benachbarter Neurone verändern. Dieser Mechanismus wird als Feld-Effekt-Interaktion bezeichnet (Jefferys 1995). In der Literatur erfolgt häufig keine präzise Unterscheidung zwischen beiden Mechanismen.

Diese Mechanismen haben große medizinische Relevanz bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Die elektrische Stimulation wird bei der tiefen Hirnstimulation zur Behandlung von Morbus Parkinson erfolgreich eingesetzt und befindet sich in der Untersuchung als Therapie zahlreicher weiterer neurologischer Erkrankungen. Ihr Funktionsmechanismus ist jedoch nicht vollständig geklärt (Montgomery 2008, Nowak *et al.* 2011). Die Stimulation von *in vitro*-Netzwerken mit elektrischen Feldern könnte zur Klärung beitragen. Die Funktion dieser Felder bei der Informationsverarbeitung ist unbekannt. Neurone besitzen zahlreiche spannungssensitive Ionenkanäle und Rezeptoren und generieren Aktionspotentiale zur Informationsweiterleitung und somit extrazelluläre elektrische Felder (Armstrong *et al.* 1998). Diese Felder könnten nicht nur ein Nebeneffekt der Informationsweiterleitung sein, sondern eine entscheidende Rolle bei der interneuronalen Kommunikation spielen.

1.4. Reduktionistischer Ansatz – Kortikale *in vitro*-Netzwerke auf Multielektrodenarrays

Die Kultivierung kortikaler embryonaler Neurone führt zu neuronalen Netzwerken weitaus geringerer Komplexität verglichen mit dem Netzwerk des nativen Kortex. Die Netzwerke auf der Oberfläche der Neurochips haben eine definierte Größe, ihre elektrische Aktivität kann analysiert, sie können gefärbt und mikroskopiert werden. Diese Methoden erlauben eine Untersuchung der Beziehung zwischen Netzwerkstruktur und Funktion, die Voraussetzung für das Verstehen neuronaler Schaltkreise ist.

Zahlreiche Neurone in den Netzwerken generieren spontane Aktionspotentiale. Die Variationen der elektrischen, extrazellulären Felder, die als Folge von Ionenbewegungen entstehen, werden von den Elektroden des MEAs (Multielektrodenarray) detektiert (Claverol-Tinture *et al.* 2002). Als Multielektrodenarray wird das Elektrodenfeld bezeichnet, auf dem das neuronale Netzwerk kultiviert wird. Es dient als Schnittstelle zwischen Neuron und Elektronik. Die extrazellulären Felder eines Netzwerks über die Zeit aufgenommen, ergeben das dynamische, zeitlich-räumliche Aktivitätsmuster

dieses Netzwerks. Die Muster jeden Netzwerks sind einzigartig. Der Ursache dieser Einzigartigkeit bzw. Verschiedenheit wird in dieser Arbeit nachgegangen.

Substrat-integrierte Multielektrodenarrays für die Detektion bioelektrischer Aktivität wurden erstmalig in den 70er Jahren hergestellt und seitdem stetig verbessert (Thomas *et al.* 1972, Gross *et al.* 1977, Pine 1980, Potter *et al.* 2001, Morin *et al.* 2005). Selbst Phänomene wie Lernen und Gedächtnis können mit dem System aus Netzwerk und Chip untersucht, Roboter können mit ihm verknüpft und von den generierten Signalen gesteuert werden (Shahaf *et al.* 2001, Marom *et al.* 2002, DeMarse *et al.* 2001, Bakkum *et al.* 2007). Die methodischen Möglichkeiten, gerade was die Aufklärung grundlegender, neuronaler Funktionsmechanismen betrifft, sind jedoch nicht ausgeschöpft. Eine detaillierte Analyse des zellulären Aufbaus kortikaler *in vitro*-Netzwerke und dessen Korrelation zur elektrischen Netzwerkaktivität gibt es bisher nicht.

Die in dieser Arbeit verwendeten MEA-Glas-Neurochips wurden im Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock entwickelt und zeichnen sich unter anderem durch ihre geringe Größe und durch Platin-Elektroden aus (Köster *et al.* 2009). Systeme aus *in vitro*-Netzwerken und MEA-Neurochips werden gegenwärtig auch für Substanztests bzw. Zytotoxizitätstests verwendet und als Ersatzmethode für Tierversuche diskutiert (Johnstone *et al.* 2010, Xiang *et al.* 2007, Gramowski *et al.* 2005). Diese Anwendungen können jedoch nur erfolgreich sein, wenn das zugrunde liegende Biosystem, das neuronale Netzwerk *in vitro*, hinreichend charakterisiert und verstanden ist. Die Ergebnisse der Substanztests werden möglicherweise falsch interpretiert, da nicht eindeutig geklärt ist, von welchen Zelltypen oder von welchem Zelltyp die detektierte Aktivität stammt. Es ist leicht vorstellbar, dass unterschiedliche Neuronentypen bei Zugabe einer Substanz unterschiedlich reagieren. Sie besitzen schließlich unterschiedliche biophysikalische und elektrophysiologische Eigenschaften (Makram *et al.* 2004, Llinas 1988, Martina *et al.* 1998, Nusser 2011). Die Aufklärung der Struktur und Funktion kortikaler Netzwerke, zu der diese Arbeit beiträgt, ist Voraussetzung für ihre Anwendung als Neurotoxizitäts-Testsystem.

Grundlegend für die Untersuchung primärer neuronaler Zellen ist eine schonende Methode der Kultivierung. Ziel ist es, möglichst gewebetypische neuronale Netzwerke zu erhalten, d.h. sämtliche Neuronentypen des nativen Gewebes sollten im kultivierten Netzwerk vorhanden sein. Die Kultivierung primärer Neurone erscheint oft schwierig. Schlechte Zelladhäsion, die Bildung von Zell-Clustern und Apoptose sind häufige Probleme. Mit einer Optimierung der

Präparations- und Kultivierungsmethode kann dem entgegengewirkt werden. Ein Parameter, der variiert werden kann, ist der Zeitpunkt der Präparation (Alter der Embryonen, embryonaler Tag, E). Da die Neurogenese des Kortex in Etappen verläuft und sich verschiedene Neuronentypen in ihrer Art der Entstehung und Migration unterscheiden, könnte der Zeitpunkt der Präparation für die Entwicklung der Neurone und der Netzwerkaktivität in der Kultur von Bedeutung sein. Dieser Hypothese wird in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nachgegangen.

1.5. Fragestellung

Folgende Fragen wurden definiert:

1. Ist die große zelluläre Vielfalt des nativen Kortex auch *in vitro* existent?
2. Hat der Tag der Präparation Auswirkungen auf die Netzwerkaktivität?
3. Welcher Zusammenhang besteht zwischen Netzwerkstruktur und Aktivitätsmuster?
4. Ist eine Korrelation von Neuronentyp zu seinem Aktivitätsmuster möglich?
5. Gibt es Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Neuronentypen?
6. Welche Rolle spielen chemische und elektrische synaptische Transmission?
7. Sind Neurone oder bestimmte Neuronentypen durch elektrische Felder beeinflussbar?

Vor der Beeinflussung neuronaler Netzwerke mittels chemischer Substanzen oder elektrischer Felder steht die Frage: Was wird beeinflusst? Biologische Systeme bestehen aus verschiedenen interagierenden Komponenten deren Zusammenwirken erst das Funktionieren ermöglicht. So wurde in dieser Arbeit vor allem der grundlegende Aspekt der Struktur-Funktions-Beziehung kortikaler Netzwerke bearbeitet, bevor zur Manipulation übergegangen wurde. Die Antworten auf die gestellten Fragen sollen zum Verständnis der Funktionsweise des zerebralen Kortex beitragen und können helfen, neurodegenerative Erkrankungen zielgerichteter zu behandeln.

2. Materialien und Methoden

2.1. Präparation muriner Kortizes

Die hier beschriebene Präparations- und Kultivierungstechnik stellte sich als optimal heraus und ist das Ergebnis zahlreicher Versuche, bei denen die verschiedenen Parameter wie Inkubationszeit, Zentrifugationszeit und Aussaatdichte variiert wurden. In Übereinstimmung mit der Richtlinie des europäischen Rats vom 24. November 1986 (86/609/EEC) wurden embryonale Kortizes aus Embryonen trächtiger Mäuse (NMRI, Charles River) an den embryonalen Tagen 9, 11-13, und 14-16 präpariert. Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und ventral gegen den Haarstrich mit Ethanol (70%, vergällt) besprüht. Der Uterus wurde entnommen und in eine Zellkulturschale, gefüllt mit kalter D1SGH-Pufferlösung (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 0.2 mM KH₂HPO₄, 16.5 mM Glukose, 22 mM Sukrose, 9.86 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)) überführt. 10 Embryonen pro Maus wurden mit zwei Präzisionspinzetten mit 0,06 mm Spitzen (Dumont, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) von Uterus und Embryonalhüllen befreit und dekaptiert. Die Köpfe wurden in eine weitere mit D1SGH gefüllte Petrischale überführt. Nach der Auftrennung der Hirnhäute entlang der Fissura longitudinalis cerebri mit Pinzetten erfolgte die Präparation der Kortizes unter dem Stereoskop. Die Hemisphären des Telenzephalons wurden abgetrennt und in eine weitere mit D1SGH gefüllte Petrischale überführt. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Dauer der Präparation betrug nicht mehr als 30 min.

2.2. Neuronale Zellkultur

Die in der Petrischale zusammengeführten Hemisphären der 10 embryonalen Kortizes wurden nach dem Abziehen der Pufferlösung mit 50 µl DNase Lösung (4mg DNaseI/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 3 ml Papain (340 µg/ml; Roche, Basel, Schweiz) für 5 min bei 37 °C zur enzymatischen Dissoziation inkubiert. Das Enzym-Gewebe-Gemisch wurde auf zwei mit je 3 ml Präparationsmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with stable glutamate, 4.5 g/l Glukose, 10% Pferdeserum, 10% fetales Kälberserum; Biochrom AG, Berlin) gefüllte 15 ml-Röhrchen verteilt und für 2 min bei 300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit je 3 ml Präparationsmedium vorsichtig trituriert. Zell-Agglomerationen setzten sich

während einer 2-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur am Boden des Röhrchens ab. Die Überstände wurden in einem weiteren Röhrchen zusammengeführt und die Zellzahl mit einer Neubauerkammer bestimmt. 28000 Zellen wurden auf mit PDL (Poly-D-Lysine, 5µg/ml, Boehringer, Mannheim) und Laminin (Roche, Basel, Schweiz) behandelte Neurochips und Deckgläser ausgesät.

Vor der Aussaat wurden die Neurochips und Deckgläser (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) mit Ethanol gewaschen (99,8 %, rotipuran, Carl Roth GmbH, Karlsruhe), getrocknet und 39 min bei 120°C autoklaviert. 40 µl PDL (25 µM) wurde auf jeden Neurochip und jedes Deckglas aufgetragen gefolgt von einer Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Das PDL wurde abgezogen und die Deckgläser und Chips mit sterilem, destilliertem Wasser dreimal gewaschen. Nach der Trocknung unter der Sterilbank wurden die Deckgläser und Chips mit 40 µl Laminin-Lösung (50 µl Laminin verdünnt in 1,5 ml DMEM; Roche, Basel, Schweiz) im Brutschrank bei 37°C 1 Stunde inkubiert. Nach dem Abziehen des Laminins erfolgte die Aussaat von 40 µl Zellsuspension pro Deckglas bzw. Neurochip. DMEM mit 10% Pferdeserum wurde als Zellkulturmedium verwendet.

Die Evaluierung der Zellkultur erfolgte zweimal wöchentlich. Die Hälfte des Mediums wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Die Dauer der Kultivierung betrug 4 Wochen (37°C, 10% CO₂). Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Mikroskop Nikon Eclipse TS100 mit den Objektiven: 10x/0,25 Ph1ADL und LWD 20x/0,40 Ph1 ADL (Nikon GmbH, Düsseldorf) und der Kamera SMX-M73 (EHD imaging GmbH, Damme) erzeugt.

2.3. Detektion von Aktionspotentialen mit Multielektrodenarrays

Nach der Periode der Kultivierung erfolgte die Detektion der elektrischen Aktivität. Dazu wurden im Lehrstuhl für Biophysik der Universität Rostock entwickelte und von der Firma GeSIM (Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH, Grosserkmannsdorf) hergestellte Siliziumnitrit-beschichtete Glasneurochips mit zentral gelegenem Elektrodenfeld aus 52 Platin-Elektroden, einem Temperatursensor und einem Sensor für die Detektion des Zellbewuchses verwendet (**Abb.1**). Die Neurochips wurden in einer speziell angefertigten „Headstage“ (Vorverstärker) kontaktiert (Koester *et al.* 2010). Mittels Verstärker/Filter (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) und der Software MEA SortClient Version 1.3.0 (Plexon Inc.) sowie Neuroexplorer Version 4.059 (Nex Technologies, Littleton, USA) wurden die Signale verstärkt, visualisiert und

separiert. Die manuelle Separation von bis zu vier verschiedenen Signalsequenzen pro Elektrode basiert auf den Unterschieden zwischen den Signalformen (Wellenformen). Es wurde davon ausgegangen, dass Signale gleicher Form von derselben Zelle generiert werden. Ein Ausschnitt aus dem Aktivitätsmuster eines Netzwerks mit 72 detektierten Units (eine Unit ist eine detektierte Signalsequenz derselben Signalform), sowie drei unterschiedliche Signalformen, die mit einer einzelnen Elektrode detektiert wurden, sind in **Abb.2** dargestellt. Werden an einer Elektrode mehrere unterschiedliche Signalsequenzen detektiert, so sind diese mit a, b, c, d gekennzeichnet. Während der Messung erfolgte eine Beheizung (37°C) und Begasung (10% CO₂ + synthetische Luft, Westfalen AG, Münster). Die Detektion erfolgte über Zeiträume von 3 bis zu 8 Stunden.

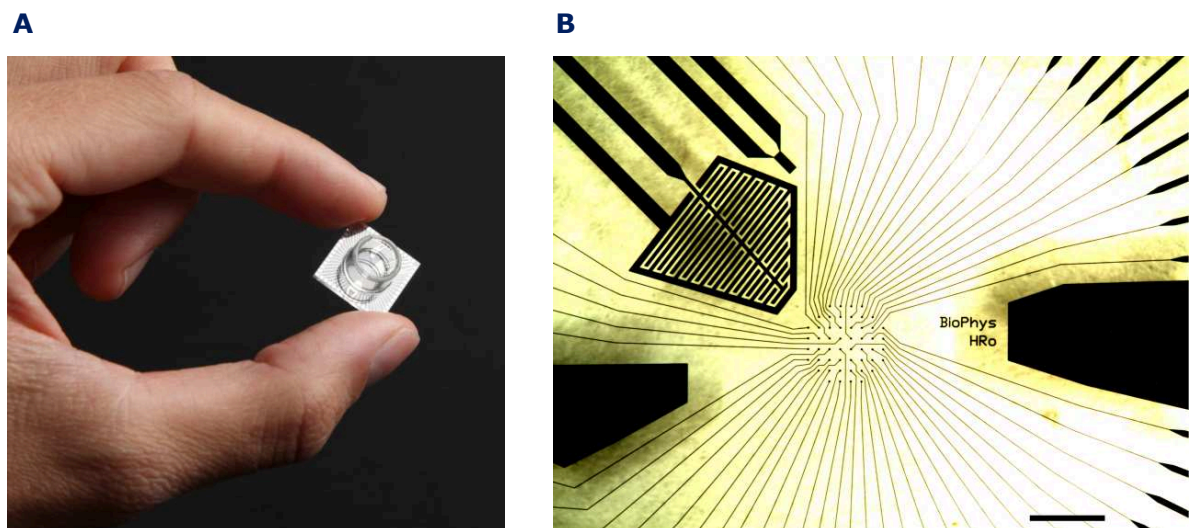


Abb.1 MEA-Glas-Neurochip. **A:** Glas-Neurochip mit aufgeklebtem Glastrog der als Reservoir für das Zellkulturmedium dient. Die Seitenlänge des Chips beträgt 16 mm. **B:** Vergrößerung der Chip-Mitte mit zentralem MEA, Masseelektroden (große schwarze Strukturen links und rechts), IDES (interdigitated electrode structure) und Temperatursensor. IDES und Temperatursensor wurden nicht verwendet. Balken: 1,2 mm.

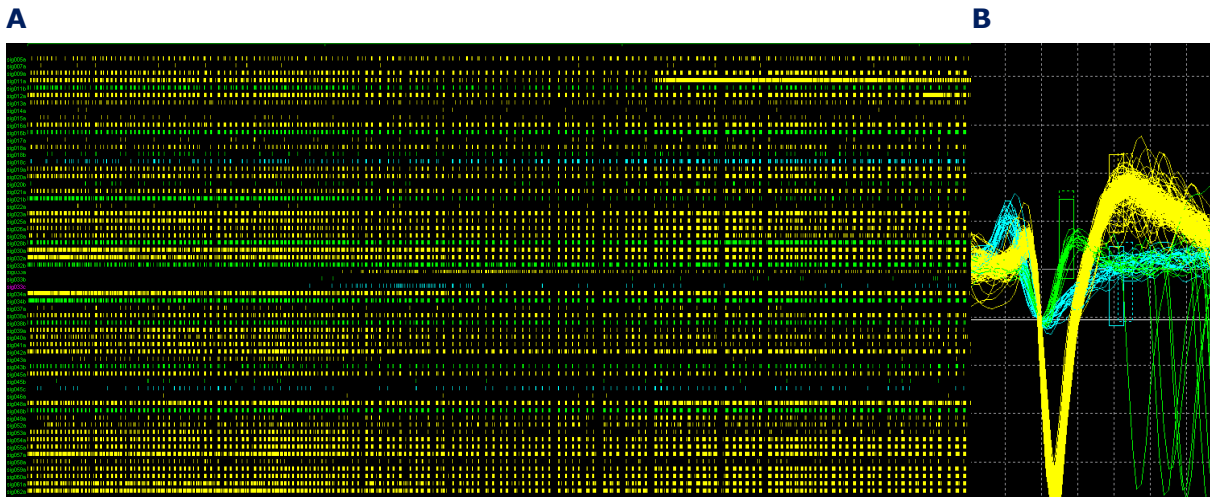


Abb.2 Detektion der nativen Spontanaktivität. **A:** Ausschnitt der spontanen Aktivität eines Netzwerks nach 4 Wochen Kultivierung. Dargestellt sind die mit den MEA-Elektroden detektierten Aktionspotentiale als einfache Zeitmarken über einen Zeitraum von 140 s. Jede Zeile stellt eine Unit dar. Neben der synchronen Aktivität gibt es einzelne Units, die in ihrem Aktivitätsmuster vom allgemeinen Muster abweichen. **B:** Drei an derselben Elektrode detektierte Signalformen (gelb, grün, blau), die sich in ihrer Form unterscheiden und somit separiert werden konnten. Ein Kästchen des Gitters hat die Maße von $83 \mu\text{V}$ senkrecht und von $200 \mu\text{s}$ waagrecht.

2.4. Immunozytochemische Färbung und konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Für die morphologische Charakterisierung der Netzwerke wurden diese immunozytochemisch gefärbt und konfokal mikroskopiert. Nach dem Waschen mit warmer (37°C) PBS-Lösung (phosphatgepufferte Salzlösung) wurden die Zellen in Paraformaldehyd (4%ig in PBS mit 4% Saccharose) für 20 min fixiert. Das Formaldehyd wurde mit Natriumchlorid (50 mM in PBS) herausgelöst, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem primären Antikörper für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen erfolgte die Inkubation unter Lichtabschluss mit dem sekundären Antikörper gekoppelt an einen Farbstoff für 45 min. Bei Färbung mehrerer Strukturen wurde mit dem zweiten primären und sekundären Antikörper analog verfahren. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in **Tab. 1** aufgelistet.

Tab.1 Zur immunozytochemischen Markierung verwendete Antikörper sowie die jeweils angewendete Verdünnung in PBS.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper		
Rabbit Anti-Neurofilament 200	1:100	Sigma St. Louis, MO, USA N4142
Mouse monoclonal Anti-MAP2	1:500	Sigma M4403
Mouse monoclonal Anti-B-3 Tubulin	1:500	Sigma T8660
Mouse monoclonal Anti-Parvalbumin	1:500	Sigma P3088
Rabbit Anti-GABA	1:1000	Sigma A2052
Sekundäre Antikörper		
Goat-anti-mouse IgG, Alexa 488	1:100	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Goat-anti-mouse IgG, Alexa 594	1:500	Invitrogen
Goat-anti-rabbit IgG, Alexa 488	1:100	Invitrogen
Goat-anti-rabbit IgG, Alexa 594	1:100	Invitrogen

Die Färbung der DNA erfolgte mit Hoechst Bisbenzimid H33258 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Glia-Zellen wurden mit Anti-GFAP Antikörpern markiert (Sigma). Nach der Färbung wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gespült und in ProLong Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eingedeckt.

Die Präparate wurden mit einem Leica TCS SP2 (true-confocal system spectral-detector, generation 2; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) unter Verwendung der Objektive: HC PL APO CS 20x0,7 DRY und HCX PL APO Lbd. BI 63x1,4 OIL mikroskopiert.

2.5. Korrelation von elektrischer Aktivität und Zytoarchitektonik

Für die Zuordnung der elektrischen Aktivität zur zellulären Netzwerkstruktur bzw. zum Zelltyp wurden 30 Netzwerke nach der MEA-Messung auf den Chips fixiert, gefärbt und mikroskopiert. Die Anzahl der Interneurone und Pyramidenzellen wurde durch Auszählen von GABA-markierten und nicht-markierten Neuronen (Pyramidenzellen) ermittelt. Die Anzahl Parvalbumin-positiver Interneurone (Basket- und Chandelierzellen) wurde durch die Markierung des Parvalbumins und die Zählung der markierten Zellen bestimmt. Die mikroskopischen Aufnahmen der Netzwerke wurden sodann dem Aktivitätsmuster zugeordnet. Die

Bestimmung des Verhältnisses von Neuronen und Gliazellen wurde durch die Zählung der Zellkerne von Neuronen und Gliazellen ermittelt.

2.6. Korrelation von Aktivitätsmuster und Neuronentyp

Die Zuordnung des Aktivitätsmusters zu einem einzelnen Neuron erforderte die Suche nach Neuronen, deren Zellkörper in der Nähe einer MEA-Elektrode lag, deren Axon visuell verfolgt werden konnte und über einer Elektrode verlief. Die systematische Suche erfolgte mit Hilfe des Mikroskops. Waren die Kriterien erfüllt, wurden Zelle und Elektrode mikroskopisch aufgenommen und der zuvor mit dieser Elektrode detektierten Aktivität zugeordnet. Kreuzkorrelogramme zur Analyse der Aktivität einzelner Neurone wurden mit der Software Neuroexplorer, Version 4.059 (Nex Technologies, Littleton, USA) erstellt. Bei der Kreuzkorrelation wird das Aktivitätsmuster das an einer Elektrode detektiert wurde mit den Mustern der übrigen Elektroden korreliert. Stimmen die Zeitpunkte des Auftretens von Aktionspotentialen überein oder gibt es eine zeitliche Verschiebung die in jedem Fall gleich groß ist, kann darauf geschlossen werden, dass die Signale von demselben Neuron generiert wurden. Als Parameter für die Kalkulation wurden X Minimum mit -0,2 s und X Maximum mit 0,2 s verwendet (Zeitraum der vor bzw. nach dem Referenzsignal betrachtet wurde). Als weiterer Parameter wurde die Anzahl der Aktionspotentiale/s bestimmt.

2.7. Blockade von elektrischer und chemischer Transmission

Die Blockade der Gap Junctions erfolgte mit dem Gap Junction-Blocker Mefloquin (Cruikshank *et al.* 2004, Juszcak *et al.* 2009) in Konzentrationen von 5, 10 und 20 μM in 9 Netzwerken. Mefloquin ist ein synthetisch hergestellter Arzneistoff zur Malaria-Prophylaxe und -Behandlung. Die Zugabe des Mefloquins erfolgte nach einer 15-minütigen Detektion der Spontanaktivität. Neben Mefloquin wurden die Gap Junction-Blocker Carbenoxolon (10 μM) und Quinin (10 μM) in jeweils 3 Netzwerken verwendet (Mercer *et al.* 2006, Traub *et al.* 2002, Traub *et al.* 2001, Srinivas *et al.* 2001).

Die Blockade der Kalzium-abhängigen chemischen synaptischen Transmission erfolgte durch den kompletten Austausch des Zellkultur-Mediums mit Kalzium-freiem Medium mit 5 mM MgSO_4 (Biochrom AG, Berlin) während der Detektion der elektrischen Aktivität.

2.8. Stimulation mit elektrischen Feldern

Die Stimulation mit elektrischen Feldern erfolgte über eine bipolare Elektrode (PI2ST3X.XA3, Science Products, Hofheim) während der Detektion der elektrischen Aktivität. Die Elektrode wurde mittels Mikromanipulator während der Messung in unterschiedlichen Entfernungen zu den Zellen positioniert. Für Zeitintervalle von 1-10 sec wurden die in **Tab.2** aufgeführten Impulse mittels des Impulsgenerators StimPulse Electrical Stimulation System (FHC, Bowdoin, ME, USA) und einem Stimulationsgenerator, der für die tiefe Hirnstimulation von Ratten eingesetzt wurde, generiert (Nowak *et al.* 2011). Außerdem wurden die Netzwerke über einen Zeitraum von 4 Wochen während der Kultivierung täglich für 8 Stunden elektrischen Feldern ausgesetzt.

Das Stimulationsmodul für die gleichzeitige Stimulation von 5 Chips während der Kultivierung wurde selbst entworfen und mit dem Impulsgenerator StimPulse Electrical Stimulation System verbunden (**Abb.3A**). Die elektrischen Impulse wurden zwischen den Masseelektroden des Neurochips spannungskonstant generiert (**Abb3B**). Die Kontaktierung der Masseelektroden erfolgte über Goldstifte (Art.-Nr.: F68029B030G040, Feinmetall GmbH, Herrenberg). Die Stimulationsparameter sind in **Tab. 2** aufgelistet.

Die Stimulationsparameter wurden mit Blick auf die Untersuchungsergebnisse von Anastassiou *et al.* und die bei der tiefen Hirnstimulation angewendeten Parameter ausgewählt (Anastassiou *et al.* 2010, 2011, Nowak *et al.* 2011). Parallel zu den stimulierten Netzwerken wurden jeweils mindestens 5 nicht-stimulierte Kontroll-Netzwerke kultiviert.

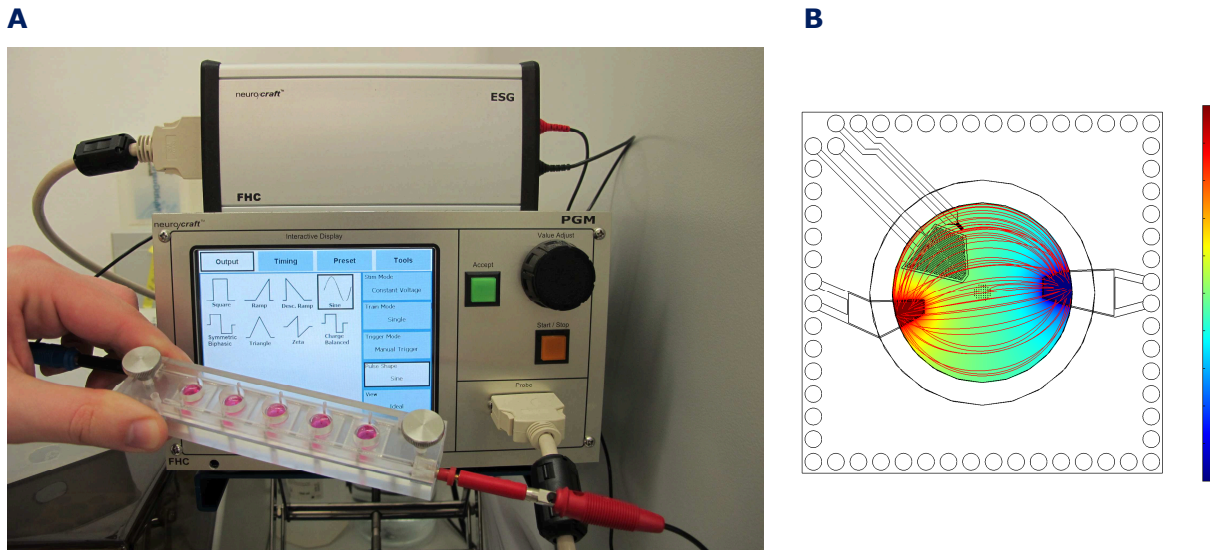


Abb.3 Elektrische Stimulation. **A:** Stimulationsmodul für die gleichzeitige Stimulation von 5 Neurochips angeschlossen an den Impulsgenerator. Halter des Moduls: M. Nissen. **B:** Simulation des elektrischen Felds zwischen den Masseelektroden des Chips. Skala: elektrisches Potential in V von 0 (blau) bis 1 (rot), (Simulation Marco Stubbe).

Tab.2 Während der Detektion der elektrischen Aktivität und während der Kultivierung angewendete Stimulationsparameter.

Pulsform	Pulsdauer	Pulsdelay	Pulsamplitude
Stimulation während Detektion (Bipolare Elektrode)			
Rechteck/Sinus, biphasisch	1 ms	1 s, 100 ms	5 V
Sinus	1 ms	1 s, 100 ms	1 V
Sinus	1 ms	1 s, 100 ms	0,5 V
Sinus	1 ms	1 s, 100 ms	0,05 V
Rechteck, monophasisch	60 μ s	7,7 ms, (130 Hz)	500 mA
Stimulation während Kultivierung			
Sinus	800 μ s	1 s (1Hz)	0,5 V
Sinus	800 μ s	1 s	0,05 V
Sinus	1 ms	1 s	0,03 V
Sinus	1 ms	1 s	0,01 V

3. Ergebnisse

3.1. Versuchsübersicht

Von 195 auf MEAs kultivierten Netzwerken zeigten 15 keine elektrisch detektierbare Spontanaktivität. Von den verbleibenden 180 Netzwerken wurde die Spontanaktivität detektiert. Bei 51 Netzwerken erfolgte die Analyse des Aktivitätsmusters in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Präparation. 50 Netzwerke wurden auf die Existenz von Interaktionen in der elektrischen Aktivität geprüft. Die Korrelation von Aktivitätsmuster und Zytoarchitektonik erfolgte bei 30 Netzwerken. In 10 Netzwerken wurde versucht das Aktivitätsmuster dem Neuronentyp zuzuordnen. Die Gap Junctions wurden in 15 Netzwerken blockiert. Die chemische synaptische Transmission in 10. 35 Netzwerke wurden elektrisch stimuliert (**Abb.4**).

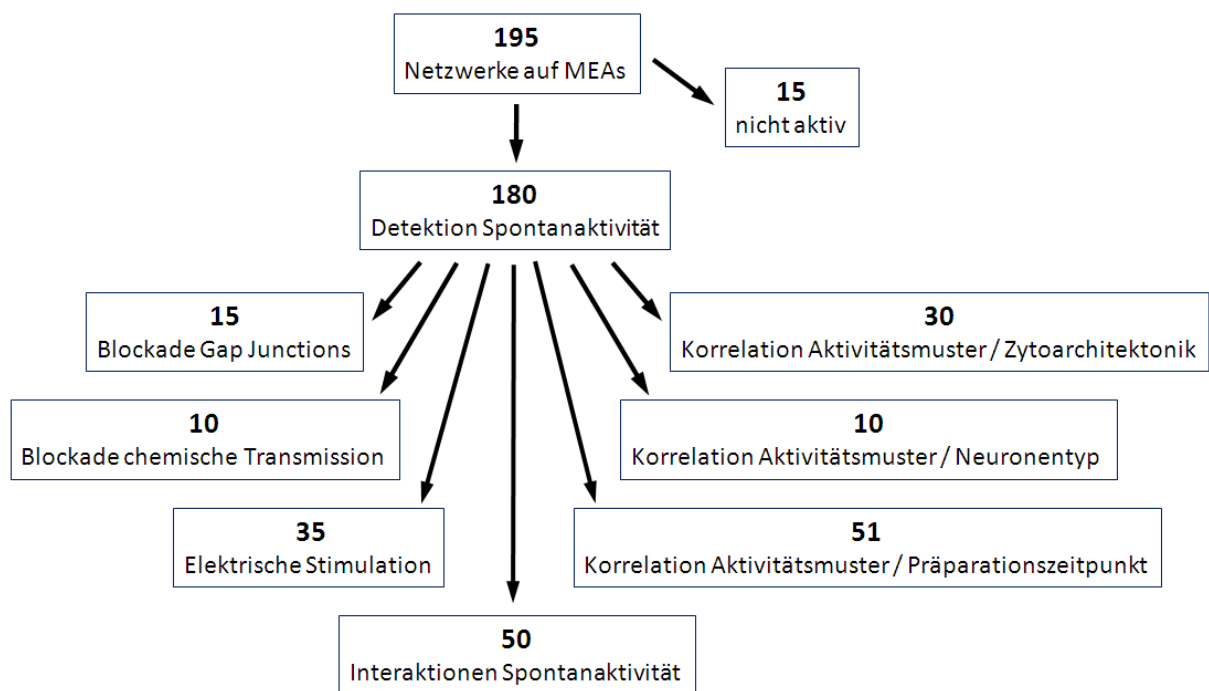


Abb.4 Versuchsübersicht.

In einigen Fällen wurden unterschiedliche Versuche am selben Netzwerk durchgeführt. So wurde das Netzwerk aus **Abb.22** immunozytochemisch gefärbt und mikroskopiert, nachdem während der Detektion der Spontanaktivität die chemische synaptische Transmission blockiert wurde. Außerdem existierte in diesem Netzwerk die unten beschriebene inhibitorische Interaktion. Weiterhin wurden Netzwerke auf Deckgläschen in 33 24-Well-Platten kultiviert. Etwa 200 auf Deckgläschen kultivierte Netzwerke wurden immunozytochemisch gefärbt.

3.2. Zelluläre Vielfalt in kortikalen *in vitro*-Netzwerken

Ist die große zelluläre Vielfalt des nativen Kortex auch *in vitro* existent oder beeinträchtigen die Methoden der Präparation und Kultivierung diese Vielfalt? Durch die Variation verschiedener Parameter der Präparation wurde eine optimale Präparations- und Kultivierungsmethode für murine, embryonale Kortizes entwickelt und an den Neurochip angepasst. Die Zeiträume der enzymatischen Dissoziation, der Zentrifugation sowie die Anzahl und Dichte der ausgesäten Zellen wurden variiert. Der Zeitraum vom Beginn der Präparation bis zur Aussaat der Zellen sollte 1 Stunde nicht überschreiten. Die resultierende, oben beschriebene Methode führte zu Netzwerken mit einer hohen neuronalen Diversität und elektrischen Aktivität. Die Oberfläche der Neurochips und Deckgläschen war nahezu vollständig mit einem Teppich aus Glia-Zellen bewachsen. Die Zellkörper der Neurone lagen auf der Oberfläche dieses Teppichs in relativ gleichmäßiger Verteilung (**Abb.5**). Die Zählung der Zellkerne von Gliazellen und Neuronen von 20 auf Deckgläschen kultivierten Netzwerken ergab ein Verhältnis von 30:1 am Ende der Kultivierungsperiode nach 4 Wochen. Die Dichte der Neurone auf den MEAs variierte zwischen 15 und 300 Neurone/mm².

Mittels immunozytochemischer Färbung konnten neben verschiedenen Gliazellen folgende Neuronentypen unterschieden werden: Parvalbumin-positive Interneurone, GABAerge Interneurone sowie Pyramidenzellen bzw. nicht-GABAerge Neurone (**Abb.6**). In einer vorherigen Arbeit (Reimer 2006) wurden bereits bipolare Neurone, Neurone mit pyramidenförmigem Zellkörper, Neurone mit kleinem runden Zellkörper und Neurone mit sehr großem Zellkörper unterschieden. Parvalbumin-positive Interneurone waren durch stark lokal verzweigte Axone gekennzeichnet (**Abb.7**). Parvalbumin war vor allem im Zellkörper und in basalen Teilen der Dendriten lokalisiert.

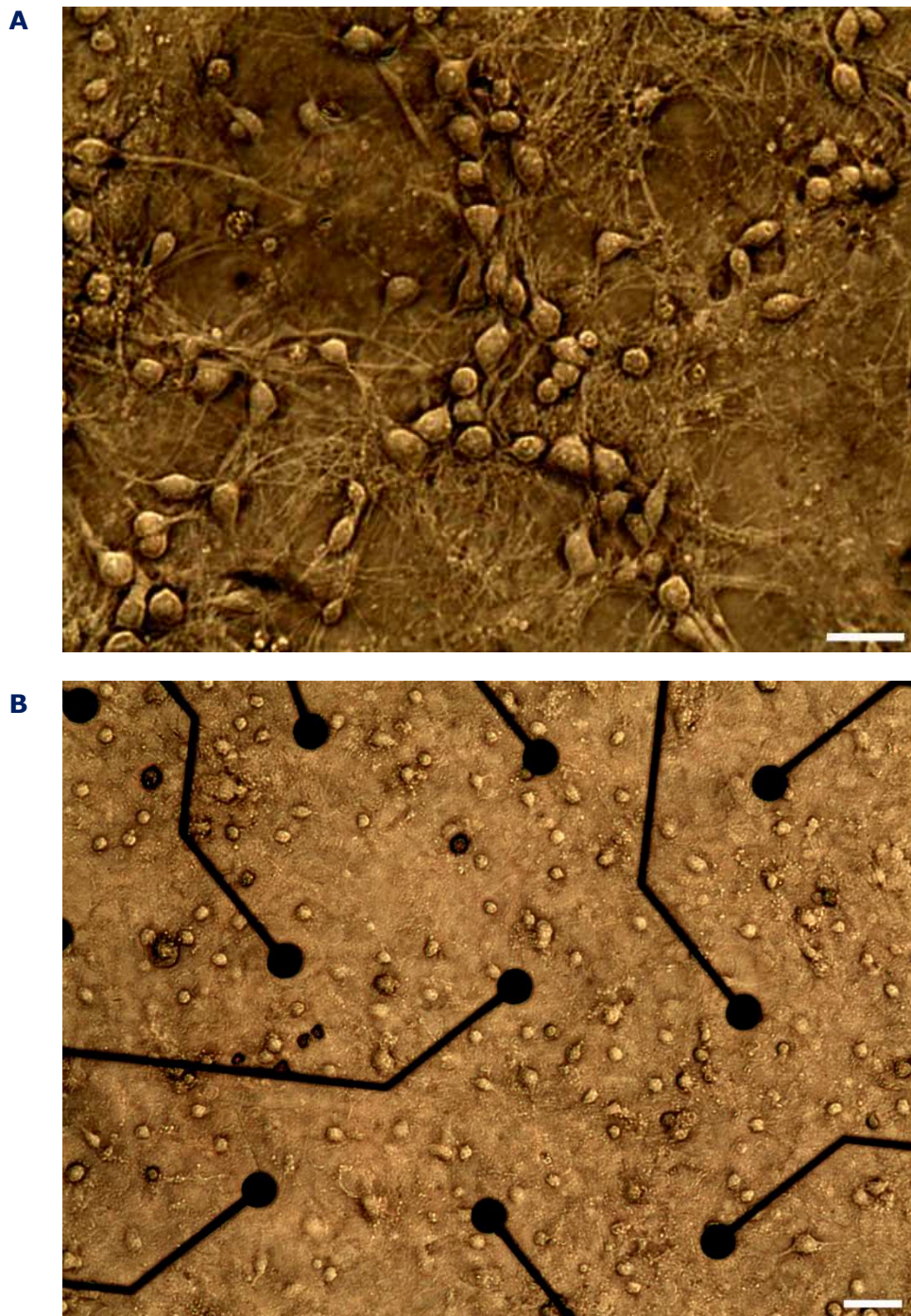


Abb.5 Neuronale Zellkultur. **A:** Korticale Neurone nach 10 Tagen der Kultivierung auf einem Deckglas. Die Zellkörper sowie zahlreiche Ausläufer sind deutlich zu erkennen. Die Neurone wachsen auf einem Teppich aus Gliazellen. Balken: 25 μm . **B:** Korticale Neurone nach 4 Wochen der Kultivierung auf dem MEA eines Neurochips. Die Zellkörper der Neurone sind relativ gleichmäßig verteilt. Balken: 50 μm .

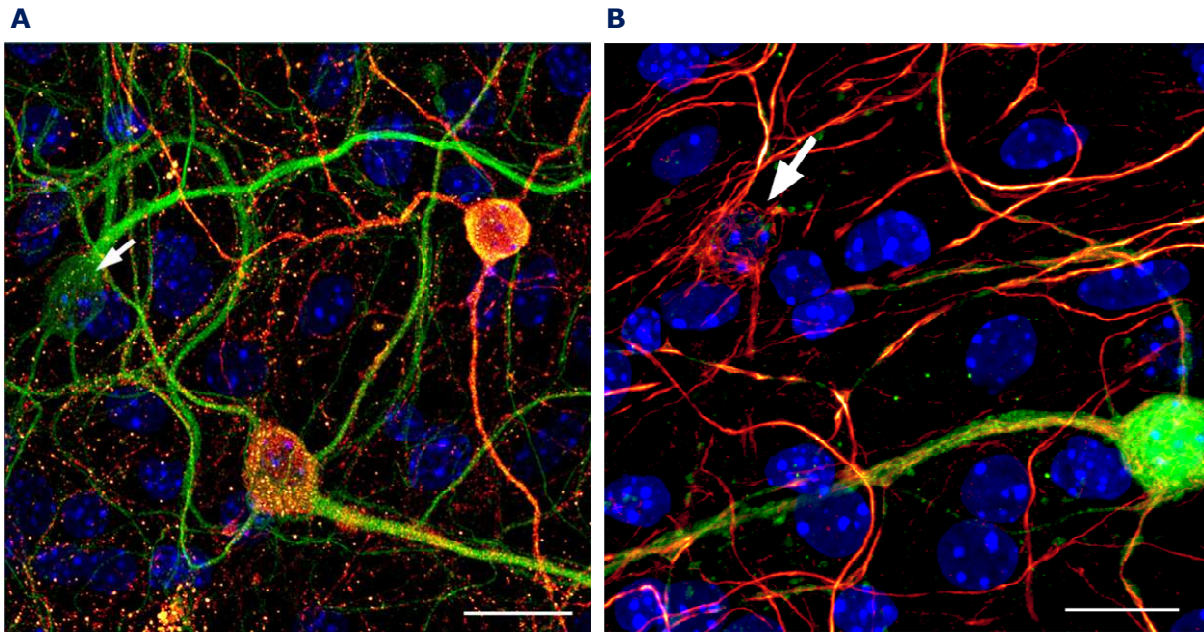


Abb.6 Immunocytochemische Markierung von Interneuronen. **A:** Zwei GABAerge Neurone (rot) und ein nicht-GABAerges Neuron (Pfeil) nach 4 Wochen Kultivierung auf einem Deckglas. Rot: GABA, grün: β -3 Tubulin, blau: DNA, Balken: 20 μ m. **B:** Parvalbumin-positives (rechts unten) und Parvalbumin-negatives Neuron (Pfeil) nach 4 Wochen Kultivierung. Grün: Parvalbumin, rot: Neurofilament 200, blau: DNA, Balken: 15 μ m.

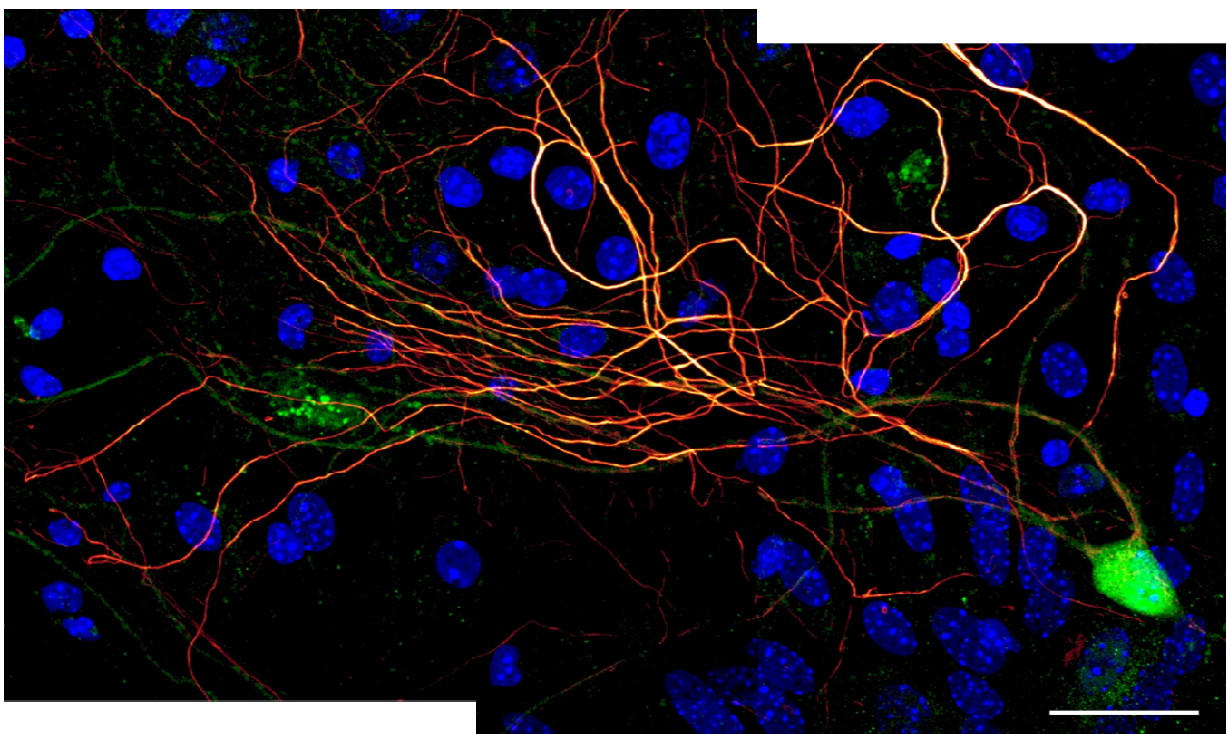


Abb.7 Axonale Verzweigung Parvalbumin-positiver Interneurone. Starke axonale Verzweigung eines Parvalbumin-positiven Interneurons nach 4 Wochen der Kultivierung. Die zahlreichen Zellkerne (blau) gehören zu Gliazellen, deren Zellkörper nicht gefärbt sind. Grün: Parvalbumin, rot: Neurofilament 200, blau: DNA, Balken: 30 μ m.

3.3. Zusammenhang von Präparationszeitpunkt und Aktivitätsmuster

Kortizes älterer und damit größerer Embryonen (E15-E19) sind einfacher zu präparieren als Kortizes jüngerer Embryonen. Aufgrund der zeitlich und räumlich unterschiedlichen Entwicklung der verschiedenen kortikalen Neuronentypen während der Neurogenese (Parnavelas *et al.* 2002, Marin *et al.* 2001) wurde hier der Hypothese nachgegangen, dass der Zeitpunkt der Präparation für die Entwicklung und Eigenschaften der Netzwerke entscheidend ist. Es wurden embryonale Mäuse im Alter von 11-13 (E11-13) und 14-16 (E14-16) embryonalen Tagen präpariert. Außerdem wurden 10 Embryonen am embryonalen Tag 9 (E9) präpariert.

Während der ersten Woche der Kultivierung war die Proliferationsrate in Kulturen die von jüngeren Embryonen (E9, E11-13) stammten höher als in Kulturen älterer Embryonen. Am Ende der Kultivierungsperiode nach 4 Wochen war visuell unter dem Lichtmikroskop betrachtet kein Unterschied zwischen den Kulturen E9, E11-13 und E14-16 zu erkennen. Die Aktivitätsmuster variierten jedoch stark. So zeigten E14-16-Netzwerke zum größten Teil synchrone Burst-Aktivität während E11-13-Netzwerke unterschiedliche Muster generierten (**Abb.8**). In beiden Gruppen gab es Netzwerke in denen verschiedene Aktivitätsmuster parallel auftraten.

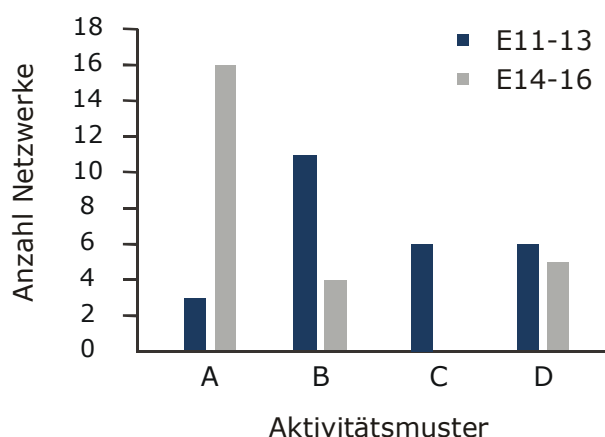
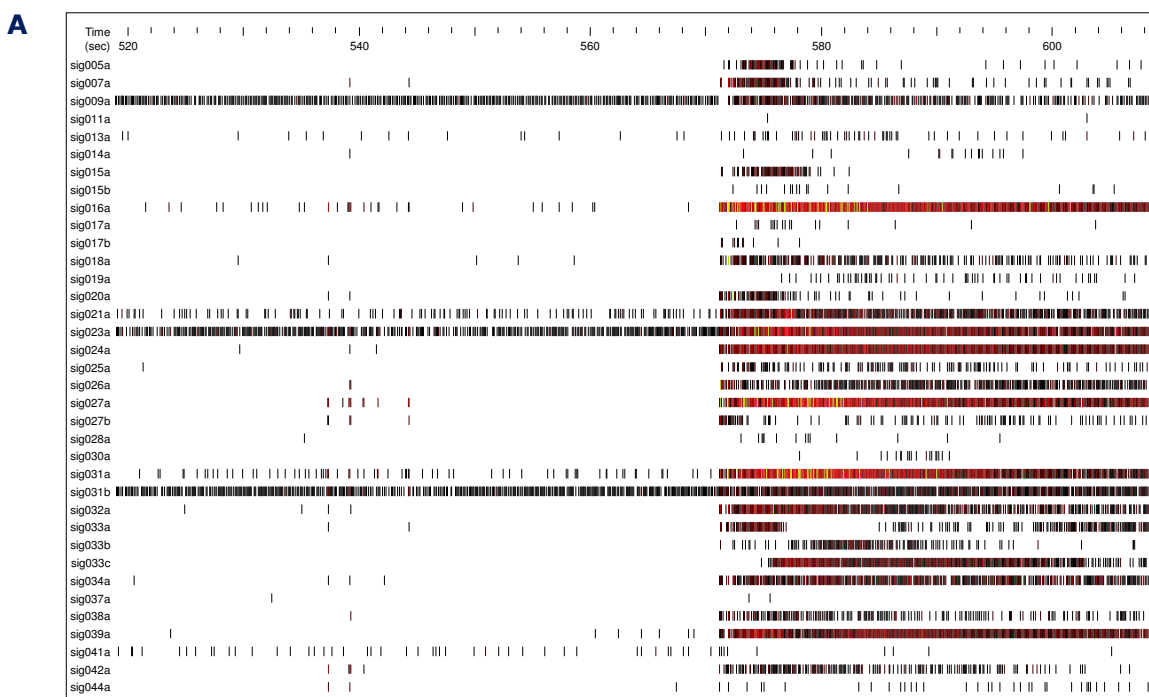


Abb.8 Zusammenhang von Präparationszeitpunkt und Aktivitätsmuster. Gegenüberstellung der Anzahl der Netzwerke mit ähnlichem Aktivitätsmuster von 20 E11-13-Netzwerken und 20 E14-16-Netzwerken. A: synchrone Burst-Aktivität, B: instabile Aktivität gekennzeichnet durch alternierende Aktivitätszustände, C: asynchrone Spike-Aktivität, D: Netzwerke in denen verschiedene Aktivitätsformen parallel auftraten.

Die Mehrzahl der E11-13 Netzwerke zeigte instabile Aktivität hoher Dynamik die durch das Alternieren von verschiedenen Aktivitätszuständen gekennzeichnet war. Der Wechsel der Aktivitätszustände fand innerhalb kurzer Zeitintervalle (einige Sekunden bis Minuten) statt. Folgende Aktivitätszustände wurden definiert: Stochastisches, asynchrones Feuern von Aktionspotentialen, synchrones Bursten und über mehrere Sekunden andauernde Netzwerk-Bursts. Von 20 Netzwerken dieser Gruppe generierten 3 ausschließlich synchrone Burst-Aktivität und 6 ausschließlich stochastische, asynchrone Aktionspotentiale. In **Abb.9** sind die instabile Aktivität eines E13-Netzwerks, die synchrone Burstaktivität eines E15-Netzwerks und die stochastische, asynchrone Aktivität eines E12-Netzwerks dargestellt.

Die 10 Netzwerke aus den 9 Tage alten Embryonen zeigten keine synchrone Burst-Aktivität, sondern generierten beinahe ausschließlich stochastische, asynchrone Aktionspotential-Muster. Nur in einem der 10 Netzwerke wurde an einer Elektrode burstende Aktivität detektiert. Die durchschnittliche Anzahl detektierter Units war in diesen 10 Netzwerken geringer (9,3) als die der E11-13- und E14-16-Netzwerke (18,9). Die maximale Anzahl an detektierten Signalfrequenzen pro Netzwerk betrug 72.



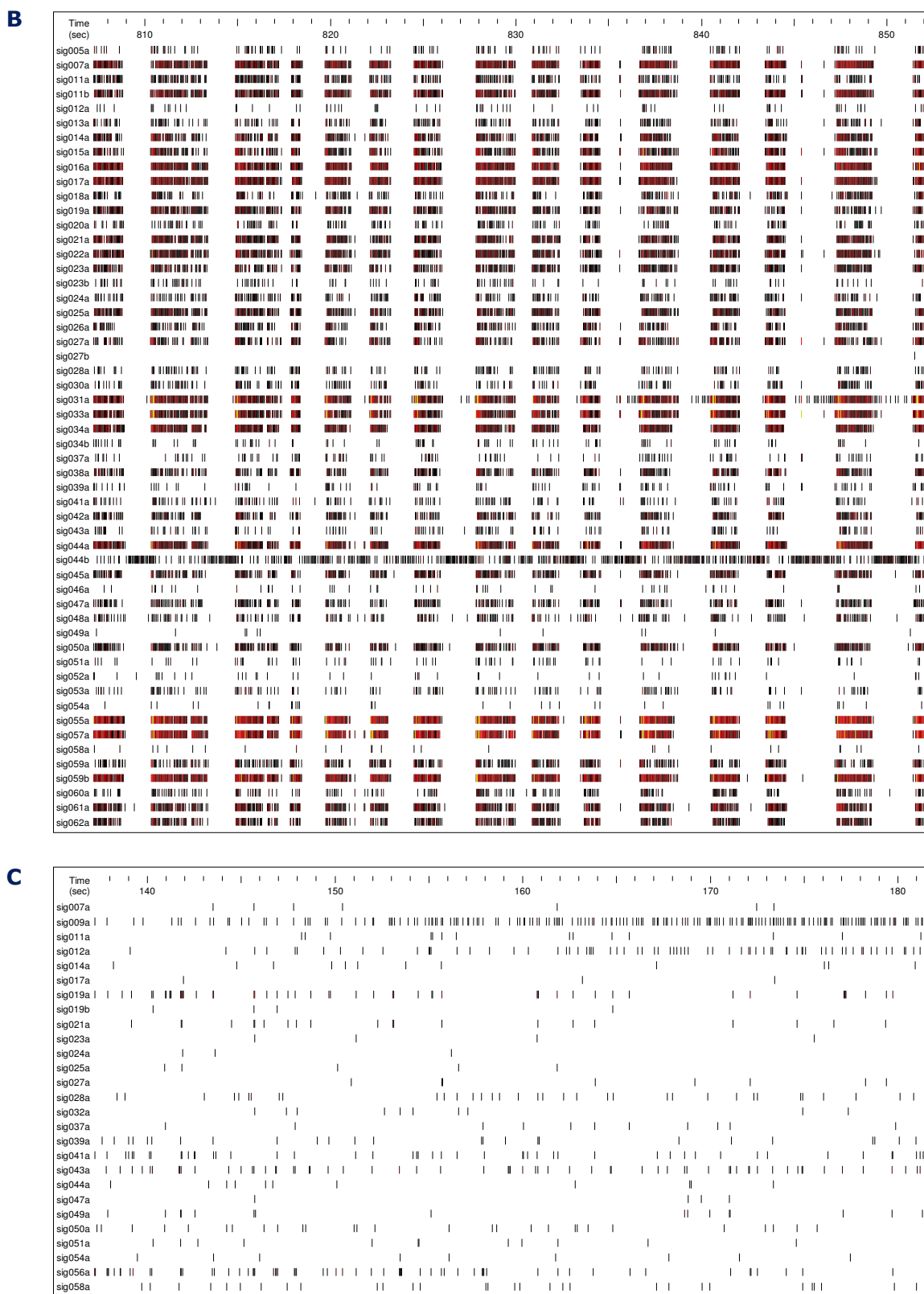


Abb.9 Unterschiede zwischen den Aktivitätsmustern in Abhängigkeit vom Präparationszeitpunkt. **A:** Instabile Aktivität eines E-13 Netzwerks. Deutlich erkennbar ist der abrupte Übergang von stochastischer Spike-Aktivität zur Netzwerk-Burst-Aktivität. **B:** Synchroner Burst-Aktivität eines E-15 Netzwerks. **C:** Stochastische, asynchrone Spike-Aktivität eines E12-Netzwerks. Ausschnitte jeweils 45 s. Die einzelnen Zeilen stellen die mit den MEA-Elektroden detektierten Signalsequenzen (Aktionspotential-Abfolgen, jeder einzelne Strich markiert den Zeitpunkt der Detektion eines Aktionspotentials) dar.

3.4. Zusammenhang von Zytoarchitektur und Aktivitätsmuster

Nach der Detektion der nativen Spontanaktivität wurden 30 Netzwerke immunozytochemisch gefärbt und mikroskopiert. Von diesen 30 Netzwerken konnte in 12 Netzwerken die Anzahl der Interneurone durch Auszählen unter dem Mikroskop bestimmt werden. Die Korrelation der zellulären Zusammensetzung verschiedener Netzwerke zu ihrem Aktivitätsmuster zeigte einen starken Zusammenhang zwischen Zytoarchitektur und Aktivitätsmuster. Die Anzahl an Parvalbumin-positiven und GABAergen Interneuronen variierte zwischen den Netzwerken. Es gab sowohl Netzwerke mit wenigen (1-5) oder gar keinen Interneuronen, als auch Netzwerke mit einer mittleren Anzahl (20 Interneurone/mm²) oder einer großen Anzahl (100 Interneurone/mm²) Parvalbumin- oder GABA-markierter Interneurone.

Netzwerke mit einer großen Anzahl an GABAergen oder Parvalbumin-positiven Interneuronen zeigten eine relativ stabile synchrone Burst oder Superburst-Aktivität. Verschiedene Aktivitätszustände wurden in diesen Netzwerken nicht beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten Netzwerke mit wenigen oder keinen Interneuronen asynchrone, stochastische Spike-Aktivität oder instabile Aktivität mit den oben beschriebenen Aktivitätszuständen. Die Netzwerke mit instabiler Aktivität generierten für kurze, teilweise auch längere (**Abb.13**) Zeitperioden synchrone Burst-Aktivität, sie zeigten jedoch keine dauerhafte oder stabile, synchrone Burst-Aktivität. Auf den folgenden 6 Seiten werden jeweils das mikroskopische Bild eines Netzwerks und ein Ausschnitt des dazugehörigen Aktivitätsmusters gezeigt (**Abb.10-15**). In **Tab.3** ist die Anzahl der Parvalbumin-positiven und GABAergen Interneurone dem Aktivitätsmuster von 12 Netzwerken zugeordnet.

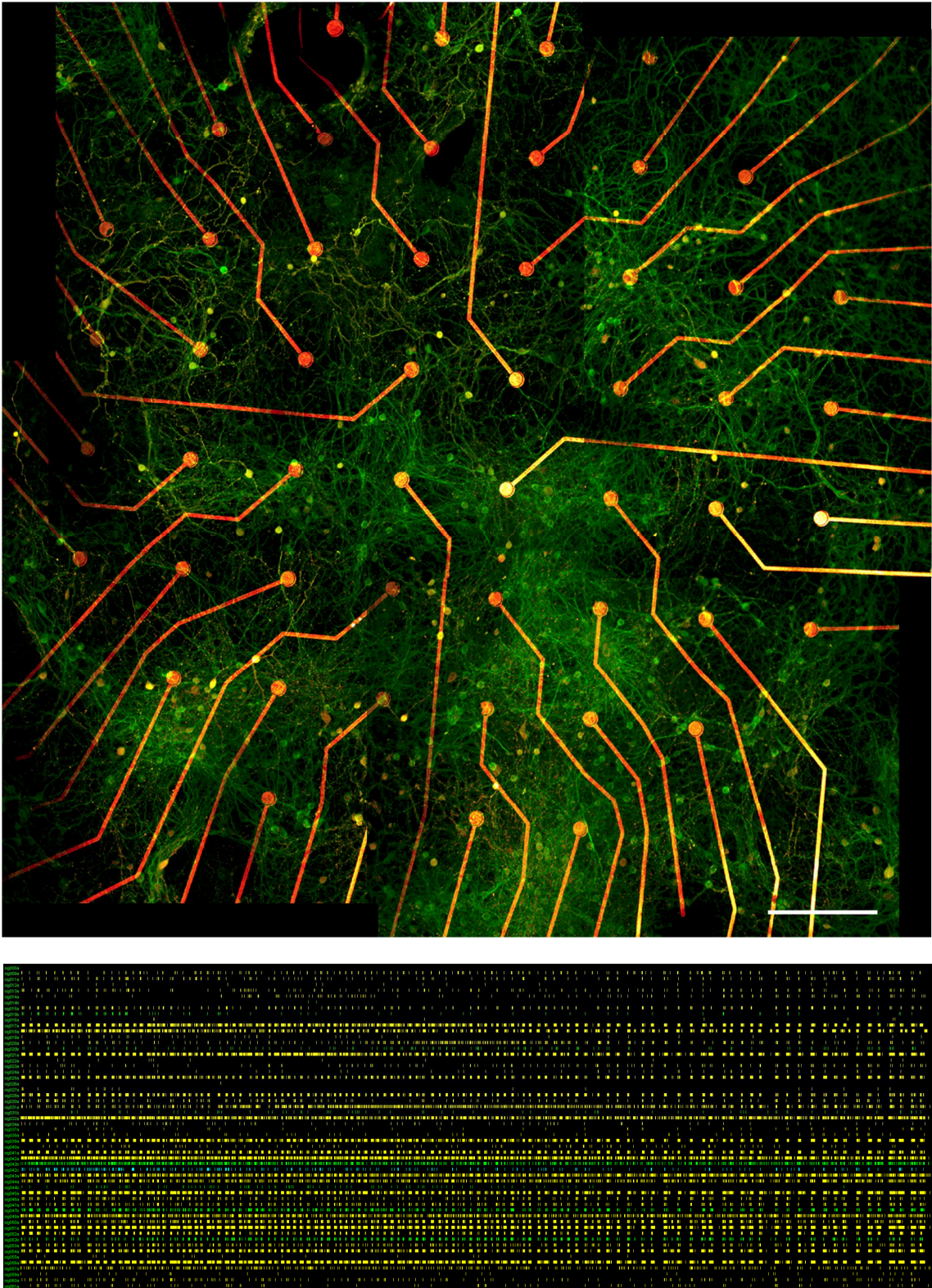


Abb.10 Netzwerk mit zahlreichen GABAergen Interneuronen ($49/\text{mm}^2$). Oben: Mikroskopisches Bild des Netzwerks auf dem MEA. Grün: MAP 2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2), gelb: GABA, rot: Elektroden, Balken: $200\ \mu\text{m}$. Es sind zahlreiche GABA-markierte (gelb) und nicht GABA-markierte (grün) Zellkörper zu erkennen. Unten: Aktivitätsmuster des Netzwerks über einen Zeitraum von 80 s. Aktivitätsmuster geprägt durch synchrone Burst-Aktivität. E12-Netzwerk.

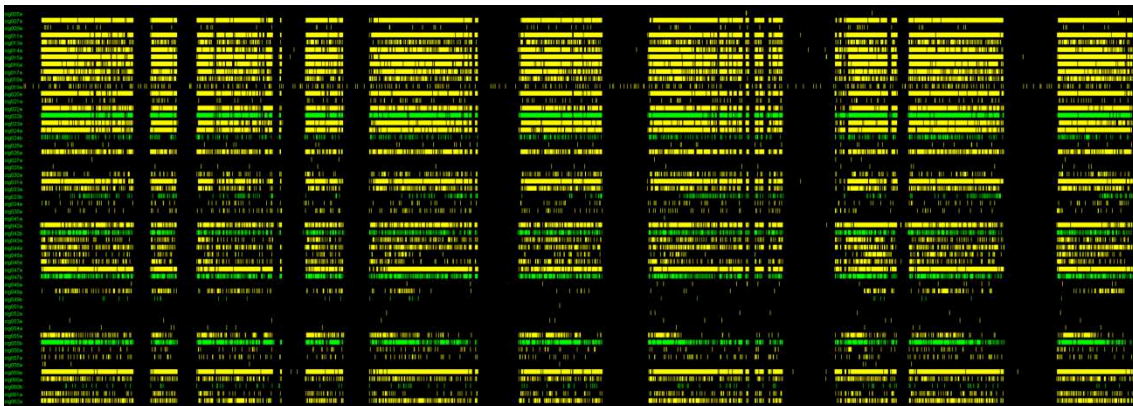
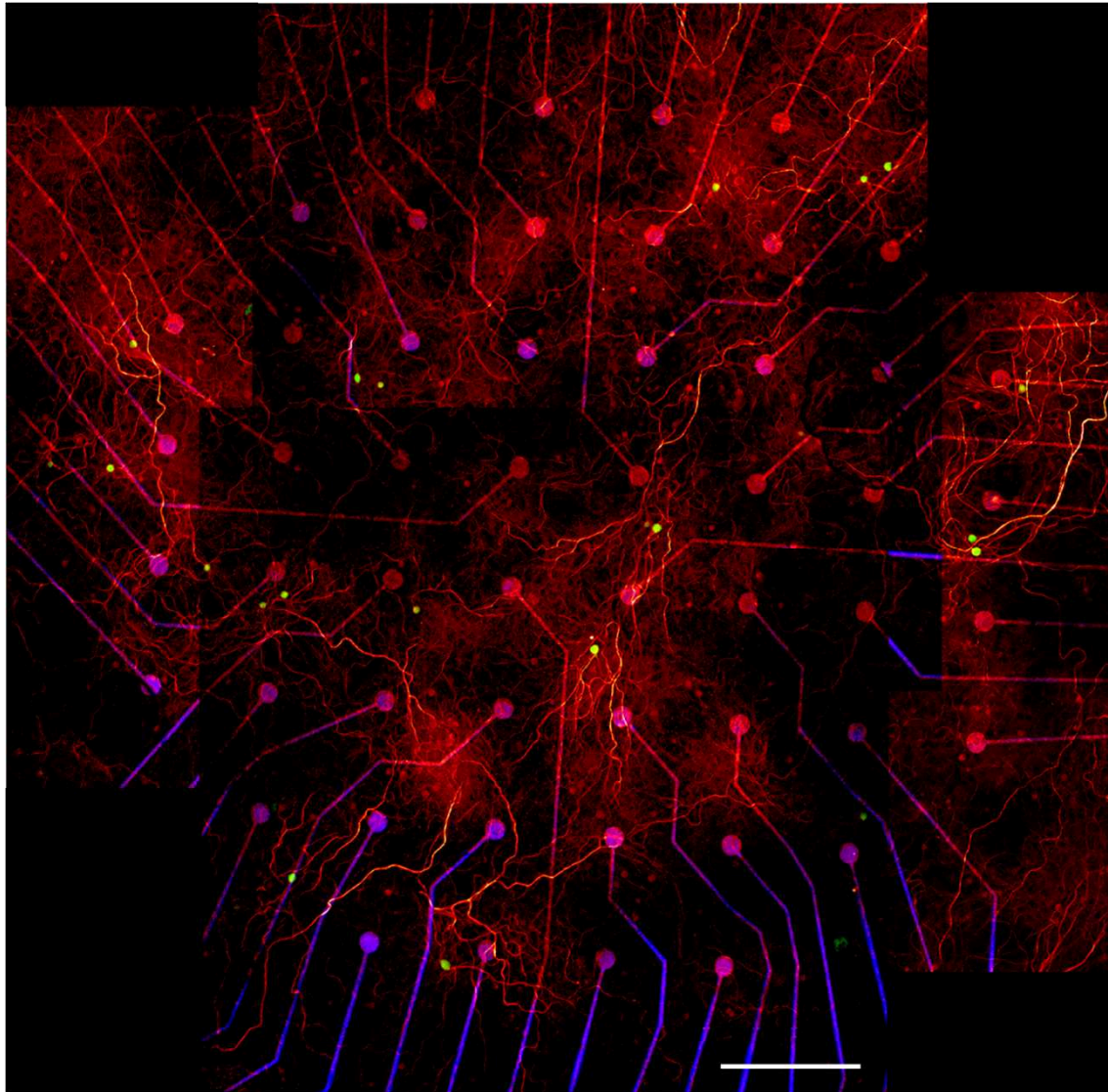


Abb.11 Netzwerk mit zahlreichen Parvalbumin-positiven Interneuronen ($20/\text{mm}^2$). Oben: Mikroskopisches Bild des Netzwerks auf dem MEA. Grün: Parvalbumin, rot: Neurofilament 200, Balken: 200 μm . Unten: Aktivitätsmuster über einen Zeitraum von 80 s geprägt durch synchrone Superbursts (Bursts mit einer Länge von mehreren Sekunden). E15-Netzwerk.

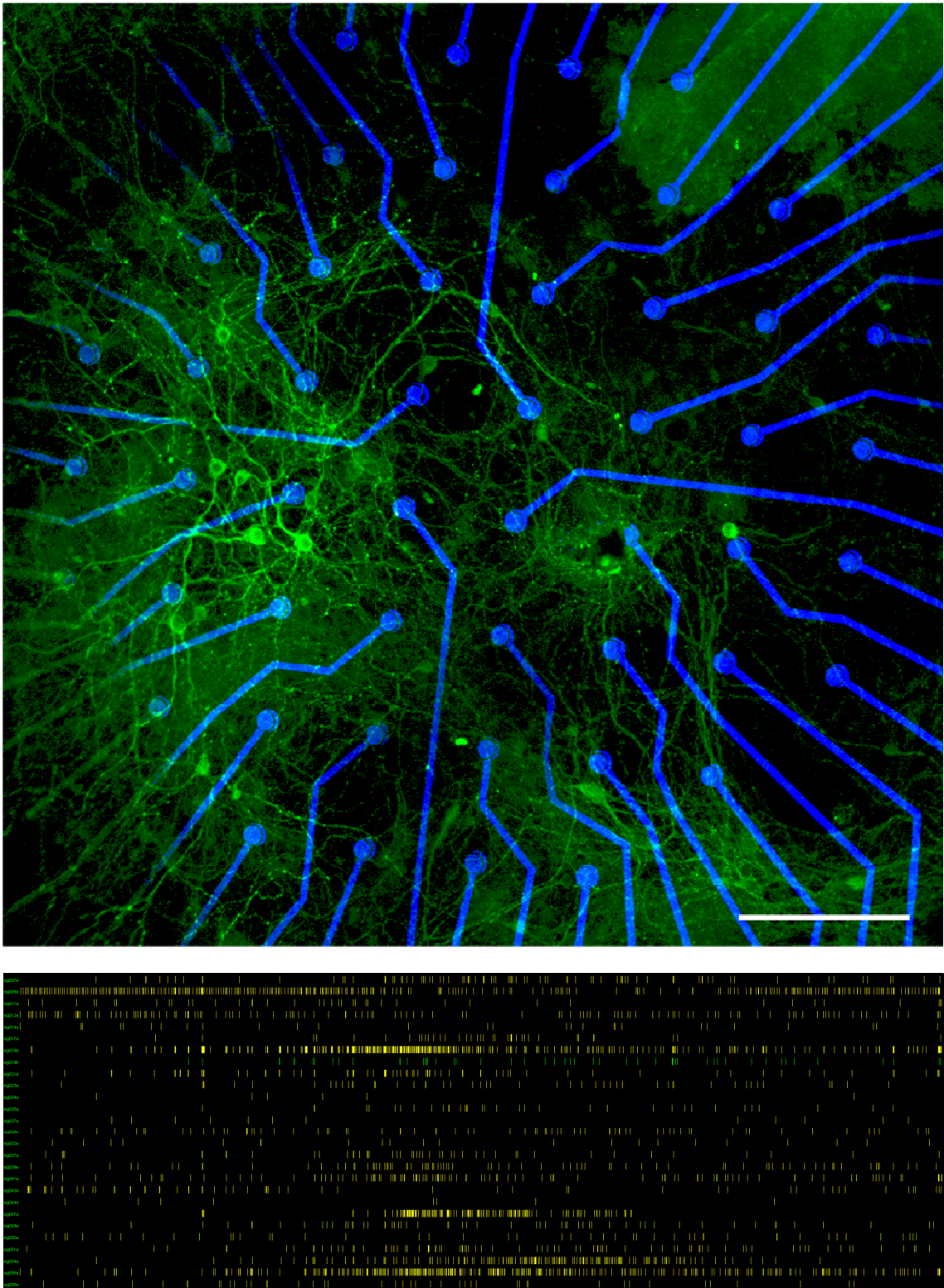


Abb.12 Netzwerk ohne Interneurone. Oben: Mikroskopisches Bild des Netzwerks auf dem MEA. Grün: MAP 2, rot: GABA, blau: Elektroden, Balken: 150 μ m. Unten: Aktivitätsmuster über einen Zeitraum von 80 s. Keine synchrone Aktivität sondern stochastisches, asynchrones Feuern von Aktionspotentialen. E13-Netzwerk.

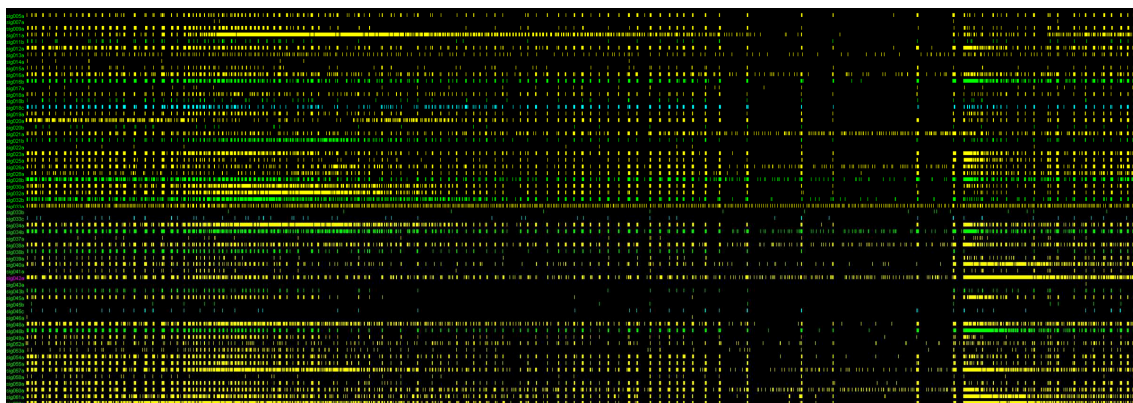
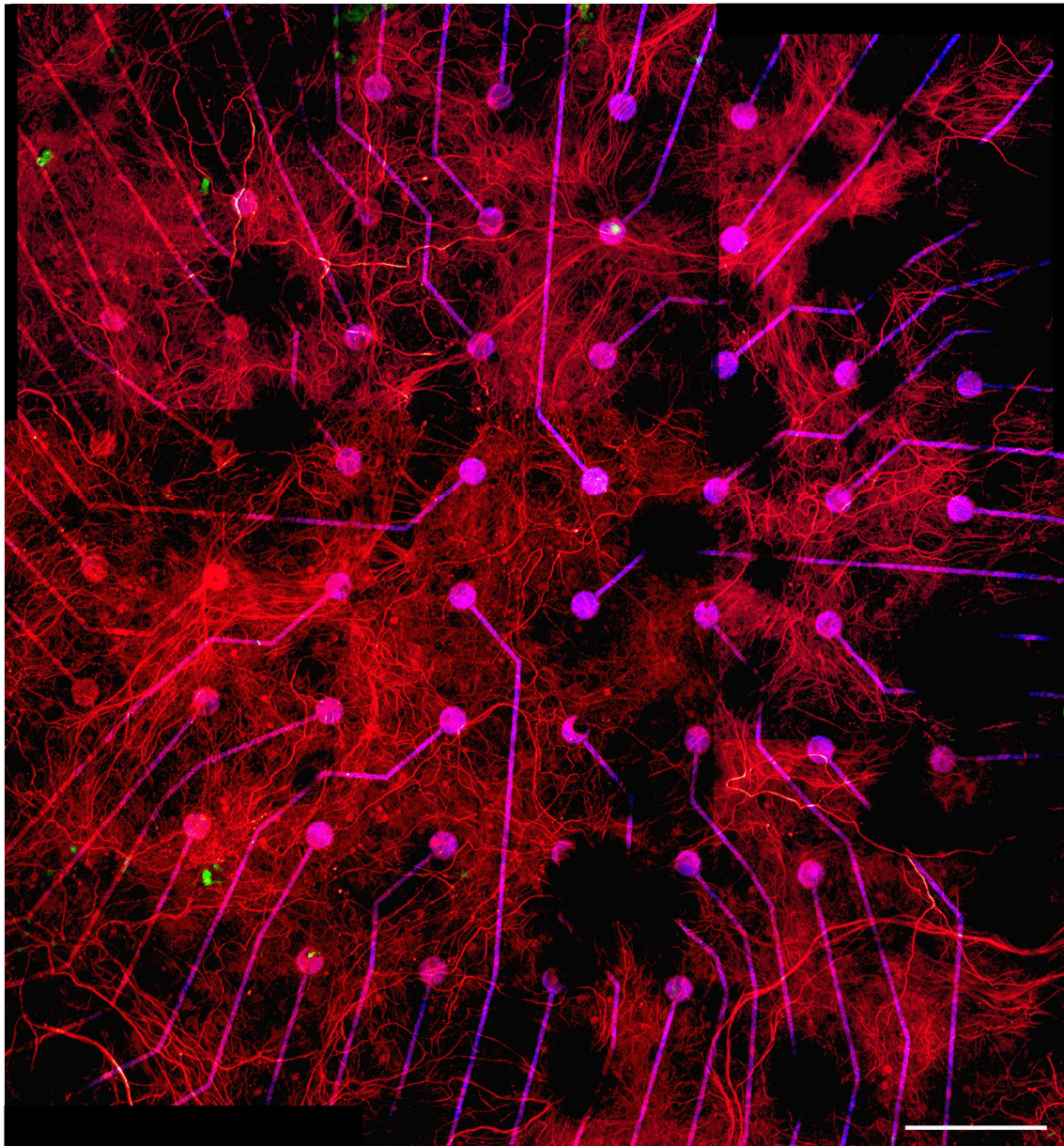


Abb.13 Netzwerk das kaum Parvalbumin-positive Interneurone enthält. Oben: Mikroskopisches Bild des Netzwerks auf dem MEA. Grün: Parvalbumin, rot: Neurofilament 200, Balken: 200 μ m. Unten: Aktivitätsmuster über einen Zeitraum von 160 s. Das Aktivitätsmuster ist durch Instabilität gekennzeichnet. Synchroner Burst-Aktivität, Spike-Aktivität und Netzwerk-Bursts wechseln sich ab. E12-Netzwerk.

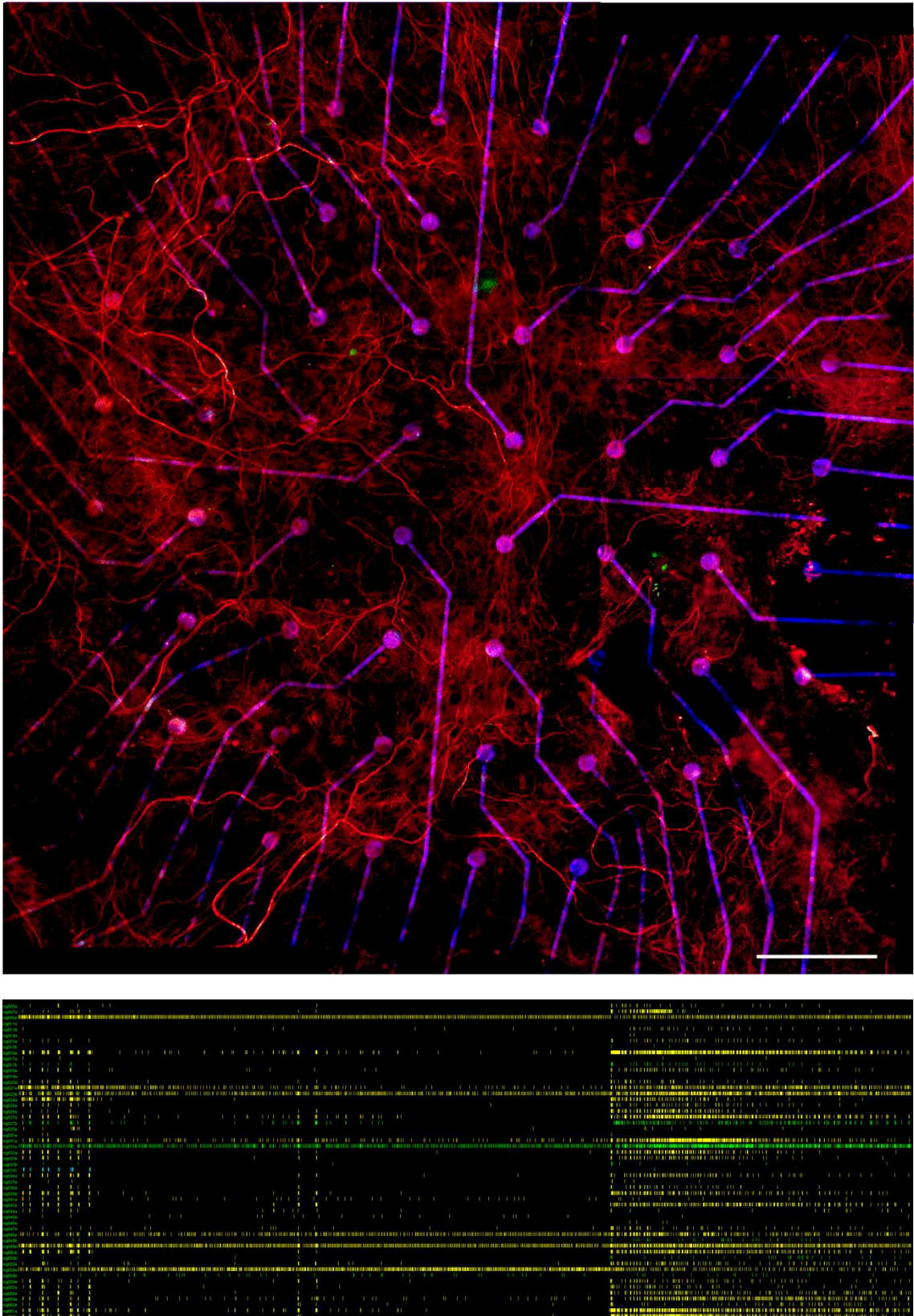


Abb.14 Netzwerk das ebenfalls kaum Parvalbumin-positive Neurone enthält. Oben: Mikroskopisches Bild des Netzwerks auf dem MEA. Grün: Parvalbumin, rot: Neurofilament 200, Balken: 200 μm . Unten: Aktivitätsmuster des Netzwerks über einen Zeitraum von 160 s. Aktivitätsmuster geprägt durch den Wechsel verschiedener Aktivitätszustände. E13-Netzwerk.

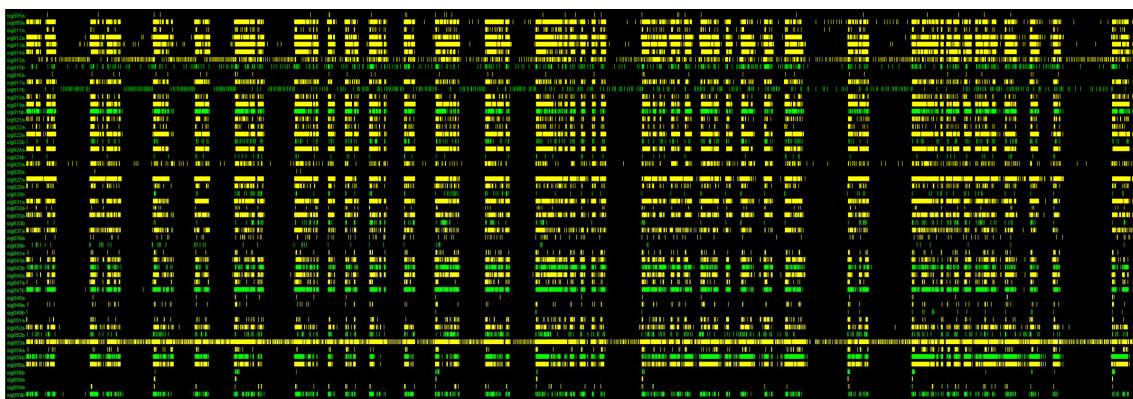
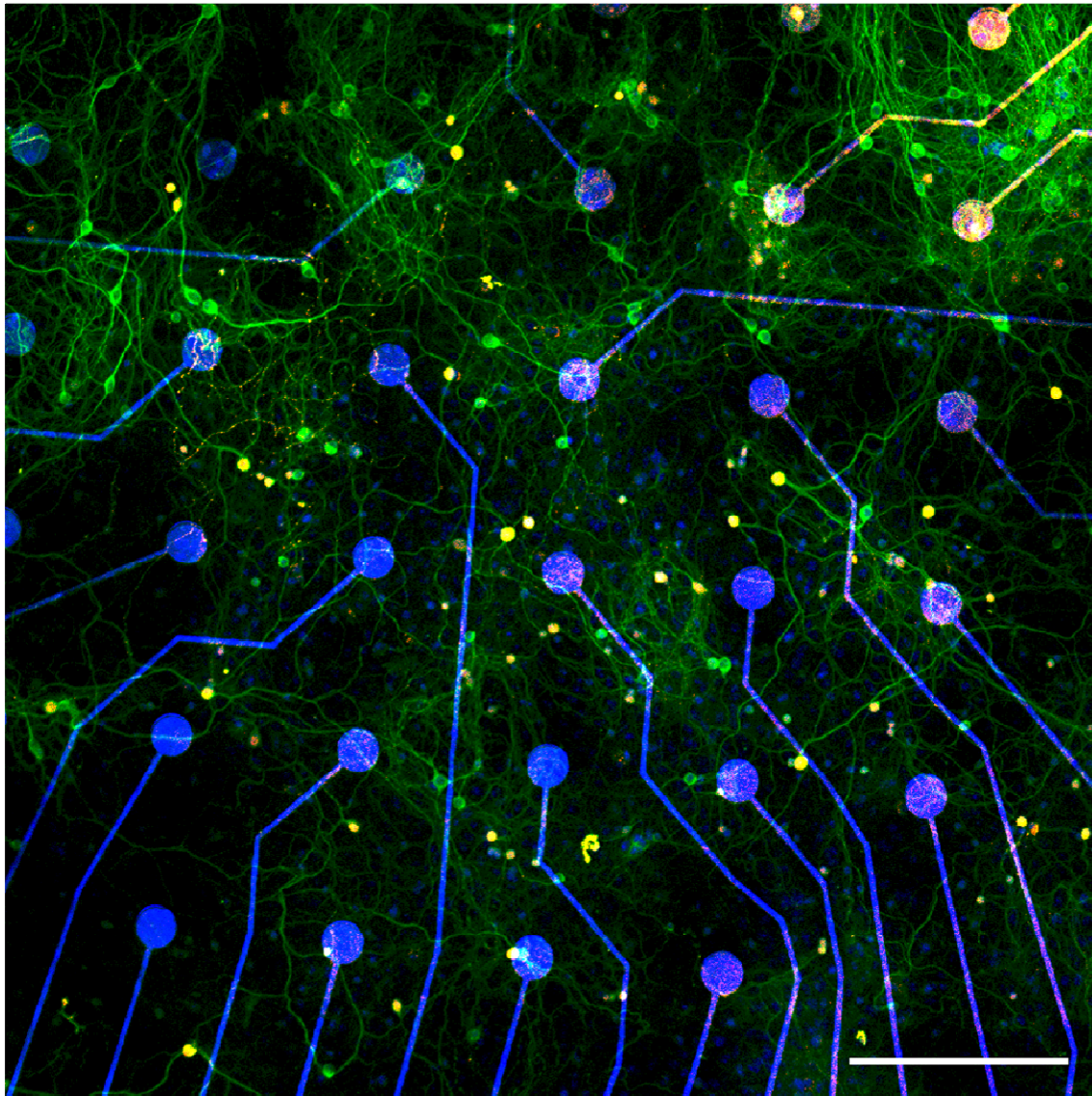


Abb.15 Netzwerk mit zahlreichen GABAergen Interneuronen (83/mm²). Oben: Mikroskopisches Bild des Netzwerks auf dem MEA. Grün: MAP 2, gelb: GABA, blau: Elektroden, Balken: 50 μ m. Unten: Aktivitätsmuster des Netzwerks über einen Zeitraum von 80 s. Aktivitätsmuster vor allem durch synchrones Bursten geprägt. Nicht alle Units partizipieren an synchroner Aktivität. Aktivität von Unit 17b ist während synchroner Bursts gehemmt. E15-Netzwerk.

Tab.3 Zuordnung der Anzahl Parvalbumin-positiver sowie GABAerger Interneurone zum Aktivitätsmuster des jeweiligen Netzwerks.

Netzwerk	Anzahl Interneurone/mm ²	Aktivitätsmuster
Parvalbumin-positive Interneurone		
1	1	instabile Aktivität
2	2	instabile Aktivität
3	4	asynchrone Spike-Aktivität (2 Elektroden mit synchroner Burst-Aktivität)
4	12	asynchrone Spike-Aktivität
5	20	synchrone Superburst-Aktivität
6	34	synchrone Superburst-Aktivität
GABAerge Interneurone		
7	0	asynchrone Spike-Aktivität
8	49	synchrone Burst-Aktivität
9	55	synchrone Burst-Aktivität
10	83	synchrone Burst-Aktivität, (mit inhibitorischen Interaktionen)
11	102	synchrone Burst-Aktivität
12	105	synchrone Burst-Aktivität

Aufgrund der starken Unterschiede zwischen den analysierten Netzwerken im Muster ihrer Burst-Aktivität, ist eine sinnvolle, statistische Auswertung des Zusammenhangs zwischen Anzahl an Interneuronen und Burst-Aktivität nicht möglich. Sowohl die Länge der Bursts, die Anzahl der Spikes in den Bursts, sowie die zeitliche Abfolge der Bursts variierten stark.

Die detektierten Signale des Netzwerks aus **Abb.11** wurden kreuzkorreliert, d.h. jedes Signal wurde einmal als Referenzsignal deklariert und auf eine Korrelation mit den übrigen Signalen geprüft. Dabei stellte sich heraus, dass bis auf zwei Signale jedes Signal mit mindestens einem an einer anderen Elektrode detektierten Signal korrelierte. Die Signale konnten somit einzelnen Neuronen zugeordnet und die Anzahl der Neurone, die die 55 in diesem Netzwerk detektierten Signale generierten, bestimmt werden. Den 55 Signalen stehen 18 Neurone gegenüber. Die Anzahl der Neurone entspricht annähernd der Anzahl (20) der Parvalbumin-positiven Neurone im Netzwerk (**Abb.11**). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Parvalbumin-positive Interneurone die synchrone Burst-Aktivität dieses Netzwerks generierten.

3.5. Burst-Aktivität Parvalbumin-positiver Interneurone

Um genau zu bestimmen welche Zellen die spontane synchrone Burst-Aktivität die in der Mehrzahl der Netzwerke (E14-E16) auftrat generieren wurde versucht, die an einzelnen Elektroden detektierte Aktivität einem Neuronentyp zuzuordnen. Die Zählung GABA-markierter und nicht GABA-markierter Neurone ergab einen Anteil von 10-30% Interneuronen. Die stark verzweigten Axone Parvalbumin-positiver Interneurone bedeckten große Bereiche der Oberflächen der Deckgläser und MEAs (**Abb.16**). Fünf dieser Neurone konnten ihrem Aktivitätsmuster zugeordnet werden (**Abb.17**). Diese Zuordnung war nur möglich, wenn der Kurs eines Axons von einem Parvalbumin-positiven Neuron mikroskopisch verfolgt werden konnte, über eine Elektrode des MEAs führte und diese Elektrode nicht von weiteren Axonen unbekanntem Ursprungs bedeckt war (**Abb.18**). Die detektierte Aktivität Parvalbumin-positiver Interneurone war ausschließlich Burst-Aktivität (**Abb.17**).

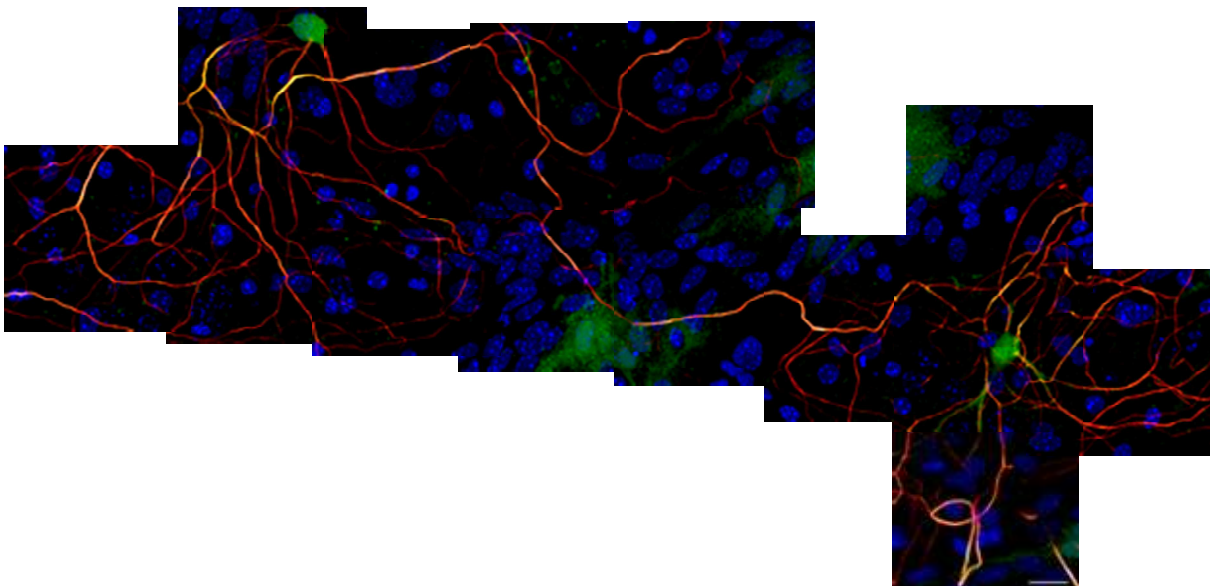


Abb.16 Axone Parvalbumin-positiver Interneurone bedecken große Oberflächenbereiche. Zwei Parvalbumin-positiv Interneurone die für 4 Wochen auf einem Deckgläschen kultiviert wurden. Die Axone (rot) bedecken große Teile der Oberfläche. Grün: Parvalbumin, rot: Neurofilament 200, blau: DNA, Balken: 20 μm .

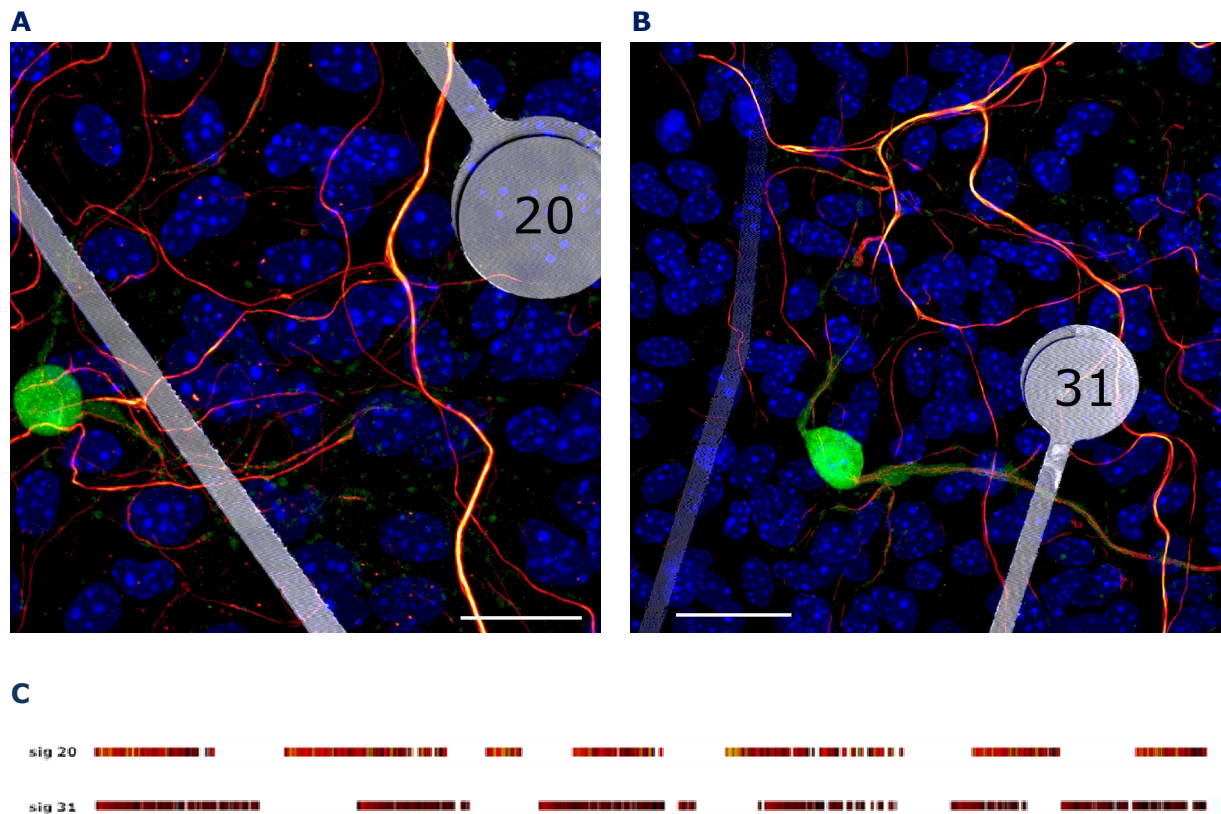


Abb.17 Zuordnung Parvalbumin-positiver Interneurone zu ihrem Aktivitätsmuster. **A:** Parvalbumin-positives Neuron eines Netzwerks in der Nähe von Elektrode 20 dessen Axon die Elektrode passiert. **B:** Parvalbumin-positives Neurone eines anderen Netzwerks in der Nähe von Elektrode 31 dessen Axon die Elektrode passiert. Grün: Parvalbumin, rot: Neurofilament 200, blau: DNA, grau: Elektroden, Balken: 20 μm . **C:** Mit beiden Elektroden detektierte starke Burst-Aktivität über einen Zeitraum von 50 s.

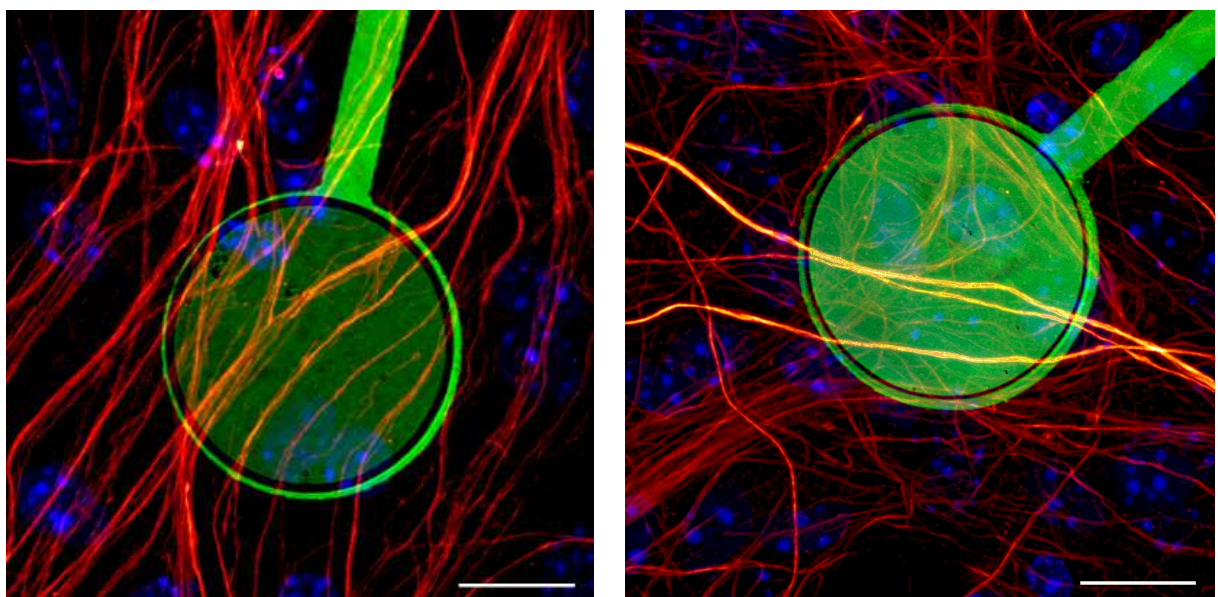


Abb.18 Einzelne Elektroden bedeckt mit zahlreichen Axonen. Eine Korrelation von Neuronentyp zum Aktivitätsmuster ist nicht möglich. Rot: Neurofilament 200, blau: DNA, grün: Elektrode, Balken 15 μm .

Die Kreuzkorrelation des Aktivitätsmusters des Neurons aus **Abb.17 B** zeigt, dass dieses Neuron mit großer Wahrscheinlichkeit ebenso für die detektierten Signale dreier weiterer Elektroden verantwortlich ist. Die Muster der Elektroden 11, 13 und 33 zeigen starke Übereinstimmung mit dem Muster der Elektrode 31 (**Abb.19**). Diese 4 MEA-Elektroden liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Die Axone des Neurons aus **Abb.17 B** dehnen sich demnach über benachbarte Elektroden aus. Die Signale, die mit den anderen Elektroden detektiert wurden, korrelieren weniger oder kaum mit dem Signal von Elektrode 31. Sie stammen demnach mit großer Wahrscheinlichkeit von anderen Neuronen. Die Aktivität des Netzwerks war eine stark synchrone Burst-Aktivität.

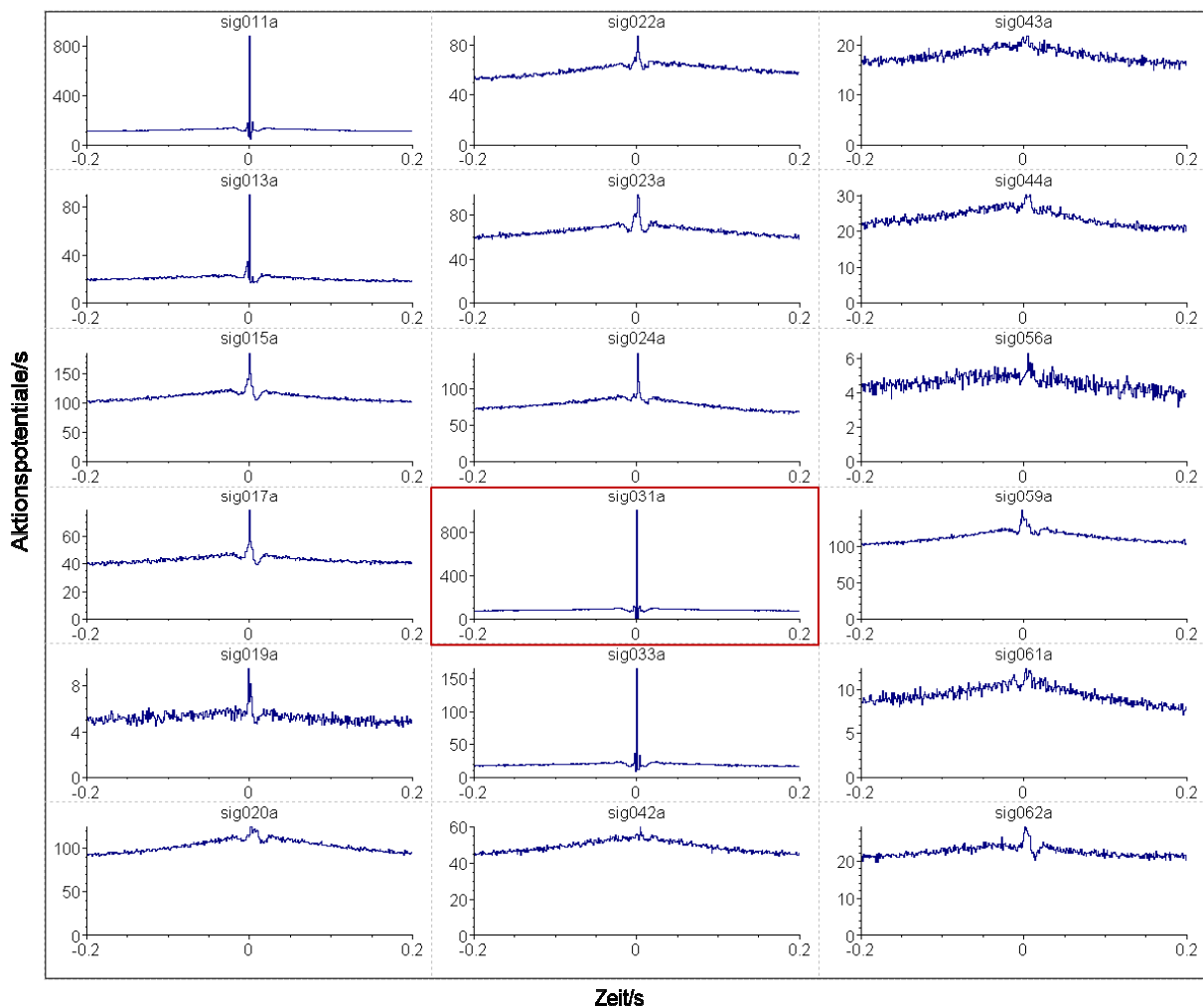
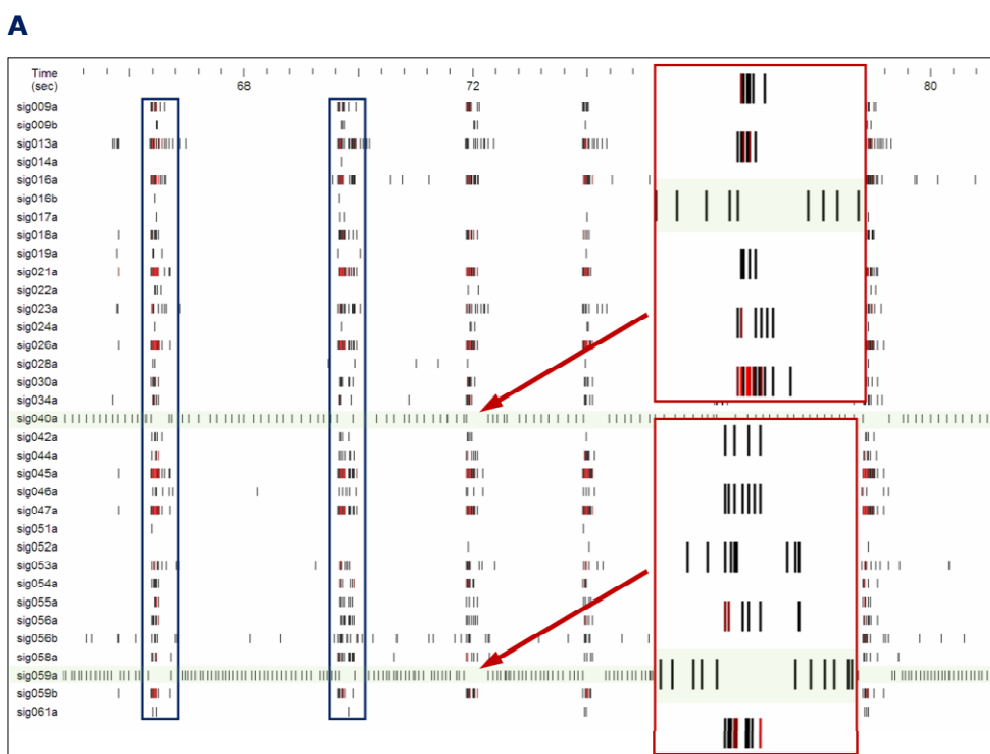


Abb.19 Kreuzkorrelation. Kreuzkorrelogramm der detektierten Signale eines Netzwerks mit MEA-Elektrode 31 als Referenz (rot eingerahmt). Die Signale der Referenzelektrode korrelieren stark mit den Signalen der Elektroden 11, 13 und 33. Diese Elektroden liegen in unmittelbarer Nachbarschaft von Elektrode 31. Das Neuron, das das Signal an Elektrode 31 generiert hat, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für die Signale an Elektrode 11, 13 und 33 verantwortlich. Die Signale der anderen Elektroden korrelieren weniger oder kaum mit Elektrode 31. x-Achse: Zeitbereich der Korrelation von -0,2 - 0,2 s, y-Achse: Aktionspotentiale/s.

3.6. Inhibitorische Interaktionen während der Spontanaktivität

Sind kortikale *in vitro*-Netzwerke aus verschiedenen Neuronentypen aufgebaut, so könnten diese miteinander interagieren. Die Analyse von 50 Netzwerken hinsichtlich möglicher Wechselwirkungen während der Spontanaktivität führte zur Beobachtung einer visuell offensichtlichen Interaktion: 10% der Netzwerke mit koexistierender synchroner Burst-Aktivität und kontinuierlicher Spike-Aktivität zeigten ein Alternieren dieser beiden Aktivitätsformen. **Abb.20** zeigt Aktionspotentialfolgen des Netzwerks aus **Abb.24**. 32 von 34 Units dieses Netzwerks waren synchron burstend mit einer Aktionspotential-Frequenz von 30-120 Hz (γ -Frequenzband und schnelle Oszillationen) während der Bursts. Zwei Units generierten kontinuierliche Abfolgen von Aktionspotentialen mit einer Frequenz von 4-12 Hz (θ - β -Frequenzband). In allen 5 Netzwerken erlosch die kontinuierliche Spike-Aktivität zum Zeitpunkt des Beginns eines synchronen Bursts und kehrte kurz nach dessen Ende wieder (**Abb.20**). Diese Beobachtung führte zur Schlussfolgerung, dass die synchrone Burst-Aktivität die kontinuierliche Spike-Aktivität inhibiert bzw. dass synchron burstende Neurone kontinuierlich spikende Neurone hemmen. Die kontinuierliche Spike-Aktivität wird rhythmisch inhibiert. Sie wurde ebenso von Superbursts gehemmt. Diese Form der Wechselwirkung wird hier als Burst-induzierte Inhibition bezeichnet.



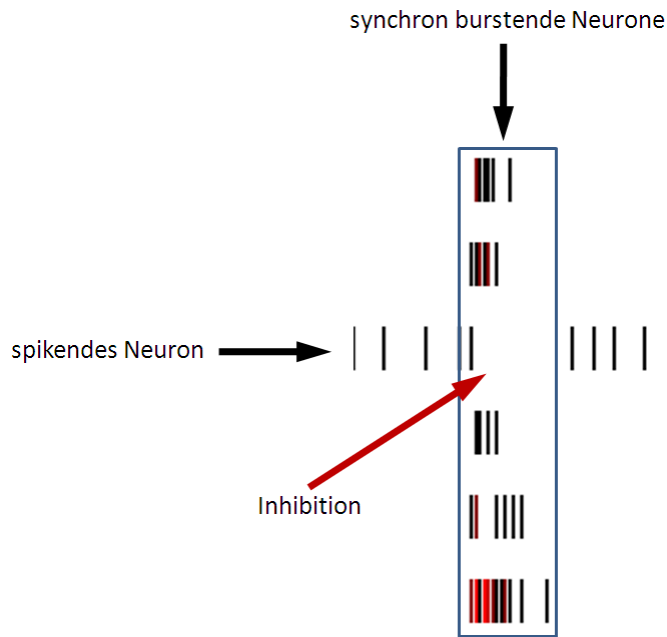
B

Abb.20 Burst-induzierte Inhibition. **A:** Synchron burstende Neurone (blaue Boxen) inhibieren die Aktivität kontinuierlich spikender Neurone (rote Pfeile). Die mit den Pfeilen markierten Regionen sind in den roten Boxen vergrößert dargestellt. **B:** Grafische Darstellung zur Verdeutlichung des Phänomens.

3.7. Blockade der Gap Junctions

Interneurone sind im Gegensatz zu Pyramidenzellen extensiv über Gap Junctions verbunden (Hestrin *et al.* 2005). Eine mögliche Funktion der Gap Junctions ist die Kopplung des Membranpotentials verknüpfter Zellen, die die Wahrscheinlichkeit der Generation synchroner Aktivität steigen lässt (Galarreta *et al.* 1999, Gibson *et al.* 1999). Die Blockade der Gap Junctions in 9 synchron burstenden Netzwerken mit dem Gap-Junction-Blocker Mefloquin führte allgemein zu einer Abnahme der Aktivität (Anzahl der Aktionspotentiale/Zeiteinheit). Außerdem verminderte sich die Dauer der Bursts (Zeitraum vom Beginn bis zum Ende eines Bursts) sowie die Anzahl der Bursts/Zeiteinheit. Die Reaktionen der Neurone waren jedoch differenziert. Einige Neurone zeigten eine langsame, andere eine schnelle Aktivitätsabnahme (**Abb.21**). Die Blockade der Gap Junctions mit den Gap Junction-Blockern Carbenoxolon und Quinin verursachte ebenfalls eine langsame Abnahme der Netzwerkaktivität. Gap Junctions könnten demnach für die synchrone Burst-Aktivität der Netzwerke bedeutend sein.

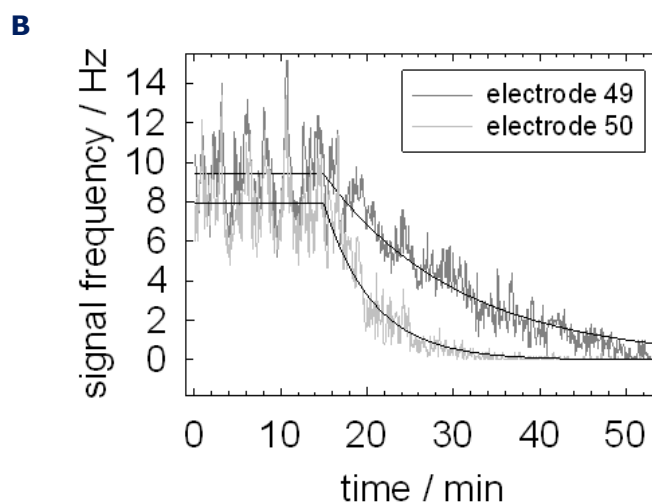
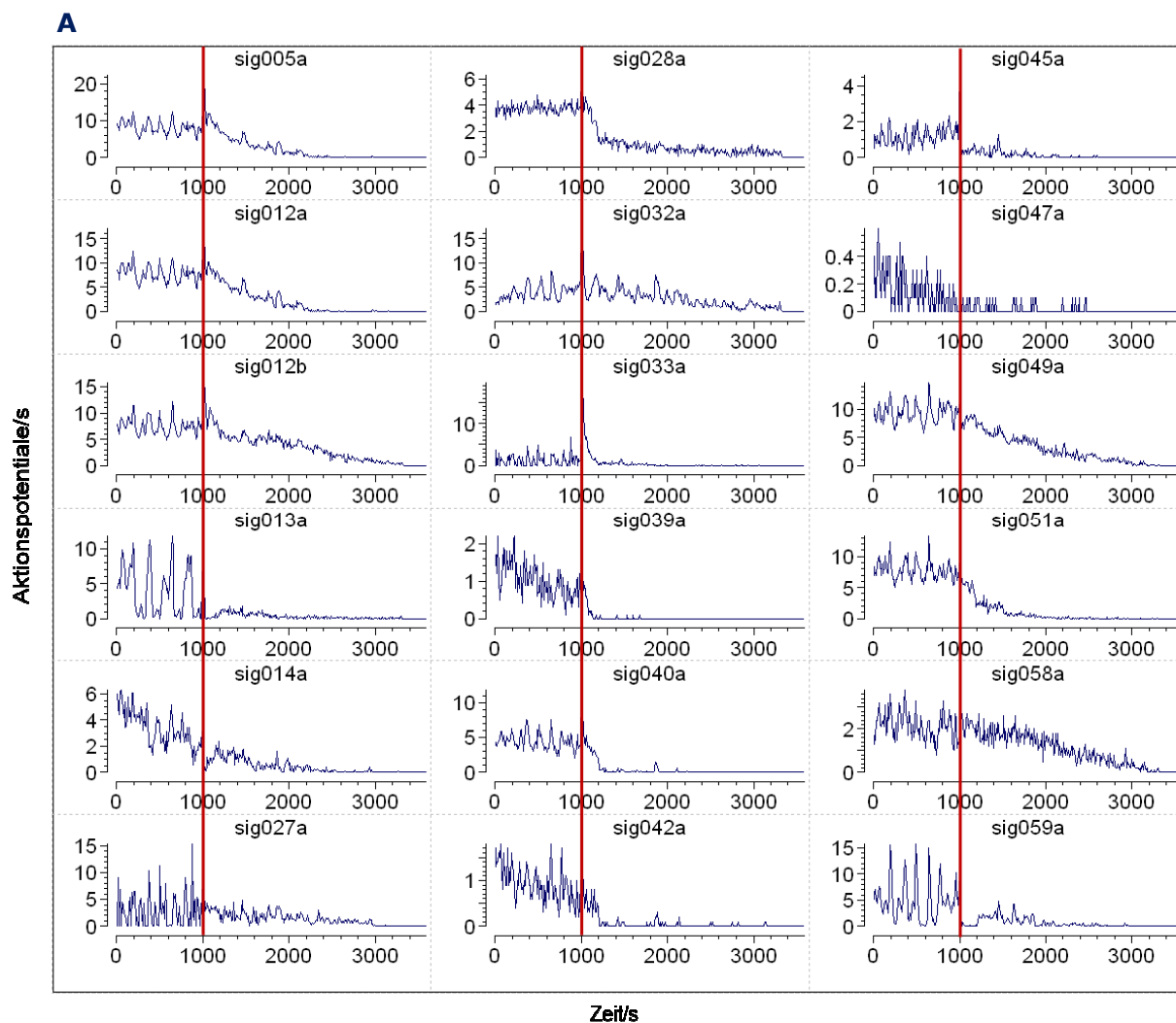


Abb.21 Blockade der Gap Junctions mit Mefloquin. **A**: Differenzierte Reaktion eines Netzwerks mit 18 Units auf die Blockade (rote Markierung) der Gap Junctions mit Mefloquin. Dargestellt ist die Spike Aktivität (y-Achse, Aktionspotentiale/s) über der Zeit (x-Achse, s). **B**: Die Frequenz der Aktionspotentiale von zwei ausgewählten Elektroden eines Netzwerks. Die Aktivität nimmt nach der Zugabe von Mefloquin ab und erlischt nach 50 min beinahe vollständig (Ausgleichsrechnung M. Nissen, M. Stubbe), (Bühler *et al.* Manuskript in Vorbereitung).

3. 8. Blockade der chemischen Transmission

Die chemische synaptische Transmission ist Kalzium-abhängig. Der Entzug des Kalziums aus dem extrazellulären Milieu führt zur Blockade der chemischen Transmission (Doller *et al.* 1982, Bouskila 1993). Der vollständige Austausch des Zellkulturmediums mit einem Medium, das sich lediglich durch das Fehlen von Kalzium vom Zellkulturmedium unterscheidet, führte zu unterschiedlichen Reaktionen. Die Aktivität von 6 synchron burstenden Netzwerken erlosch vollständig. Netzwerke mit asynchron spikender Aktivität zeigten eine stark differenzierte Reaktion. An der Mehrzahl der Elektroden wurde ein Anstieg der Spike-Rate (Anzahl der Aktionspotentiale pro Zeiteinheit) beobachtet. Es gab jedoch ebenso Elektroden, deren Aktivität abfiel oder gleich blieb. Im Netzwerk aus **Abb.22** veränderte sich das Aktivitätsmuster der kontinuierlich spikenden und der synchron burstenden Units. Nach dem Austausch des Mediums zeigten die zuvor kontinuierlich spikenden Units eine leicht erhöhte Aktivität die durch sehr kurze Bursts gekennzeichnet war. Die Aktivität der meisten der zuvor synchron burstenden Units erlosch. Einige Units zeigten nach dem Medienaustausch stochastische Spike-Aktivität.

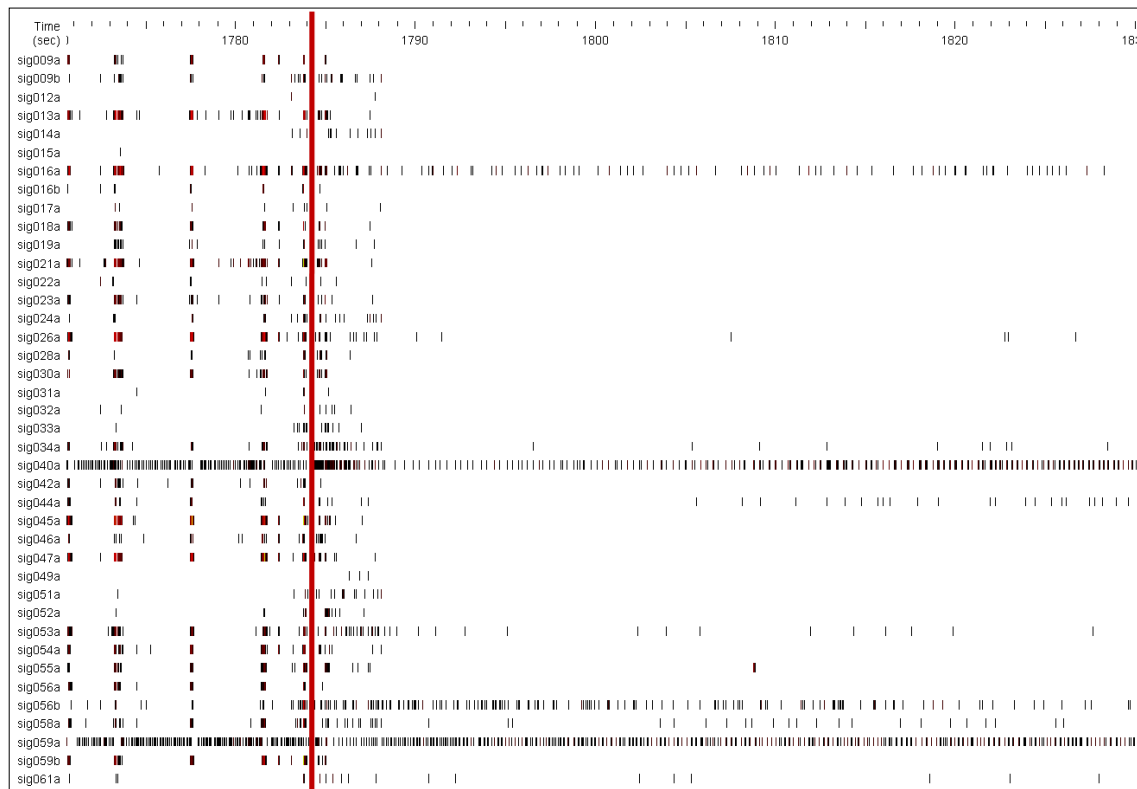


Abb.22 Blockade der chemischen synaptischen Transmission. Netzwerkaktivität (60 s) vor und nach dem kompletten Austausch des Mediums durch Kalzium-freies Medium. Unmittelbar nach dem Austausch kam es zum Stop der synchronen Burst-Aktivität. Die zuvor kontinuierlich spikenden Neurone veränderten ihr Aktivitätsmuster zu einer Burst-Aktivität gekennzeichnet durch kurze Bursts. Die Aktivität der Mehrzahl der zuvor synchron burstenden Neurone erlosch. Die Aktivität einiger der zuvor burstenden Neurone veränderte sich zu stochastischer Spike-Aktivität.

3.9. Elektrische Stimulation

Elektrische Felder, die während der MEA-Messung über eine bipolare Elektrode in der Nähe des Netzwerks erzeugt wurden, hatten kaum Auswirkungen auf das Aktivitätsmuster der Netzwerke. In vier Netzwerken gab es leichte Effekte bei einzelnen Neuronen nach der Stimulation. In einem Netzwerk wurde an einer Elektrode das Stoppen der zuvor detektierten Aktivität beobachtet. In zwei weiteren kam es zu einer Steigerung der Spike-Rate einiger Units. In einem Netzwerk zeigte ein Neuron eine besondere Reaktion. Sein Aktivitätsmuster setzte nach jedem Stimulationszyklus zunächst aus um nach einigen Sekunden wieder einzusetzen. Es hatte den Anschein als benötige dieses Neuron eine Erholungszeit nach der Stimulation.

Allgemein kann als Ergebnis dieser Versuche festgestellt werden, dass die synchrone Burst-Aktivität kaum oder gar nicht von den externen elektrischen Feldern zu beeinflussen war. Die Analyse der Aktivität während der Stimulation wurde durch Artefakte gestört. Die gleichzeitige Detektion von Spontanaktivität und Stimulus war mit dem verwendeten System nicht möglich. Nach erfolgter Stimulation waren bis auf die erwähnten Effekte keine Änderungen im Aktivitätsmuster im Vergleich zum Muster vor der Stimulation nachweisbar. Die elektrischen Felder erzeugten, bis auf die erwähnten Ausnahmen, keine Änderungen in der Burst- und Spike-Aktivität (**Abb.23**).

Über den Masseelektroden des Chips generierte elektrische Felder, die über einen Zeitraum von 4 Wochen täglich für 8 h erzeugt wurden, führten zu folgenden Ergebnissen: Pulsamplituden von 0,5 V führten nach drei Tagen zum Tod der kultivierten Neurone. Amplituden von 0,01-0,09 V (bei einem Abstand von 5,34 mm zwischen den Masseelektroden beträgt die elektrische Feldstärke bei diesen Amplituden 1,9 – 16,8 mV/mm) hatten keine Auswirkungen auf die Morphologie und elektrische Aktivität der untersuchten Netzwerke.

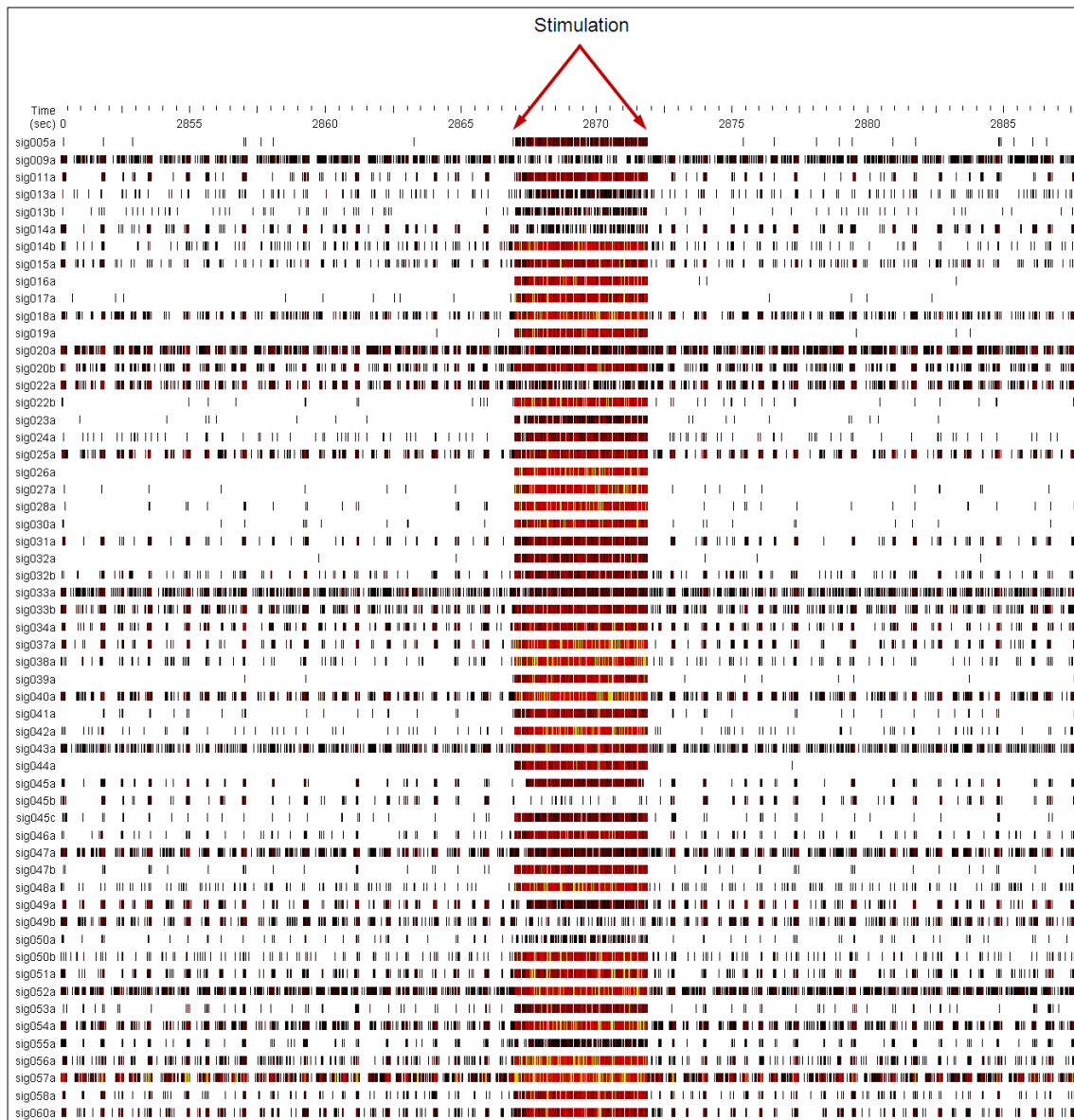


Abb.23 Aktivitätsmuster (40 s) vor und nach elektrischer Stimulation. Die Stimulation mit einer Frequenz von 130 Hz, 60 μ s Pulslänge und 500 mA Pulsamplitude führte zu keiner unmittelbaren Änderung des Aktivitätsmusters. Die Stimulation erfolgte über eine bipolare Elektrode die unmittelbar über dem Netzwerk positioniert wurde. Während der Stimulation (rote Pfeile) ist die Detektion der Aktionspotentiale durch Stimationsartefakte überlagert und somit nicht möglich.

4. Diskussion

4.1. Multielektrodenarrays und neuronale Netzwerke als System zur Untersuchung kortikaler Funktionsmechanismen?

Kortikale neuronale Netzwerke, die auf MEAs kultiviert werden, besitzen verglichen mit dem nativen Kortex eine weitaus geringere Komplexität (**Abb.24**). Sie bestehen aus einer definierten Anzahl an Neuronen und sind für elektrophysiologische Untersuchungsmethoden, chemische und elektrische Manipulationen sowie für die Mikroskopie zugänglich.

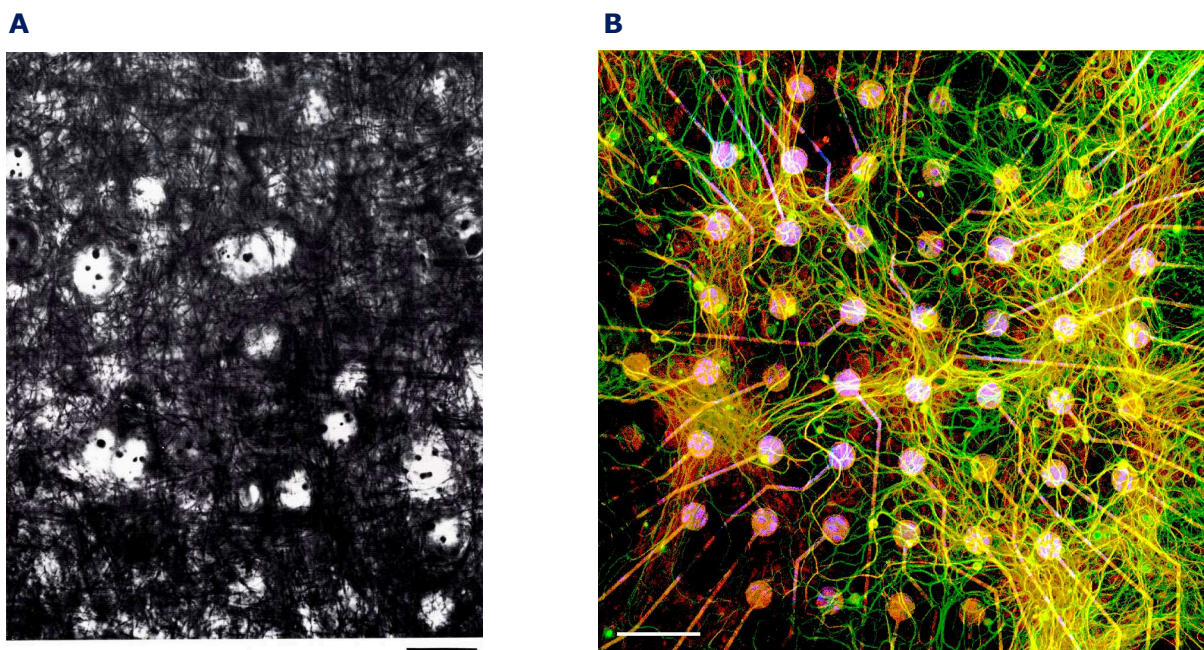


Abb.24 Vergleich der Dichte des nativen Kortex und kortikalen *in vitro*-Netzwerken. **A**: Dichtes Axon-Netzwerk in Layer V des Kortex (Maus). Schwarz: Axone, weiße Bereiche: Blutgefäße, Balken: 20 μm (Braitenberg *et al.* 1998). **B**: Netzwerk auf dem Multielektrodenarray des Glas-Neurochips. Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie eines 28 Tage kultivierten Netzwerks. Grün: β -3 Tubulin, rot: Neurofilament 200, gelb: Rot überlagert mit Grün (Spektralfarben), Balken: 100 μm .

Kultivierte neuronale Netzwerke besitzen nicht den Aufbau des nativen Kortex. Die Neurone werden randomisiert ausgesät, migrieren in den ersten Tagen der Kultivierung stark und eine große Zahl geht in die Apoptose. Die Ursache der Migration könnte in der Suche nach dem richtigen Verknüpfungspartner liegen. Möglicherweise werden Neurone, die nicht den passenden Partner finden apoptotisch. Nach diesen Prozessen der Selbstorganisation blieben konsolidierte Netzwerke, die sich in ihrer zellulären Struktur und ihrer spontanen Aktivität unterscheiden.

Die Anzahl und Art der Neurone die die Prozeduren der Präparation und Kultivierung überleben, sich selbst organisieren und miteinander verknüpfen, bestimmen die Struktur und damit auch das Aktivitätsmuster eines Netzwerks, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Die Anzahl und Art wiederum hängen von der Randomisierung der Neurone während der Präparation ab. Das erklärt die Einzigartigkeit jedes Netzwerks. Gerade diese Einzigartigkeit ist nicht etwa ein Nachteil sondern der entscheidende Vorteil kortikaler *in vitro*-Netze. Sie ermöglicht die Entdeckung ihrer Ursachen. Die Unterschiede zwischen den Netzwerken können analysiert werden. Ist ein Netzwerk beispielsweise besonders stark synchron aktiv, ein zweites jedoch nicht und das erste besteht zum großen Teil aus Interneuronen das zweite jedoch nicht, lässt sich ein Zusammenhang zwischen zellulärer Struktur und Aktivitätsmuster herstellen und somit auf die Ursache der unterschiedlichen Aktivitätsmuster schließen.

Es wurde gezeigt, dass nicht in jedem Netzwerk alle kortikalen Zelltypen existieren. Zwar koexistieren GABAerge Interneurone, Parvalbumin-positive Interneurone und Pyramidenzellen in vielen Netzwerken, doch gerade in Netzwerken geringer Zelldichte könnte die neuronale Diversität eingeschränkt sein. Viele Neurone, die nicht den richtigen Verknüpfungspartner finden oder nicht an der synchronen Aktivität teilhaben, werden apoptotisch (Voigt *et al.* 1997). Außerdem ist es möglich, dass Neurone zwar im Netzwerk existieren jedoch nicht elektrisch aktiv sind, oder ihre elektrische Aktivität nicht detektiert wird, da sie zu schwach ist, ihre Axone und Zellkörper nicht über einer Elektrode liegen oder der Glia-Teppich als Isolierung zwischen Elektrode und Neuron wirkt. Eine reduzierte Anzahl an verschiedenen Neuronentypen, zu schwache elektrische Aktivität und elektrische Inaktivität können, verglichen mit den Mustern des nativen Kortex, eine reduzierte Anzahl an verschiedenen Aktivitätsmustern zur Folge haben. Daraus folgt, dass eine große Anzahl an Netzwerken untersucht werden muss, um möglichst viele der *in vivo*-Phänomene *in vitro* zu entdecken. Sowohl die zelluläre Vielfalt in den Netzwerken, als auch die Variabilität zwischen ihnen, prädestiniert kortikale *in vitro*-Netzwerke für die Untersuchung grundlegender Prinzipien kortikaler Kommunikation.

4.2. Neurogenese und Präparationszeitpunkt

Schon kleine Details bei der Präparation und Kultivierung primärer Neurone können große Unterschiede bewirken (Banker *et al.* 1998). Je später in ihrer Entwicklung Zellen präpariert werden, desto unwahrscheinlicher ist es, dass sie überleben und sich an eine neue Umgebung anpassen (Marom 2002). Pyramidenzellen und Interneurone unterscheiden sich in ihrer zeitlichen Entwicklung und haben unterschiedliche Ursprungsregionen. Interneurone entwickeln sich später als Pyramidenzellen. Sie sind bei der Geburt des Embryos am embryonalen Tag 19-21 noch unreif (Goffinet *et al.* 2000). Interneurone entwickeln sich aus der ganglionischen Eminenz und migrieren tangential zu ihrem Zielort im Kortex. Pyramidenzellen entwickeln sich aus der Ventrikularzone und migrieren vor allem radial zu ihrem Zielort (Britanova *et al.* 2006, Nadarajah *et al.* 2003, Marin *et al.* 2001, Marin *et al.* 2003, Wonders *et al.* 2006, Parnavelas *et al.* 2002, Hatanaka *et al.* 2002, Corbin *et al.* 2011).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Zeitpunkte der Präparation gewählt. Die Hypothese, dass die Präparation zu unterschiedlichen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung Auswirkungen auf die elektrische Aktivität der Netzwerke haben könnte, stellte sich als richtig heraus. So zeigten E14-16-Netzwerke beinahe ausschließlich synchrone Burst-Aktivität während E11-13-Netzwerke weitaus weniger homogen in ihrem Aktivitätsmuster waren und vor allem instabile Aktivität generierten. E9-Netzwerke zeigten stochastische Spike-Aktivität. Die Ursache dieser Unterschiede könnte in der unterschiedlichen zellulären Zusammensetzung der Netzwerke liegen, die bei der immunozytochemischen Färbung der Netzwerke deutlich wurde.

Bei einer späten Präparation (E14-E20) könnte die Vitalität eines großen Teils der schon weit in ihrer Entwicklung fortgeschrittenen Pyramidenzellen beeinträchtigt werden. Sich später entwickelnde Interneurone überstehen die spätere Präparation möglicherweise besser und tragen somit in den E14-16-Netzwerken zum größten Teil der spontanen Aktivität bei.

Bei einer frühen Präparation (E9-E13) ist der Anteil an Pyramidenzellen und neuronaler Progenitorzellen (Vorläuferzellen mit hoher Regenerationsfähigkeit) mit einer großen Vitalität möglicherweise höher. Das würde zu Netzwerken führen, bei denen die Pyramidenzellen den größten Teil der spontanen Aktivität ausmachen. Die hohe Anzahl an Progenitorzellen würde die stärkere Proliferationsrate in den E11-13-Netzwerken erklären.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Tag der Präparation ein entscheidender Faktor ist, der die Zytoarchitektur und damit das Aktivitätsmuster der Netzwerke beeinflusst.

4.3. Struktur-Funktions-Beziehung

Die grundlegende Frage, die hier versucht wurde zu beantworten, ist die nach dem neuronalen Substrat, das für die verschiedenen Aktivitätsmuster kortikaler *in vitro*-Netzwerke verantwortlich ist. Die Korrelation detaillierter morphologischer Information mit physiologischen Merkmalen spezifischer Neuronen ist ein Schritt hin zum Verstehen der funktionellen Organisation neuronaler Schaltkreise (DeFelipe 2008). Es konnte mittels der Korrelation von Netzwerkstruktur und elektrischem Aktivitätsmuster der Zusammenhang zwischen beiden Eigenschaften belegt werden. Die Unterschiede im Aktivitätsmuster bei unterschiedlicher Anzahl an Interneuronen lässt auf eine Abhängigkeit der Charakteristika der Spontanaktivität von der Zytoarchitektur der Netzwerke schließen. Der methodische und damit zeitliche Aufwand, der zu diesen Ergebnissen führte, ist groß. Vielleicht gibt es aus diesem Grund diesbezüglich kaum publizierte Untersuchungen.

Netzwerke mit zahlreichen Interneuronen zeigten eine relativ stabile synchrone Burst-Aktivität. Im Gegensatz dazu zeigten Netzwerke ohne oder mit nur wenigen Interneuronen stochastische Spike-Aktivität oder instabile Aktivität, die durch den Wechsel verschiedener Aktivitätszustände gekennzeichnet war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Interneurone die relativ stabile Burst-Aktivität verursachen. Die beinahe exakte Übereinstimmung der durch die Kreuzkorrelation bestimmten Anzahl der für die detektierten Signale eines Netzwerks verantwortlichen Neurone mit der Anzahl der markierten und gezählten Parvalbumin-positiven Interneurone, sind ein weiteres Ergebnis, das für diese Schlussfolgerung spricht.

Pyramidenzellen generieren stochastische Spike-Aktivität oder instabile Aktivität, sind jedoch ebenfalls zur Generierung synchroner Aktivität fähig, wie die Experimente zeigten. Kritisch für die Netzwerkaktivität scheint demnach das Verhältnis von Interneuronen zu Pyramidenzellen zu sein. Diese Grundtypen unterscheiden sich im Aufbau ihrer Membranen. Beispielsweise unterscheiden sich die Kaliumkanäle von „Fast-spiking“ Interneuronen und Pyramidenzellen in ihrer Struktur. Diese Unterschiede könnten zu verschiedenen Aktionspotential-Phänotypen führen (Martina *et al.* 1998). Die Zelltyp-spezifische, subzelluläre

Verteilung spannungssensitiver Ionenkanäle (Nusser 2011) und die große Anzahl an Ionenkanal-Typen, die in neokortikalen Neuronen identifiziert wurden (Wilson 1999), deuten auf Unterschiede in den elektrischen Eigenschaften zwischen verschiedenen Neuronentypen hin. Diese Unterschiede könnten für die Variabilität der Aktivitätsmuster der Netzwerke verantwortlich sein.

Die Zuordnung von einzelnen Interneuronen zu ihrem Aktivitätsmuster zeigte, dass identifizierte Parvalbumin-positive Interneurone ausschließlich Burst-Aktivität generierten. Ihre charakteristischen, stark verzweigten Axone mit zahlreichen dünnen Ästen ($<0.5 \mu\text{m}$) könnten die Ursache dafür sein, dass die elektrische Aktivität dieser Neurone mit einer größeren Wahrscheinlichkeit von den MEA-Elektroden detektiert wird als die anderer Neuronentypen, wie z.B. Pyramidenzellen (Stepanyants *et al.* 2004, Debanne 2004). Das würde zu einer erhöhten Detektion der Aktivität von burstenden Interneuronen führen, wenngleich sie nur 10-30% der Neurone in den Netzwerken darstellen. Das Ergebnis dieser Arbeit, dass Parvalbumin-positive Interneurone die synchrone Burst-Aktivität generieren wird außerdem von Studien unterstützt, die zeigen, dass die Generation von synchronen Bursts von einem Sub-Netzwerk bestehend aus einer kleinen Gruppe von Neuronen abhängt (Voigt *et al.* 2001, Mao *et al.* 2001).

Die Kreuzkorrelation zeigte, dass einzelne Interneurone zwar für die Aktivität an verschiedenen Elektroden verantwortlich zeichnen können, dass die synchrone Burst-Aktivität jedoch zahlreiche Neurone erfassen kann. Die Zuordnung einzelner Interneurone zu ihrem Aktivitätsmuster wird hier als ausreichendes Kriterium betrachtet, um zu schlussfolgern, dass alle anderen Neurone des Netzwerks, die an der synchronen Aktivität teilhaben, zum selben Zelltyp gehören. Es ist unwahrscheinlich und es gibt keinen Beweis dafür, dass Neurone mit unterschiedlichen biophysikalischen und elektrophysiologischen Eigenschaften ihre Aktivität synchronisieren können.

Die verschiedenen Aktivitätszustände der Netzwerke ohne oder mit äußerst wenigen Interneuronen ähneln den *in vivo* beobachteten „cortical states“ die auch ohne eine Stimulation spontan auftreten können (Grinvald *et al.* 2002). Eine Korrelation von Zelltyp und Aktivitätsmuster im nativen Kortex ist aufgrund der großen Dichte, in der die verschiedenen Zelltypen zusammenliegen, kaum möglich. *In vitro*-Studien haben daher diesbezüglich eine besondere Bedeutung. Für eine endgültige Verifizierung der beschriebenen Ergebnisse sind weitere Korrelationen durchzuführen. Eine Vorhersage des Aktivitätsmusters bei

bekannter Netzwerkstruktur bzw. der Netzwerkstruktur bei bekanntem Aktivitätsmuster wäre dann möglich.

4.4. Synchroner Spontanaktivität und Interaktionen

In fünf der in dieser Arbeit untersuchten kortikalen Netzwerke inhibierten synchron, mit einer Frequenz von 30-120 Hz (γ -Frequenzbereich und schnelle Oszillationen) burstende Neurone die Aktivität kontinuierlich, mit einer Frequenz von 4-12 Hz (θ - und β -Frequenzbereich) spikender Neurone. Der Rhythmus der synchron burstenden Neurone bestimmte dabei den Rhythmus der kontinuierlich spikenden Neurone. Die Inhibition begann unmittelbar nach dem Beginn eines synchronen Bursts und endete einige Millisekunden nach dessen Ende.

Die Korrelation von Netzwerken mit zahlreichen Parvalbumin-positiven Interneuronen und von einzelnen Parvalbumin-positiven Interneuronen zu ihrem Aktivitätsmuster weist darauf hin, dass diese Neurone die synchrone Burst-Aktivität und damit die Hemmung verursachen. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch die Ergebnisse von Klostermann *et al.*, der zeigte dass die Aktivität von „Fast-spiking“ Basket-Zellen (Parvalbumin-positiv) in Hirnschnitten der Ratte durch spontane Bursts im γ -Frequenzbereich gekennzeichnet ist (Klosterman *et al.* 1999).

Es bleibt die Frage nach der Identität der kontinuierlich spikenden Neurone. Pyramidenzellen feuern mit relativ niedriger Frequenz und unregelmäßig ähnlich der inhibierten Neurone in den Netzwerken. In der Ratte sind Parvalbumin-positiv Neurone vor allem in der Nähe der Zellkörper von großen Pyramidenzellen in Schicht 5 des Kortex lokalisiert (Uematsu 2008). In der Zellkultur bedecken GABAerge Neurone große Bereiche und umgeben die Somata nicht-GABAerger Neurone (Lima de 1997). Im nativen Kortex können große GABAerge oszillierende Netzwerke die Entladung von Pyramidenzellen blockieren (Buzsáki *et al.* 1995). Spezifische Typen von Interneuronen können die Aktivität von Pyramidenzellen im Hippocampus kontrollieren und ihre Entladungen zeitlich steuern und synchronisieren (Somogyi 2005). Interneurone können außerdem den Zeitpunkt zu dem eine Pyramidenzelle feuert bestimmen (Jefferys *et al.* 1996). Diese Fakten deuten darauf hin, dass die gehemmten, kontinuierlich spikenden Neurone in den untersuchten *in vitro*-Netzwerken Pyramidenzellen sind. Es gibt jedoch auch andere Neuronentypen, die in ähnlicher Weise gehemmt werden. Beispielsweise Oriens-lancunosum moleculare (O-LM)-Zellen,

die während Ripple-Episoden im Hippocampus inhibiert werden (Klausberger *et al.* 2003).

Schon Donald Hebb entdeckte synchron feuernde Schrittmacher-Neurone im Kortex (Hebb 1949). GABAerge, Parvalbumin-positive Interneurone bilden ein durch Gap-Junctions verbundenes Netzwerk im zerebralen Kortex und generieren synchrone Aktivität im γ -Frequenzbereich (Voigt *et al.* 2001, Fukuda 2007). Γ -Oszillationen spielen eine Rolle bei der Koordination neuronaler Aktivität wie in theoretischen Modellen und Hirnschnitt-Experimenten gezeigt wurde (Fries *et al.* 2007; Otte *et al.* 2010). Interaktionen zwischen Rhythmen in γ - und θ -Frequenz sowie synchrone Aktivität sind für das Lernen und die Erinnerung von grundlegender Bedeutung (Jutras 2010, Kahana *et al.* 2001). Diese Ergebnisse ähneln der hier beschriebenen Burst-induzierten Inhibition und weisen auf ihre mögliche Bedeutung hin.

Unterschiedliche Neuronentypen unterscheiden sich in ihren Resonanzeigenschaften. Ihre charakteristischen Zelltyp-spezifischen Membraneigenschaften führen zu einem bevorzugten Antwort-Verhalten auf Eingänge bestimmter Frequenzen. So haben Pyramidenzellen eine besondere Empfänglichkeit für Oszillationen im θ -Frequenzbereich während inhibitorische Interneurone eine bevorzugte Resonanz im γ -Frequenzbereich zeigen (Llinas 1988, Silva *et al.* 1991, Pike *et al.* 2000, Zemankovics *et al.* 2010). Die Frequenz des synchronen Burstens der in dieser Arbeit untersuchten Netzwerke lag im γ -Frequenzbereich während das kontinuierliche Feuern im θ -Frequenzbereich lag.

Spontane Burst-Aktivität in der CA3-Region des Hippocampus verursacht eine Verringerung der Aktivität in den Dendriten von CA1-Pyramidenzellen und führt zu Aktionspotentialen in Interneuronen (Buzàki *et al.* 2012). Dieses aktuelle Forschungsergebnis der Buzàki-Gruppe zeigt eine Auswirkung spontaner Aktivität ähnlich der hier beschriebenen Inhibition von Pyramidenzellen durch synchrones Bursten von Interneuronen. Die Synchronizität des Burstens wird möglicherweise durch elektrische Felder vermittelt. Schon 1978 entdeckten Noebels und Prince, dass während stark synchroner Aktivität große lokale extrazelluläre Ströme Aktionspotentiale in benachbarten axonalen Endigungen auslösen können (Noebels *et al.* 1978).

Bezüglich des Mechanismus der Burst-induzierten Inhibition wird hier die Hypothese aufgestellt, dass das durch das kollektive Feuern zahlreicher Interneurone generierte elektrische Feld die Inhibition verursacht. Dieses elektrische Feld könnte spannungssensitive Ionenkanäle in der Membran von

Pyramidenzellen beeinflussen und so ihre Aktivität hemmen. Anastassiou *et al.* demonstrierte kürzlich, dass schwache elektrische Felder (1mV/mm) ephaptisch vermittelte Veränderungen im Membranpotential von Pyramidenzellen auslösen können (Anastassiou *et al.* 2011). Das unmittelbare Auftreten der Inhibition nach dem Beginn eines synchronen Bursts spricht ebenfalls für einen elektrischen Effekt und gegen die chemische synaptische Transmission, die bedingt durch die synaptische Verzögerung mehr Zeit benötigt.

Inhibitorische Interaktionen zwischen verschiedenen Neuronentypen während der Spontanaktivität von *in vitro*-Netzwerken wurden bisher nicht beschrieben. Die Spontanaktivität von vier Wochen kultivierten Netzwerken wird gewöhnlich als synchrone Burst-Aktivität, die sich über das gesamte Netzwerk ausbreitet charakterisiert (Wagenaar *et al.* 2006, Pelt *et al.* 2004, Jimbo 2007, Baltz *et al.* 2010). Eine große Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Netzwerke generierte ebendiese synchrone Burst-Aktivität. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Ursache für diese Aktivitätsform möglicherweise im Alter der präparierten Embryonen und der resultierenden zellulären Netzwerkstruktur liegt und dass die spontanen Aktivitätsmuster kortikaler *in vitro*-Netzwerke weitaus vielfältiger sind.

Im nativen zerebralen Kortex wie auch in den hier untersuchten Netzwerken entsteht der Großteil der elektrischen Aktivität spontan, unabhängig von externer sensorischer Stimulation. „The neocortex communicates first and foremost within itself.“ (Nieuwenhuys 1994). Diese endogene Aktivität ist für die Informationsverarbeitung, das Gedächtnis und die Generierung neuer Information essentiell. Eine Funktion dieser Aktivität könnte die Inhibition benachbarter Neurone sein, die zur Bildung abgegrenzter Erregungsbahnen führen würde. Die synchrone Aktivität zahlreicher Interneurone als Basis der Burst-induzierten Inhibition könnte ein Mechanismus für das „selective routing of signals across densely interconnected networks“ sein (Singer 2009).

4.5. Chemische und elektrische Manipulation

Um die Bedeutung der verschiedenen Wege der Signaltransmission zu untersuchen, wurde die chemische synaptische Transmission durch den Entzug extrazellulären Kalziums manipuliert, Gap Junctions wurden blockiert und die Netzwerke wurden extrinsischen, elektrischen Feldern ausgesetzt.

Der Austausch des Kulturmediums mit kalziumfreiem Medium während der Detektion der Spontanaktivität führte zum unmittelbaren Stop der Burst-

Aktivität. Die Aktivität der zuvor burstenden Neurone erlosch vollständig oder ging in eine geringe stochastische Spike-Aktivität über. Demzufolge war Kalzium für die Generation der Bursts essentiell. In den zuvor kontinuierlich spikenden Neuronen führte der Medienaustausch zu einer Zunahme der Aktivität und zu einem Aktivitätsmuster, das durch kurze Bursts gekennzeichnet war.

Ein ähnlicher Effekt wurde in Hirnschnitten des Hippocampus der Ratte nach dem Entzug des extrazellulären Kalziums und der damit einhergehenden Blockade der chemischen synaptischen Transmission beobachtet. Nach der Blockade synchronisierten Pyramidenzellen ihre Aktivität zu sogenannten „field-bursts“, dem spontanen, synchronen feuern von Aktionspotentialen in sehr schnellen Abfolgen. Als Ursache wird die Blockade der Aktivität Kalzium-abhängiger, inhibitorischer Interneurone vorgeschlagen (Jefferys *et al.* 1982). Der Mechanismus der Synchronisierung der Aktivität der Pyramidenzellen könnte das elektrische Übersprechen (Krnjevic *et al.* 1986) oder die Übertragung durch axoaxonale Gap Junctions sein (Traub *et al.* 1999).

„Fast-spiking“, Parvalbumin-positive Basket-Zellen haben eine hohe Kalzium-Puffer-Kapazität, exprimieren Kalzium-permeable Glutamat-Rezeptoren und generieren Kalzium-Oszillationen (Aponte *et al.* 2008). Diese Ergebnisse zeigen die starke Kalzium-Abhängigkeit dieses Neuronentyps und könnten den inhibitorischen Effekt des Kalzium-Entzugs aus dem Extrazellulärraum auf die Aktivität erklären.

Neurone, die in der Lage sind ohne die Kalzium-abhängige chemische synaptische Transmission Aktionspotentiale zu generieren gelten als intrinsisch aktiv. Sie gehören zu einer Unterklasse der Pyramidenzellen und benötigen persistente Natrium-Ströme für ihre Aktivität (Mao *et al.* 2001, Le Bon-Jego 2007). In den hier untersuchten Netzwerken zeigten die kontinuierlich spikenden Neurone eine starke intrinsische Aktivität. Das deutet auf ihre Identität hin und lässt vermuten, dass diese Neurone Pyramidenzellen sind. Dieses Ergebnis ist ein zusätzliches Indiz dafür, dass die gehemmten, kontinuierlich spikenden Neurone der beschriebenen Burst-induzierten Inhibition Pyramidenzellen sind. Die Ursache für die Zunahme ihrer Aktivität nach dem Entzug des Kalziums könnte in der Unterdrückung der synchronen Burst-Aktivität der Kalzium-abhängigen, Parvalbumin-positiven Interneurone und der damit einhergehenden Enthemmung der Pyramidenzellen liegen.

Der in dieser Arbeit benutzte Gap Junction Blocker Mefloquin blockiert Connexin 36-, 43- und 50-Gap Junctions (Cruikshank *et al.* 2004, Juszczak *et al.* 2009).

Der Einsatz des Mefloquins führte ebenso wie die Gap Junction-Blocker Carbenoxolon und Quinin zu einer allgemeinen Abnahme der Netzwerk-Aktivität und zu einer Verringerung der Dauer und der Anzahl der Bursts. Diese Ergebnisse weisen auf die Notwendigkeit der Gap Junctions für die Ausbreitung der Spontanaktivität hin. Da Gap Junctions vor allem Interneurone verbinden, bestärken die Ergebnisse die Vermutung, dass Interneurone primär für die Generation synchroner, spontaner Burst-Aktivität verantwortlich sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die beobachteten Veränderungen in der elektrischen Aktivität durch unspezifische Nebeneffekte der verwendeten Substanzen verursacht wurden (Behrens *et al.* 2011).

Die bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnisse von Untersuchungen zur Auswirkung elektrischer Felder auf das Wachstum und die elektrische Aktivität von Neuronen sind zwar vielfältig, doch bezüglich des Verstehens der Funktion elektrischer Felder bei der neuronalen Kommunikation sind kaum Fortschritte zu verzeichnen. Die Effekte der Stimulation sind sowohl auf der Ebene einzelner Neurone, als auch auf der Ebene neuronaler Ensembles kaum verstanden. Bis heute ist der Mechanismus der tiefen Hirnstimulation nicht vollständig aufgeklärt.

Die mit den Impulsgeneratoren erzeugten elektrischen Felder hatten keine oder nur geringe Auswirkungen auf kortikale *in vitro*-Netzwerke. Extrazelluläre Felder kleiner Amplitude und niedriger Frequenz, appliziert mittels trans-kranialer elektrischer Stimulation können jedoch messbare Auswirkungen auf neuronale Aktivität und kognitive Funktionen haben (Ozen *et al.* 2010, Marshall *et al.* 2006). Auch das Wachstum neuronaler Axone ist durch elektrische Felder beeinflussbar (McCaig 1990, Patel *et al.* 1984, Cork *et al.* 1994). Warum gab es bei der Stimulation der Netzwerke keinen signifikanten Effekt? Die gewählten Stimationsparameter könnten trotz der Orientierung an der Fachliteratur für die *in vitro*-Netzwerke nicht biologisch relevant sein. Bestehen diese vor allem aus Interneuronen, die möglicherweise selbst mittels elektrischer Felder andere Zellen beeinflussen, ist es denkbar, dass sie selbst schwer durch externe elektrische Felder ähnlicher Parameter zu beeinflussen sind. Eine weitere Ursache könnte in der Leitfähigkeit des Kulturmediums (300 μ l) liegen, dass sich über dem Netzwerk befindet. Diese liegt bei 1,5 S/m und ist damit wesentlich größer als die neuronalen Gewebes oder neuronaler Membranen, jedoch ähnlich der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (Gabriel *et al.* 1996). Eine Voraussetzung für die Beeinflussung neuronaler Membranen durch elektrische Felder ist nach Krnjevic eine niedrige extrazelluläre Leitfähigkeit bzw. ein hoher extrazellulärer Widerstand (Krnjevic 1986). Die Neurone des relativ planaren Netzwerks liegen

in geringer Dichte vor, verglichen mit der hohen Dichte des nativen Kortex. Die fehlende Isolierung und der große extrazelluläre Raum beeinflussen möglicherweise die Effektivität der Stimulation (Claverol-Tinture *et al.* 2002). Das Absterben der Neurone bei großer Pulsamplitude und geringer Pulsfrequenz wurde möglicherweise durch elektrochemische Reaktionen an den Masselektroden des Neurochips, zwischen denen die Impulse erzeugt wurden, ausgelöst (Gimsa *et al.* 2004). Die nur bei wenigen, einzelnen Neuronen beobachteten Effekte der Stimulation könnten ein Hinweis auf die Präferenz verschiedener Neuronentypen für elektrische Felder spezifischer Charakteristika sein.

Neurone generieren extrazelluläre Felder, doch ist die Nachahmung dieser Felder, das Finden von biologisch relevanten Parametern, die zu einer Beeinflussung führen, bisher kaum gelungen. Es bleibt die Aufgabe, die Eigenschaften der von Neuronen und neuronalen Gruppen generierten Felder genau zu bestimmen, sie nachzuahmen und verschiedene Neuronentypen diesen Feldern auszusetzen.

4.6. Elektrischer Feldeffekt und elektrisches Übersprechen als Mechanismus neuronaler Informationsverarbeitung

Nach einer Zeit der Vernachlässigung elektrischer Phänomene finden seit einigen Jahren Versuchsansätze zur Untersuchung von Gehirnmechanismen, die in Richtung nichtsynaptischer Mechanismen, elektrischer Felder und Oszillationen tendieren, größere Beachtung (Anastassiou *et al.* 2011, Buzsàki *et al.* 2012, Krnjevic 1986, Krnjevic 2005). Mit der chemischen, synaptischen Transmission allein sind viele Ergebnisse schwer zu interpretieren. Die Vielfalt der Oszillationen und ihre Korrelation mit sensorischen und motorischen Phänomenen weist auf ihre Bedeutung hin (Buzsàki *et al.* 2012). Bekannt ist, daß lokale elektrische Felder, die durch die kooperative Aktivität zahlreicher Neurone entstehen, den zeitlichen Verlauf neuronaler Aktivität individueller Neurone beeinflussen (Anastassiou *et al.* 2010). Anastassiou zeigte außerdem mit Hilfe eines 12 Patchelektroden-Aufbaus, daß ephaptische Interaktionen zur Synchronisierung von Aktionspotentialen führen können (Anastassiou 2011). Die Bedeutung dieser Ergebnisse hinsichtlich der kortikalen Informationsverarbeitung ist jedoch weiterhin ungeklärt.

Die Forschungsergebnisse die in dieser Arbeit dargelegt sind, weitere eigene Ergebnisse, die eben aufgeführten aktuellen Ergebnisse von Anastassiou sowie Literaturstudien führten zur Entwicklung einer Theorie kortikaler

Informationsverarbeitung die auf dem elektrischen Feldeffekt bzw. auf dem elektrischen Übersprechen beruht und die eine mögliche Funktion elektrischer Felder bei der Informationsverarbeitung im zerebralen Kortex aufzeigt. Diese Theorie wird hier dargelegt:

*Die kortikale Informationsverarbeitung findet durch die Interaktion inhibitorischer Interneuronen-Netze und exzitatorischer Pyramidenzell-Netze statt. Diese Interaktion wird vor allem durch elektromagnetische Felder verursacht, nicht durch die chemische synaptische Transmission. Aktivierte und spontan aktive Interneuronen-Netzwerke erzeugen durch kollektive, synchrone Aktivität definierte elektrische Felder bzw. lokale Feldpotentiale. Diese Felder wirken inhibitorisch auf die Aktivität benachbarter Pyramidenzellen. Aus der Summation und Überlagerung der elektrischen Felder zahlreicher Interneurone, der hohen Frequenz der Aktionspotentiale (γ -Frequenzband und schnelle Oszillationen) und der unmittelbaren Nähe zu Pyramidenzellen resultiert die Effektivität der Felder. Die elektrischen Felder wirken außerdem an chemischen Synapsen. Die Inhibition der exzitatorischen Pyramidenzellen führt zur Begrenzung der Ausbreitung ihrer Aktivität und somit zu spezifischen, räumlich begrenzten Erregungsbahnen. Diese Begrenzung ermöglicht eine differenzierte, eingangabhängige Informationsverarbeitung und einen adäquaten Ausgang. Die Minderheit an Interneuronen (20%) kann so die Aktivität einer Überzahl an Pyramidenzellen „kontrollieren“ (**Abb.25**).*

Es gibt zahlreiche Fakten und Hinweise die für diese Theorie sprechen. Die oben beschriebene Inhibition von Pyramidenzellen durch die synchrone Burst-Aktivität der Interneurone könnte durch elektrische Felder verursacht werden. Das zeitlich beinahe synchron einsetzende Bursten und das unmittelbar folgende Aussetzen der Spike-Aktivität spricht für eine elektrische Kopplung bzw. einen elektrischen Effekt. Die Verzögerung an der chemischen Synapse (synaptic delay) beträgt etwa 2-3 ms. Die schnelle Ausbreitung der Burst-Aktivität zwischen Interneuronen könnte über die elektrische Kopplung der Interneurone über Gap Junctions oder elektrische Felder erfolgen, die Inhibition der Aktivität der Pyramidenzellen, die kaum über Gap Junctions mit Interneuronen verbunden sind, über elektrische Felder.

Interneurone haben im Gegensatz zu Pyramidenzellen, die lange gerichtete, auch in subkortikale Areale projizierende Axone besitzen, stark lokal verzweigte Axone die den Kortex nicht verlassen (Nieuwenhuys 1994, Braitenberg *et al.* 1998). Axone GABAerger Interneurone besitzen mehr Natriumkanäle und sind leichter

erregbar (Martina *et al.* 2000, Forti *et al.* 2000). Sie sind anders als Pyramidenzellen extensiv über Gap Junctions verknüpft. Interneurone könnten in ihren Kommunikationsprinzipien demnach eher elektrisch ausgerichtet sein, Pyramidenzellen chemisch. Die Funktion der zwischen Pyramidenzellen liegenden Interneurone könnte in der ephaptischen, lokalen Inhibition liegen.

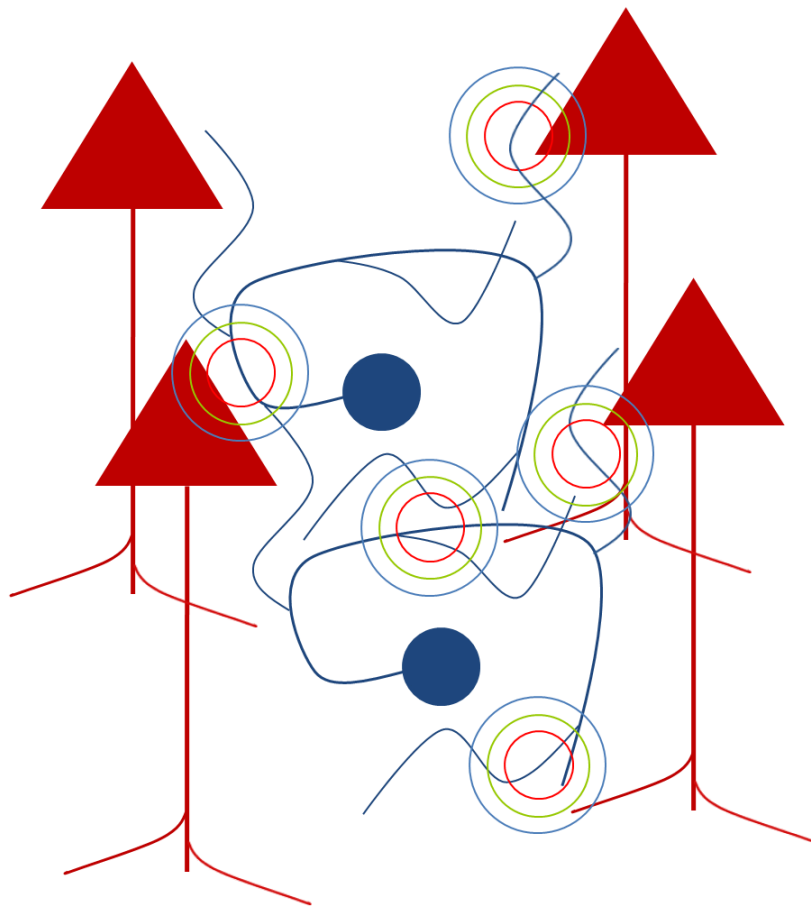


Abb.25 Elektrische Interaktionen zwischen Interneuronen und Pyramidenzellen. Inhibitorische Interneurone (blau) beeinflussen die Aktivität von Pyramidenzellen (rot) durch elektrisches Übersprechen und Feld-Effekt-Interaktionen. Die extrazellulären Felder der Interneurone sind schematisch als Kreise (rot, grün, blau), die Zellkörper der Interneurone als blau gefüllte Kreise, die der Pyramidenzellen als rot gefüllte Dreiecke dargestellt. Aus den Zellkörpern entspringt jeweils ein Axon. Die Axone der Interneurone sind stark lokal verzweigt, die der Pyramidenzellen eher gerichtet. Aus Gründen der Vereinfachung sind die Dendriten beider Zellklassen nicht dargestellt. Elektrisches Übersprechen bewirkt eine spezifische, lokale Inhibition der Aktivität benachbarter Pyramidenzellen. Feld-Effekt-Interaktionen entstehen durch die Summation und Überlagerung extrazellulärer Felder zahlreicher Neurone und führen zu einer Inhibition größerer Bereiche (nicht dargestellt).

Nichtsynaptische Mechanismen, wie Interaktionen durch den elektrischen Feldeffekt, wurden während der synchronen Aktivität bei epileptischen Anfällen sowie während kollektiver neuronaler Aktivität von Pyramidenzellen im Hippocampus beobachtet (Dudek *et al.* 1998, Snow *et al.* 1986, Taylor *et al.* 1984, Vigmond *et al.* 1997). Elektrische Interaktionen existieren außerdem zwischen Mauthner-Zellen sowie zwischen Basket- und Purkinje-Zellen des Kleinhirns der Ratte (Weiss *et al.* 2008, Korn *et al.* 1980). Sie können neuronale Synchronisierung im Zeitbereich von Millisekunden bewirken. Dagegen benötigen chemische Mechanismen mehrere 10 Millisekunden (Jefferys 1995). Die Theorie findet ebenfalls Unterstützung durch die Ergebnisse der Untersuchungen von Feldpotentialen in der CA3-Region des Hippocampus. Dort generieren Interneurone im Gegensatz zu Pyramidenzellen spontane, ausgedehnte inhibitorische Feldpotentiale an den zahlreichen, vor allem an den Somata und Dendriten der Pyramidenzellen verteilten Endigungen. Dabei ist die Feldverteilung von der Verteilung der Endigungen abhängig (Bazelot 2010). Diese Ergebnisse sprechen für eine elektrische Ausrichtung spezifischer Interneurone und für den beschriebenen Mechanismus der inhibitorischen Interaktion. Untersuchungen von Trevelyan zeigen, dass Interneurone relativ große, inhibitorische Potentiale erzeugen können, die für die Mehrzahl der mit der Elektroenzephalographie (EEG) detektierten Signale verantwortlich sind (Trevelyan 2009).

Trotz des Konsens, der über die Bedeutung der chemischen, synaptischen Transmission herrscht, ist die Frage, inwieweit und in welchem Verhältnis chemische und elektrische Phänomene bei der kortikalen Informationsverarbeitung beteiligt sind, weiterhin offen. Die Existenz von gemischten Synapsen, die zur chemischen und elektrischen Transmission fähig sind, weist auf eine mögliche Kombination beider Mechanismen hin (Peters *et al.* 1991, Surchev 1992). Die zahlreichen nicht-synaptisch endenden axonalen Varikositäten, die in der Großhirnrinde bei nicht-Pyramidenzellen vorkommen, deuten auf eine Funktion dieser Kompartimente hin (Vizi 2003, Vizi *et al.* 2004). Hier wird, im Gegensatz zur Interpretation von Vizi, der den Effekt von Transmittern, die an nicht-synaptischen Varikositäten freigesetzt werden, auf nicht-synaptische Rezeptoren, als Mechanismus interneuronaler Kommunikation propagiert, die Hypothese aufgestellt, dass die Funktion der Varikositäten sowie der zahlreichen nicht-synaptisch endenden, teilweise äußerst feinen axonalen Seitenäste der Interneurone, in der präzisen Verbreitung elektrischer Felder und der resultierenden lokalen Inhibition liegt.

Elektrische Felder könnten auch an chemischen Synapsen wirken. Das nicht unbestrittene, von Ranvier beschriebene „Springen“ von Aktionspotentialen von Schnürring zu Schnürring erfolgt über mehrere Mikrometer. An einem synaptischen Spalt von 20 nm zwischen Pre- und Postsynapse mit einer großen Anzahl an synaptischen, spannungssensitiven Ionenkanälen sollte demzufolge eine elektrische Beeinflussung möglich sein.

Axone im Kortex sind nicht myelinisiert. Sie können somit extrazelluläre Felder generieren und sind diesen ausgesetzt. Die Symptome der Multiplen Sklerose, die mit einer Demyelinisierung von Hirnbereichen einhergeht, könnten auf eine pathologische Synchronisierung, hervorgerufen durch elektrisches Übersprechen zwischen demyelinisierten Axonen, zurückzuführen sein (Kesselring 1985).

Die hier aufgestellte Theorie stellt eine neue Sichtweise dar. Dabei wird die besondere Bedeutung der chemischen Transmission nicht in Frage gestellt. Gerade bei Lernprozessen ist sie für die synaptische Plastizität essentiell. Der Mechanismus der schnellen Informationsverarbeitung, die keine synaptischen Veränderungen erfordert, könnte jedoch die schnellere und effektivere, rein elektrische Interaktion zwischen Pyramidenzellen und Interneuronen sein. Neben der Rolle elektrischer Felder bei der Synchronisierung neuronaler Aktivität, wird die inhibitorische Wirkung der aus der Synchronisierung resultierenden, elektrischen Felder postuliert.

Relevanz und Ausblick

Das Verstehen der nativen Spontanaktivität ist eines der größten Herausforderungen der Neurowissenschaften. Die hier entdeckte Inhibition, verursacht von rhythmischem, synchronen Bursten, könnte eine Funktion spontaner Aktivität sein. Die Zuordnung dieser Aktivität zum Neuronentyp der Parvalbumin-positiven Interneurone ist ein weiterer Schritt hin zum Verstehen der Eigenschaften der verschiedenen kortikalen Neuronentypen. Relevant sind diese Ergebnisse neben der neurobiologischen Grundlagenforschung ebenso für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Die Kenntnis der Funktion und der elektrophysiologischen Eigenschaften spezifischer Neuronentypen kann gezielte neurologische Eingriffe ermöglichen. Neuroimplantate, die den richtigen Zelltyp hemmen oder stimulieren, könnten entwickelt werden. Parvalbumin-positiv Interneurone stehen in Verbindung mit der Generation anormaler, synchroner Aktivität wie sie bei Epilepsie beobachtet wird (Freund *et al.* 2007). Beinahe jede psychiatrische Erkrankung ist mit einem Fehler in der rhythmischen neuronalen Aktivität verknüpft (Buzàki 2006). Die Arbeit liefert einen Hinweis auf den Mechanismus der tiefen Hirnstimulation der möglicherweise in der Inhibition von exzitatorischen Neuronen liegen könnte. Für das Anwendungsgebiet der Neurotoxizitätstestung, für das das System aus Netzwerk und Chip heute bereits Anwendung findet, wäre eine Studie zur Entwicklung von Standardmethoden zur Bestimmung der zellulären Struktur der Netzwerke von großer Bedeutung. Die Ergebnisse könnten die Untersuchung der Wirkung von Substanzen auf verschiedene Neuronentypen ermöglichen. Wünschenswert wäre eine Fortsetzung der Versuche mit dem Ziel, eine noch größere Anzahl an Netzwerken morphologisch sowie elektrophysiologisch zu charakterisieren, um die beschriebenen Zusammenhänge endgültig zu verifizieren. Das Nachahmen elektrischer Felder kortikaler Interneurone und die Untersuchung der Auswirkungen dieser Felder auf Pyramidenzellen könnte die aufgestellte Theorie zur Informationsverarbeitung ohne chemische synaptische Transmission bestätigen.

Bibliografie

- Anastassiou CA, Montgomery SM, Barahona M, Buzsàki G, Koch C (2010) The effect of spatially inhomogeneous extracellular electric fields on neurons. *J. Neurosci.* 30:1925–1936.
- Anastassiou CA, Perin R, Makram H, Koch C (2011) Ephaptic coupling of cortical neurons. *Nature Neurosci.* 14:217–223.
- Aponte Y, Bischofberger J, Jonas P. (2008) Efficient Ca²⁺ buffering in fast-spiking basket cells of rat hippocampus. *J. Physiol.* 586:2061–2075.
- Armstrong CM, Hille B (1998) Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20:371–380.
- Bakkum DJ, Gamblen PM, Ben-Ary G, Chao ZC, Potter SM (2007) MEART: The semi-living artist. *Front. Neurorobot.* 1:1–10.
- Baltz T, Lima de AD, Voigt T (2010) Contribution of GABAergic interneurons to the development of spontaneous activity patterns in cultured neocortical networks. *Front. Neurosci.* 4:1–17.
- Banker G, Goslin K (Eds.) (1998) *Culturing nerve cells*. 2nd ed. MIT press London.
- Bazelot M, Dinocourt C, Cohen I, Miles R (2010) Unitary field potentials in the CA3 region of rat hippocampus. *J. Physiol.* 588.12:2077–2090.
- Behrens CJ, Ui Hag R, Liotta A, Anderson ML, Heinemann U (2011) Nonspecific effects of the gap junction blocker mefloquine on fast hippocampal network oscillations in the adult rat in vitro. *Neuroscience* 192:11–9.
- Bhattacharya J, Petsche H, Pereda E (2001) Long-range synchrony in the γ -band: role in music perception. *J. Neurosci.* 21:6329–6337.
- Braitenberg V, Schüz A (1998) *Cortex: Statistics and geometry of neuronal connectivity*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Briggman KL, Denk W (2006) Towards neural circuit reconstruction with volume electron microscopy techniques. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16:562–570.
- Britanova O, Alifragis P, Junek S, Jones K, Gruss P, Tarabykin V (2006) A novel mode of tangential migration of cortical projection neurons. *Dev. Biol.* 298(1):299–311.
- Brown SP, Hestrin S. (2009) Cell-type identity: a key to unlocking the function of neocortical circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19:415–421.
- Buehler SM, Bonk M, Stubbe M, Nissen M, Reimer T, Gimsa J, Sensors for glass cell-culture chips (GC³) for the replacement of animal experiments. under preparation.
- Buskila Y, Dudek FE (1993) Neuronal synchronization without calcium-dependent synaptic transmission in the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3207–3210.
- Buzsàki G (2006) *Rhythms of the brain*. Oxford Univ. Press.
- Buzsàki G, Chrobak JJ (1995) Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5:504–510.
- Buzsàki G, Draguhn A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304:1926–1929.

- Buzsàki G, Silva FL (2012) High frequency oscillations in the intact brain. *Prog. Neurobiol.* doi:10.1016, 2012.02.004
- Buzsàki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Rev.* 13:407-420.
- Cantero JL, Atienza M (2005) The role of neural synchronization in the emergence of cognition across the wake-sleep cycle. *Rev. Neurosci.* 16(1):69-83.
- Claverol-Tinture E, Pine J (2002) Extracellular potentials in low-density dissociated neuronal cultures. *J. Neurosci. Methods* 117:13-21.
- Corbin JG, Butt SJB (2011) Developmental mechanisms for the generation of telencephalic interneurons. *Dev. Neurobiol.* 71:710-732.
- Cork RJ, McGinnis ME, Tsai J, Robinson KR (1994) The growth of PC 12 neurites is biased toward the anode of an applied electrical field. *J. Neurobiol.* 25:1509-1516.
- Cohen AH, Rossignol S, Grillner S (1988) Neural control of rhythmic movements in vertebrates. Wiley, NY.
- Cruikshank SJ, Hopperstad M, Younger M, Connors BW, Spray DC, Srinivas M (2004) Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(33):12364-9.
- Cruikshank SJ, Landisman CE, Mancilla JG, Connors BW (2005) Connexon connexions in the thalamocortical system. *Prog. Brain Res.* 149:41-57.
- Dale HH (1965) Some recent extensions of the chemical transmission of the effects of nerve impulses. in *Nobel Lectures 1922–1941*, New York, Elsevier, pp 402–413.
- Debanne D (2004) Information processing in the axon. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:304-316.
- DeFelipe J (2002) Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog. Brain Res.* 136:215-38.
- DeFelipe J (2008) The neuroanatomist's dream, the problems and solutions, and the ultimate aim. *Front. Neurosci.* 2:10-12.
- DeFelipe J (2010) *Cajal's butterflies of the soul*. Oxford University Press.
- DeMarse TB, Wagenaar DA, Blau AW, Potter SM (2001) The neurally controlled animat: biological brains acting with simulated bodies. *Autonomous Robots* 11:305-310.
- Doller HJ, Weight FF. (1983) Perforant pathway activation of hippocampal CA1 stratum pyramidale neurons: electrophysiological evidence for a direct pathway. *Brain Research* 237:1-13.
- Dudek FE, Yasumura T, Rash JE (1998) Non-synaptic mechanisms in seizures and epileptogenesis. *Cell Biol. Int.* 22:793-805.
- Eccles JC (1976) From electrical to chemical transmission in the central nervous system. *Notes. Rec. R. Soc. Lond.* 30:219–230.
- Eccles JC (1884) The cerebral neocortex: a theory of its operation. in: *Cerebral Cortex Vol.2: Functional properties of cortical cells*. Jones EG, Peters A, (Eds.) pp. 1-32.
- Engel AK, Fries P, Singer W (2001) Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(10):704-716.
- Faber DS, Korn H (1989) Electrical field effects: their relevance in central neural networks. *Physiol. Rev.* 69:821-863.

- Fonseca M, Soriano E, Ferrer I, Martinez A, Tunon T (1993) Chandelier cell axons identified by parvalbumin-immunoreactivity in the normal human temporal cortex and in alzheimer's disease. *Neuroscience* 55:1107-1116.
- Forti L, Pouzat C, Liano I (2000) Action potential-evoked Ca^{2+} signals and calcium channels in axons of developing rat cerebellar interneurons. *J. Physiol. (Lond.)* 527:33-48.
- Friedman D, Strowbridge BW (2002) Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 98:2601-2610.
- Fries P, Nikolic D, Singer W. 2007. The gamma cycle. *Trends Neurosci.* 30:309-316.
- Fukuda T, Kosaka T (2000) The dual network of GABAergic interneurons linked by both chemical and electrical synapses: a possible infrastructure of the cerebral cortex. *Neurosci. Res.* 38:123-130.
- Fukuda T, Kosaka T (2003) Ultrastructural Study of Gap Junctions Between Dendrites of Parvalbumin-Containing GABAergic Neurons in Various Neocortical Areas of Adult Rat. *Neuroscience* 120:5-20.
- Fukuda T, Kosaka T, Singer W, Galuske RAW (2006) Gap Junctions among dendrites of cortical GABAergic neurons establish a dense widespread intercolumnar network. *J. Neurosci.* 26:3434-3443.
- Fukuda T. (2007) Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex. *The Neuroscientist* 13:199-207.
- Gabriel C, Gabriel S, Corthout E (1996) The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey. *Phys. Med. Biol.* 41:2231-2249.
- Galarreta M, Hestrin S (1999) A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402:72-75.
- Galarreta M, Hestrin S (2001) Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nature Rev. Neurosc.* 2:425-32.
- Gibson JR (1999) Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in the neocortex. *Nature* 402:75-79.
- Gimsa J, Habel B, Schreiber U, van Rienen U, Strauss U, Gimsa U (2005) Choosing electrodes for deep brain stimulation experiments-electrochemical considerations. *J. Neurosci. Meth.* 142:251-265.
- Goffinet AM, Rakic P eds. (2000) *Mouse brain development*. Springer, Berlin-Heidelberg.
- Gramowski A, Stüwe S, Jügelt K, Schiffmann D, Loock J, Gross GW, Schröder O, Weiss DG (2005) Detecting neurotoxicity through electrical activity changes of neuronal networks on multielectrode neurochips. *ALTEX* 23 Suppl.:410-415.
- Gray CM, König P, Engel AK, Singer W (1989) Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature* 338:334-337.
- Grinvald A, Arieli A, Tsodyks M, Kenet T (2002) Neuronal assemblies: single cortical neurons are obedient members of a huge orchestra. *Biopolymers* 68:422-436.
- Gross GW, Kowalski JM (1999) Origins of activity patterns in self-organizing neuronal networks in vitro. *J. Intel. Mat. Sys. Struct.* 10:558-64.
- Gross GW (1994) Internal dynamics of randomized mammalian neuronal networks in culture. in *Enabling technologies for cultured neural networks*, Stenger A, McKenna TM (Eds.) Academic Press, NY.

Gross GW, Rieske E, Kreutzberg GW, Meyer A (1977) A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity *in vitro*. *Neurosc. Lett.* 6:101-05.

Hatanaka Y, Murakami F (2002) *In vitro* analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.* 454:1-14.

Hebb DO (1949) *The organization of behavior: a neuropsychological theory.* Wiley, NY.

Hestrin S, Galarreta M (2005) Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *TINS* 28:304-9.

Jefferys JGR, Haas HL (1982) Synchronized bursting of CA1 pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature Lond.* 300:448-450.

Jefferys JGR (1995) Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions. *Physiol. Rev.* 75:689-723.

Jefferys JGR, Traub RD, Whittington MA (1996) Neuronal networks for induced 40 Hz rhythms. *TINS.* 5:202-208.

Jimbo Y (2007) MEA-based recording of neuronal activity *in vitro*. *Arch. Ital. Biol.* 145:289-297.

Johnstone AFM, Gross GW, Weiss DG, Schroeder OHU, Gramowski A, Shafer TJ (2010) Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century. *Neurotoxicology* 31:331-350.

Jones KE, Campbell PK, Normann RA (1992) A glass silicon composite intracortical electrode array. *Ann. Biomed. Eng.* 20:423-437.

Juszczak GR, Schwiergiel AH (2009) Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33(2):181-98.

Jutras MJ, Buffalo EA (2010) Synchronous neural activity and memory formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20:150-155.

Kahana MJ, Seelig D, Madsen JR (2001) Theta returns. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11(6):739-744.

Kamioka H, Maeda E, Jimbo Y, Robinson HPC, Kawana A (1996) Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neurosci. Lett.* 206:109-112.

Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principles of Neural Science* (4th ed.). McGraw-Hill, New York.

Kawaguchi Y, Kondo S (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystikinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J. Neurocytol.* 31:277-287.

Kesselring J (1985) Paroxysmale Phänomene bei der multiplen Sklerose. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 115: 1054-1059.

Klostermann O, Wahle P (1999) Patterns of spontaneous activity and morphology of interneuron types in organotypic cortex and thalamus-cortex cultures. *Neuroscience* 92:1243-1259.

- Korn H, Axelarad H (1980) Electrical inhibition of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6244-6247.
- Korn H, Faber DS (1980) Electrical field effect interactions in the vertebrate brain. *TINS* 3:6-9.
- Krnjevic K, Dalkara T, Yim C (1986) Synchronization of pyramidal cell firing by ephaptic currents in hippocampus in situ. *Adv. Exp. Med. Biol.* 203:413-423.
- Krnjevic K (1986) Ephaptic interactions: a significant mode of communications in the brain. *NIPS* 1:28-29.
- Krnjevic K (2005) From soup Physiology to normal brain science. *J. Physiol.* 569.1:1-2.
- Le Bon-Jego M, Yuste R (2007) Persistently active, pacemaker-like neurons in neocortex. *Front. Neurosci.* 1:123-129.
- LeBeau FEN, Traub RD, Monyer H, Whittington MA, Buhl EH (2003) The role of electrical signaling via gap junctions in the generation of fast network oscillations. *Brain Res. Bull.* 62:3-13.
- Legendy CR, Salcman M (1985) Bursts and recurrences of bursts in the spike trains of spontaneously active striate cortex neurons. *J. Neurophysiol.* 53:926-939.
- Lima de AD, Voigt T (1997) Identification of two distinct populations of γ -aminobutyric acidergic neurons in cultures of rat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 288:526-540.
- Llinas R (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242:1654-1664.
- Maeda E, Robinson PC, Kawana A (1995) The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons. *J. Neurosci.* 15:6834-6845.
- Makram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:793-807.
- Mao BQ, Hamzei-Sichani F, Aronov D, Froemke RC, Yuste R (2001) Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* 32:883-898.
- Marin O, Rubenstein JLR (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26:441-483.
- Marin O, Rubenstein JLR (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nature Rev.* 2:780-790.
- Marom S, Shahaf G (2002) Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy. *Q. Rev. Biophys.* 35:63-87.
- Marshall L, Helgadottir H, Molle M, Born J (2006) Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature* 444:610-613.
- Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Monyer H, Jonas P (1998) Functional and molecular differences between voltage gated K^+ Channels of fast spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J. Neurosci.* 18:8111-8125.
- Martina M, Vida I, Jonas P. (2000) Distal initiation and active propagation of action potentials in interneurones dendrites. *Science* 287:295-300.
- Maynard EM, Nordhausen CT, Normann A (1997) The Utah electrode array: a recording structure for potential brain-computer interfaces. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 102: 228-239.
- McCaig CD (1990) Nerve branching is induced and oriented by a small applied electric field. *J. Cell Sci.* 95:605-615.

- Mercer A, Bannister AP, Thomson AM (2006) Electrical coupling between pyramidal cells in adult cortical regions. *Brain Cell Biol.* 35:13-17.
- Molnar Z, Cheung AFP (2006). Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci. Research* 55:105-15.
- Montgomery EB Jr, Gale J (2008) Mechanisms of action of deep brain stimulation (DBS). *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32(3):388-407.
- Morin FO, Takamura Y, Tamiya E (2005) Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives. *J. Biosci. Bioeng.* 100:131-143.
- Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG (2003) Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb. Cortex* 13:607-61.
- Nakanishi K, Kukita F (1998) Functional synapses in synchronized bursting of neocortical neurons in culture. *Brain Research* 795:137-146.
- Nieuwenhuys R (1994) The neocortex. *Anat. Embryol.* 190:307-337.
- Noebels JL, Prince DA (1978) Development of focal seizures in cerebral cortex: role of axon terminal bursting. *J. Neurophysiol.* 41:1267-1281.
- Normann RA (2007) Technology insight: future neuroprosthetic therapies for disorders of the nervous system. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 3:444-452.
- Nowak K, Mix E, Gimsa J, Strauss U, Sriperumbudur KK, Benecke R, Gimsa U (2011) Optimizing a rodent model of Parkinson's disease for exploring the effects and mechanisms of deep brain stimulation. *Parkinsons Dis.* 2011. doi: 10.4061/2011/414682, 1-20.
- Nusser Z (2011) Differential subcellular distribution of ion channels and the diversity of neuronal function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22:1-6.
- O. Loewi (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I. *Pflügers Archiv* 189: 239-242.
- Otte S, Hasenstaub A, Callaway EM (2010) Cell type-specific control of neuronal responsiveness by gamma-band oscillatory inhibition. *J. Neurosci.* 30:2150-2159.
- Ozen S, Sirota A, Bellucio MA, Anastassiou CA, Stark E, Koch C, Buzàki G. (2010) Transcranial electric stimulation entrains cortical neuronal populations in rats. *J. Neurosci.* 30:11476-11485.
- Parnavelas JG, Alifragis P, Nadarajah B (2002) The origin and migration of cortical neurons. *Prog. Brain Res.* 136:73-80.
- Patel NB, Poo MM (1984) Perturbation of the direction of neurite growth by pulsed and focal electric fields. *J. Neurosci.* 4:2939-2847.
- Pelt van J, Wolters PS, Corner MA, Rutten WLC, Ramakers GJA (2004) Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 51:2051-62.
- Peters A, Palay SL, Webster HF (1991) *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells.* 3.ed. Oxford University Press.
- Pike FG, Goddard RS, Suckling JM, Ganter P, Kasthuri N, Paulsen O (2000) Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurons in response to oscillatory currents. *J. Physiol.* 592:205-213.

- Pine J (1980) Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *J. Neurosci. Meth.* 2:19-31.
- Potter SM, DeMarse TB (2001) A new approach to neural cell culture for long-term studies. *J. Neurosci. Methods* 110:17-24.
- Reimer T (2006) "Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen synaptischer Transmission und dem axonalen Transport in kortikalen neuronalen Netzwerken in vitro" Univ. Rostock, Diplomarbeit.
- Rozental R, Giaume C, Spray DC (2000) Gap junctions in the nervous system. *Brain Res. Rev.* 32:11-15.
- Schüz A, Palm G (1989) Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 286:442-455.
- Shahaf G, Marom S (2001) Learning in networks of cortical neurons. *J. Neurosci.* 21:8782-8788.
- Silva LR, Amitai Y, Connors BW (1991) Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer five pyramidal neurons. *Science* 251:432-435.
- Somogyi P, Klausberger T. (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol.* 562.1:9-26.
- Singer W. 2009. Distributed processing and temporal codes in neuronal networks. *Cogn. Neurodyn.* 3:189-196.
- Srinivas M, Hopperstad MG, Speay DC (2001) Quinine blocks specific gap junction channel subtypes. *PNAS USA* 98:10942-10947.
- Stepanyants A, Tamàs G, Chklovskii DB (2004) Class-specific features of neuronal wiring. *Neuron* 43:251-259.
- Surchev L (1992) Freeze-etched postsynaptic membranes in the visual cortex reveal different types of synapses including mixed synapses. *Brain Research* 573:174-178.
- Szentágothai J (1989) *Modulare Organisation nervöser Zentralorgane, vor allem der Hirnrinde.* Westdeutscher Verlag, Opladen.
- Tamas G, Buhl EH, Lorincz A, Somogyi P (2000) Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nature Neurosci.* 3:366-371.
- Taylor CP, Dudek FE (1984) Synchronization without active chemical synapses during hippocampal afterdischarges. *J. Neurophysiol.* 52: 143-154.
- Thomas CA, Springer PA, Loeb GW, Berwald-Netter Y, Okun LM (1972) A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp. Cell Res.* 74:61-66.
- Traub RD, Schmitz D, Jefferys JGR, Draguhn A (1999) High-frequency population oscillations are predicted to occur in hippocampal pyramidal neuronal networks interconnected by axoaxonal gap junctions. *Neuroscience* 92:407-426.
- Traub RD, Whittington MA, Buhl EH, LeBeau FEN, Bibbig A, Boyd S, Cross H, Baldeweg T (2001) A possible role for gap junctions in generation of very fast EEG oscillations preceding the onset of, and perhaps initiating seizures. *Epilepsia* 42(2):153-70.
- Traub RD, Bibbig A, LeBeau FEN, Buhl EH, Whittington MA (2004) Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro. *Annu. Rev. Neurosci.* 27:247-78.

Traub RD, Kopell N, Bibbig A, Buhl EH, LeBeau FEN, Whittington MA (2001) Gap Junctions between interneuron dendrites can enhance synchrony of gamma oscillations in distributed networks. *J. Neurosci.* 21:9478-9586.

Traub RD, Draguhn A, Whittington MA, Baldeweg T, Bibbig A, Buhl EH, Schmitz D (2002) Axonal gap Junctions between principal neurons: a novel source of network oscillations, and perhaps epileptogenesis. *Rev. Neurosci.* 13:1-30.

Trevelyan AJ (2009) The direct relationship between inhibitory currents and local field potentials. *J. Neurosci.* 29:676-682.

Uematsu M, Hirai Y, Karube F, Ebihara S, Kato M, Obata K, Yoshida S, Hirabayashi M, Yanagawa Y, Kawaguchi Y (2008) Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic Venus-Expressing Rats. *Cereb. Cortex.* 18:315-330.

Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J (2001) The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(4):229-239.

Vigmont EJ, Velazquez JLP, Valiante TA, Bardakjian BL, Carlen PL (1997) Mechanisms of electrical coupling between pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 78:3107-3116.

Vizi ES (2003) Non-synaptic interaction between neurons in the brain, an analog system: far from Cajal-Sheringtons's galaxy. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* 158:373-380.

Vizi ES, Kiss JP, Lendvai B (2004) Nonsynaptic communication in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 4:443-451.

Voigt T, Baier H, Lima de AD (1997) Synchronization of neuronal activity promotes survival of individual rat neocortical neurons in early development. *Eur. J. Neurosci.* 9:990-999.

Voigt T, Opitz T, Lima de AD. (2001) Synchronous oscillatory activity in immature cortical network is driven by GABAergic preplate neurons. *J. Neurosci.* 21:8895-8905.

Wagenaar DA, Pine J, Potter SM (2006) An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neuroscience* 7:11.

Wang Y, Makram H, Goodman PH, Berger TK, Ma J, Goldman-Rakic PS (2006) Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. *Nature Neurosci.* 9:534-542.

Weiss SA, Preuss T, Faber DS (2008) A role of electrical inhibition in sensorimotor integration. *PNAS* 105: 18047-18052.

Wilson HR (1999) Simplified dynamics of human and mammalian neocortical neurons. *J. Theor. Biol.* 200:375-388.

Wonders CP, Stewart AA (2006) The origin and specification of cortical interneurons. *Nature Rev. Neurosci.* 7:687-696.

Xiang G, Pan L, Huang L, Yu Z, Song X, Cheng J, Xing W, Zhou Y (2007) Microelectrode array-based system for neuropharmacological applications with cortical neurons cultured in vitro. *Biosens. Bioelectron.* 22:2478-2484.

Xu X, Roby KD, Callaway EM (2010) Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J. Comp. Neurol.* 518:389-404.

Zemankovics R, Káli S, Paulsen O, Freund TF, Hájos N (2010) Differences in subthreshold resonance of hippocampal pyramidal cells and interneurons: the role of h-current and passive membrane characteristics. *J. Physiol.* 588.12:2109-2132.

Publikationen und Vorträge

Vorträge

1. Reimer T (20.03.2009) „Signal transmission in cortical neuronal networks growing on miniaturized neurochips“, welisa-workshop 1, Warnemünde
2. Reimer T (06.11.2009) „Signal transmission in cortical neuronal networks“, welisa-workshop 2, Graal-Müritz
3. Reimer T (03.06.2010) „Cortical neuronal networks on neurochips – a model system for understanding the universals of neuronal communication“, welisa-workshop 3, Gollwitz
4. Reimer T, Gimsa J (16.09.2010) „Neuronal networks in miniaturized neurochips as a system for the analysis of neuronal communication“ 6. Materials' Days 2010 Rostock, www.materials-days.eu/matdays10/Oeresund_Brokerage/View_Project_Idea.php
5. Reimer T (18.10.2011) „Correlation of cellular structure and the electrical activity of cortical neuronal networks growing on MEA neurochips“, welisa-workshop 5, Groß Breesen
6. Gimsa J, Weihe T, Reimer T (10.11.2011) „Von Neuronenverstehern und Zellenflüsterern“ Ringvorlesung der Interdisziplinären Fakultät der Universität Rostock „Elektroimpulse und Implantate“
7. Reimer T (19.11.2012) „Kortikale neuronale Netzwerke auf Multielektrodenarrays als reduktionistischer Ansatz zur Aufklärung der Funktionsprinzipien des zerebralen Kortex“ welisa-workshop 7, Wustrow

Veröffentlichungen in Tagungsbänden und Posterpräsentationen

1. Lüder M, Salomon R, Reimer T (2009) iCAMS: An FPGA-based system for the REAL-time monitoring of the activity of in-vitro cells. 32nd Annual German Conference on Artificial Intelligence, Paderborn, *in*: Mertsching B, Hund M, Aziz Z (Eds.) (2009) KI 2009: Advances in artificial intelligence, vol. 5803, ISBN: 978-3-642-04617-9 (e-book), ISBN: 978-3642046162 (print), Springer, Berlin-Heidelberg (Poster, Veröffentlichung)
2. Reimer T, Baumann W, Gimsa J (2010) Burst – induced inhibition in low density cortical neuronal networks *in vitro*. 7th FENS Forum, Amsterdam, FENS Abstr., vol. 5, 130.66, Session 130 – Network interactions 1 (Poster, Veröffentlichung)

3. Reimer T, Baumann W, Koester PJ, Gimsa J (2010) Burst-induced inhibition in low density cortical neuronal networks *in vitro*. 7th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, Reutlingen, *in*: Stett A (Ed.) Proceedings MEA Meeting 2010, ISBN 3-938345-08-5, pp. 66-67 (Poster, Veröffentlichung)
4. Koester PJ, Tautorat C, Reimer T, Zwanzig M, Baumann WH, Gimsa J (2010) Gold Shark Teeth structures on MEAs - Electroplating of Nano-structures on Metallic Microelectrodes. 7th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, Reutlingen, *in*: Stett A (Ed.) Proceedings MEA Meeting 2010, ISBN 3-938345-08-5, pp. 289-290 (Poster, Veröffentlichung)
5. Van Rienen U, Appali R, Bader R, Baumann W, Beck U, Behrend D, Benecke R, Biala K, Birkholz H, Burkel E, Engel G, Ewald H, Gimsa J, Gimsa U, Gongadze E, Grünbaum A, Haba Y, Liese F, Liu B, Lüder M, Matschegewski C, Mittelmeier W, Mix E, Nebe JB, Nowak KA, Pahnke J, Pau HW, Pauleweit S, Petersen S, Polnick S, Reimer T, Rott G, Salomon R, Vinter E, Weihe T, Wolkenhauer O (2010) Analysis and simulation of electrical interactions of implants with bio-systems. Biomed Tech 2010, vol. 55 (Suppl.1), ISSN 1862-278X, DOI: 10.1515/BMT.2010.712, pp. 167-170 (Poster, Veröffentlichung)
6. Reimer T, Baumann W, Koester PJ, Gimsa J (2010) Gap Junction-vermittelte Signaltransmission in kortikalen neuronalen Netzwerken kultiviert auf Neurochips. Biomed Tech 2010, vol. 55 (Suppl.1), ISSN: 1862-278X, DOI: 10.1515/BMT.2010.588, pp. 33-35 (Poster, Veröffentlichung)
7. Reimer T, Gimsa J (2011) „Das Gehirn auf dem Chip“ Highlights der Physik 2011, Rostock, Veranstaltungsreihe für Bildung und Forschung (BMBF) und der Deutschen Physikalischen Gesellschaft (DPG), <http://www.dpg-physik.de/presse/highlights/index.html>, (Poster, Infostand)
8. Reimer T, Baumann W, Gimsa J (2012) Are bursting neurons interneurons? 8th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, Reutlingen, *in*: Stett A, Zeck G (Eds.) Proceedings MEA Meeting 2012, ISSN 2194-5519, pp. 57-58 (Poster, Veröffentlichung)
9. Reimer T, Baumann W, Gimsa J (2012) Spontaneous activity patterns of cortical *in vitro* networks depend on cellular network composition. 8th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, Reutlingen, *in*: Stett A, Zeck G (Eds.) Proceedings MEA Meeting 2012, ISSN 2194-5519, pp. 98-99 (Poster, Veröffentlichung)
10. Nissen M, Bühler SM, Bonk SM, Stubbe M, Reimer T, Baumann W, Gimsa J (2012) Sensors for Glass Cell-Culture Chips (GC³). 8th Int. Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, Reutlingen, *in*: Stett A, Zeck G (Eds.) Proceedings MEA Meeting 2012, ISSN 2194-5519, p. 290 (Poster, Veröffentlichung)

Journal-Veröffentlichungen


1. Reimer T, Baumann W, Gimsa J (2012) Population bursts of parvalbumin-positive interneurons inhibit spiking pyramidal cells in spontaneously active cortical *in vitro* networks. J. Chem. Chem. Eng. 6:1033-1042.
2. Reimer T (2012) Are neurons Huygens' clocks? eingereicht.

Preise

1. Winner of the "best picture award", MEA-Meeting 2010
2. Winner of the "best picture award", MEA-Meeting 2012

Danksagung

Den Betreuern dieser Arbeit Prof. Dr. habil. Jan Gimsa sowie Dr. Werner Baumann sei hiermit herzlich für ihre Hilfe und Unterstützung, ihre Anregungen und für die gewährten Freiheiten gedankt.

Der DFG danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs  .

Frau Prof. Ursula van Rienen als vorsitzende Sprecherin des Graduiertenkollegs danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung und das Zustandekommen des Kollegs.

Sämtlichen welisa-Stipendiaten sei hiermit für ihre Anregungen und Diskussionen während der Workshops und für das nette Miteinander gedankt.

Herr Dr. Peter Lorenz aus der Abteilung für Immunologie der Medizinischen Fakultät und PD Dr. Sergei A. Kuznetsov aus dem Lichtmikroskopiezentrum danke ich für die Organisation der Mikroskopieterminen.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biophysik Rostock sei hiermit herzlich für alle Unterstützung gedankt.

Meiner Frau bin ich wie schon während der Zeit meiner Diplom-Arbeit zu außerordentlichem Dank verpflichtet. Sie war immer da wenn ich sie brauchte und musste meine Launen während der nicht immer leichten Zeit ertragen. Danke.

Meinen Kindern danke ich für ihr Lachen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Kortikale neuronale Netzwerke auf Multielektrodenarrays als reduktionistischer Ansatz zur Aufklärung der Funktionsprinzipien des zerebralen Kortex“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe sowie ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Die vorliegende Arbeit wurde in dieser oder anderer Form bisher nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt.