

Aus dem Institut für Physiologie der Universitätsmedizin der Johannes- Gutenberg-Universität
Mainz

Die Reifung der GABAergen Inhibition und die Änderung
des Verhältnisses an inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen in
neokortikalen Neuronenkulturen.

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Cécilia Marie Ahtner aus Heidelberg

Mainz, 2020

Tag der Promotion: 14.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung.....	10
2. Literaturdiskussion.....	11
2.1. Ursprung und Entwicklung der GABAerge Neurone.....	11
2.2. GABA und sein GABA _A Rezeptor.....	11
2.3. Die Rolle von GABA bei der Zellmigration.....	12
2.4. GABA: von der Exzitation zur Inhibition.....	12
2.5. Die Bedeutung von GABA in der neuronalen Netzwerkaktivität.....	15
2.6. Das Inhibitions-/Exzitations-Verhältnis.....	16
3. Material und Methoden.....	18
3.1. Schematische Darstellungen der Versuche.....	18
3.2. Die Tiere.....	20
3.3. Protokoll für die Bestimmung des zeitlichen E/I-Wechsels.....	20
3.3.1. Immunzytochemie.....	21
3.3.2. NKCC1 und KCC2 mRNA Nachweis/ qPCR.....	23
3.4. VU und Furosemid Versuch.....	26
3.5. Alamar blue cell viability test.....	26
3.6. Protokolle für die Kulturen mit verändertem E/I-Verhältnis.....	27
3.7. Elektrophysiologie.....	30
3.8. Statistiken.....	31
4. Ergebnisse.....	32
<i>Teil I: In vitro Bestimmung des zeitlichen GABAergen E/I-Wechsels.....</i>	<i>32</i>

4.1.	Bestimmung der GABAergen Antwort auf der elektrophysiologischen Ebene ...	32
4.2.	Bestimmung der GABAergen Antwort auf der mRNA-Ebene	38
4.3.	Bestimmung der GABAergen Antwort auf der Proteinebene.....	39
4.4.	Vu und Furosemid Versuch	43
4.5.	Alamar blue cell viability test	47
<i>Teil II: FACS-basierte Bildung der in vitro Kulturen mit verändertem E/I-Verhältnis</i>		<i>49</i>
4.6.	Protokollauswahl für den FACS	49
4.7.	Nervenzelldichte.....	50
4.8.	PO versus PEI	51
4.9.	Die Zelltrennung mit dem FACS	52
4.10.	FACS mit WT Mäuse	54
4.11.	Qualität der Sortierung	55
4.12.	Cell-death viability test.....	57
4.13.	Elektrophysiologie	58
5.	Diskussion.....	60
<i>Teil I: In vitro Bestimmung des zeitlichen GABAergen E/I-Wechsels.....</i>		<i>60</i>
5.1.	Bestimmung der GABAergen Antwort auf der elektrophysiologischen Ebene ...	60
5.2.	Bestimmung der GABAergen Antwort auf der mRNA Ebene	62
5.3.	Bestimmung der GABAergen Antwort auf der Proteinebene.....	62
5.4.	VU und Furosemid Versuch.....	62
5.5.	Alamar blue cell viability test	63
<i>Teil II: FACS-basierte Bildung der in vitro Kulturen mit verändertem E/I-Verhältnis</i>		<i>64</i>
5.6.	Protokollauswahl für den FACS	64
5.7.	Nervenzelldichte.....	64
5.8.	PO versus PEI	65
5.9.	Qualität der Sortierung	65

5.10. Cell death viability test	66
5.11. Elektrophysiologie	66
6. Klinische Relevanz	68
7. Limitationen	69
8. Zusammenfassung.....	71
Literaturverzeichnis.....	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Abbildung der Änderung der GABAergen Polarität während der Entwicklung (Ben-Ari, 2014).....	14
Abbildung 2 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die zeitliche Eingrenzung des GABAergen E/I-Wechsels.	18
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Protokolls für die GAD-67-GFP Populationen mit verändertem E/I-Verhältnis mittels FACS.	19
Abbildung 4 Zyklus der quantitativen Echtzeit PCR	24
Abbildung 5 Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Mediums- und Zusatzes-Wechsel während der elektrophysiologischen Messungen.....	25
Abbildung 6 Elektrische Aktivität der Zellkultur am TIV 7-8 vor und nach Gabazin-Zugabe. ...	34
Abbildung 7 Elektrische Aktivität der Zellkultur am TIV 13-15 vor und nach Gabazin-Zugabe.	35
Abbildung 8 Elektrische Aktivität der Zellkultur am TIV 20-21 vor und nach Gabazin-Zugabe.	36
Abbildung 9 Boxplots zur Wirkung von Gabazin auf die gemessenen Aktionspotential-Frequenzen und auf die Anzahl aktivierter Neurone.....	37
Abbildung 10 Vergleich der mRNA-Mengenänderung von Synaptophysin, NKCC1 und KCC2 über 3 Wochen.....	38
Abbildung 11 Immunhistochemie von primären kortikalen Mausneuronen am TIV 7.	39
Abbildung 12 Immunhistochemie von primären kortikalen Mausneuronen am TIV 14.	40
Abbildung 13 Immunhistochemie von primären kortikale Mausneuronen am TIV 21.	41
Abbildung 14 Aktionspotential-Frequenz und Änderung der Anzahl an aktiven Neuronen nach VU- oder Furosemid-Zugabe.	43
Abbildung 15 Veränderung der elektrischen Aktivitätsmuster nach Furosemid-Behandlung.	45
Abbildung 16 Veränderung der elektrischen Aktivitätsmuster nach VU-Behandlung.	46
Abbildung 17 Alamar blue cell viability test.....	47
Abbildung 18 Neuronenpopulation auf Deckzellen TIV 7-8 von Mäusen PO-P1.....	50
Abbildung 19 Aufnahmen von Nervenzellpopulationen nach PEI-/PO-Vorbehandlung der MEA Chips.	51
Abbildung 20 Neuronen-Trennung mit der ARIA III Software.	53

Abbildung 21 Neuronentrennung mit der FACS ARIA III Software von Wildtyp Mäusen.....	54
Abbildung 22 Qualität der Sortierung dargestellt mit Kastengraphik und exemplarische Kulturaufnahmen mit unterschiedlichem E/I-Verhältnis.....	56
Abbildung 23 Immunfärbungen von getrennten Populationen am TIV 8 für den cell-death viability test.	57
Abbildung 24 Anteil an lebenden Populationen auf die gesamte Anzahl an Populationen und Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen.	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Listung der primären Antikörper und der Fluoreszenzfarbstoffe	22
Tabelle 2 Listung der sekundären Antikörper	22
Tabelle 3 Primer für die quantitative Echtzeit PCR	24
Tabelle 4 Zusammensetzung der ACSF Lösung	25
Tabelle 5 gemittelte Fluoreszenzintensität von KCC2 am TIV 7, TIV 14 und 21	42
Tabelle 6 gemittelte Differenz der alamar blue cell viability Testergebnisse am TIV 7 und TIV 14.....	48

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACSF	Artificial cerebrospinal fluid
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure
ANOVA	Analysis of variance, dt. einfache Varianzanalyse
AP	Aktionspotential
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
Cl ⁻	Chlorid
cDNA	Komplementäre DNA
cENOS	Cortical early network oscillations
cGDP	Cortical giant depolarizing potential
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E(x)	Bezeichnung zum Embryonalzeitpunkt
E/I o. exzi./inhibi	Verhältnis von exzitatorisch zu inhibitorisch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescent activated cell sorting
FSC	Forward Scatter
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAD-67-GFP	Glutamat decarboxylase -67- green fluorescent protein
GAT	Gamma aminobuttersäure Transporter
GFP-	Green fluorescent protein negativ
GFP+	Green fluorescent protein positif
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazin-1-ethanschwefelsäure
Hz	Herz
K ⁺	Kalium
KCC2	K ⁺ /2Cl ⁻ Transporter

MAP2	Microtubule-associated protein2
MEA	Mikroelektroden-Array
MEM	Minimal Essential Medium
Min.	Minute
Mittl.	Mittleren
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NKCC1	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ Transporter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht Signifikant
P(x)	Bezeichnung zum postnatalen Zeitpunkt
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PO	Polyornithin
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
SSC	Side scatter
Tab.	Tabelle
TIV	Tag in vitro
u.a.	Unter anderem
USF-1	Upstream stimulatory Factor 1
UV-	Licht Ultraviolett-Licht
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Kortikale GABAerge Neurone entstehen aus Vorläuferzellen der kaudalen und medialen ganglionären Vorwölbung des embryonalen Telencephalons und migrieren im Verlauf zur Kortikalplatte (Lavdas et al., 1999, Luhmann et al., 2018). Während des Migrationsvorganges bildet sich ein Verhältnis von exzitatorischen zu inhibitorischen Neuronen aus, welches etwa 80% zu 20% beträgt und im reifen Kortex fortbesteht (Meinecke and Peters, 1987, Sahara et al., 2012).

Zudem ändern GABAerge Neurone während der Entwicklung ihre Antwort von einer unreifen, exzitatorischen Antwort hin zur reifen, überwiegend inhibitorischen, GABAerge Antwort. Die NKCC1-/KCC2-Kotransporter sowie die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration sind an diesem Vorgang beteiligt (Ben-Ari, 2002, Halbhuber et al., 2019).

Die Balance zwischen dem zerebralen exzitatorischen und inhibitorischen Schenkel ist unabdingbar, um nervale elektrische Ströme zu erhalten. Sie spielt eine wesentliche Rolle in der Ausbildung spontaner kortikaler Aktivitäten, somatosensorisch evozierter Potentiale, in der Gedächtnisbildung oder innerhalb der synaptischen Plastizität (Vogels et al., 2011, Yu et al., 2014). Eine Dysfunktion kann sich in diversen neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie z.B. Epilepsie, Schizophrenie, Depression oder Autismus äußern (Luhmann et al., 2015) .

Ein Ziel dieser Dissertation bestand darin, den Zeitpunkt des Wechsels von der unreifen, exzitatorischen GABAergen Antwort hin zur reifen, inhibitorischen GABAergen Antwort bei Mäusen zu ermitteln. Des Weiteren setzten wir uns zur Aufgabe, ein Protokoll zu etablieren, womit es möglich ist, primäre neokortikale Neuronenkulturen mit unterschiedlichem exzitatorischen/inhibitorischen Verhältnis nach einer FACS-basierten Sortierung zu generieren.

2. Literaturdiskussion

2.1. Ursprung und Entwicklung der GABAerge Neurone

GABAerge Neuronen entstehen in der kaudalen und medialen ganglionären Vorwölbung des embryonalen Telencephalons aus Vorläuferzellen, die sogenannten *subplate* Neuronen (Lavdas et al., 1999, Luhmann et al., 2018). Im Verlauf der zerebralen Entwicklung migrieren sie zunächst tangential in Richtung Kortex und anschließend radial zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort (Anderson et al., 1997). Im Laufe dieses Vorgangs erwerben sie ihre biochemischen Eigenschaften, sodass eine Vielfalt von über 50 Interneuronen (Zeisel et al., 2015, Harris et al., 2018) mit unterschiedlichen strukturellen, morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften entsteht (Markram et al., 2004). Es wird diskutiert, dass die Migration die Synapto- und Morphogenese beeinflussen könnte (Wamsley and Fishell, 2017, Lim et al., 2018).

GABAerge Zellen existieren bereits zwischen dem Embryonalzeitpunkt 11-13 (E11-E13) bei Mäusen oder zwischen E13-E15 bei Ratten und sind ab dem E21 in der Kortalplatte (bei Ratten) nachweisbar (Cancedda et al., 2007, Luhmann et al., 2015). Die Lokalisation GABAerger Neurone in den Laminae corticales wird u.a. durch neuronale Aktivität (De Marco García et al., 2011) und Präsenz von exzitatorischen Neuronen beeinflusst (Lodato et al., 2011)

2.2. GABA und sein GABA_A Rezeptor

GABA (γ -Aminobuttersäure) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ausgereiften Gehirn und wird von GABAergen Neuronen ausgeschüttet. Er bindet beispielsweise an ionotrope GABA_A/GABA_C und metabotrope GABA_B Rezeptoren. Die GABA_A Rezeptoren existieren bereits sehr früh in der Entwicklung (LoTurco et al., 1995, Galanopoulou, 2008, López-Bendito et al., 2002). Nach Vollendung der zerebralen Reifung ist der GABA_A R. der häufigste Rezeptor im Gehirn. Dieser ionotrope Rezeptor ist für Cl⁻ und HCO₃⁻ durchlässig und erlaubt die Bildung spontaner, elektrischer Aktivitäten im unreifen Kortex. Ebenso verhindert er im reifen Gehirn eine übermäßige neuronale Exzitation und beeinflusst das „*spike timing*“ von individuellen Neuronen. In den Basalganglien und im Kleinhirn moduliert er die Motorik (Bewegungsausmaß und -Ablauf) und spielt eine große Rolle bei der Schlaferhaltung im Thalamus. Er hilft sogar bei der Konsolidierung des Gedächtnisses durch Langzeitpotenzierungen im Hippocampus (Craig and McBain, 2014).

2.3. Die Rolle von GABA bei der Zellmigration

Während des Zellmigrationsvorganges (Ratte: 13.-21. Tag Post-Conceptionem (PC); Mensch: 2.-5. Monat PC (Rice and Barone, 2000)) kann GABA die Migration fördern oder über GABA_A Rezeptoren die Migration der oberflächlich gelegenen Neuronen hemmen. Sie sind ebenso an der kortikalen Laminierung beteiligt, indem sie die Cajal-Retzius Zellen beeinflussen (Ogawa et al., 1995, Kirischuk et al., 2014, Blanquie et al., 2017). Eine Dysfunktion des GABAergen Systems durch Alkohol oder Medikamente kann in einen Verlust der kortikalen Laminierung enden, Störungen des Migration-Vorganges bewirken und letztendlich zu neuropsychiatrischen Erkrankungen führen (Gressens et al., 2001, Luhmann et al., 2015, Miller, 1986). Neuere Erkenntnisse erbrachten, dass nicht nur GABA aus Neuronen die Migration beeinflusst, sondern auch GABA aus endothelialen Zellen. Es konnte bei der Maus gezeigt werden, dass ein Mangel an endotheliale GABA während der Embryogenese zu vaskulären Defekten und einer Beeinträchtigung des Migrationsvorganges führte. Dies bewirte eine falsche Positionierung der GABAerge Neuronen in den kortikalen Schichten, woraus sich Verhaltensstörungen ergaben (Li et al., 2018).

Die Zellmigration wird beendet, wenn der GABAerge E/I-Wechsel stattgefunden hat (Bortone and Polleux, 2009, de Lima et al., 2009).

2.4. GABA: von der Exzitation zur Inhibition

Früh in der Entwicklung des neuronalen Netzwerkes wird die spontane elektrische Aktivität, wie es bei Nagern nachgewiesen worden ist, über gap junctions, AMPA/NMDA und GABA_A Rezeptoren gesteuert (Khazipov et al., 2004, Allène et al., 2008, Kilb et al., 2011, Murata and Colonnese, 2020). Die GABAergen Neurone sind in der Entwicklungsgeschichte Teil der ersten Neurone, welche durch ihre „Taktgeber-Funktion“ früh elektrische Aktivität aufweisen und elektrische Muster bilden (Picardo et al., 2011). Hierfür ist u.a. die Umwandlung der GABAergen Antwort von einer frühen exzitatorischen in eine spätere, überwiegend inhibitorische Antwort nötig (Farrant and Kaila, 2007, Kirmse et al., 2015). Dieser exzitatorischen/inhibitorischen-Wechsel ist in vielen Spezies, wie z.B. Würmer, Hühner oder Fröschen, vorhanden (Ben-Ari et al., 2007). Beeinflusst wird der E/I-Wechsel von NKCC1- und KCC2-Kotransportern, die eine Änderung der intrazellulären Cl⁻ Konzentration verursachen (Rivera et al., 1999, Khirug et al., 2010, Liu et al., 2019). Somit sind in unreifen Neuronen die einwärts transportierenden Cl⁻-Transporter NKCC1 im Gegenteil zu den KCC2-Transportern, die das Cl⁻ auswärts transportieren, in überwiegender Anzahl zu finden. Der NKCC1-

Transporter benutzt den Natrium Gradienten, der primär über die Na⁺/ K⁺-ATPase gebildet wird und tauscht es gegen extrazelluläres Cl⁻ aus, sodass sich die intrazelluläre Cl⁻ Konzentration erhöht (Yamada et al., 2004, Murata and Colonnese, 2020). Wenn GABA an seinem GABA_A Rezeptor andockt, folgt Cl⁻ seinem Gradienten und strömt aus der Zelle, wodurch die Zelle depolarisiert und Ca²⁺ ausschüttet (Ben-Ari, 2014, Luhmann et al., 2014). Im reifen Gehirn ändert sich das Verhältnis von NKCC1 zu KCC2, wobei der KCC2-Transporter-Anteil überwiegt. Funktionsfähig wird der Transporter erst am Ende der Migration, wenn die Neuronen reif sind (Li et al., 2002). Der KCC2-Transporter befördert K⁺ und Cl⁻ nach extrazellulär, sodass die intrazelluläre Cl⁻ Konzentration sinkt. Bei Eintreffen eines Aktionspotentials folgt Cl⁻ seinem Gradienten und strömt in die Zelle. Somit wirkt GABA inhibierend und kann auf diese Weise den Migrationsvorgang beenden (Abb.1) (Bortone and Polleux, 2009, de Lima et al., 2009). Eine Blockade des KCC2-Transporters kann zu einer Erhöhung der intrazellulären Cl⁻ Konzentration führen (Hekmat-Scafe et al., 2006, Khalilov et al., 2011, Watanabe et al., 2019), was schließlich in einer durch GABA vermittelten, potentiellen Übererregbarkeit enden kann (Olde Engberink et al., 2018). Hübner und Kollegen sowie Woo und Kollegen (2001, 2002) zeigten, dass Mäuse mit KCC2 Mangel unter generalisierter Epilepsie litten und früh post partum starben. Somit können kleinste Veränderungen in der Cl⁻ Homöostase die GABAerge Inhibition stören (Ben-Ari, 2017).

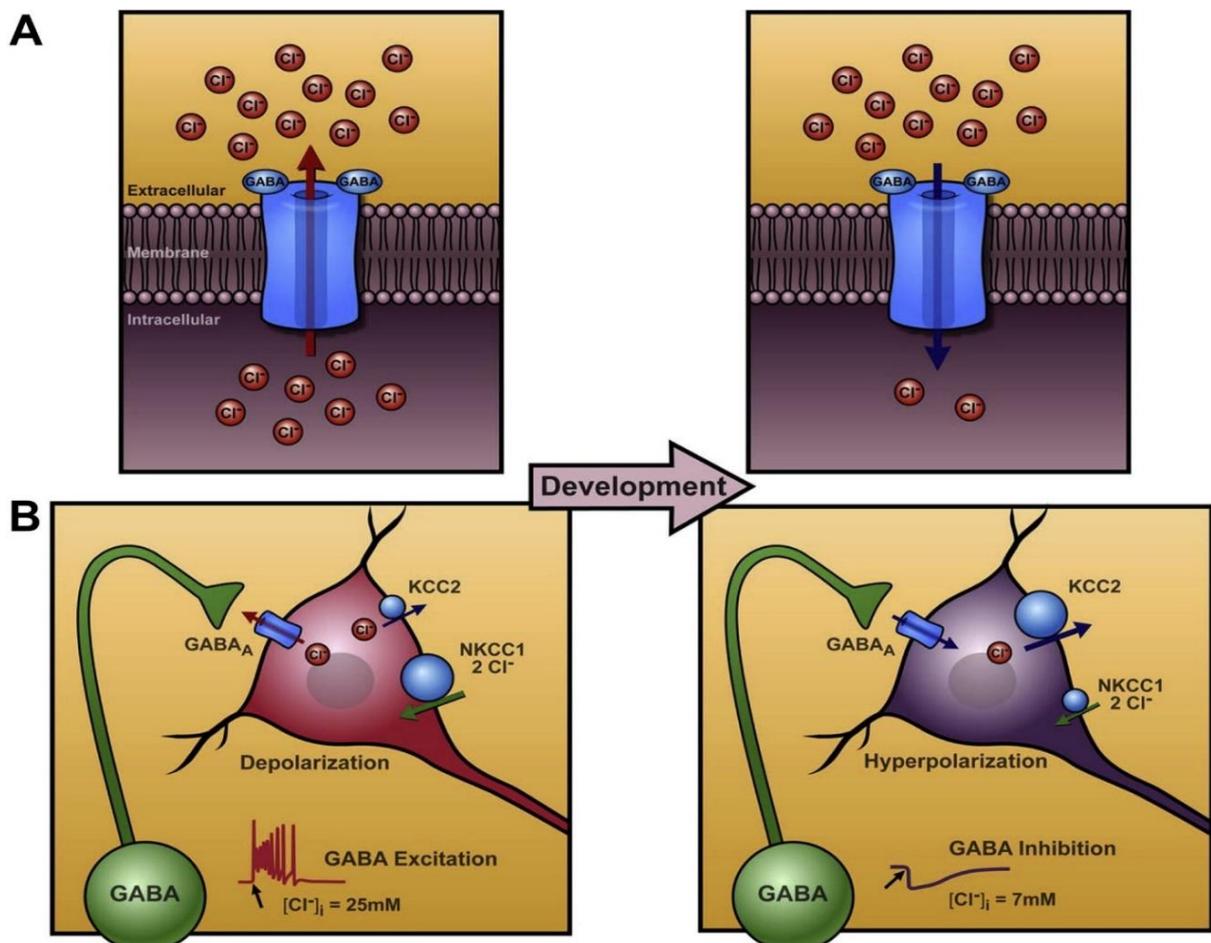


Abbildung 1 Schematische Abbildung der Änderung der GABAergen Polarität während der Entwicklung (Ben-Ari, 2014)

(A) Der intrazelluläre Cl^- -Gehalt ist in unreifen Neuronen höher als in reifen Neuronen. (B) Durch das Überwiegen der NKCC1-Transporter und der hohen intrazellulären Cl^- -Konzentration in unreifen Neuronen, wirkt GABA exzitatorisch. In reifen Neuronen überwiegt der KCC2-Transporter Anteil, was zu einer niedrigeren intrazellulären Cl^- -Konzentration und somit zu einer inhibitorischen GABAergen Antwort führt.

Im unreifen Kortex können sogar physiologische GABAerge Aktivitäten zu einer Verarmung der intrazellulären Chloridkonzentration führen (Kolbaev et al., 2011, Lombardi et al., 2018) und dadurch eine übermäßige GABAerge neuronale Exzitation verhindern (Ben-Ari et al., 2012, Kilb et al., 2013). Vermutlich liegt es an der geringen Cl^- -Aufnahmefähigkeit von NKCC1 (Achilles et al., 2007).

Im reifen Kortex können pathophysiologische Aktivierungen von GABA_A R. zu einer intrazellulären Cl^- -Anreicherung führen, was in einer Dämpfung der GABAergen Inhibition resultiert. Es kann sogar zu einem GABAergen E/I-Wechsel, von inhibitorisch zu exzitatorisch

kommen (Staley et al., 1995, Kaila et al., 2014). Dennoch können Aktivierungen, die sich im physiologischen Bereich befinden, ebenso zu einer Erhöhung des intrazellulären Cl⁻-Gehalts und zur Dämpfung der GABAergen Inhibition im reifen Neokortex führen. Eine zusätzliche Aktivierung von Glutamatrezeptoren unterstützt die Anreicherung des intrazellulären Cl⁻, allerdings wird die Dämpfung der GABAergen Antwort dabei nicht verstärkt (Halbhuber et al., 2019).

Der zeitliche GABAerge E/I-Wechsel wurde bereits in anderen Regionen des Zentralnervensystems (ZNS), wie z.B. im Rückenmark oder im Prä-Bötzing-Komplex von Nagern untersucht. Demnach wurde eine Abnahme der NKCC1-Funktion ab dem Embryonalzeitpunkt 15.5 (E15.5) (Wu et al., 1992, Sibilla and Ballerini, 2009) und ein E/I-Wechsel am E17.5 festgestellt (Branchereau et al., 2002). Weitere Untersuchungen des Rückenmarksvorderhorns von Ratten zeigten eine inhibitorische GABAerge Antwort in Kombination mit einer Verringerung von NKCC1 und einer Zunahme von KCC2-Transportern ab dem Postnatalzeitpunkt 4-5 (P4-P5) (Stil et al., 2009). Ähnlich wurde der Zeitpunkt in dem Prä-Bötzing-Komplex von Mäusen zwischen dem P2 und dem P4 ermittelt (Ritter and Zhang, 2000, Viemari et al., 2013). Allerdings liegt nach aktueller Studienlage noch keine genaue zeitliche Beschreibung des kortikalen GABAergen E/I-Wechsels in primären kortikalen Neuronen vor.

2.5. Die Bedeutung von GABA in der neuronalen Netzwerkaktivität

Die depolarisierende Wirkung von GABA spielt prä-, peri- und postnatal eine Rolle in der spontanen elektrischen Aktivität (Khazipov and Luhmann, 2006). Zu jedem Entwicklungszeitpunkt gibt es typische Aktivitätsmuster (Garaschuk et al., 2000, Luhmann et al., 2016). Schon im späten Embryonalstadium von Nagern entstehen Ca⁺⁺ getriggerte asynchrone Netzwerkaktivitäten (Crépel et al., 2007). Um P2 bis P4 entstehen die sogenannten cENOS (cortical Early Network Oscillations) (Garaschuk et al., 2000), die sich mit niedriger Frequenz von occipital nach frontal ausbreiten. Sie werden dann progressiv von hoch-frequenten cGDPs (cortical Giant Depolarizing Potential) ersetzt (Adelsberger et al., 2005). Die cGDPs werden v.a. über GABA_A Rezeptoren generiert und treten zwischen P6 und P8 auf (Garaschuk et al., 2000, Allène et al., 2008, Ben-Ari, 2014, Luhmann et al., 2016). Die spontanen synchronen Aktivitäten gehen ab P9 bis P10 in eine asynchrone neokortikale Netzwerkaktivität über (Golshani et al., 2009), was auf dem E/I-Wechsel zurückzuführen ist.

2.6. Das Inhibitions-/Exzitations-Verhältnis

Mit der Reifung etabliert sich ein Verhältnis von exzitatorischen zu inhibitorischen Neuronen von ungefähr 80% zu 20% (Meinecke and Peters, 1987, Sahara et al., 2012). Dieses Verhältnis besteht bereits während der neuronalen Migration (Sahara et al., 2012). Das Verhältnis ist auch in anderen Spezies, wie z.B. Affen (Rockel et al., 1980, Contreras, 2004) zu beobachten. Ein Überschuss an GABAergen Zellen kann an die Umgebung angepasst bzw. reguliert werden (Cowan et al., 1984, Kuan et al., 2000). Wong und Kollegen (2018) beschrieben, dass die Aktivität der pyramidalen Neuronen das E/I-Verhältnis verändern kann, in dem sie durch ihre Aktivität das Überleben von Interneuronen bei Mäusen postnatal beeinflussen. Denaxa und Forschungsgruppe (2018) zeigten, dass ebenso die zellautonome Depolarisation das Überleben fördert und, dass Kompensationmechanismen existieren, um das E/I-Verhältnis konstant zu halten. Somit können Interneurone der kaudalen ganglionären Vorwölbung durch ihr Überleben den Mangel an Interneuronen der medialen ganglionären Vorwölbung aufheben.

In vielen Versuchen wurde in das E/I-Verhältnis eingegriffen. Bracci und Kollegen (1996) haben durch die pharmakologische Blockade der Inhibition rhythmische, spontane Bursts (Aktionspotential Bündel) im Rückenmark der Ratte generiert. Die Forschungsgruppe von Xin Chen und Rhonda Dzakpasu (2010) vermischten Anteile des Striatums und Hippocampus und variierten auf diese Weise den Gesamtanteil inhibitorischer Neurone innerhalb der gesamten Nervenzellpopulation. Sie zeigten, dass eine reine striatale Population, die fast nur aus Interneuronen besteht, keine elektrische Aktivität aufweist (Graveland and DiFiglia, 1985, Kreitzer and Malenka, 2008). Jedoch wurde gezeigt, dass die Dichte einen Einfluss auf die striatale Netzwerkbildung hat. Somit bewies die Forschungsgruppe von Sergeeva (2006), dass eine dichtere, rein striatale Population auch eine Netzwerkaktivität aufweisen kann. Je höher der Anteil an Interneuronen war, desto kürzer waren die Bursts und desto weniger Aktionspotentiale befanden sich in einem Burst. Ebenso ist die Anzahl an Aktionspotentialen, die von der Population generiert wurde, zurückgegangen. Diese Ergebnisse deuten an, dass die inhibitorischen Neurone einen nicht außer Acht zu lassenden Einfluss auf das temporäre Netzwerkstruktur haben.

Vogels and Abbott (2009) veränderten den inhibitorischen Zufluss mittels verschiedener „Gates“, die sie künstlich in ein neuronales Netzwerk einsetzten. Je stärker die inhibitorische Information gedrosselt wurde, desto weniger wurden die exzitatorischen Neurone gehemmt.

Sie zeigten ebenso, dass eine kleine Veränderung der Inhibition zu einer dramatischen Veränderung im Netzwerkaktivitätsmuster, im Sinne einer allgemeinen Übererregbarkeit, führte. Weitere Rechenmodellversuche zeigten, dass sich bei erhöhter zerebraler Exzitation und niedriger Inhibition, das rezeptive Feld rasch erweitert. Bei sehr starker Exzitation oder sehr niedriger Inhibition verliert das Neuron seine räumliche Spezifität, sodass sich die Erregungsweiterleitung auf ein ganzes Gebiet erweitern kann (Xing and Gerstein, 1996, Brunel, 2000). Auf der molekularen Ebene wurde anhand genetisch modifizierter Mäuse gezeigt, dass Faktoren wie Cadherin-10 die synaptische Struktur stabilisieren und damit das E/I-Verhältnis erhalten können (Smith et al., 2017).

3. Material und Methoden

Im folgenden Teil werden Untersuchungen zur Wechselzeitpunktbestimmung eines unreifen, exzitatorischen in ein reifes, inhibitorisches GABAerges Antwortverhalten primärer kortikaler Neuronen beschrieben. Darauffolgend werden Untersuchungen zur in-vitro-Herstellung primärer, kortikaler Neuronenkulturen mit unterschiedlichem exzitatorischen/-inhibitorischen Verhältnis beschrieben. Zunächst sollen die Versuchsdesigns, die Abläufe und die in der Studie verwendeten Materialien dargestellt werden.

3.1.Schematische Darstellungen der Versuche

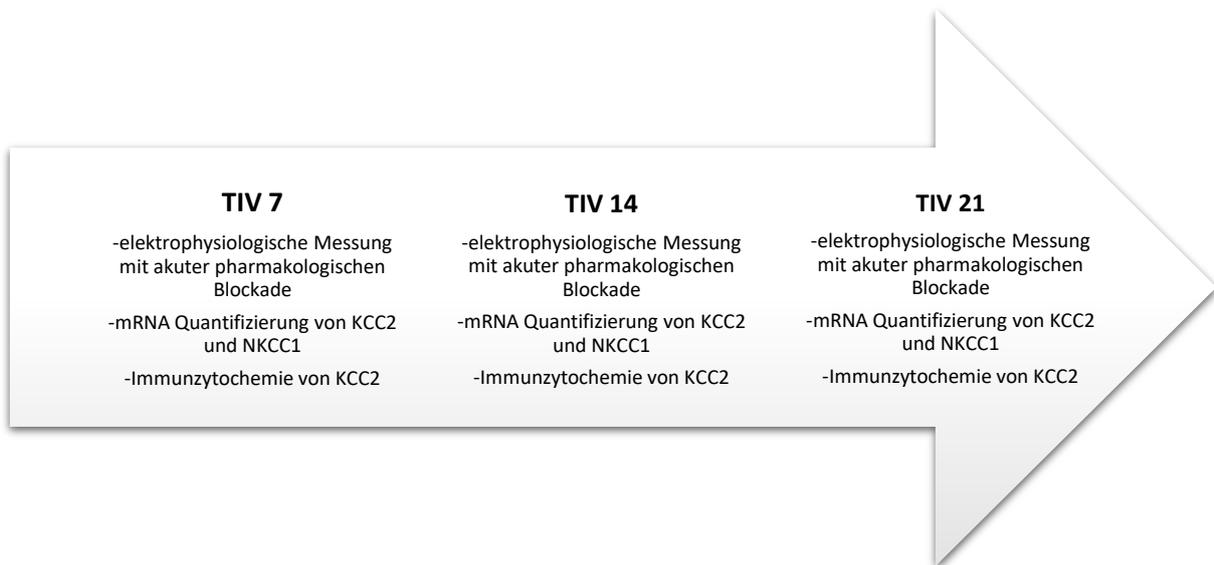


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die zeitliche Eingrenzung des GABAergen E/I-Wechsels.

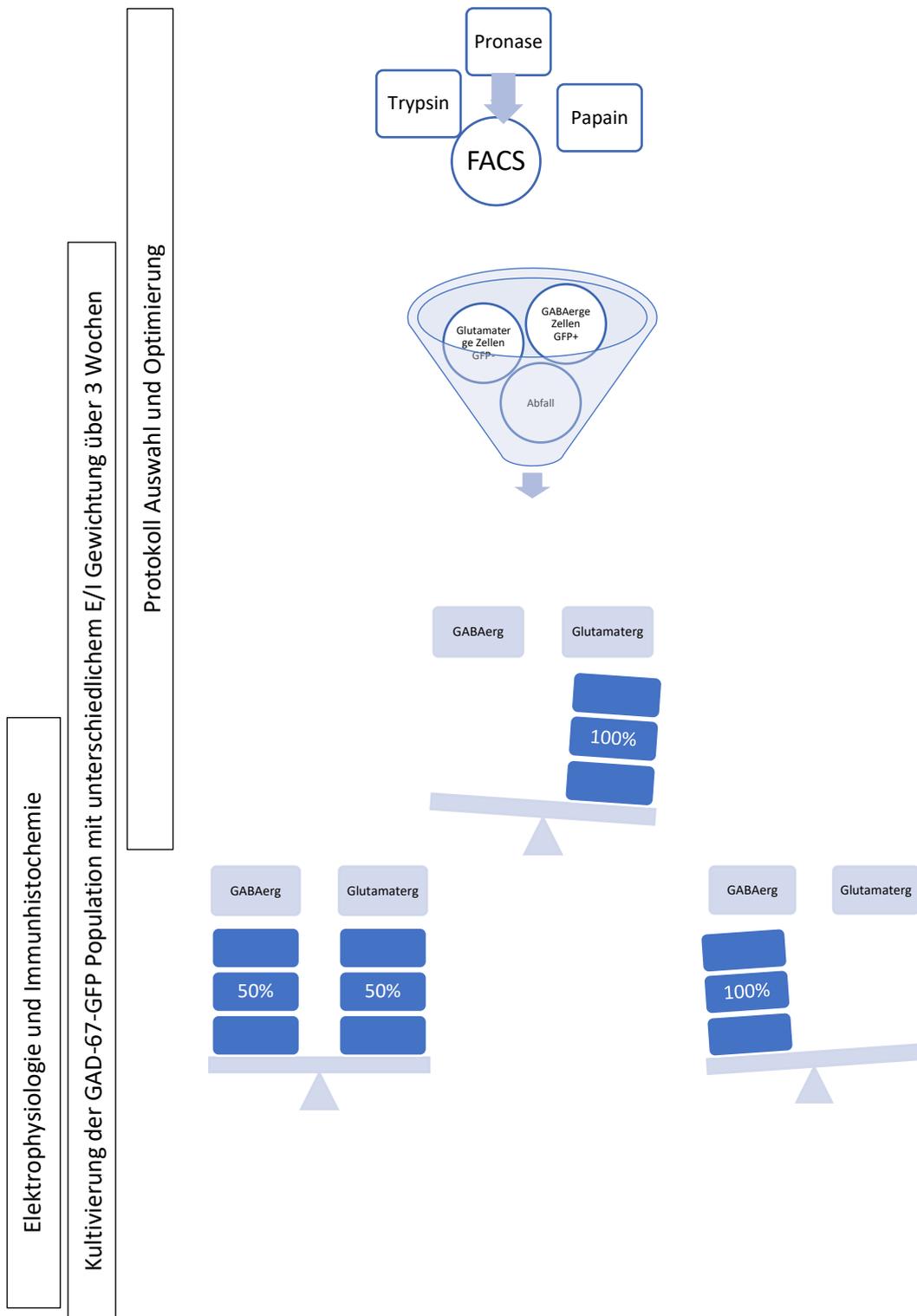


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Protokolls für die GAD-67-GFP Populationen mit verändertem E/I-Verhältnis mittels FACS.

3.2. Die Tiere

Alle Tierexperimente wurden gemäß dem nationalen und europäischen (86/609/EEC) Gesetz für die Verwendung von Tiere in der Wissenschaft durchgeführt und bestätigt vom lokalen Ethikkomitee (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz 23.177-07/G 14-1-018). Die Tierexperimente wurden mit neugeborenen C56bl/6-N Mäusen und mit neugeborenen heterozygoten Mäusen der *Glutamic Acid Decarboxylase 67-Green Fluorescent Protein* (GAD 67-GFP) knock-in Mauslinie durchgeführt. Für die Zucht wurden C56bl/6-N Weibchen und heterozygoten GAD-67-GFP Böcke verpaart. Die heterozygote Jungtiere wurden durch Ableuchten der Schädel von den Tierpflegern identifiziert (Tamamaki et al., 2003). Der Geburtsort der Tiere befand in der lokalen zentralen Versuchstiereinrichtung ZVTE.

3.3. Protokoll für die Bestimmung des zeitlichen E/I-Wechsels

Gehirnpräparation

C56bl/6-N Mäuse wurden an den postnatalen Tagen von 0 bis 1 zerebral disloziert. Das Gehirn wurde direkt in eiskaltes Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ freies HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) überführt. Zusätzlich im HBSS: Penicillin und Streptomycin (10 mM, gibco), HEPES Puffer (7 mM), Glucose (0,6%) und Sodium Pyruvat (1 mM).

Der Kortex wurde vom Truncus cerebri, Diencephalon, Hippocampus, Zerebellum und Bulbus olfactorius getrennt. Die Meningen sorgfältig abgetrennt, bevor der Kortex weiter in HBSS auf Eis überführt wurde.

Neuronenextraktion

Die Kortizes wurden 3 Mal mit HBSS gewaschen, und anschließend wurde das im 37°C warmes Wasserbad aktivierte Trypsin Gemisch hinzugegeben: Trypsin/EDTA (Gibco 0,05%) mit Zusatz Penicillin/Streptomycin (5000 units/ml) und 1M von HEPES. 20 Min. lang wurde das Gewebe mit dem Trypsin im 37°C warmen Wasserbad belassen und alle 5 Minuten invertiert.

Anschließend wurde DNase (10 mM, Sigma DN25) hinzugegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur wirken gelassen. Im Folgenden wurden die Kortizes 2 Mal mit HBSS und einmal mit *plating medium* gewaschen, um den chemischen Dissoziationsvorgang aufzuhalten. Pro Kortex wurden 2 ml *plating medium* hinzugegeben (MEM: Minimal Essential Medium ohne Glutamax (Gibco), 10% Pferdeserum, 0,6% Glucose). Der mechanische Dissoziationsschritt erfolgte durch das hoch und runter pipettieren mit feuerpolierten Pasteur Pipetten. Jeweils 10 Mal mit breiterem und anschließend engerem Pipetten-Lumen.

Abschließend wurde die Zellsuspension über ein steriles 40 µm breites Zellsieb (EASYstrainer, greiner bio-one) gegeben, um größere nicht-dissoziierte Gewebeteile zu trennen.

Nervenzellkultivierung

Die lebenden Nervenzellen wurden mit Trypanblau angefärbt und unmittelbar darauf auf eine Neubauer-Zählkammer gezählt, um die nötige Menge an Zellsuspension zu errechnen. Die Zieldichte ist in einer 24 Well Platte von 200 000 Neuronen pro Deckglas und in MEA Chips (Multi Electrode Array) von Größe S 800 000 und Größe L 1,2 Mio. Nervenzellen, um eine Dichte von 3000/mm² zu erreichen.

Mindestens 2 Stunden zuvor wurden die Deckgläser und die MEAs mit PEI beschichtet (Polyethyleneimine 0.05% in Borat-Puffer; P3143-100ML, Fluka) und vor dem Aussähen der Nervenzellen durch *plating medium* ausgetauscht. Nach 20 Minuten wurde das ganze Medium mit *neurobasal medium* (Gibco; Zusätze: 2% B27 und 1mM L-Glutamine) ausgetauscht und dann im Inkubator (37°C bei 5% CO₂) kultiviert. Die ARAC Behandlung fand zwischen dem 2. und 4. TIV (Tag in vitro) statt (2,5/5/10 µL ARAC für einen Well/MEA S/ MEA L).

Ein Drittel des *neurobasal mediums* wurde einmal pro Woche entfernt und mit 2 Drittel frischem *neurobasal medium* wieder ausgefüllt.

3.3.1. Immunzytochemie

Die Fixierung der Nervenzellkulturen auf den Deckgläsern erfolgten am TIV 7, 14, 21. Die Nervenzellkulturen wurden 15 Minuten lang mit 4%iges Paraformaldehyd (PFA verdünnt mit PBS) fixiert und anschließend 3 Mal mit PBS gewaschen.

Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde auf den fixierten Kulturen 2 Stunden lang 7% Eseserum und 3% PBS/0,1% Triton Lösung gegeben.

Über Nacht wurde in einer 2% BSA (Bovine Serum Albumin) mit 0.05% Azide und 0,1% Triton Lösung der erste Antikörper (siehe Tabelle 1) inkubiert.

Nach 3-maligem Waschen mit PBS/Triton, wurden die Zellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (siehe Tabelle 2) und dem 1/100 verdünnten DNA-Farbstoff DAPI inkubiert.

Nach weiteren 3-maligen Waschen mit PBS wurden die Neuronen in Fluoromount (Sigma-Aldrich) eingebettet.

Tabelle 1 Listung der primären Antikörper und der Fluoreszenzfarbstoffe

Primärer Antikörper	Bestellnummer	Firma	Verdünnung
KCC2 (rb); polyclonal	#07-432	Merck Millipore	1/1000
NeuN (ms); monoclonal	MAB377	Merck Millipore	1/1000
Synaptophysin (rb); rabbit monoclonal (YE269)	ab32127	Abcam	1/500
MAP2 (ms); monoclonal; clone HM-2	M 9942	Sigma-Aldrich	1/200
Cleaved Caspase-3 (Asp175); polyclonal	#9661	Cell Signaling Technology	1/200
Parvalbumin PV 235 (ms); monoclonal	235	Swant	1/1000
Fluoreszenz Farbstoff			
DAPI	4099,0005	AppliChem	1/100

Tabelle 2 Listung der sekundären Antikörper

Sekundärer Antikörper	Firma und Bestellnummer
Cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	711-165-152 (Jackson; Dianova)
Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	711-605-152 (Jackson, Dianova)

3.3.2. NKCC1 und KCC2 mRNA Nachweis/ qPCR

mRNA Extraktion

Am TIV 7,14,21, wurde 350µl Lysepuffer (Buffer RLT, Mat.No. 1015750, Qiagen GmbH Germany) auf den Nervenzellkulturen gegeben und mit dem Zellschaber geschabt.

Die folgenden Schritte wurden mit dem RNeasy Mini Kit (Ref 74104 Qiagen GmbH Germany) durchgeführt. 70% Ethanol wurden zu den abgeschabten Zellen hinzugefügt und 15 Sekunden bei 8000xg in dem *RNeasy spin column* zentrifugiert. Für die Zerstörung der DNA wurden zuerst 350µl an RWT hinzugefügt und zentrifugiert, danach 10µl an DNase und 70µl an RDD hinzugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Zentrifugieren wurden die Proben mit 350µl mit RWT gewaschen und dann 15 Sekunden lang zentrifugiert.

Um das Ethanol zu eliminieren, wurden die Proben mit 500µl an RPE Puffer (2 Minuten lang) zentrifugiert. Zum Schluss wurden die *RNeasy spin column* in neue Tuben von 1,5 ml eingesetzt und mit 30-50µl an RNase freies Wasser für 1 Minute zentrifugiert.

Die mRNA Menge Bestimmung wurde mit dem UV-Vis Spektrophotometer Nano drop 2000 (Ser. No. 1065, Thermo scientific U.S.A.) durchgeführt.

Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde mit dem Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit (04379012001 Roche, Deutschland) durchgeführt und dem Mastercycler personal (No.: 533202319 Eppendorf Germany). Pro Ansatz wurden 10 µl RNA in cDNA umgeschrieben und dazu:

- 40 µl transkriptor RT reaction buffer
- 5 µl protector RNase inhibitor
- 20 µl dNTP mix
- 2,5 µl transkriptor reverse transcriptase 5U

Quantitative Echtzeit PCR

Die quantitative Echtzeit PCR wurde mit dem StepOneplus Real-Time PCR System Thermal Cycling Block (S/N: 272009182, Applied Biosystems by life technologies) durchgeführt.

Für die Umschreibung in cDNA wurde mit dem gleichen RNeasy Mini Kit gearbeitet.

Die RNA wurde zuerst zu 1:3 mit RNA-freiem Wasser verdünnt. Pro Ansatz wurden zudem 2 µl der jeweiligen verdünnten RNA Entität hinzugefügt:

- 5 µl master mix

- 2,65 µl RNase freies Wasser
- 0,25 µl primer mix (vorwärts und rückwärts Primer)
- 0,1 µl von der dazugehörigen Sonde
- Die Kontrollprobe bekam anstelle von RNA, 2µl H₂O.

Tabelle 3 Primer für die quantitative Echtzeit PCR

Primer		Sequenz	Hersteller	Primernummer und UPL-Proben
Aktin	Vorw (5'zu 3')	TGACAGGATGCAGAAGGAGA	invitrogen	probe#106
	Rückw (5'zu 3')	CGCTCAGGAGGAGCAATG	invitrogen	
Synaptophysin	Vorw (5'zu 3')	TGTTTGCCTTCTCTACTCCA	invitrogen	U3907H11
	Rückw (5'zu 3')	TGTGGCCAGGAAGTCCAT	invitrogen	U3907H12
NKCC1	Vorw (5'zu 3')	CACAATAGGGCCTTTGGATTC	invitrogen	probe#102
	Rückw (5'zu 3')	TGAGGAAGAGGATGGCAAGA	invitrogen	
KCC2	Vorw (5'zu 3')	TTC GAC CCA CCC AAT TTC	invitrogen	probe#79
	Rückw (5'zu 3')	AAA GCC ATG GCG AGA CAG	invitrogen	

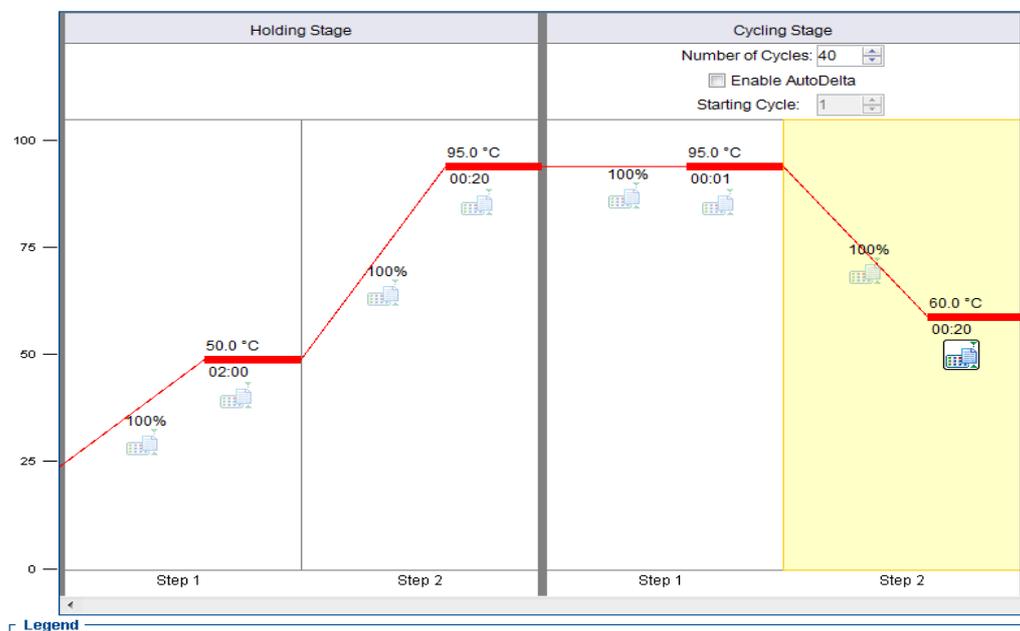


Abbildung 4 Zyklus der quantitativen Echtzeit PCR

Perfusionssystem



Abbildung 5 Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Mediums- und Zusatzes-Wechsel während der elektrophysiologischen Messungen.

Tabelle 4 Zusammensetzung der ACSF Lösung

	mM	g/l	Firma
NaCl	129	7,534	Roth Art.-Nr.HN00.2
Kcl	5,3	0,395	Roth Art.-Nr.6781.3
CaCl2	2	147	Roth Art.-Nr.5239.2
MgCl	1	203,3	Roth Art.-Nr.2189.2
Glukose	10	1,8	Roth Art.-Nr.X997.2
NaHCO3	26	2184	Roth Art.-Nr.HN01.2

Um einen Referenzwert zu haben, wurden die elektrischen Ströme zuerst im *neurobasal medium* 10 Min. lang aufgenommen. Mittels des Perfusionssystem wurde das *neurobasal medium* mit einer Geschwindigkeit von 1.0 ml/min mit 37°C warmes ACSF ein- und 1.2 ml/min ausgewaschen bis das *neurobasal medium* zuletzt gegen ACSF ausgetauscht wurde. Die Netzwerkaktivität wurde 15 Minuten lang registriert, zum Schluss wurde 3µM GABAzin (SR 95531 hydrobromide; Tocris) ein GABA_A Rezeptorantagonist in dem ACSF hinzugegeben und 20 Min. lang die Aktivität Neuronalen Kulturen am TIV 7, 14 und 21 gemessen (Abb.4).

3.4.VU und Furosemid Versuch

Die Präparation erfolgte wie im Abschnitt „Protokoll für die Bestimmung des zeitlichen E/I Wechsels“. Die Zellen wurden auf MEA Chips mit einer Dichte von 3000 Neuronen/mm² gezüchtet. Am TIV 3 mit ARAC behandelt und am TIV 7 wurde das Medium zu 1/3 ausgewechselt. Am TIV 7 wurden die Zellen mit VU 0463271 (10µM; TOCRIS Bioscience) oder Furosemid (500µM; F4381-1G, Sigma) behandelt. Am TIV 14 wurde 15 Min. lang die elektrophysiologische Aktivität gemessen.

3.5. Alamar blue cell viability test

Die Präparation erfolgte wie im Abschnitt „Protokoll für die Bestimmung des zeitlichen E/I Wechsels“. Die Gruppe, die mit TIV 7 gemessen wurde, wurde jeweils auf 2 Deckzellen mit CNQX (30µM) + DAPV (40µM), Gabazin (10µM), VU (10µM) oder Furosemid (100µM) am TIV 1 behandelt. 2 Deckzellen wurden als Kontroll-Gruppe nicht behandelt, 2 wurden die Nacht vor der Messung mit 2,5 µl Staurosporin behandelt und 2 Deckzellen bekamen einen einfachen Nährmedium, aber keine Zellen.

Für die Gruppe, die mit TIV 14 gemessen wurde, wurden die Deckzellen am TIV 7 mit derselben Konzentration an Stoffen behandelt, die in der Gruppe TIV 7 benutzt wurden.

Die Zellen wurden am TIV 3 mit ARAC behandelt und für die TIV 14 Gruppe wurde am TIV 7 ein Drittel des Mediums gewechselt.

Für die Messung der lebenden/toten Zellen, wurde Alamar blue statt des *neurobasal mediums* auf die Zellen gegeben und 1 Stunde lang auf 37°C und mit 5% CO₂ inkubiert. Der Alamar blue wurde zu 1:60 in HBSS (Gibco) komplementiert mit 10 mM Glukose (Roth Art.-Nr.X997.2), 2mM CaCl₂ (Roth Art.-Nr.5239.2) und 1 mM MgCl₂ (Roth Art.-Nr.2189.2) verdünnt.

Mit TECAN (S/N: 905001032 Austria GmbH) wurde bei 540 nm die Exzitation und bei 595 nm die Emission gemessen.

3.6. Protokolle für die Kulturen mit verändertem E/I-Verhältnis

Um den höchsten Zellertrag mit zugleich sehr hoher Überlebensrate zu erhalten, haben wir drei Protokolle mit jeweils unterschiedlichen Enzymen (Trypsin, Papain oder Pronase) verglichen. Das nach den o.g. Kriterien beste Protokoll wurde ausgewählt. Darüber hinaus waren die Methodik sowie die einzelnen Ablaufschritte für den FACS zu optimieren.

Gehirnpräparation

Die GAD-67-GFP Mäuse wurden zwischen den 2. bis zum 5. Postnataltag zerebral disloziert. Das Gehirn wurde in eiskaltes Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ freies HBSS (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) überführt, zusätzlich in das HBSS: Penicillin und Streptomycin (10 mM, gibco), HEPES Puffer (7 mM), Glucose (0,6%) und Sodium Pyruvat (1 mM).

Der Kortex wurde von Hirnstamm, Diencephalon, Hippocampus, Cerebellum und Bulbus olfactorius getrennt. Die Meningen wurden sorgfältig abpräpariert. In den Protokollen, in welchen das Enzym Trypsin oder Pronase verwendet wurde, wurden die Kortizes mittels tissue chopper (McIlwain, Mickle Laboratory Engineering, Surrey, United Kingdom; Modell Nummer CT/2; Serie Nummer 7988) in 400 µM dicke Scheiben geschnitten.

Zum Schluss wurden die Schnitte mit eiskaltem HBSS gewaschen.

3.6.1. Neuronenextraktion

Trypsin-Protokoll: Die Kortizes wurden 3 Mal mit HBSS gewaschen, und anschließend wurde das im 37°C warmes Wasserbad aktivierte Trypsin Gemisch hinzugegeben: Trypsin/EDTA (Gibco 0,05%) mit Zusatz Penicillin/Streptomycin (5000 units/ml) und 1M von HEPES. 20 Min. lang wurde das Gewebe mit dem Trypsin im 37°C warmen Wasserbad belassen und alle 5 Minuten invertiert.

Anschließend wurde DNase (10 mM, Sigma DN25) hinzugegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur wirken gelassen. Im Folgenden wurden die Kortizes 2 Mal mit HBSS und einmal mit *plating medium* gewaschen, um den chemischen Dissoziationsvorgang aufzuhalten. Pro Kortex wurden 2 ml *plating medium* hinzugegeben (MEM: Minimal Essential Medium ohne Glutamax (Gibco), 10% Pferdeserum, 0,6% Glucose). Der mechanische Dissoziationsschritt erfolgte durch das hoch und runter pipettieren mit feuerpolierten Pasteur Pipetten. Jeweils 10 Mal mit breiterem und anschließend engerem Pipetten-Lumen.

Abschließend wurde die Zellsuspension über ein steriles 40 µm breites Zellsieb (EASYstrainer, greiner bio-one) gegeben, um größere nicht-dissoziierte Gewebeteile zu trennen.

Papain-Protokoll: Der Versuch wurde mit dem GentleMACS Dissociation Kit P: Neural Tissue Dissociation durchgeführt.

Für 400 mg an Gehirnmasse sind erforderlich:

- 50µl an Enzym P
- 1900µl an Puffer X
- 20µl an Puffer Y
- 10µl an Enzym A

Das Enzyme P und der Puffer X wurden zusammen gemischt, 15 Minuten im Wasserbad erwärmt und zum Schluss zu den Gehirnschnitten hinzugegeben. Zuvor wurde das HBSS abgesaugt. Für das Herauslösen von den Zellen wurde hoch und runter pipettiert, dann invertiert und anschließend in die *C-Tube* umgefüllt.

Der MACS Dissociator Programm *m_brain-01_01* wurde 2 Mal durchgeführt und die *C-Tuben* 15 Minuten lang auf dem Rotator im Inkubator belassen.

Nach 15 Min. wurde das Programm *m_brain-02-01* nochmal 2 Mal durchgeführt, danach die Enzymmischung Puffer Y und Enzym A hinzugegeben und zum Schluss nochmal den Programm *m_brain-02-01* 2 Mal durchgeführt. Abschließend, rotierten die Nervenzellen weitere 10 Minuten im Inkubator.

Vor und nach dem Durchsieben durch den 40µm Zellsieb wurden die Nervenzellen auf 1000 rpm, 10 Min. lang bei 23°C zentrifugiert.

Pronase-Protokoll:

Nach HBSS-Waschung wurde das Enzym Pronase (10mg/ml in HBSS verdünnt) für 15 min (+/- 2 min für ältere/jüngere Mäuse) auf die Kortizes gegeben und bei Raumtemperatur belassen. Der Pronase wurde für 5 Min. vor dem Schluss die DNase hinzugefügt.

Um den chemischen Dissoziationsvorgang zu stoppen, wurden die Kortizes 2 Mal mit HBSS und einmal mit *plating medium* gewaschen. Pro Kortex wurden 2 ml *plating medium* hinzugegeben (MEM: Minimal Essential Medium ohne Glutamax (Gibco), 10% Pferdeserum, 0,6% Glucose und Amphotericin B 2 µg/ml). Der mechanische Dissoziationsschritt erfolgte durch das hoch und runter pipettieren mit Feuer polierten Pipetten. Jeweils 10 Mal mit breiteren und danach mit engeren Pasteurpipettlumen.

Abschliessend wurde die Zellsuspension über ein steriles 40 µm breites Zellsieb (EASYstrainer, greiner bio-one) gegeben, um größere nicht-dissoziierte Gewebeteile zu trennen.

Um den Zellertrag zu bestimmen und einen Vergleich zwischen den 3 verschiedenen Protokollen herzustellen, wurden die Nervenzellen mit Trypanblau gefärbt und auf eine Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach Auswahl des Protokolls, wurde dieser Schritt nicht mehr durchgeführt.

3.6.2. Nervenzellkultivierung

Für die Protokollauswahl wurden die Zellen vorerst wie folgt kultiviert: mindestens 2 Stunden zuvor wurden die Deckgläser und die MEAs mit PEI beschichtet (Polyethyleneimine, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany; 0.05% in Borat-Puffer; P3143-100ML, Fluka) und vor dem Aussähen der Nervenzellen durch *plating medium* ausgetauscht. Für das Trypsin- und Pronase-Protokoll wurde nach 20 Minuten das ganze Medium mit *neurobasal medium* (Gibco; Zusätze: 2% B27 und 1mM L-Glutamine) ausgetauscht und dann im Inkubator (37°C bei 5% CO₂) kultiviert. Für das Papin-Protokoll wurde nach 30 Min. das gesamte Medium mit MACS *neurobasal medium* mit 2% von *neuron brew* und 0,4% an L-Glutamin ausgetauscht und im Inkubator (37°C bei 5% CO₂) belassen.

Zwischen dem 2. und dem 4. TIV wurde mit ARAC behandelt (2,5/5/10 µL ARAC für einen Well/MEA S/ MEA L). 1 Mal pro Woche wurde ein Drittel des *neurobasal mediums* entfernt und mit 2 Drittel frischem *neurobasal mediums* wieder aufgefüllt.

Es wurden Abänderungen am ausgewählten Pronase-Protokoll zur Nervenzellkultivierung vorgenommen, um die Überlebensrate der Neuronen nach dem FACS zu verbessern. Es erwies sich somit günstiger die Deckgläser mit Polyornithin (0,1mM, Sigma P4538-50MG) mindestens 2 Stunden vorher zu beschichten, anstelle von PEI.

2h nach der Zelltrennung wurde das *plating medium* vollständig abgesaugt und durch *neurobasal medium* (von Gibco, mit 2% von B27 und 1mM L-Glutamine, Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B 2 µg/ml) ersetzt. Anschließend wurden die Neuronen im Inkubator (37°C bei 5% CO₂) belassen.

Der Mediumwechsel wurde wegen der geringeren Zelldichte und Beeinträchtigung des Zellwachstums und der Synapsenbildung nicht mehr durchgeführt. Ebenso wurde auch nicht

mehr mit ARAC behandelt, da eine negative Auswirkung auf dem Zellwachstum zu beobachten war.

3.6.3. Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)

Die Nervenzellen wurden zum IMB (Institute of Molecular Biology, das Nachbar Gebäude) in einer Polyesterkiste mit Deckel auf Eis transportiert, um die Temperatur konstant zu halten. Anschließend wurde mit DAPI gefärbt und hoch und runter pipettiert, um die Zellklumpen abzulösen. Sortiert wurde bei einer Kühlung von 4°C. Die Zieldichte für eine 24 Well Platte: 60 000 Neuronen pro Deckglas und in MEA Chips S (schmale Version): 120 000 Neuronen.

Die Neuronen wurden in *plating medium* (Minimal Essential Medium von Gibco mit 10% Pferdeserum, 0,6% Glucose, Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B) 2-4 Stunden einsortiert. Nach dem Sortieren wurden die Zellen in den Inkubator vom IMB gestellt. Für den Rücktransport wurden zwei Wärmflaschen auf 37°C erwärmt, die Chips bzw. die Platten in Alufolie gewickelt und in der Styroporbox zurückgebracht.

3.7. Elektrophysiologie

Multi Electrode Array (MEA) Aufnahmen

Es wurden planare MEAs genutzt, die 120 planare Elektroden aus Nitrit und Titan mit 4 internen Referenzen enthalten (120MEA 100/30iR-Ti-gr und 120MEA200/30iR-Ti, Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany). Die Elektroden haben einen Durchmesser von 30 µm und einen Interelektrodenintervall von 100µm oder 200µm.

Die Signale wurden mit der MC_RACK Software und dem MEA 2100 System (Multi Channel Systems) bei einer Abtastrate = *Sampling rate* von 50 kHz gemessen und mit einen *high-pass* Filter von 200 Hz gefiltert.

Die Aktionspotentiale wurden von einem Detektor (MC_Rack, Multi Channel Systems) erfasst, dessen Schwellenwert die 7-fache Standardabweichung des Störfeldes betrug.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die elektrophysiologischen Aufnahmen in ACSF (Artificial CerebroSpinal Fluid) bei konstanter Temperatur von 32°C durchgeführt (TCO₂, S/N 2146, Multi Channel Systems). Im zweiten Teil wurden die elektrischen Aktivitäten im Kulturmedium bei ebenfalls konstanten 32 °C aufgenommen.

Die Bilder wurden mit einem Epifluoreszenz Mikroskop Olympus BX61WI aufgenommen.

Aktionspotentialsortierung und Analyse

Die Aktionspotential Sortierung wurde anhand der Software Mat Lab R2008B Version 7.7 (Mathworks, Natick, MA, USA) durchgeführt. Diese Software benutzt den k-Mittelwert Algorithmus, der auf der *Cluster Analyse* (Ballung an Aktionspotentiale) beruht. Die Anzahl an *Clustern* ist visuell bestimmt worden. Ein Neuron wurde als aktiv bezeichnet, wenn ≥ 5 Aktionspotentiale aufgenommen wurden. Die Populationen wurden verworfen, wenn Spontanaktivitäten am TIV 7 von < 7 Neuronen, TIV 14 von < 14 Neuronen und am TIV 21 von < 21 Neuronen gemessen worden sind.

3.8.Statistiken

Die Ergebnisse sind mit Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Es wurden Student's t Test, oneway Anova (KCC2/NKCC1 mRNA), Newman-Keuls-Test (Alamar Test) mittels GraphPad Prism 5 Software genutzt, wie in der Bild-/Tabellenlegende beschrieben. Werte mit einer Signifikanz von $p < 0.05$, wurden als statistisch relevant bewertet. $p < 0.05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

4. Ergebnisse

Teil I: In vitro Bestimmung des zeitlichen GABAergen E/I-Wechsels

4.1. Bestimmung der GABAergen Antwort auf der elektrophysiologischen Ebene

Um den Zeitpunkt des Wechsels der GABAergen Antwort von der unreifen, exzitatorischen Antwort hin zur reifen, inhibitorischen, GABAergen Antwort in primären kortikalen Neuronen zu bestimmen, wurden nach 7, 14 und 21 Tagen in Kultur (TIV) die spontane elektrische Aktivität mit Hilfe extrazellulärer, MEA-basierter Messungen vor und nach Applikation des GABA_AR. - Antagonist Gabazin gemessen.

Die repräsentativen, elektrophysiologischen Messungen am TIV 7-8 sind in Abbildung 7 gezeigt. Die mittlere Aktionspotential-Frequenz sinkt nach Zugabe von Gabazin signifikant um 51,4% von $0,14 \pm 0,03$ Hz auf $0,07 \pm 0,01$ Hz (Abb. 7A und Abb. 7C: unpaired t-test; $P=0,01$; Mittelwertunterschied und Standardfehler $0,07 \pm 0,03$ Hz; CI [0,01;0,13]; $R^2= 0,04$; $n=6$ aus 6 unabhängigen Kultur-Präparationen). Die Anzahl aktiver Neurone veränderte sich nach Applikation von GABA im Durchschnitt nicht signifikant von 12 auf 10,5 aktive Neurone (Abb. 7B und Abb. 7D: paired t-test; $P=0,2$; Mittelwertdifferenz 1,5; CI [-1,2;4,2]; $R^2= 0,28$; $r=0,93$; ; $n=6$ aus 6 unabhängigen Kultur-Präparationen). Zusammenfassend, ist die Spontanaktivität und die Anzahl an aktiven primären Nervenzellen nach akuter, pharmakologischer Blockade der GABA_AR. vermindert, was darauf schließen lässt, dass die GABAerge Antwort am TIV 7-8 überwiegend exzitatorisch ist.

Die repräsentativen, elektrophysiologischen Messungen am TIV 13-15 sind in Abbildung 8 gezeigt. Die Messungen zeigten nach Zugabe von Gabazin eine signifikante Erhöhung der mittleren Aktionspotential-Frequenz um 52,2% von $0,46 \pm 0,04$ Hz auf $0,70 \pm 0,06$ Hz (Abb. 8A und Abb. 8C: unpaired t-test; $p=0,001$; Mittelwertunterschied und Standardfehler $-0,24 \pm 0,07$ Hz; CI [-0,38;-0,09]; $R^2= -0,01$; $n=8$ aus 6 unabhängigen Kultur-Präparationen) und ebenso eine signifikante Erhöhung der Anzahl an aktiven Neuronen um 20,3% von 30,9 auf 38,7 im Durchschnitt (Abb. 8B und Abb. 8D: paired t-test; $p=0,01$; Mittelwertdifferenz -7,87; CI [-13,3;-2,4]; $R^2= 0,62$; $r=0,96$; $n=8$ aus 6 Kultur-Präparationen). Die Rasterdiagramme zeigen zusätzlich eine Synchronisierung und ein geringeres Auftreten einzelner Aktionspotentiale. Nach akuter, pharmakologischer Blockade der GABA_AR. ist die Spontanaktivität sowie die Anzahl aktiver

primärer Nervenzellen erhöht, was zeigt, dass die GABAerge Antwort am TIV 13-15 nun inhibitorisch ist.

Um diese inhibitorischen GABAergen Antwort im weiteren Verlauf zu verifizieren, haben wir weitere Kulturen im Zeitraum TIV 20-21 gemessen (Abb. 9; n=4 aus 3 unabhängigen Kultur-Präparationen). Die mittlere AP-Frequenz verändert sich nicht signifikant nach Gabazin-Zugabe von $0,58 \pm 0,07$ Hz auf $0,62 \pm 0,1$ Hz (Abb. 9A und Abb. 9C unpaired t-test; $p=0,70$; Mittelwertunterschied und Standardfehler $-0,04 \pm 0,12$ Hz; CI $[-0,29;0,20]$; $R^2= 0,00$). Die Anzahl an aktiven Neuronen verändert sich nicht signifikant nach Gabazin-Zugabe von 38,5 zu 48 aktiven Neuronen (Abb. 9B und Abb. 9D paired t-test; $p=0,06$; Mittelwertdifferenz $-9,5$; CI $[-20,3;1,3]$; $R^2= 0,72$; $r=0,96$). Am Rasterdiagramm ist ebenso eine Synchronisierung der Aktionspotentiale zu erkennen.

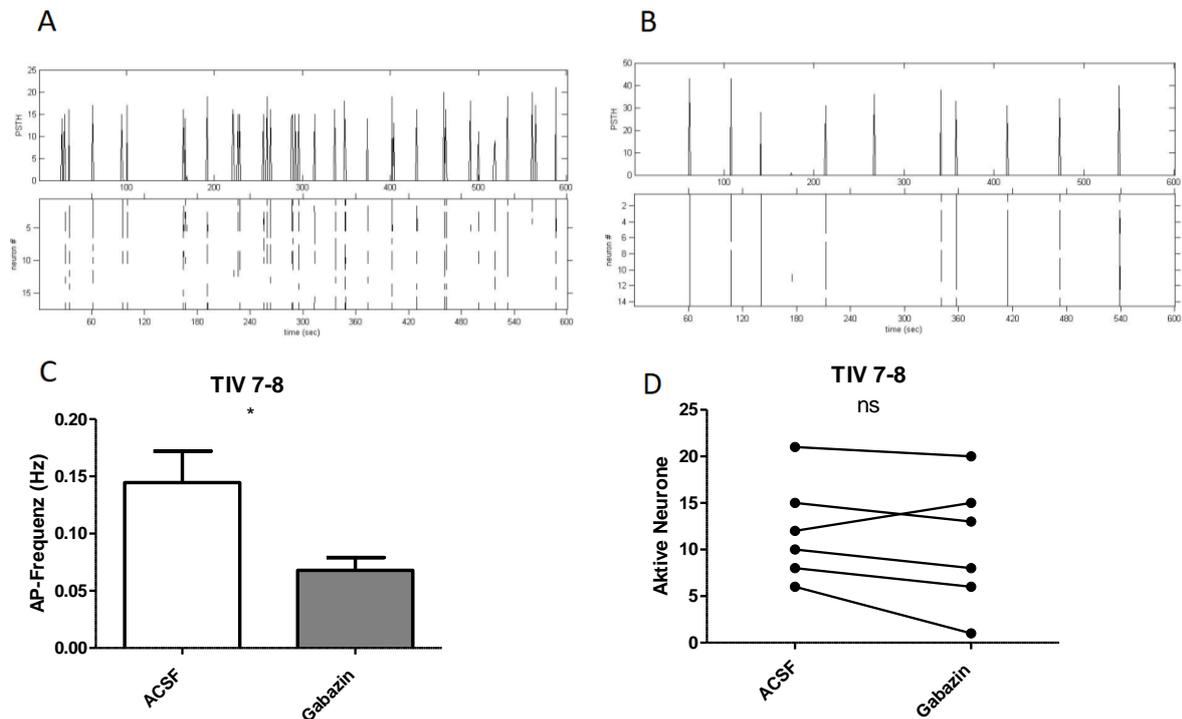


Abbildung 3 Elektrische Aktivität der Zellkultur am TIV 7-8 vor und nach Gabazin-Zugabe.

(A) Repräsentative MEA-Messung der elektrischen Aktivität einer primären Nervenzellkultur am TIV 8 in ACSF (17 aktive Neurone; gesamte AP 595; Mittlere AP-Rate 0,058 AP/Neuron/Sekunde). Der obere Abschnitt repräsentiert die Anzahl an Aktionspotentialen pro Sekunde, der untere Abschnitt die einzelnen Aktionspotentiale einzelner Neuronen. (B) Repräsentative MEA-Messung der elektrischen Aktivität einer primären Nervenzellkultur am TIV 8 unter Gabazin-Zugabe (14 aktive Neurone; ges. AP 358; mittl. AP-Rate 0,043 AP/Neuron/Sek.) Der obere Abschnitt repräsentiert die Anzahl an Aktionspotentialen pro Sekunde, der untere Abschnitt die Aktionspotentiale einzelner Neuronen. (C) Balkendiagramm der mittleren Aktionspotentialfrequenz in Herz mit und ohne Gabazin-Zugabe am TIV 7-8 (ACSF-Säule-Mittelwert und -Standardfehler $0,14 \pm 0,03$ $n=74$; Gabazin-Säule-Mittelwert und -Standardfehler $0,07 \pm 0,01$ $n=64$) (D) Darstellung der Anzahl an aktiven Neuronen im Liniendiagramm vor und nach Gabazin-Zugabe am TIV 7-8.

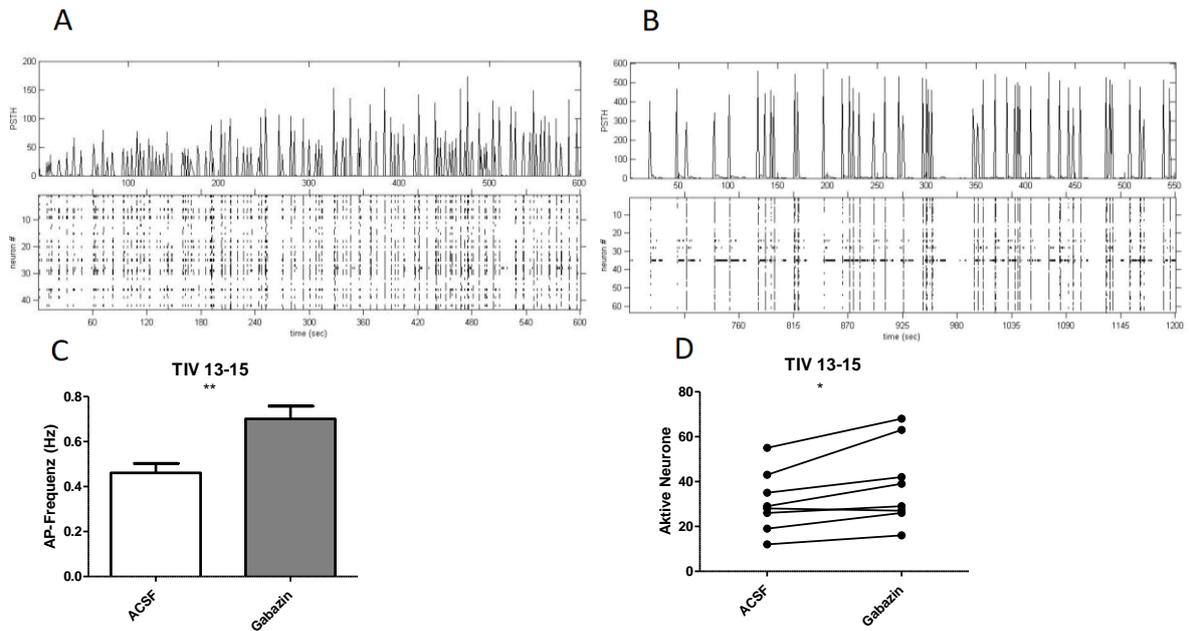


Abbildung 4 Elektrische Aktivität der Zellkultur am TIV 13-15 vor und nach Gabazin-Zugabe.

(A) Repräsentative MEA-Messung der elektrischen Aktivität einer primären Nervenzellkultur am TIV 14 in ACSF (63 aktive Neurone; ges. AP 23134; mittl. AP-Rate 0,697 AP/Neuron/Sek.). Der obere Abschnitt repräsentiert die Anzahl an Aktionspotentialen pro Sekunde, der untere Abschnitt einzelne Aktionspotentiale verschiedener Neuronen. (B) Repräsentative MEA-Messung der elektrischen Aktivität einer primären Nervenzellkultur am TIV 14 unter Gabazin-Zugabe (43 aktive Neurone.; ges. AP 8718; mittl. AP- Rate 0,338 AP/Neuron/Sek.) Der obere Abschnitt repräsentiert die Anzahl an Aktionspotentialen pro Sekunde, der untere Abschnitt einzelne Aktionspotentiale verschiedener Neuronen. (C) Balkendiagramm der mittleren Aktionspotentialfrequenz in Herz mit und ohne Gabazin-Zugabe am TIV 13-15 (ACSF-Säule-Mittelwert und -Standardfehler 0,46±0,04 n=247; Gabazin-Säule-Mittelwert und -Standardfehler 0,70±0,06 n=310) (D) Darstellung der Anzahl an aktiven Neuronen im Liniendiagramm vor und nach Gabazin-Zugabe am TIV 13-15.

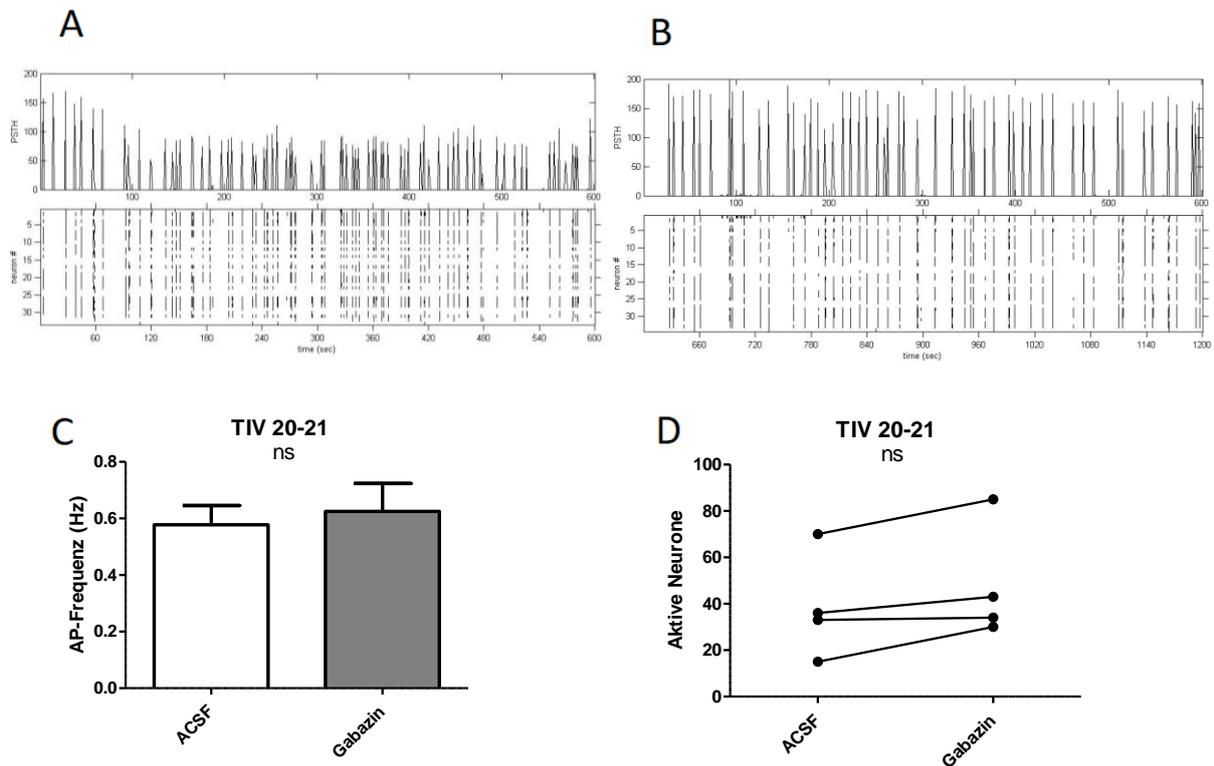


Abbildung 5 Elektrische Aktivität der Zellkultur am TIV 20-21 vor und nach Gabazin-Zugabe.

(A) Repräsentative MEA-Messung der elektrischen Aktivität einer primären Nervenzellkultur am TIV 21 in ACSF (33 aktive Neurone; ges. AP 6986; mittl. AP-Rate 0,353 AP/Neuron/Sek.) Der obere Abschnitt repräsentiert die Anzahl an Aktionspotentialen pro Sekunde, der untere Abschnitt einzelnen Aktionspotentiale verschiedener Neuronen. (B) Repräsentative MEA-Messung der elektrischen Aktivität einer primären Nervenzellkultur am TIV 21 unter Gabazin-Zugabe (34 aktive Neurone.; ges. AP 9063; mittl. AP-Rate 0,444 AP/Neuron/Sek.) Der obere Abschnitt repräsentiert die Anzahl an Aktionspotentialen pro Sekunde, der untere Abschnitt einzelnen Aktionspotentiale verschiedener Neuronen. (C) Balkendiagramm der mittleren Aktionspotentialfrequenz in Herz mit und ohne Gabazin-Zugabe am TIV 20-21 (ACSF-Säule-Mittelwert und -Standardfehler $0,57 \pm 0,06$ $n=166$; Gabazin-Säule-Mittelwert und -Standardfehler $0,62 \pm 0,09$ $n=209$) (D) Darstellung der Anzahl an aktiven Neuronen im Liniendiagramm vor und nach Gabazin-Zugabe am TIV 20-21.

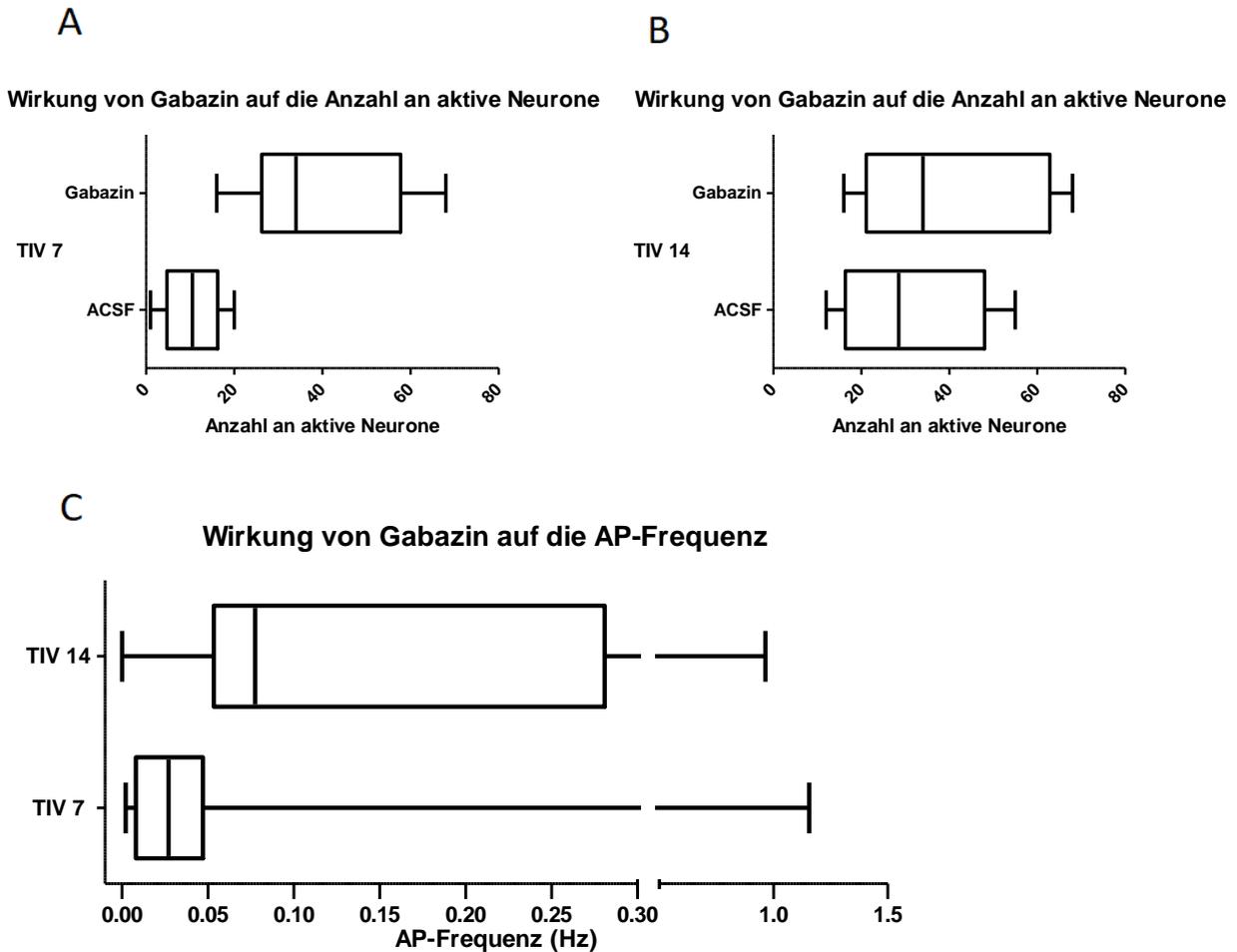


Abbildung 6 Boxplots zur Wirkung von Gabazin auf die gemessenen Aktionspotential-Frequenzen und auf die Anzahl aktivierter Neurone.

(A) Änderung der Anzahl an aktiven Neuronen am TIV 7 mit ACSF (Kontrolle) und nach Gabazin-Zugabe. (B) Änderung der Anzahl an aktiven Neuronen am TIV 14 mit ACSF (Kontrolle) und nach Gabazin-Zugabe. (C) Gegenüberstellung der Wirkung von Gabazin auf die AP-Frequenz am TIV 7 und 14. Sowohl für den TIV 7 als auch für den TIV 14 wurden die Daten auf Gabazin normalisiert. Dabei wurde die Differenz zwischen der AP-Frequenz mit ACSF (Kontrolle) und der AP-Frequenz mit Gabazin berechnet.

4.2. Bestimmung der GABAergen Antwort auf der mRNA-Ebene

Die Menge an KCC2/NKCC1-mRNA wurde am TIV 7, 14 und 21 mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt. Im Verlauf der 3 Wochen wurde ein Anstieg der KCC2-mRNA (Abb. 12 C; $P < 0,0001$; $R^2 = 0,27$) bei gleichzeitiger Verringerung der NKCC1-mRNA (Abb. 12 B; $P = 0,07$; $R^2 = 0,13$) festgestellt. Als Positivkontrolle wurde die mRNA-Konzentration des präsynaptischen Markers Synaptophysin bestimmt, bei dem sich, wie erwartet, eine signifikante Steigerung der Synaptophysin-mRNA-Menge im Verlauf der 3 Wochen gezeigt hat (Abb. 12 A; $P < 0,0001$; $R^2 = 0,33$).

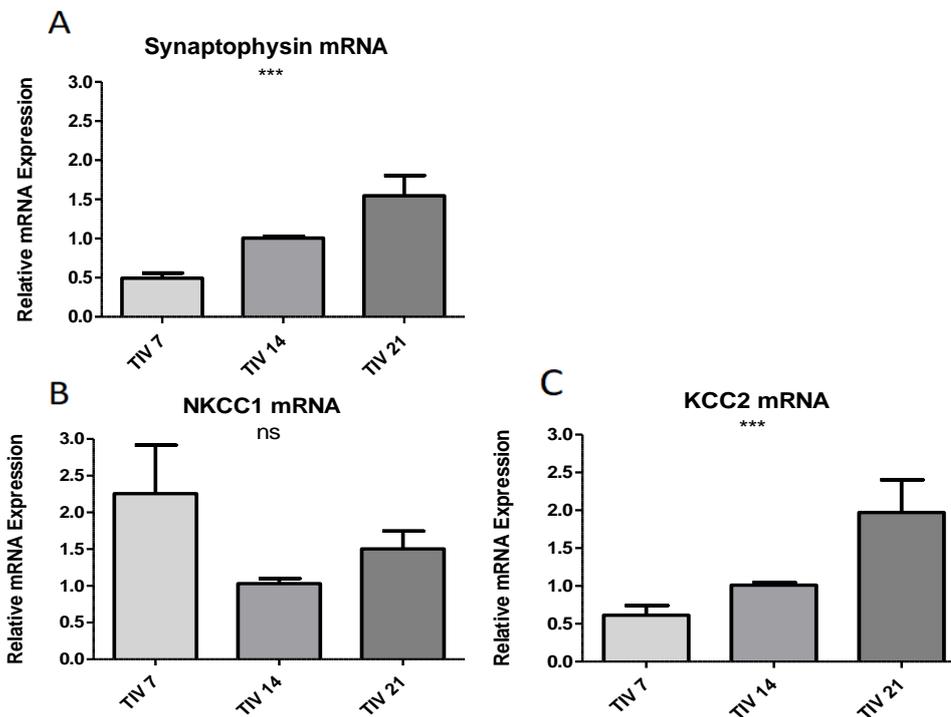


Abbildung 7 Vergleich der mRNA-Mengenänderung von Synaptophysin, NKCC1 und KCC2 über 3 Wochen.

(A) PCR Kontrollprobe mit Synaptophysin (TIV 7 n=20 von 6 unabhängigen Kultur-Präparationen; TIV 14 n=24 von 7 unabhängigen Kultur-Präparationen; TIV 21 n=17 von 7 unabhängigen Kultur-Präparationen). (B) PCR ermittelte Menge an NKCC1-mRNA über 3 Wochen (TIV 7 n=12 von 4 unabhängigen Kultur-Präparationen; TIV 14 n=15 von 5 unabhängigen Kultur-Präparationen; TIV 21 n=12 von 4 unabhängigen Kultur-Präparationen). (C) PCR ermittelte Menge an KCC2-mRNA über 3 Wochen (TIV 7 n=18 von 5 unabhängigen Kultur-Präparationen; TIV 14 n=15 von 5 unabhängigen Kultur-Präparationen; TIV 21 n=12 von 7 unabhängigen Kultur-Präparationen). Statistik: one-way ANOVA.

4.3. Bestimmung der GABAergen Antwort auf der Proteinebene

Die Menge an KCC2-Proteinen wurde mittels Immunhistochemie bestimmt. In Übereinstimmung mit den Daten zur RNA-Expression zeigte sich, dass die Bildung von KCC2-Proteinen mit dem Alter der Nervenzellpopulation zunimmt. Wie man in Abb. 13 gut erkennen kann, ist am TIV 7 eine Anhäufung von KCC2-Transportern im Soma zu verzeichnen. An Axonen und Dendriten sind diese seltener zu finden. Die Intensitätszunahme der immunzytochemischen Färbung im Zytoskelett des Somas sowie in den kommunizierenden Axonen und Dendriten am TIV 14 sprechen für eine Dichtezunahme des KCC2-Proteins. Am TIV 21 ist die Intensität der KCC2-Fluoreszenz nur noch leicht erhöht.

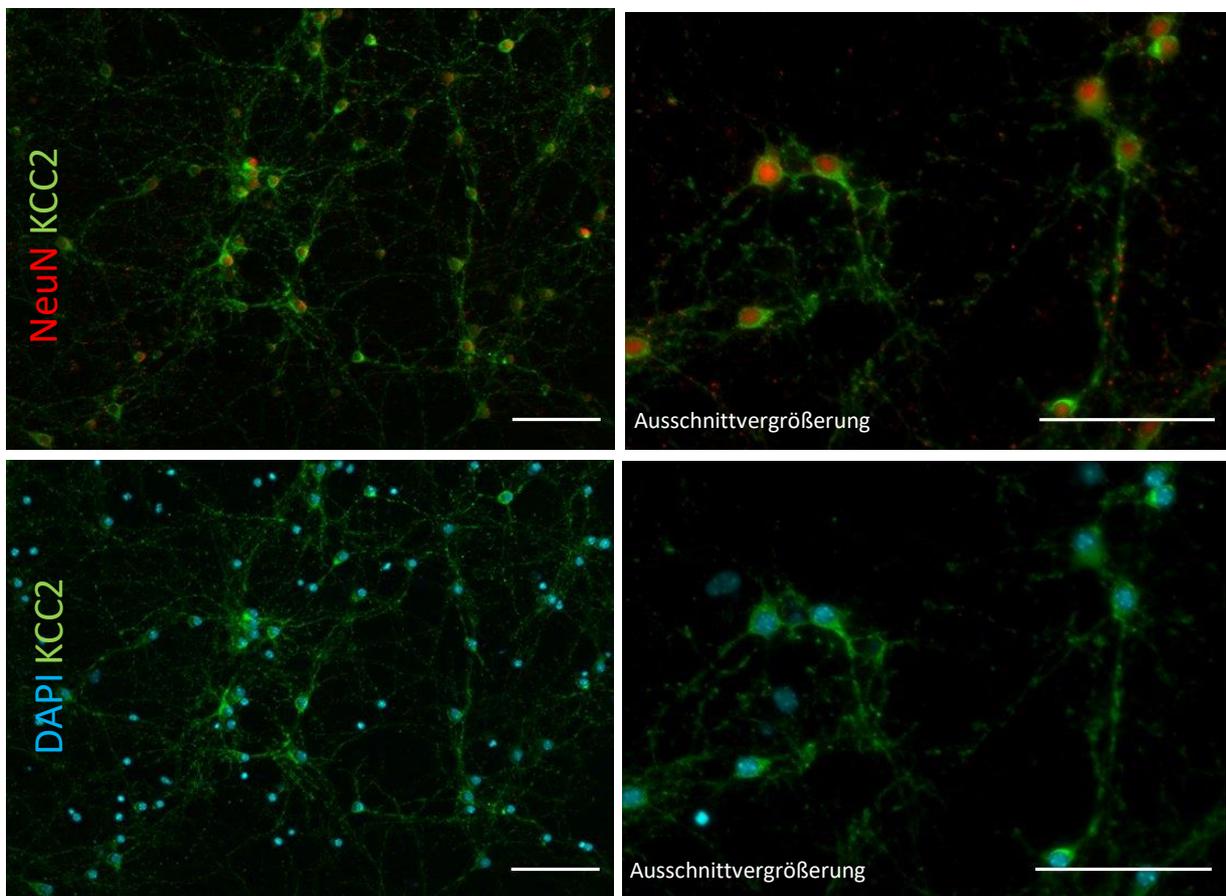


Abbildung 8 Immunhistochemie von primären kortikalen Mausneuronen am TIV 7.

In grün dargestellt sind die KCC2-Transporter. In rot dargestellt (NeuN-Färbung) die Proteine spezifisch für neuronale Nuclei und perinucleäre Zytoplasmen, in blau dargestellt (DAPI-Färbung) zur Markierung der DNA. Kondensierte Kerne repräsentieren Nervenzellen in Apoptose. Die Maßstableiste korrespondiert zu 100µm.

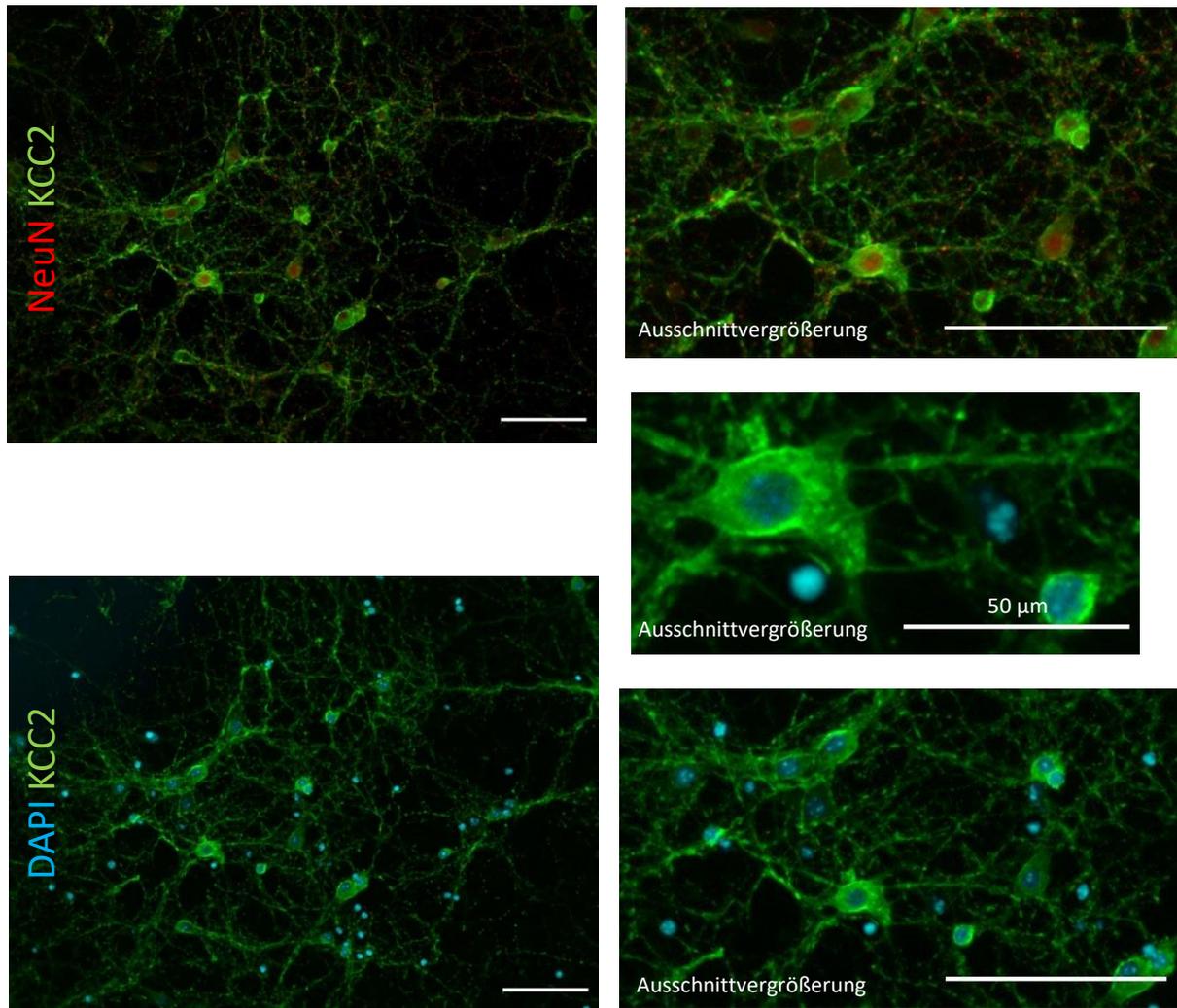


Abbildung 9 Immunhistochemie von primären kortikalen Mausneuronen am TIV 14.

In grün dargestellt sind die KCC2-Transportern, in rot dargestellt (NeuN-Färbung) die Proteine spezifisch für neuronale Nucleii und perinucleäre Zytoplasmen, in blau dargestellt (DAPI-Färbung) zur Markierung der DNA. Kondensierte Kerne repräsentieren Nervenzellen in Apoptose. Die Maßstableiste korrespondiert zu 100µm.

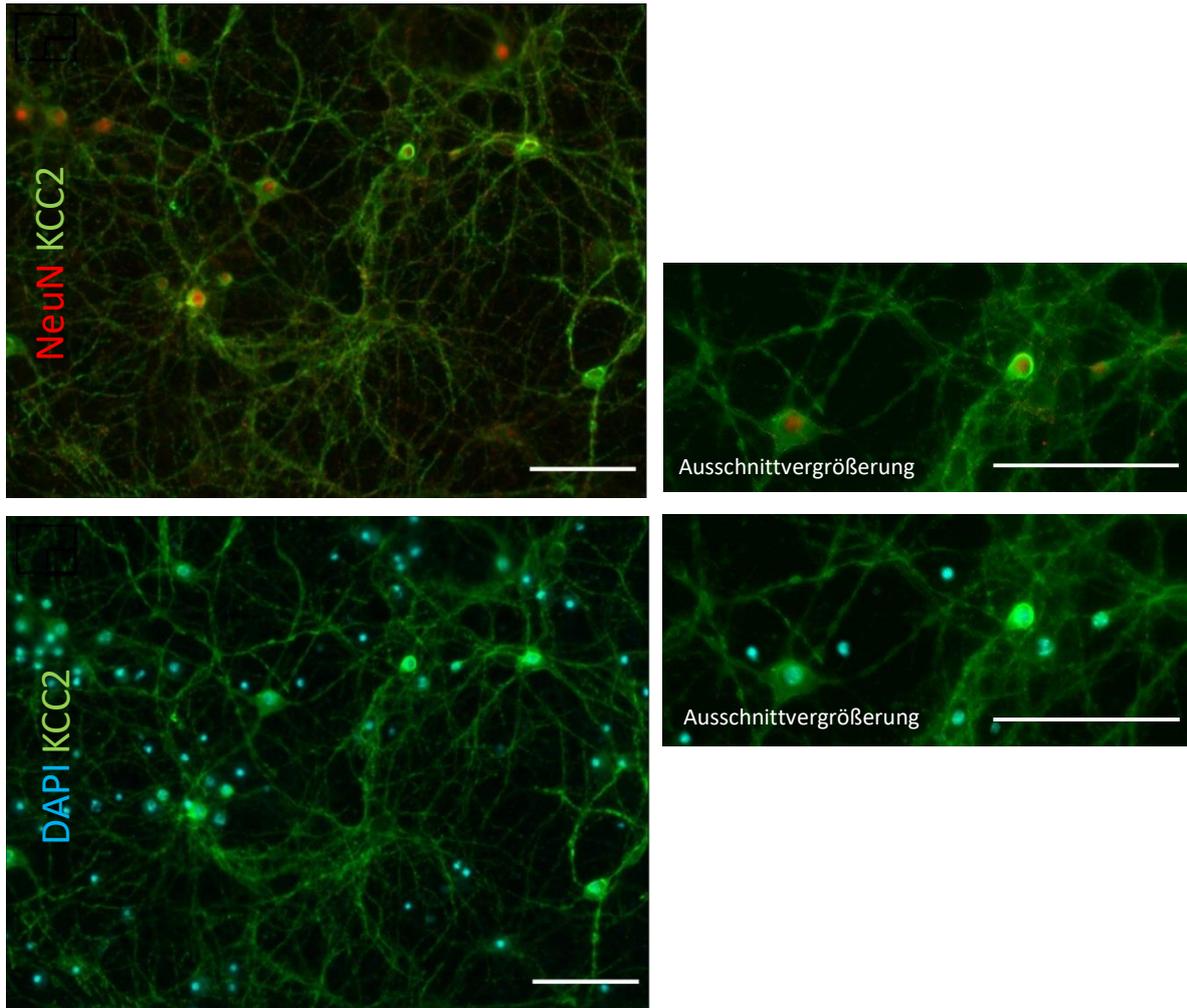


Abbildung 10 Immunhistochemie von primären kortikale Mausneuronen am TIV 21.

In grün dargestellt sind die KCC2-Transportern, in rot dargestellt (NeuN-Färbung) die Proteine spezifisch für neuronale Nucleii und perinucleäre Zytoplasmen, in blau dargestellt (DAPI-Färbung) zur Markierung der DNA. Kondensierte Kerne repräsentieren Nervenzellen in Apoptose. Die Maßstableiste korrespondiert zu 100µm.

Tabelle 5 gemittelte Fluoreszenzintensität von KCC2 am TIV 7, TIV 14 und 21

	KCC2 Fluoreszenz		KCC2 Fluoreszenz		KCC2 Fluoreszenz
Neurone	TIV 7	Neurone	TIV 14	Neurone	TIV 21
1	36.029	1	75.672	1	29.465
2	36.272	2	48.965	2	44.421
3	39.562	3	26.994	3	39.000
4	28.930	4	55.712	4	48.956
5	35.586	5	64.723	5	28.490
6	21.583	6	37.847	6	24.129
7	46.658	7	43.510	7	25.464
8	37.544	8	49.031	8	54.115
9	23.268	9	36.729	9	23.791
10	22.018	10	34.427	10	28.174
11	49.626	11	36.923	11	27.047
12	33.209	12	41.226	12	24.668
13	16.315	13	54.757	13	24.396
14	24.904	14	37.140	14	18.467
15	20.984	15	31.176	15	25.294
16	29.558	16	35.087	16	20.679
17	23.169	17	28.777		
18	16.661	18	21.559		
19	13.426	19	45.461		
20	14.305	20	65.802		
Mittelwert	28.480	Mittelwert	43.576	Mittelwert	30.410

Auch die quantitative Auswertung der Intensität des KCC2 Immunfluoreszenzsignales (Tab. 5) zeigt eine deutliche Erhöhung der KCC2 Expression zwischen TIV 7 und TIV 14. Eine Immunhistochemische Untersuchung von NKCC1 war leider nicht möglich, da kein ausreichend spezifischer Antikörper zur Verfügung stand.

Zusammenfassend zeigen primäre kortikale Neuronenkulturen ab dem TIV 14 eine inhibitorische GABAerge Funktion.

Im nächsten Abschnitt sollte nun untersucht werden, wie sich das elektrophysiologische Verhalten der neuronalen Zellkulturen verändert, wenn die NKCC1- und KCC2-Transporter pharmakologisch blockiert werden.

4.4. Vu und Furosemid Versuch

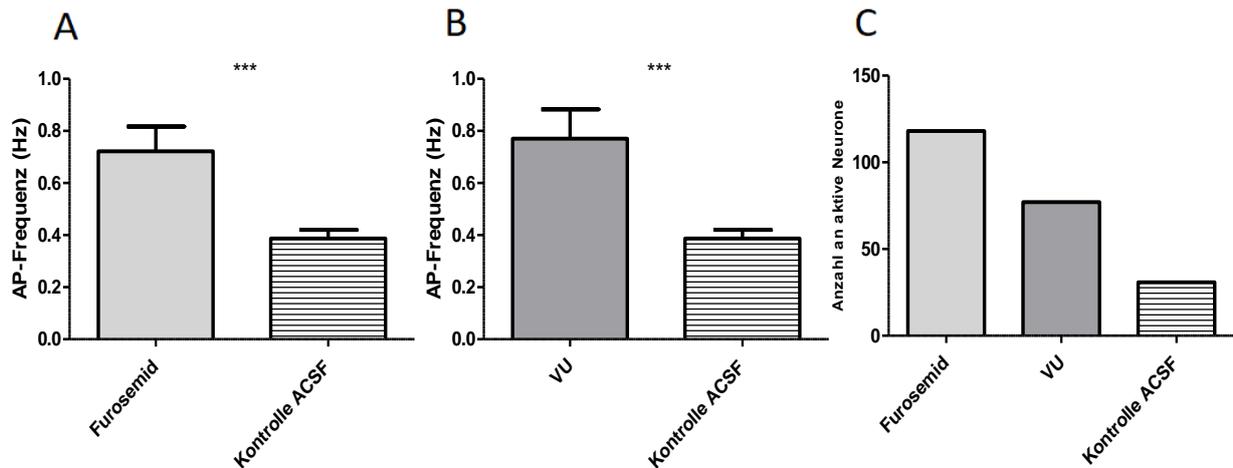


Abbildung 11 Aktionspotential-Frequenz und Änderung der Anzahl an aktiven Neuronen nach VU- oder Furosemid-Zugabe.

(A) Darstellung der Aktionspotentialfrequenzänderung nach Furosemid-Zugabe am TIV 14 (Furosemid-Säule-Mittelwert und Standardfehler $0,72 \pm 0,09$ $n=118$; ACSF-Säule-Mittelwert und Standardfehler $0,38 \pm 0,03$ $n=213$; $n=4$ von 4 Kultur-Präparationen und $n=8$ von 6 Kultur-Präparationen für ACSF) (B) Darstellung der Aktionspotentialfrequenzänderung nach VU-Zugabe am TIV 14 (VU-Säule-Mittelwert und Standardfehler $0,77 \pm 0,11$ $n=77$; ACSF-Säule-Mittelwert und Standardfehler $0,38 \pm 0,03$ $n=213$; $n=1$ von 1 Kultur-Präparation für VU und $n=8$ von 6 Kultur-Präparationen für ACSF) (C) Darstellung der Anzahl an aktiven Neuronen nach Furosemid- (118 aktive Neurone) oder VU- (77 aktive Neurone) Zugabe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ACSF (Mittelwert aller 6 Wildtyp Populationen: 31 aktive Neuronen) am TIV 14.

Die primären kortikalen Neurone wurden hierzu entweder mit dem nicht-selektiven NKCC1- und KCC2-Inhibitor Furosemid oder mit dem selektiven KCC2-Inhibitor VU während des Wachstums auf MEA Chips behandelt. Hierbei erfolgte erneut die MEA-basierte Messung der extrazellulären elektrischen Aktivität am TIV 14.

Wie in der Abbildung 16 dargestellt, ist am TIV 14 die Aktionspotentialfrequenz und die Anzahl an aktiven Neuronen nach Behandlung mit Furosemid als auch mit VU höher als in der Kontrollgruppe. Daraus kann man schließen, dass sowohl die Gabe von Furosemid als auch VU zu einer Disinhibition in vitro führen.

Im Vergleich zur Kontrollkultur mit ACSF erhöht sich die mittlere AP-Frequenz signifikant um 50,6% (Abb.16 B; unpaired t-test; $p < 0,0001$; Mittelwertunterschied und Standardfehler $0,38 \pm 0,03$ Hz; CI $[0,21; 0,55]$; $R^2 = 0,06$) bei VU-Gabe und um 47,2% (Abb.16 A; unpaired

t-test; $p < 0,0001$; Mittelwertunterschied und Standardfehler $0,33 \pm 0,08\text{Hz}$; CI $[0,17;0,49]$; $R^2 = 0,04$) bei Furosemid-Zugabe. Die Anzahl an aktiven Neuronen steigt bei Furosemid- und bei VU-Zugabe respektiv um 73,7% und um 59,7%. Es sind mit dem Immersionsmikroskop keine schädlichen Wirkungen an den Zellen durch VU oder Furosemid feststellbar gewesen (Abb.17 A und Abb.18 A).

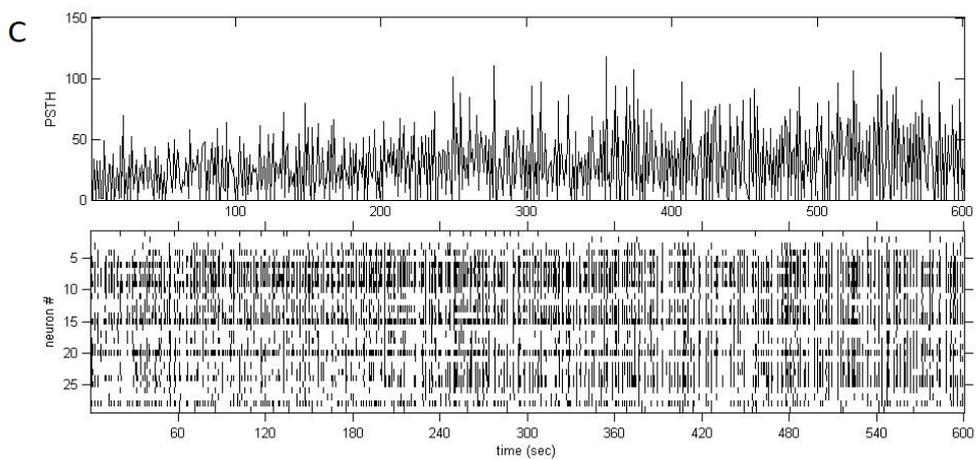
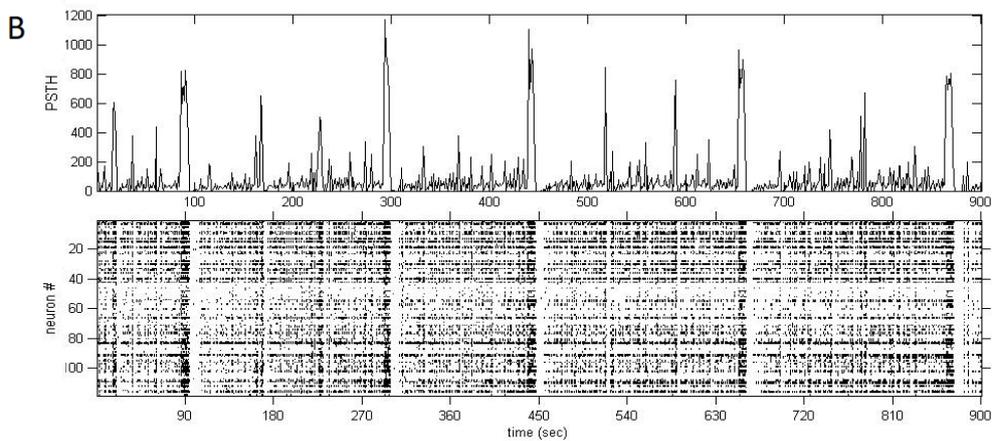
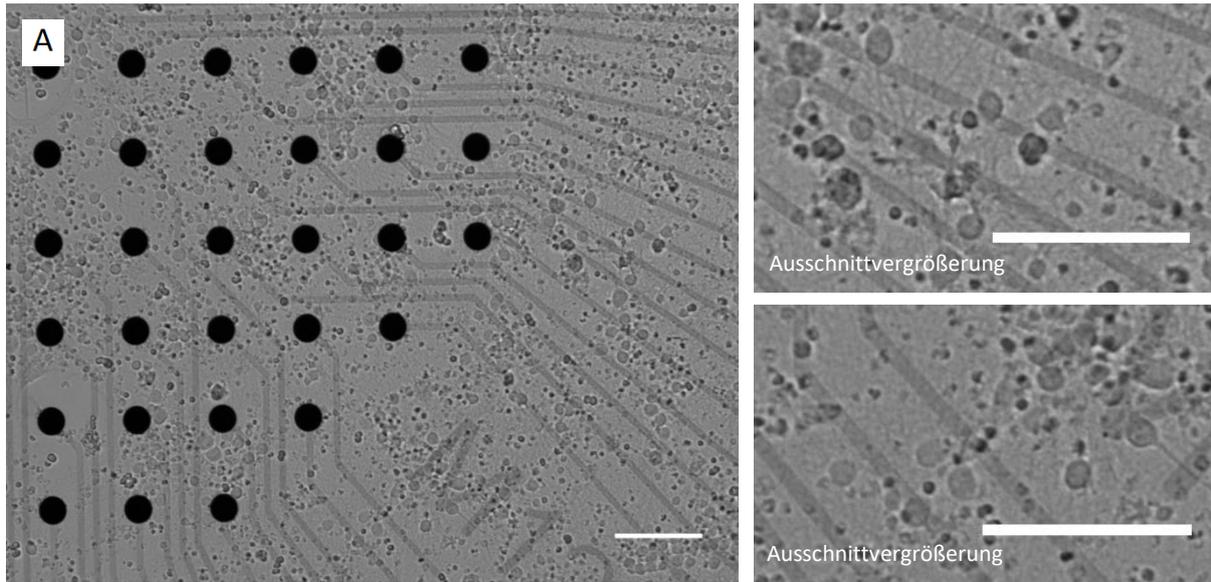


Abbildung 12 Veränderung der elektrischen Aktivitätsmuster nach Furosemid-Behandlung.

(A) Hellfeldbeleuchtungs-Aufnahme der Zellkultur auf MEA chips am TIV 14. (B) Repräsentative MEA-gemessene elektrische Aktivität einer Nervenzellkultur am TIV 14 nach Furosemid-Behandlung (118 aktive Neurone; ges. AP 76694; mittl. AP-Rate 0,722 AP/Neuron/Sek.). (C) zum Vergleich eine repräsentative, MEA-gemessene elektrische Aktivität einer Nervenzellkultur in ACSF am TIV 14 (29 aktive Neurone; gesamte Aktionspotentiale 17959; mittlere AP-Rate 1.032 AP/Neuron/Sek). Die Maßstableiste korrespondiert zu 100µm.

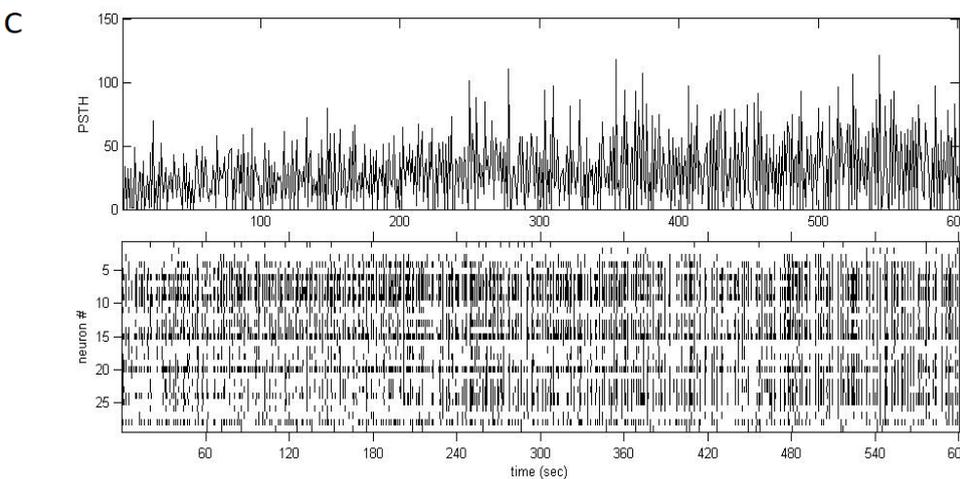
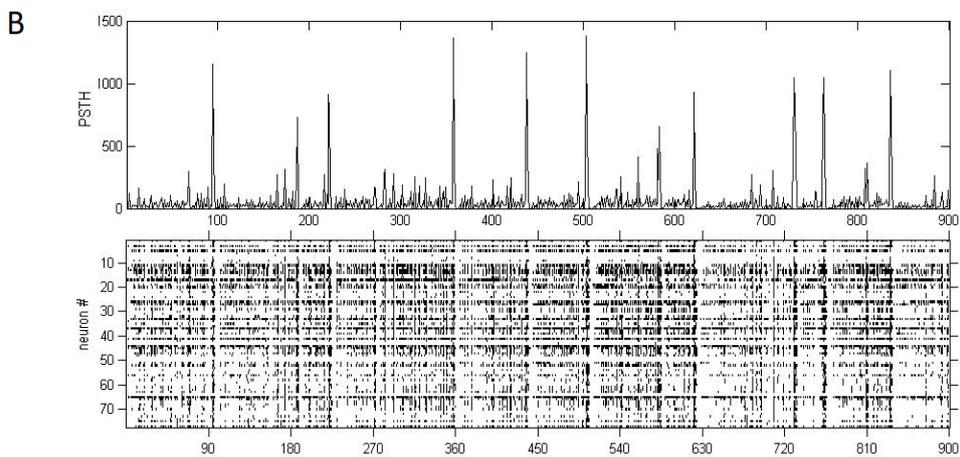
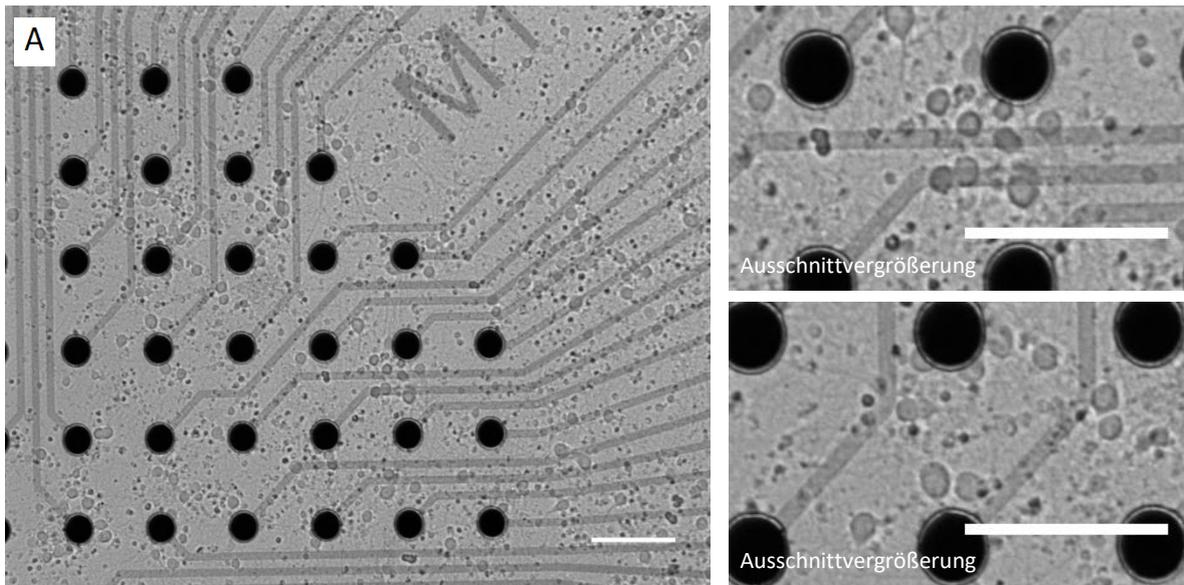


Abbildung 13 Veränderung der elektrischen Aktivitätsmuster nach VU-Behandlung.

(A) Hellfeldbeleuchtungs-Aufnahme der Zellkultur auf MEA Chips am TIV 14. (B) Repräsentative MEA-gemessene elektrische Aktivität einer Nervenzellkultur am TIV 14 nach VU-Behandlung (77 aktive Neurone; ges. AP 53406; mittl. AP-Rate 0,771 AP/Neuron/Sek.). (C) Zum Vergleich eine repräsentative, MEA-gemessene elektrische Aktivität einer Nervenzellkultur in ACSF am TIV 14 (29 aktive Neurone; gesamte Aktionspotentiale 17959; mittlere AP-Rate 1.032 AP/Neuron/Sek.). Die Maßstableiste korrespondiert zu 100µm.

4.5. Alamar blue cell viability test

Im nächsten Versuchsabschnitt sollte nun der Einfluss der glutamatergen und GABAergen synaptischen Aktivität, sowie die Rolle der Chlorid-Kotransporter auf die Vitalität der primären kortikalen Neuronen während der Entwicklung untersucht werden. Hierzu erfolgte die Zugabe von CNQX (AMPA/Kainat Rezeptor Antagonist) + DAPV (NMDA Rezeptor Antagonist), Gabazin, VU und Furosemid sowohl am TIV 7 als auch am TIV 14. Als Positivkontrolle wurden die Neuronen mit Staurosporin behandelt, was sowohl an TIV 7 als auch am TIV 14, wie erwartet, zu einer signifikanten Verminderung der Lebensfähigkeit führte. In unreifen kortikalen Neuronen führte sowohl die Blockade der glutamatergen als auch der GABAergen synaptischen Aktivität zu einem Zellertrag am TIV 7 und TIV 14. Zudem haben die pharmakologisch herbeigeführten Störungen der synaptischen Aktivität von Neuronen, welche sich noch in einem frühen Entwicklungsstadium befanden, vermehrt zu einem neuronalen Zellertrag geführt. Populationen, die am Zeitpunkt der Behandlung älter waren, wiesen eine bessere Überlebensfähigkeit auf.

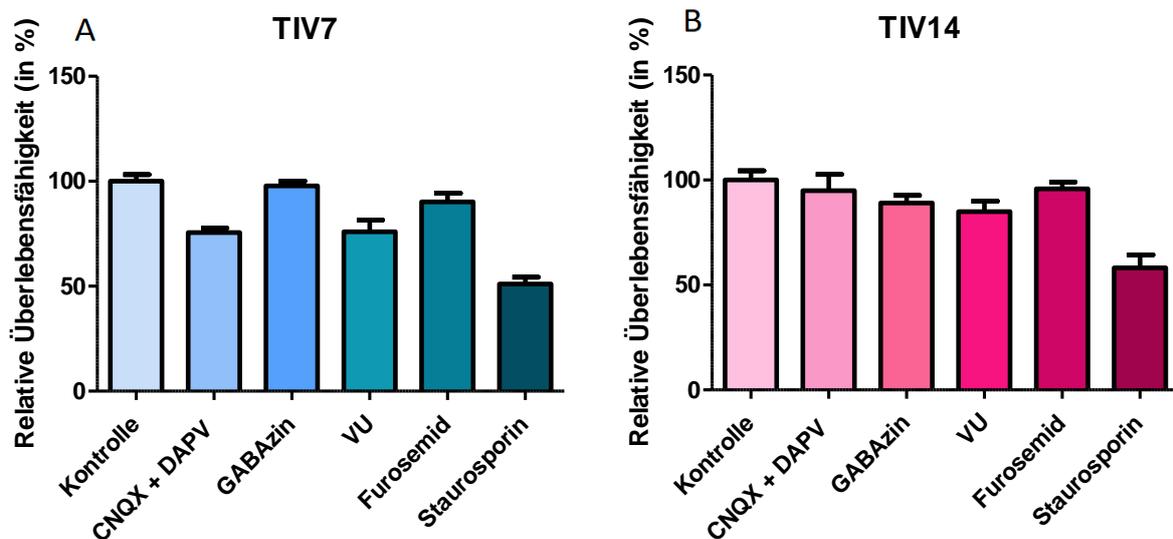


Abbildung 14 Alamar blue cell viability test.

(A) Alamar blue cell viability test am TIV 7 $n=3$ von 3 unabhängigen Experimenten; (B) Alamar blue cell viability test am TIV 14 $n=3$ von 3 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 6 gemittelte Differenz der alamar blue cell viability Testergebnisse am TIV 7 und TIV 14.

Newman-Keuls-Test TIV 7	mittlere Differenz	Signifikanz
Staurosporin vs Kontrolle	-49	***
CNQX + DAPV vs Kontrolle	-24,38	***
VU vs Kontrolle	-24,02	***
Furosemid vs Kontrolle	-9,833	ns
GABAzin vs Kontrolle	-2,183	ns

Newman-Keuls- Test TIV 14	mittlere Differenz	Signifikanz
Staurosporin vs Kontrolle	-41,85	***
CNQX + DAPV vs Kontrolle	-5,037	ns
VU vs Kontrolle	-15,11	ns
Furosemid vs Kontrolle	-4,133	ns
GABAzin vs Kontrolle	-10,9	ns

Teil II: FACS-basierte Bildung der in vitro Kulturen mit verändertem E/I-Verhältnis

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten anhand *fluorescent activated cell sorting* (FACS) primäre kortikale Neuronenkulturen mit einem modifizierten Verhältnis von inhibitorischen Interneuronen zu exzitatorischen Prinzipalzellen hergestellt werden. Diese Kulturen mit einer E/I-Dysbalance sollten dann auf deren Überlebensfähigkeit und elektrophysiologisches Verhalten überprüft werden.

4.6. Protokollauswahl für den FACS

Das erste Ziel bei der Etablierung eines Protokolls bestand darin, einen höchstmöglichen Nervenzellertrag aus der Kortexträparation nativer Wildtypmäuse bei zugleich gesunder Zellpopulation zu erhalten. Hierfür standen uns drei Basisprotokolle zur Auswahl.

Das erste Protokoll verwendet das Enzym Trypsin als Endopeptidase. Durch Proteinabspaltung wird die Verbindungen der Neuronen aufgehoben. Pro Kortex konnten bei Anwendung dieses Protokolls etwa 3,2 Millionen Nervenzellen erhalten werden. Davon überlebte durchschnittlich die Hälfte. Das neuronale Netz aus zahlreichen Somata, Zellausläufern und Synapsen stellte einen Komplex von hoher Vitalität dar (Abb. 2 B).

Im zweiten Protokoll erbrachte das Enzym Pronase, eine Endo- und Exopeptidase zugleich, eine sehr hohe Anzahl an Neuronen (14 Millionen pro Kortex) bei einem vergleichsweise sehr hohen Anteil an überlebenden Zellen (88%). Gegenüber dem ersten Protokoll war die Vitalität jedoch geringer (Abb. 2 C).

Mit Papain, einer Cysteinprotease wurden im dritten Protokoll lediglich 2,2 Millionen Zellen pro Kortex, trotz eines sehr guten Überlebensquotienten von 97%, erreicht. Die Vitalität und Bildung eines Netzwerkes waren hier sehr begrenzt (Abb. 2 A).

Aufgrund dieser Erfahrungen wurden die Experimente folglich basierend auf dem zweiten Protokoll durchgeführt.

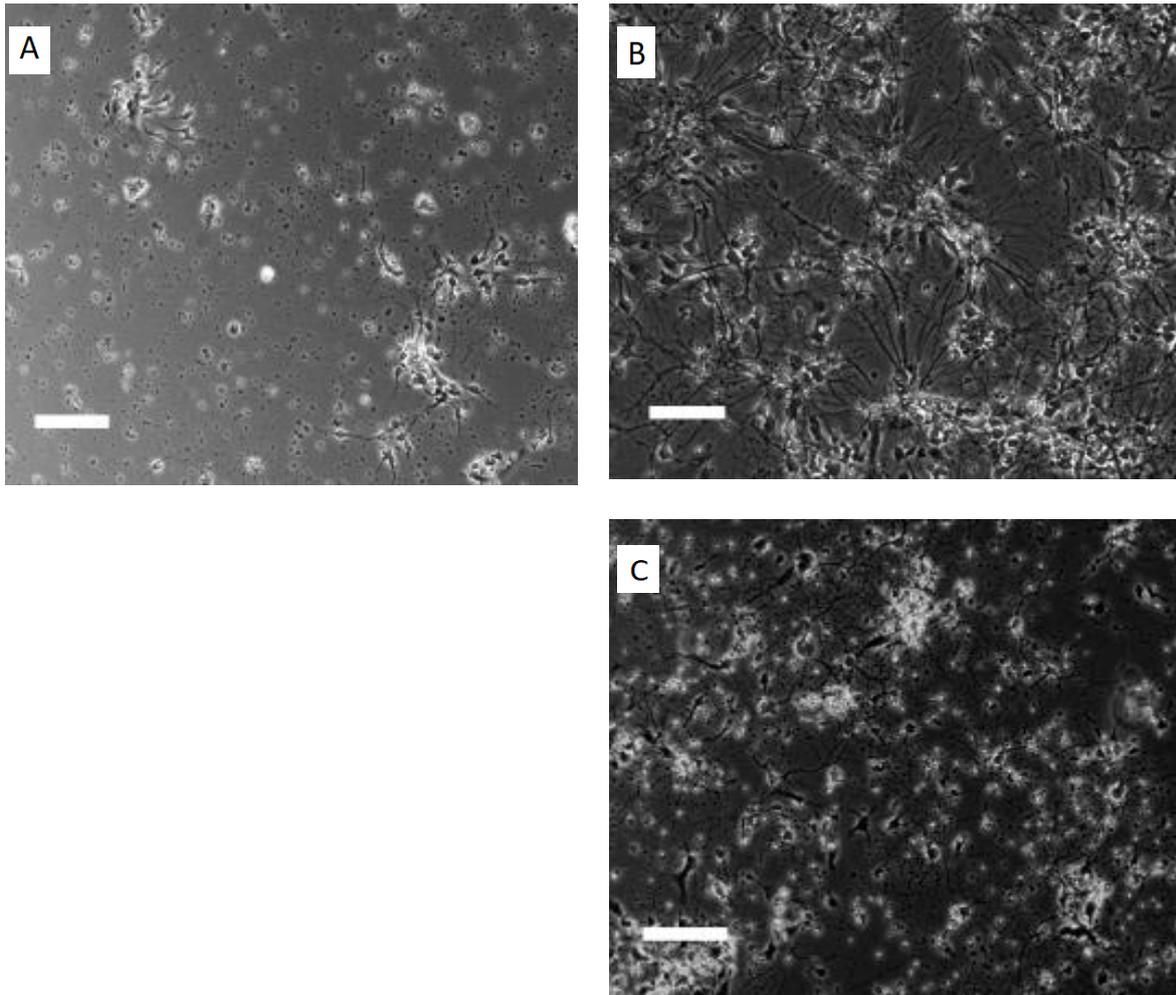


Abbildung 15 Neuronenpopulation auf Deckzellen TIV 7-8 von Mäusen PO-P1.

(A) mit dem Papain-Enzym (B) mit dem Trypsin-Enzym (C) mit dem Pronase-Enzym. Die Maßstableiste korrespondiert zu $100\mu\text{m}$.

4.7.Nervenzelldichte

Im nächsten Schritt wurde untersucht welche minimale Zelldichte benötigt wird, um eine vitale Neuronenkultur zu erhalten. Bei der Titrierung zeigten sich unterschiedliche Zellzahlen. Ab einer Dichte von $1128/\text{mm}^2$ überlebten die Zellen. Für eine höhere Reliabilität wurde die Mindestanzahl auf 420 000 Neurone je MEA Ring (schmal) begrenzt, was eine Dichte von $1482/\text{mm}^2$ beträgt.

4.8. PO versus PEI

Die nach dem FACS geschwächten Nervenzellen zeigten sich nach PO Behandlung der Deckzelle vitaler und hatten eine bessere Überlebensrate, mehr Axone, Dendriten und Synapsen gebildet gegenüber PolyEthylinimin (PEI) (Abb. 17).

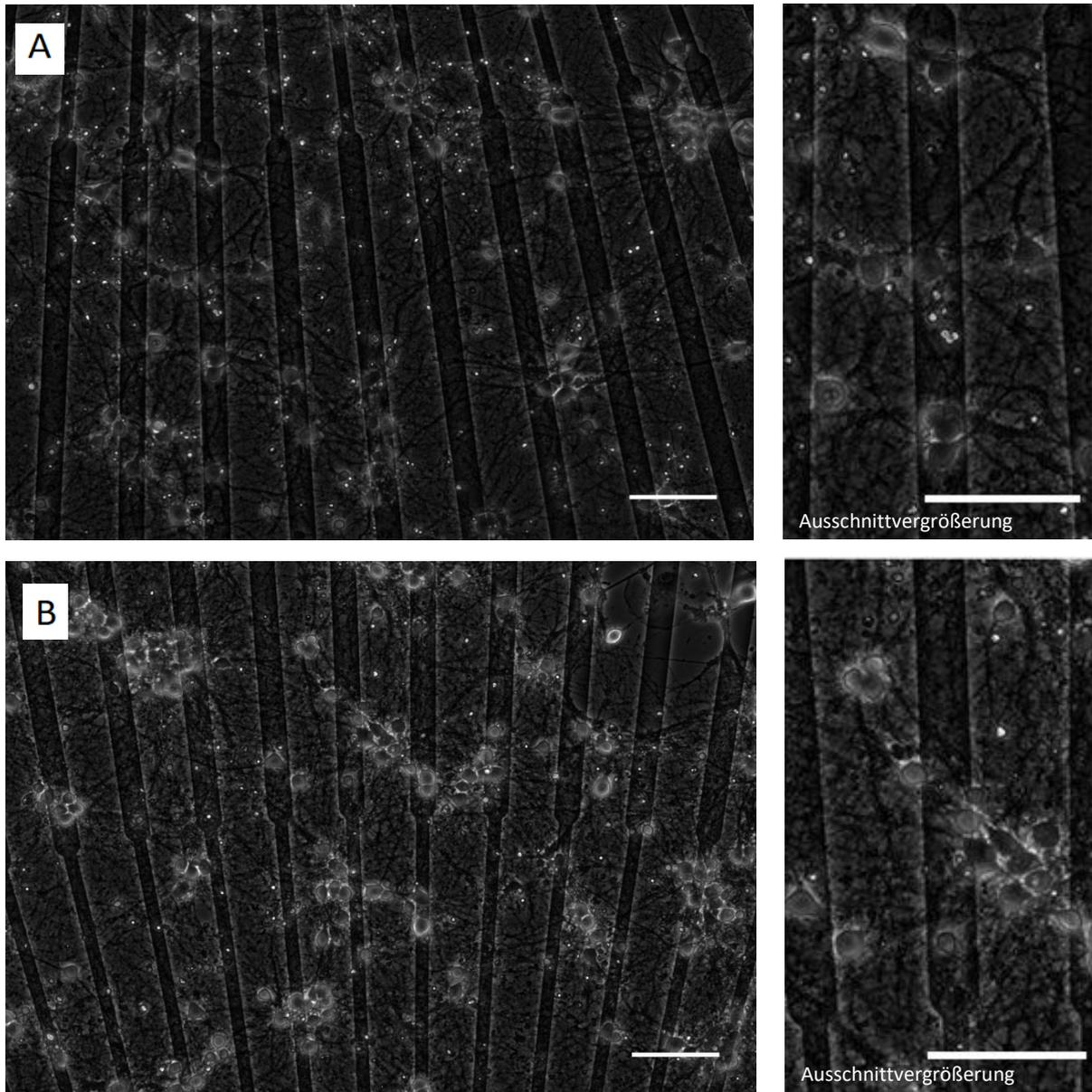


Abbildung 16 Aufnahmen von Nervenzellpopulationen nach PEI-/PO-Vorbehandlung der MEA Chips.

(A) Neuronale WT Kultur mit PEI-Vorbehandlung, TIV 14. (B) Neuronale WT Kultur mit PO-Vorbehandlung, TIV 14. Maßstabelleiste korrespondiert zu 80µm.

4.9. Die Zelltrennung mit dem FACS

Die Sortierung der Zellen erfolgte über das *Fluorescent Activated Cell Sorting* (FACS), eine Durchflusszytometrie, die Fluoreszenzfarbstoffe nutzt. Das FACS-Gerät ARIA III Cell Sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) ermöglichte die Neuronensuspension mit hoher Geschwindigkeit zu trennen und zu analysieren. Das Prinzip beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, dabei wird die einzelne Zelle in einen Tropfen verpackt und erhält eine Ladung. Die einzelnen Tropfen passieren den Laserstrahl, die vom Detektor erfasst werden. Je nach Form, Struktur oder Färbung, entsteht ein Effekt, aus dem die Eigenschaften der Zellen abgeleitet werden können. Die Wellenlänge des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes *Green Fluorescent Protein* (GFP) beträgt ungefähr 490 nm. Die Wellenlänge des verwendeten Laserarts betrug 488 nm. Über das elektrische Feld wird der geladene Tropfen durch eine 100 µm dicke *nozzle* den verschiedenen *Wells* zugeordnet.

Bei dem Trennvorgang wird auf Reinheit der Populationen geachtet. Hiermit wird die Sauberkeit der Trennung gemeint bzw. wie hoch der Anteil an GABAergen Neuronen in einer von uns angeforderten reinen GABAerge Neuronenpopulation besteht. Es werden Punktgraphiken erstellt, wobei jeder Punkt ein „Event“ also i.d.R. eine Zelle repräsentiert. Es werden aber auch Zellklumpen, tote Zellen oder Zelldebris als „Event“ berechnet, diese würden jedoch die Dichte und die Reinheit der Nervenzellkultur verändern. Um dies auszuschließen, gibt es die Möglichkeit „gates“ zu setzen. Deren Funktion ist vergleichbar mit einer Schranke. Nur die Zellen, die in den „gates“ eingeschlossen werden, werden sortiert (Abb. 19).

Diese Graphiken werden aus dem Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) und dem Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) gebildet. Der FSC ist ein Maß für das Volumen der Zelle, die durch die Beugung des Lichts im flachen Winkel entsteht. Hingegen ist der SSC ein Maß für die Granularität der Zelle (mitunter zählen die Größe und Struktur des Zellkerns und bestehenden Vesikeln), die durch Brechung des Lichts im rechten Winkel entsteht. Wir konnten auf dieser Weise die grün fluoreszierenden GABAergen Neuronen (GFP + Population) von den nicht-fluoreszierenden glutamatergen Zellen (GFP - Population) unterscheiden.

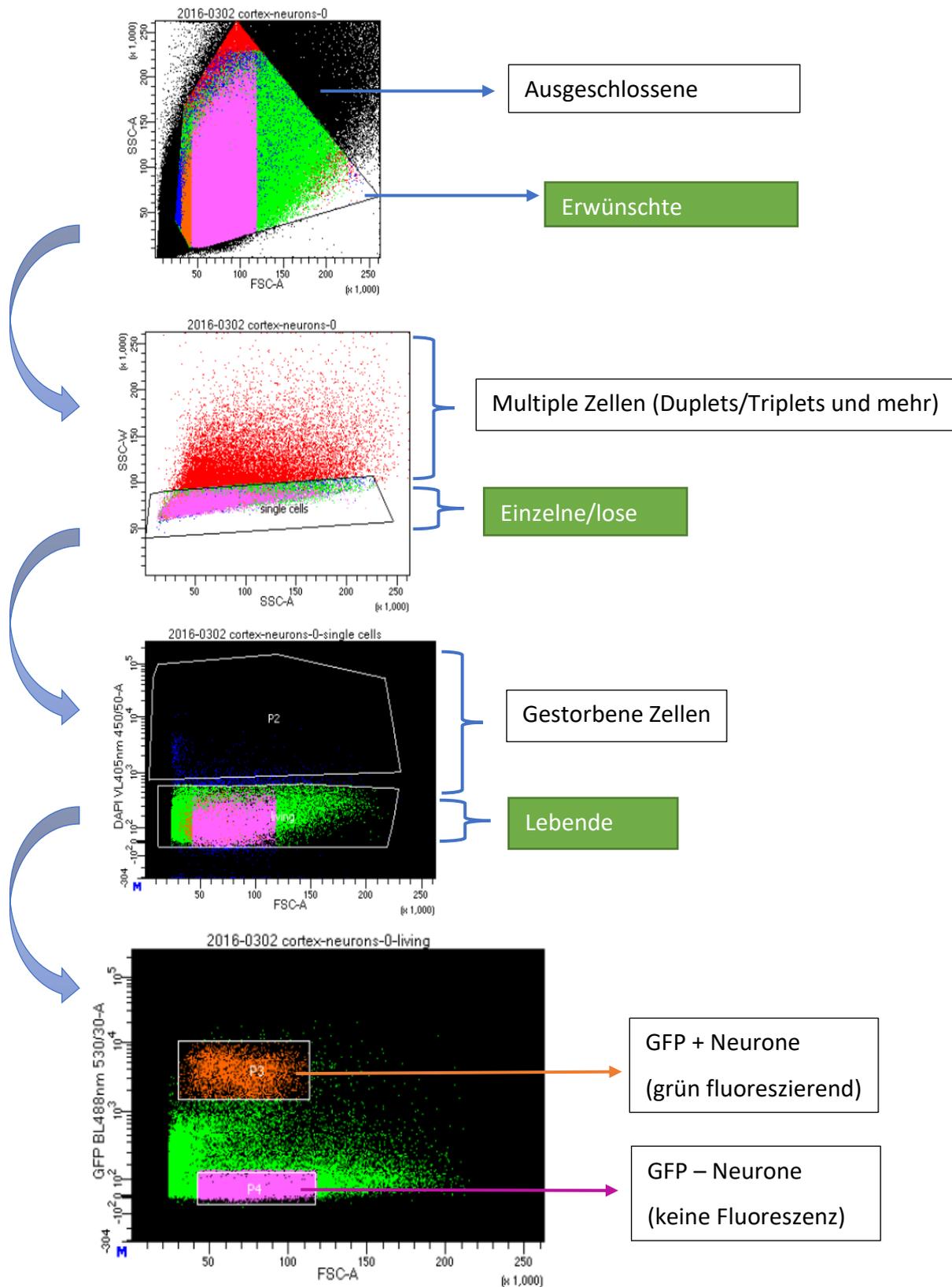


Abbildung 17 Neuronen-Trennung mit der ARIA III Software.

4.10. FACS mit WT Mäuse

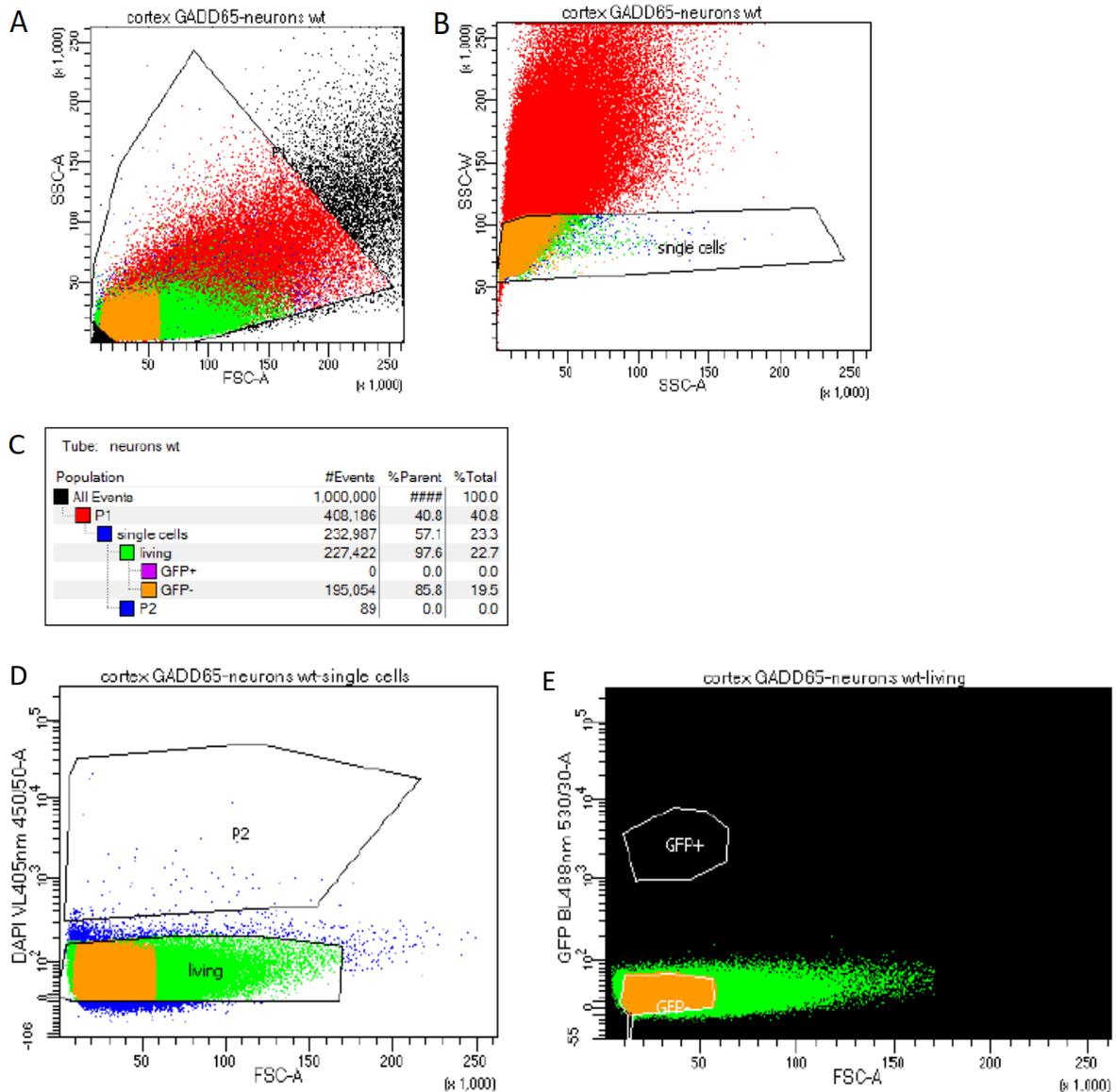


Abbildung 18 Neuronentrennung mit der FACS ARIA III Software von Wildtyp Mäusen.

(A) Darstellung aller „events“. (B) Auswahl der einzelnen Zellen. Die abgeschiedenen Zellen werden in Rot dargestellt. (C) Prozent-Angaben der Gruppen-Unterteilungen und Anzahl der registrierten „events“ durch den FACS. (D) Darstellung der Lebenden (rot und grün) und abgestorbenen Neurone (blau). (E) Darstellung der Abwesenheit an GFP+ Neuronen bei der Wildtyp Präparation. In Grün und Orange werden die GFP- Neuronen dargestellt.

Um Verzerrungen zu vermeiden, setzten wir dieselben „gates“ sowohl für die GAD-69-GFP Kulturen als auch für die Wildtyp-Kulturen. Es sind keine GFP + Neuronen in der Wildtyp Population zu sehen.

Zur negativ-Kontrolle und um zu entscheiden, welchen Einfluss die FACS-basierte Sortierung auf die Vitalität der Neuronenkulturen hat, erfolgte auch die FACS-basierte Sortierung von Wildtyp Kortex Gewebe. Wie erwartet, konnten hier im Scatterplot (Abb. 21) keine GFP + Zellpopulationen erfasst werden.

4.11. Qualität der Sortierung

Im Folgenden sollten die Qualität und Reinheit der Neuronenkulturen nach der FACS-basierten Zelltrennung und anschließender Kultivierung untersucht werden. Hierzu wurden nun Kortexes von GAD-67-GFP Knock-in Mäusen genutzt. Diese transgenen Mäuse haben GAD-67 positive Interneurone, die ein grün fluoreszierendes Signal (GFP) exprimieren. Dies erlaubt die FACS-basierte Trennung von GFP positiven (GFP +) Neuronen.

Die höchste Reinheit zeigten die 100% GFP - Populationen (Median 92,9 %; Minimum 66,7%; Maximum 100%; Mittelwert: 89,7%; Standardabweichung 11,5%; Standardfehler 2,3%; CI [84,9; 94,4]). Aufgrund der niedrigen Reproduzierbarkeit des 50%/50% Verhältnisses, weisen die 50%/50% Populationen eine hohe Standard-Abweichung auf. Jedoch liegt der Median bei 50% (Minimum 12%; Maximum 100%; Mittelwert: 54,6%; Standardabweichung 21,8%; Standardfehler 3,6%; CI [47,3; 61,8]). Hingegen weisen die GFP – Population mit einem Anteil an 22,5% GFP + Neurone im Durchschnitt in der Kultur eine niedrige Reinheit auf (Median 22,5%; Minimum 0%; Maximum 50%; Mittelwert: 22,5%; Standardabweichung 17,1%; Standardfehler 3,8%; CI [14,5; 30,6]).

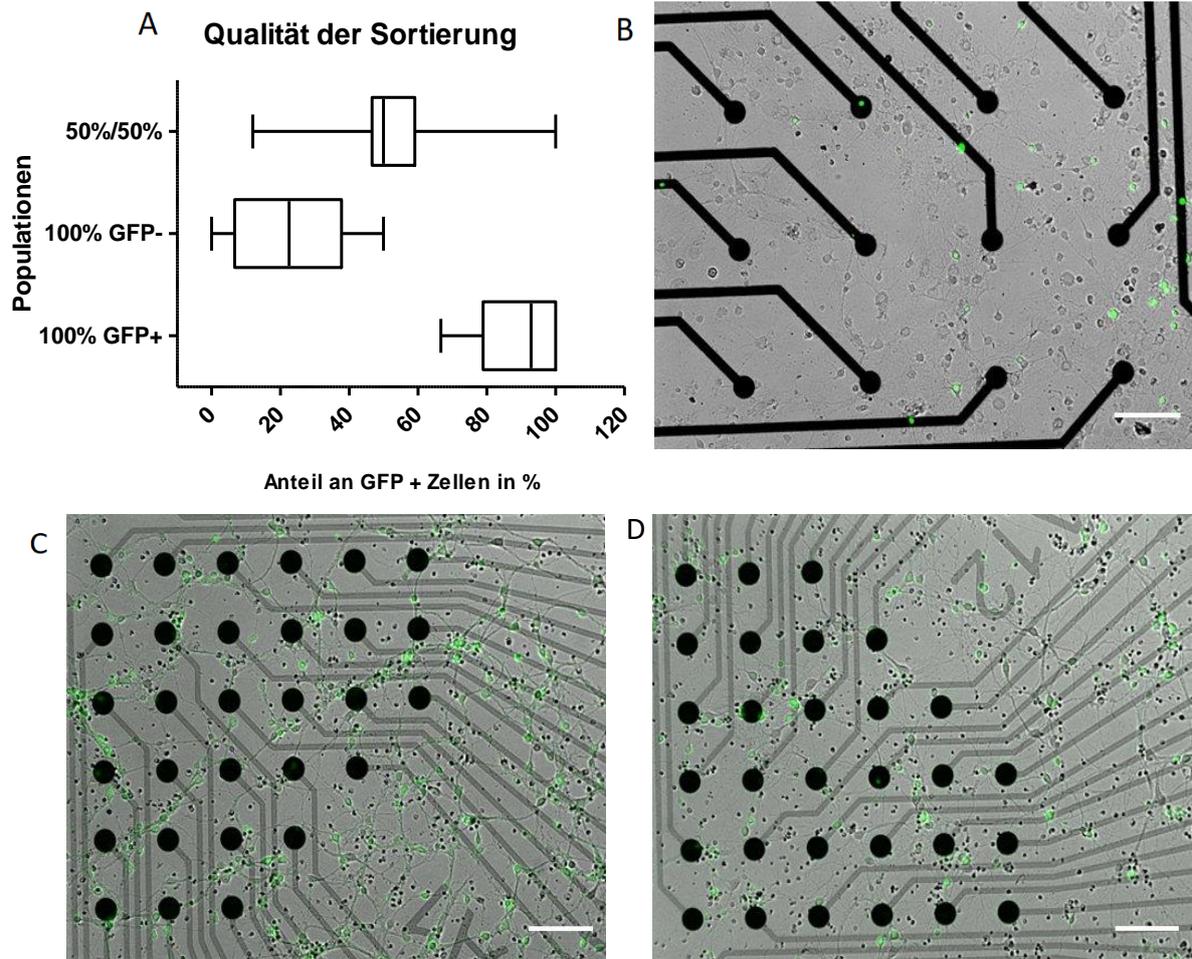


Abbildung 19 Qualität der Sortierung dargestellt mit Kastengraphik und exemplarische Kulturaufnahmen mit unterschiedlichem E/I-Verhältnis.

(A) Die Zellen wurden visuell gezählt, deren Populationen gewichtet und daraus ein Mittelwert berechnet, um eine Verzerrung durch einzelne Populationen mit hoher Anzahl an Sichtfeld/n zu vermeiden. 50%/50% Populationen: $n = 10$ aus 6 unabhängigen Kultur-Präparationen, $M = 3,7$ Sichtfeld/n; 100% GFP - $n = 6$ aus 5 unabhängigen Kultur-Präparationen, $M = 3,3$ Sichtfeld/n; 100% GFP + $n = 8$ aus 7 unabhängigen Kultur-Präparationen, $M = 3,1$ Sichtfeld/n (B) Representative 100% GFP - Zellkultur am TIV 14. (C) Representative 100% GFP + Zellkultur am TIV 14. (D) Representative 50% GFP - / 50% GFP + Zellkultur am TIV 14. Die Maßstableiste korrespondiert zu 100 μm .

1.1. Cell-death viability test

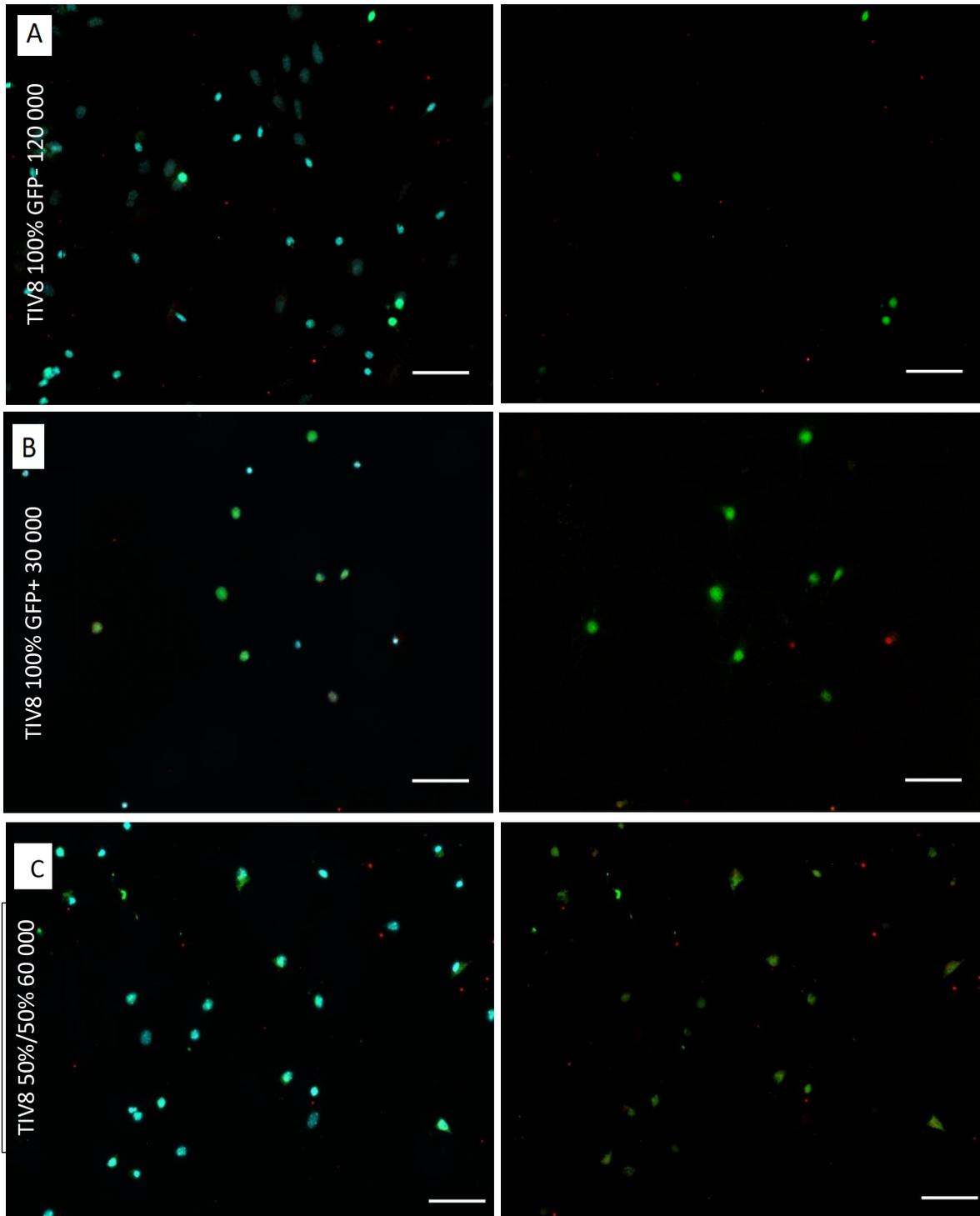


Abbildung 20 Immunfärbungen von getrennten Populationen am TIV 8 für den cell-death viability test.

Bei allen Populationen befinden sich weniger als 5% der Nervenzellen in Apoptose. (A) 100% GFP - Population: 0% Neurone in Apoptose (B) 50%/50% GFP +/- Population: 20% Neurone in Apoptose (C) 100% GFP + Population: 0% Neurone in Apoptose. Die Maßstabelleiste korrespondiert zu 100µm.

1.2. Elektrophysiologie

Die GAD-67-GFP-Populationen weisen eine höhere Rate an lebenden Populationen und elektrophysiologisch aktivere Neuronen auf als die Wildtyp-Populationen. Von allen Populationen erfüllen keine die vorgegebenen elektrophysiologischen Kriterien (mind. 7 aktive Kanäle am TIV 7, mind. 14 aktive Kanäle am TIV 14, mind. 21 aktive Kanäle am TIV 21).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Etablierung eines Protokolls für die Generierung von primären Kortikalen Neuronen nach der FACS-basierten Modifikation des Verhältnisses an Interneuronen und exzitatorischen Prinzipalzellen gelungen ist. Allerdings ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, Kulturen auf den MEA-Arrays zu generieren, die eine stabile und ausreichende elektrische Aktivität zeigen, um diese vergleichend quantifizieren zu können.

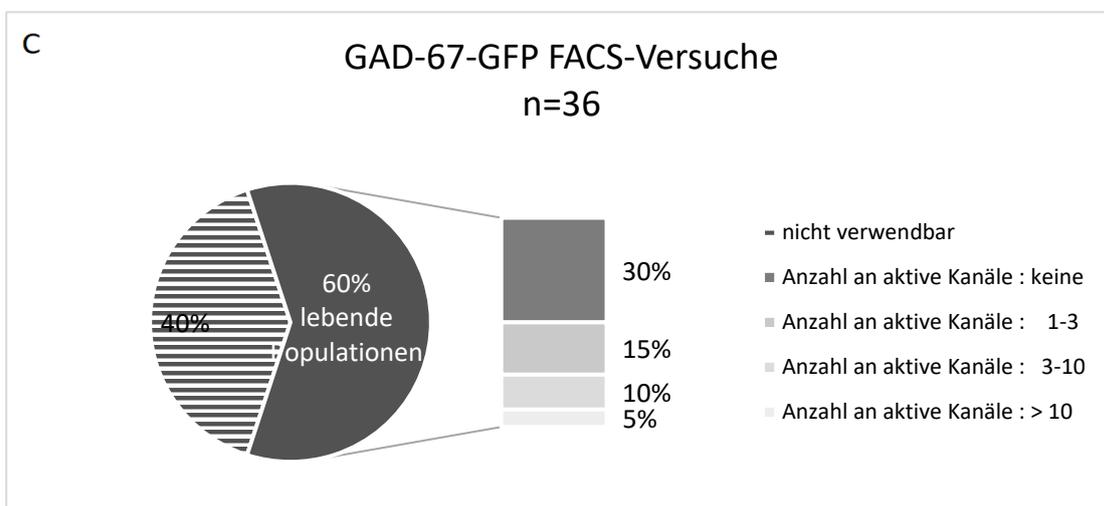
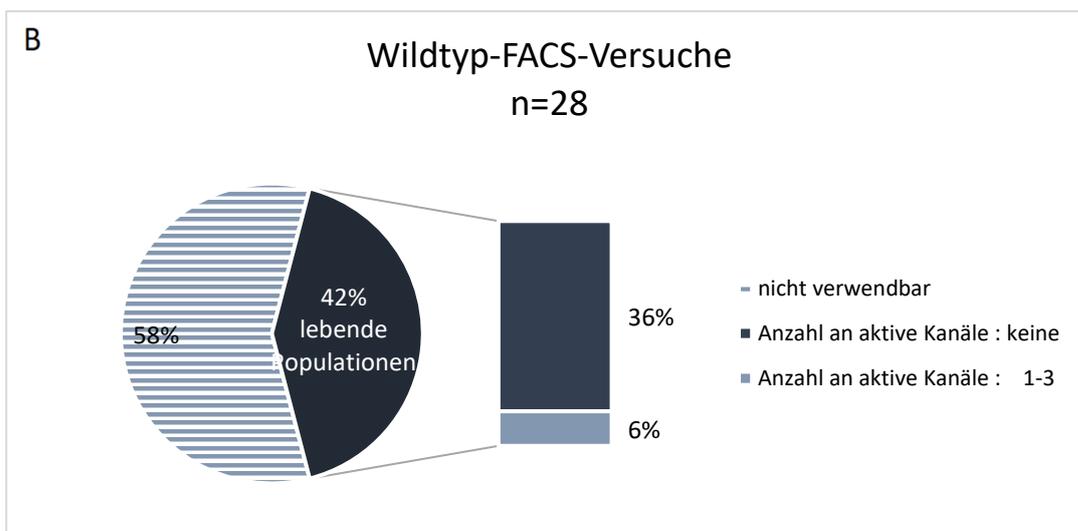
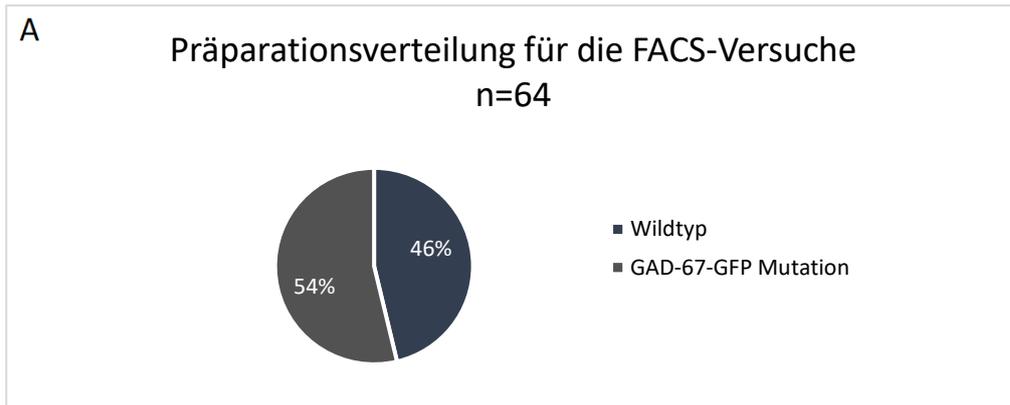


Abbildung 21 Anteil an lebenden Populationen auf die gesamte Anzahl an Populationen und Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen.

(A) Verteilung der GAD-67-GFP Präparationen auf die gesamte Anzahl an Präparationen. (B) Elektrophysiologische Ergebnisse aller Wildtyp-Kulturen nach dem FACS. (C) Elektrophysiologische Ergebnisse aller GAD-67-GFP-Kulturen nach dem FACS.

2. Diskussion

Die exzitatorische und inhibitorische Balance im reifen wie auch im unreifen Gehirn ist für die Bildung eines funktionstüchtigen neuronalen Netzwerkes erforderlich. Jedoch bleiben die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen zur Etablierung des E/I-Verhältnisses noch unklar. Im ersten Teil dieser Arbeit stellten wir den Wechsel der GABAergen exzitatorischen in eine inhibitorische Antwort fest. Die neuronalen Kulturen zeigten eine Änderung der elektrophysiologischen Antwort auf eine akute pharmakologische Blockade der GABA_A Rezeptoren *in vitro* ab dem 14. Tag. Im zweiten Teil ermöglichten wir die Kultivierung neuronaler Populationen mit veränderten exzitatorischen und inhibitorischen Anteilen. Wir zeigten, dass die Neuronen-Kulturen trotz unterschiedlichem E/I-Verhältnis überlebensfähig sind und ein neuronales-Netzwerk ausbilden. Weiter konnten keine elektrophysiologischen Daten erhoben werden.

Teil I: In vitro Bestimmung des zeitlichen GABAergen E/I-Wechsels

2.1. Bestimmung der GABAergen Antwort auf der elektrophysiologischen Ebene

In den letzten Jahren wurden viele Untersuchungen zum besseren Verständnis der Hirnfunktion durchgeführt. Bildgebende Darstellungen neuronaler Netzwerke größerer Hirnareale, wie PET (Positronemissionstomographie) oder fMRT (funktionelle Magnetresonanztomographie) erlauben jedoch keine genaueren Untersuchungen der Interaktion, der Entwicklung und möglicher Veränderungen kleiner Zellverbände. Um diese Lücke zu schließen, wurden sehr unterschiedliche Experimente durchgeführt. Soweit es die Ethik erlaubt, bietet die Implantation von Mikroelektroden in das Gehirn von Tieren zum einen viele Vorteile durch ihre direkte Messung unter *in vivo* Konditionen, andererseits ist diese Methode sehr aufwändig und ermöglicht jedoch nicht, die Netzwerkentwicklung von Anfang an zu verfolgen. Besser zu kontrollieren sind Schnittpräparate, welche kontrovers diskutiert werden. Diese werden von Kritiker als pathologisch bewertet, weil Zellverbände von umgebenden Hirnregionen getrennt und neuronale Vernetzungen unterbrochen werden. Zellkulturen erlauben es, die Entstehung neuronaler Netzwerke und deren Interaktionen auf der Einzelzellebene zu beobachten, was am komplexen Gehirn *in vivo* kaum möglich wäre. Sie sind reproduzierbar, kontrollierbar und die Verwendung von pharmakologischen Substanzen und genetischen Methoden ist wesentlich einfacher

durchzuführen. Elektrische Ströme können mit großer räumlicher Auflösung mittels MEA gemessen werden. Die Verwendung von MEAs macht die Messung elektrischer Aktivität eines Neurons, das simultan optisch identifiziert und fotografiert wird, möglich (Weir et al., 2015). Die elektrischen Aktivitäten neokortikaler Neurone unter *in vitro* Konditionen bilden innerhalb weniger Tage spontane elektrische Aktivitäten, die denen unter *in vivo* Konditionen ähnlich sind (Kamioka et al., 1996, Sun et al., 2010, Egorov and Draguhn, 2013, Ciarrusta et al., 2020).

Die GABA_A Rezeptoren sind schon in frühen neuronalen Entwicklungsstadien vorhanden und steuern bereits zu diesem Zeitpunkt die elektrische Aktivität (LoTurco et al., 1995, Galanopoulou, 2008, Kilb et al., 2013, Halbhuber et al., 2019). Aus diesen Gründen wurde für dieses Experiment der selektive, potente, allosterische GABA_A R. Antagonist Gabazin gewählt. Er zeigte am TIV 7 eine inhibitorische Wirkung, woraus gefolgert werden kann, dass GABA in diesem Stadium exzitatorisch wirkt. An TIV 14 und 21 hingegen führte Gabazin zu einer allgemeinen neuronalen Exzitation, was für GABA einen möglichen inhibitorischen Einfluss bedeutet. Am TIV 21 wurden niedrigere Aktionspotenzialfrequenzen gemessen, was vermutlich auf ein höheres Populationsalter und dem sich daraus ergebenden neuronalen Untergang zurückzuführen ist.

In diesem Versuch wurde ein Perfusionssystem benutzt, womit das neuronale Nährmedium ausgewaschen und durch eine bestimmte Flüssigkeit mit vorgegebenen Zusätzen (Gabazin-Zusatz) ersetzt wurde. Strömungen, welche durch das Perfusionssystem erzeugt werden, können möglicherweise Nervenzellen aus der Kultur herauspülen, was die Messwerte potenziell verändert. Die richtige Auswahl der Spülgeschwindigkeit ist eine grundlegende Voraussetzung dafür, spätere Messfehler reduzieren zu können. (Saalfrank et al., 2015) zeigten, dass *in vitro* Perfusionen neuronaler Populationen während 70-tägiger Kontrolle unter dem Mikroskop keinen schädlichen Einfluss auf die Kulturen hatten.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften wurden anhand der MEA Chips erfasst und gespeichert. Die elektrische Aktivität wurde simultan mit einer hohen zeitlichen Auflösung abgeleitet. Der Abstand von 100-200 µm zwischen zwei Elektroden erlaubte die Ableitung einzelner Neuronen und deren Zuweisung zur jeweils zugehörigen Elektrode. Eine zusätzliche,

visuelle Sortierung der Aktionspotenziale steigerte die Präzision der Ergebnisse (Franke et al., 2012, Weir et al., 2014).

2.2. Bestimmung der GABAergen Antwort auf der mRNA Ebene

Ab dem TIV 14 ist ein KCC2-mRNA-Anstieg und eine gleichzeitige NKCC1-mRNA-Verarmung in den primären kortikalen Zellkulturen zu beobachten. Wenn man dieses Ergebnis mit dem Ergebnis aus der elektrophysiologischen Untersuchung in Verbindung setzt, wird verdeutlicht, dass unter anderem der KCC2-mRNA-Anstieg, den E/I-Wechsel auslöst (Ben-Ari, 2002, Ben-Ari, 2014, Ben-Ari, 2017). Zusätzlich ist eine leichte NKCC1-mRNA-Erhöhung am TIV 21 im Vergleich zum TIV 14 beobachtet worden, jedoch in geringerem Ausmaß als an TIV 7. Diese Veränderung könnte auf einem Regulationsmechanismus der intrazellulären Chloridkonzentration beruhen. So werden bei Bedarf NKCC1-Transporter in die Zellmembran eingebaut, was den intrazellulären Chloridgehalt erhöht. Dieser Regulationsmechanismus ist abhängig vom Ausmaß der jeweiligen Netzwerkaktivität. Er dämpft im ausgereiften Kortex eine übermäßig inhibitorische GABAerge Wirkung und kann sogar den E/I-Wechsel auslösen (Staley et al., 1995, Kaila et al., 2014).

2.3. Bestimmung der GABAergen Antwort auf der Proteinebene

Wegen Insuffizienz des Markers wurde NKCC1 nicht bestimmt. Die Fluoreszenz-Intensitätsabnahme von KCC2 zwischen TIV 14 und 21 korrelierte weniger mit dem Anstieg an KCC2-mRNA von TIV 14 auf 21. Abb. 12, 13, 14 zeigen anhand der kondensierten, mit DAPI gefärbten Nervenzellkerne, einen größeren Neuronenuntergang, der vermutlich durch das Alter der Population bedingt ist. Möglicherweise liegt es am schnelleren Zerfall der Proteine im sterbenden Neuron, wohingegen die mRNA mehrere Stunden bis Tage lang stabil ist.

2.4. VU und Furosemid Versuch

Furosemid ist ein nicht-selektiver Cl⁻-Transporter-Inhibitor, der sowohl NKCC1- und KCC2-Transporter hemmen kann. Aus mehreren Gründen wurde der Versuch in vitro durchgeführt, und dabei ausschließlich kortikale Mausneuronen verwendet. Nicht-selektive Diuretika können auch in der Maus extrazerebrale Chlorid-Transporter hemmen (Hesdorffer et al., 2001, Andreasen and Nedergaard, 2017). Dadurch können sie das metabolische, hormonelle und sogar das kardiorespiratorische System beeinflussen (Löscher and Köhling, 2010, Löscher et al., 2013, Löscher et al., 2020). Dies könnte zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen.

Unter *in vitro* Bedingungen lässt sich der pH-Wert weitgehend konstant halten. pH-Abweichungen könnten die neuronale Aktivität verändern. Regulierend greift hier z.B. der GABA_A Rezeptor aufgrund seiner Durchlässigkeit für HCO₃⁻ ein (Farrant and Kaila, 2007, Casey et al., 2010, Kirischuk et al., 2017). Darüber hinaus ist die Furosemid-Dosis *in vivo* schwieriger festzulegen, da sie u.a. vom Tiermodell, der Geschwindigkeit des Metabolismus und der Blut-Hirn-Schranken-Passage abhängig ist (Brandt et al., 2010, Löscher et al., 2020).

Furosemid wurde auf primäre, kortikale Mausneurone aufgetragen und hemmte ab Beginn des neuronalen Wachstums die NKCC1- und KCC2-Transporter. Am TIV 14 wiesen die behandelten Kulturen ein höheres Exzitationslevel auf als die unbehandelten. Daraus lässt sich folgern, dass eine Hemmung der NKCC1- und KCC2-Transporter und die daraus resultierende Änderung der Cl⁻-Konzentration, zu einer Störung im E/I-Wechsel führen. Weitere Versuche wurden mit dem selektiven KCC2-Transporter-Inhibitor VU durchgeführt. Ähnlich wie Furosemid verhinderte VU den E/I-Wechsel. Dies zeigt, dass KCC2-Transporter vor dem TIV 14 den Zeitpunkt des E/I-Wechsels beeinflussen können.

2.5. Alamar blue cell viability test

Ausschließlich die Kulturen, die früh in der Entwicklung mit VU und CNQX & DAPV behandelt wurden, zeigten einen signifikanten Zelluntergang. In der Literatur ist beschrieben, dass sich der Anteil an exzitatorischen Neuronen verringert, wenn eine Übererregbarkeit neuronaler Netzwerke entsteht (Cowan et al., 1984, Kuan et al., 2000, Wong et al., 2018, Denaxa et al., 2018). Möglicherweise hat die pharmakologisch herbeigeführte Störung am Beginn der neuronalen Entwicklung eine E/I-Dysbalance ausgelöst, welche das Überleben der Nervenzellen beeinflusst haben könnte.

Zusammenfassend wurde auf der elektrophysiologischen Ebene, mRNA-Ebene und Protein-Ebene gezeigt, dass der GABAerge E/I-Wechsel zum TIV 14 stattgefunden hat und es im direkten Zusammenhang mit der NKCC1- und KCC2-Mengenregulierung steht. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Reifung des GABAergen Systems *in vitro* vergleichbar zu der *in vivo* Situation stattfindet. Somit kann dieses Modellsystem auch für weitere Untersuchungen der E/I-Balance und der physiologischen und pathophysiologischen Veränderungen im GABAergen System genutzt werden. Dieser Teil der vorliegenden Arbeit wurde auch innerhalb eines peer-reviewten Originalartikels im Journal *Frontiers of cellular neurosciences* (REF) veröffentlicht.

Teil II: FACS-basierte Bildung der in vitro Kulturen mit verändertem E/I-Verhältnis

2.6. Protokollauswahl für den FACS

Bei Mäusen liegt das Verhältnis von exzitatorischen zu inhibitorischen Neuronen ab dem Embryonaltag 14.5 bei etwa 4:1 (Sahara et al., 2012). Chen und Dzakpasu (2010) haben dieses 4:1-Verhältnis *in vitro* verändert, indem sie Hirngewebe mit unterschiedlichen E/I-Anteilen zusammengeführt haben. Die *in-vitro* Reproduzierbarkeit jener E/I-Kombinationen gestaltete sich jedoch schwierig. Wir machten es uns zur Aufgabe, Nervenzellpopulationen mit reproduzierbaren E/I-Kombinationen zu bilden. Der FACS (fluorescent activated cell sorting; ARIA III, IMB Mainz) ermöglichte uns mit einer relativen Genauigkeit, Nervenzellen anhand ihrer Fluoreszenz zu unterscheiden. Um den größten Zellertrag nach der Gehirnpräparation zu erhalten, standen drei Protokolle zu Verfügung. Das Protokoll mit dem enzymatischen Verdauungsschritt (Pronase), erzielte den größten Zellertrag. Zudem zeichneten sich die so gewonnenen Populationen als besonders robust aus. Es waren jedoch weitere Versuche nötig, um das Protokoll zum FACS zu optimieren.

2.7. Nervenzelldichte

Im Kortex der Maus beträgt die Nervenzelldichte etwa $50.000/\text{mm}^3$. Frühere Arbeiten des Labors AG Luhmann zeigten, dass die niedrigste Dichte für *In-vitro*-Versuche auf MEA Chips $115,2 (\pm 19,9)$ Neuronen/ mm^2 betrug (Weir et al., 2014). Wir führten Versuche in ansteigender Zelldichte durch (106 Neuronen/ mm^2 , $170/\text{mm}^2$, $282/\text{mm}^2$, $423/\text{mm}^2$). Eine Zelldichte von $423/\text{mm}^2$ wurde als am besten zum schmalen MEA Chip erachtet und daher übernommen. Aufgrund der durch FACS ausgelösten Apoptose reduzierte sich die Zelldichte deutlich. Dennoch ist eine adäquate Zelldichte Voraussetzung für ein optimales Populationswachstum sowie für die Ausbildung eines elektrischen Netzwerkes. Sowohl Parnas und Kollegen als auch Dus und Kollegen (1997, 1997) zeigten u.a., dass die Zelldichte einen Einfluss auf die Signalkaskaden und Genexpression von Neuronen haben kann.

Ein Wechsel des Nährmediums wirkte sich negativ auf die Vitalität der Populationen aus und wurde deshalb vermieden. Nervenzellarme Populationen zeigten eine geringere Stoffwechselaktivität.

2.8. PO versus PEI

Nach dem FACS benötigen Neuronen bestmögliche Überlebensbedingungen *in vitro*. Dabei stellt ein guter Haftungsgrund das Fundament zur Kultivierung neuronaler Netzwerke dar. Rüegg und Hefti(1984) berichteten, dass PO durch PEI ersetzt werden kann. Das Haften der Zellen und deren Weiterentwicklung wurden als vergleichbar eingeschätzt. Dagegen zeigten Vancha und Kollegen (2004), dass schwach haftende Zelllinien ein besseres Outcome durch das Polymer PEI haben. Harnett und Kollegen (2007) beschrieben, dass sich die Wirkung von PO je nach Untergrund verändert. Leider basierten diese Untersuchungen nicht auf MEA Chips. In unseren Versuchen konnte keine höhere Überlebensrate der Zellen nach dem FACS bei der PEI Beschichtung gegenüber der PO Beschichtung auf den MEA Chips beobachtet werden.

2.9. Qualität der Sortierung

Die Qualität der Sortierung mittels FACS wurde bei Jang und Kollegen (2014) mit einer Sensitivität von 0,01 % bewertet. Allerdings waren keine Neuronen Gegenstand der Sortierung. Dagegen vertreten Fontana und Kollegen (2017) die Meinung, dass eine komplette Separation von unterschiedlichen Zelltypen in einer Lösung mittels FACS nicht möglich sei.

Um zuverlässig abgestorbene Zellen zu markieren, wurde der Marker DAPI benutzt. Jedoch konnten weitere Bestandteile, wie z.B. Zelltrümmer nicht markiert werden. Diese Verunreinigungen mindern die Qualität der Sortierung, was die statistischen Ergebnisse verfälschen kann. Wallberg und Kollegen (2016) haben in ihren Versuchen Populationen mit Annexin V(FITC)/DAPI/TMRM markiert, um genauere Ergebnisse zu erzielen. DAPI kann mit Annexin V(FITC) kombiniert werden. TMRM bindet an aktive Mitochondrien und markiert somit auch lebende Zellen. Auf dieser Weise können lebenden Zellen auch von Verunreinigungen unterschieden werden.

Die Sortierung der 100% GFP + Populationen war in unseren Versuchen besserer Qualität als bei den 100% GFP - Populationen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass sich in den nichtleuchtenden Bestandteilen unreife GFP + Neurone befinden, die das grün-fluoreszierende Protein noch nicht ausreichend exprimieren oder sich im Medium Unreinheiten oder Gliazellen befinden. Die Qualität der Sortierung ist von der Anzahl an exprimierten, grün-fluoreszierenden Proteinen in GABAergen Neuronen abhängig. Ungefähr 93% der GABAergen Neuronen exprimieren das grün-fluoreszierende Protein und leuchten

grün (Tamamaki et al., 2003). Die übrigen 7% sind die GABAergen Zellen, die die Glutamat Decarboxylase (GAD) nicht exprimieren (Sonnewald et al., 2004). Die Negativkontrolle mit Wildtyp-Mäusen zeigte das eindeutige Fehlen von GFP + Neurone.

Problematisch war die Herstellung der 50% GFP +/50% GFP - Populationen. Da die GFP - Populationen eine relative Anzahl an GFP + Neuronen aufwiesen, musste der Sortiervorgang am ARIA III Sortiergerät auf 80% GFP - und 20% GFP + Neurone eingestellt werden. Mehrere Versuche wurden gestartet, um das Verhältnis *in vitro* von 50% GFP - und 50% GFP+ Populationen zu erhalten.

2.10. Cell death viability test

Die Herausforderung bestand darin Nervenzellen nach dem FACS zu kultivieren. Frühere Kultivierungsversuche wurden mit Neuronen von Plattwürmern (Asami et al., 2002) oder Drosophilaen gestartet (Feuillette et al., 2017).

Nachteil an der Durchflusszytometrie ist die nicht schonende Trennung der Nervenzellen. Es werden mehr als 1000 Zellen pro Sekunde sortiert, was sich somit negativ auf das Überleben der Zellen auswirkt. Die Zellen werden von einem Flüssigkeitsfilm ummantelt und werden durch eine sog. Nozzle geschleust. Wir wählten eine 100µm breite Nozzle, um die Zellen möglichst schonend zu trennen. Es sind noch weitere Untersuchungen nötig, um die genaue Auswirkung vom FACS auf das Überleben von Neuronen darzustellen. Bisher liegen keine Arbeiten vor, die neokortikale Zellen nach dem FACS kultivieren.

2.11. Elektrophysiologie

Die mit dem FACS hergestellten Kulturen zeigten eine verzögerte Entwicklung der Neuronen, der Fortsätzen und somit des elektrischen Netzwerkes. Eine rudimentäre neuronale Aktivität wurde dementsprechend in den elektrophysiologischen Messungen beobachtet. Zudem lag die Sterblichkeit der Nervenzellpopulationen nach FACS höher. Kaum eine Population konnte bis zum TIV 21 kultiviert werden. Dies ist auch durch den semi-sterilen Trennungsvorgang bedingt. Die Populationen sind trotz Penicillin/Streptomycin (bakterizid/bakteriostatisch) und Amphotericin B (fungizid/fungostatisch) Behandlung (Hawser and Islam, 1999, Meletiadis et al., 2007), sehr anfällig für Kontaminationen gewesen. Schädigenden Wirkungen, die durch Dosis-Erhöhungen getriggert werden, konnten nicht ausgeschlossen werden. In der Tat wirken Penicillin und Streptomycin ab einer gewissen Dosis neurotoxisch (MOLITOR and KUNA, 1949, Vardakas et al., 2018) und für Amphotericin B genügen schon 1mg/ml, um eine Neurotoxizität

bei der Ratte auszulösen (Reuhl et al., 1993, Laniado-Laborín and Cabrales-Vargas, 2009). Beim Menschen wurden nach mehreren Fällen eine Neurotoxizität nach Amphotericin B Gabe beobachtet (Winn et al., 1979, Glasser and Murray, 2011).

Eine weitere Bedingung, die die mangelnde neuronale Aktivität der Nervenzellpopulationen nach dem FACS erklären könnte, ist die fehlende Anwesenheit von Gliazellen. In der Tat wachsen Neuronen in Anwesenheit von Gliazellen besser und bilden vermehrt Fortsätze, Verzweigungen und Synapsen (Pfrieger and Barres, 1996, Um, 2017). Jedoch funktioniert die Nervenzellkultivierung auch ohne Gliazellen. In den Nervenzellkulturen wird sogar das Wachstum der unerwünschten Fibroblasten und Gliazellen mittels des Mitose Hemmstoffes AraC gehemmt. Schwieger und Kollegen (2016) zeigten, dass mittels AraC nahezu alle Gliazellen und Fibroblasten untergehen, wodurch der Neuronenanteil stark ansteigt. Zusätzlich beobachteten sie, dass weder das Überleben, das Neuritenwachstum oder der Somadurchmesser negativ beeinflusst wurden. Jedoch muss AraC wegen seines neurotoxischen Effektes in niedriger Dosierung angewendet werden (Courtney and Coffey, 1999). Unseren Nervenzellpopulationen wurden mit B27/Neurobasalmedium kultiviert, was das Astrozyten Wachstum hemmt (Brewer et al., 1993). Zusätzlich wurde die Gliazell-Population von der ARIA Software erkannt und aussortiert. In dieser Arbeit wurde versucht die Kortikalen Nervenzellen mit Konditioniertem Medium zu Kultivieren. Dieses Medium enthält

Faktoren, die von Gliazellen sezerniert werden. Jedoch wurde kein Unterschied in die Regenerationsfähigkeit, Elektrophysiologie oder Lebensdauer der Nervenzellpopulationen nach dem FACS beobachtet. Eine weitere Möglichkeit wäre, eine bestimmte Anzahl an Gliazellen mit dem FACS in der verschiedenen Population zu sortieren mit der Fragestellung, ob sich ein stabileres und aktiveres Netzwerk ausbildet.

Frühere Arbeiten zeigten, dass ein Netzwerk umso erregbar ist, je stärker die Inhibition gedrosselt wird (Vogels and Abbott, 2009) und dass Populationen, die nur aus inhibitorischen Neuronen bestehen, keine elektrische Aktivität aufweisen (Chen and Dzakpasu, 2010). Sowohl Sipilä und Kollegen (2009) als auch Pfeffer und Kollegen (2009) zeigten, dass ein Verlust an exzitatorischer GABA-Wirkung in NKCC1-Knockout Mäusen zu einer kompensatorischen Erhöhung der glutamatergen Aktivität und Verzögerung der glutamatergen und GABAergen synaptischen Reifung führte. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Deprivation der GABAergen

Neurone im unreifen Kortex zu einer erhöhten Überlebensrate der Interneurone führte. Dies verursachte eine Synchronisation des elektrischen Netzwerkes im reifen Kortex (Duan et al., 2020). Die Fragestellung, ob Populationen mit unterschiedlichem E/I-Neuronenanteil, elektrophysiologischen, morphologischen Veränderungen oder Adaptationen aufweisen, konnte bisher innerhalb der Versuche der vorliegenden Arbeit nicht ausreichend beantwortet werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es prinzipiell möglich ist, primäre Neuronenkulturen nach einer FACS-basierten Zelltrennung zu generieren. Zudem besteht auch die Möglichkeit, kortikale Netzwerke zu bilden, die sowohl nahezu aus Interneuronen bestehen oder auch nur zur Hälfte Interneurone aufweisen. Jedoch müsste die Quantität und Qualität der Zellen in der Neuronenkultur gesteigert werden, um elektrophysiologische Vergleiche zwischen den Kulturen bilden zu können. Ebenso könnten durch eine Optimierung des Versuchs potenzielle strukturelle Veränderungen oder Kompensationsmechanismen aufgedeckt werden, die aufgrund der E/I-Dysbalance entstehen könnten.

3. Klinische Relevanz

Die Balance zwischen dem inhibitorischen und exzitatorischen Schenkel ist unabdingbar für die Bildung funktionstüchtiger neuronaler Netze. Eine Störung in der GABAergen Reifung oder eine Verzögerung des GABAergen E/I-Wechsels kann eine Veränderung der Anzahl an überlebenden Interneuronen mit Überwiegen des exzitatorischen oder inhibitorischen Schenkels verursachen (Watanabe et al., 2019, Duan et al., 2020). Viele neuropsychiatrische Krankheitsbilder weisen eine E/I-Dysbalance auf, wie z.B. Epilepsie (Löscher et al., 2020), Autismus (Culotta and Penzes, 2020), Alzheimer (Xu et al., 2020), Depression, Schizophrenie oder bipolare affektive Störungen (Van Voorhis et al., 2019).

Unsere Arbeit beschreibt die Ausreifung des GABAergen Systems, von einer unreifen exzitatorischen hin zu einer inhibitorischen GABAergen Antwort und kann künftigen Studien zur Erforschung der Entwicklung des Zentralnervensystems als Hinweis dienen.

4. Limitationen

Die Sortierung mit dem ARIA III hat eine negative Auswirkung auf der Vitalität der Nervenzelle hinterlassen und war hiermit ein Limitierungsfaktor für den Zellwachstum. Viele Methodikschritte mussten geändert werden, um die besten Überlebensraten zu erzeugen.

Die semi-sterilen Sortierungszustände haben ebenfalls die Kultivierung von Nervenzellpopulationen sehr erschwert. Das ARIA Gerät wurde in sehr viele Projekte involviert, von Drosophilen bis zu Neuronen. Nach jedem Durchgang wurden die Schläuche gespült und die Proben-Einsätze mit Ethanol gesäubert. Trotz all dieser Bemühungen ist es vermutlich durch die Luftströmungen und verbliebenen Partikeln in den Schläuchen und Umgebung immer wieder zu Kontaminationen der Kulturen gekommen. Dies musste jeweils mit höheren Dosen an Antibiotika und Antimykotika kompensiert werden.

Die Versuche mit dem FACS verlangten ein hohes Maß an Flexibilität und Organisation. Sobald GFP + Mäuse zur Welt kamen, musste innerhalb von maximal 2 Tagen ein Termin im Nachbargebäude für den sehr begehrten ARIA Sorter organisiert werden.

Um an unser Ziel zu gelangen, mussten wir zuerst die Mindestdichte an Neuronen auf Deckgläser und MEAs finden. Der Trenn-Schritt mit dem Zellsorter ist ein langer Prozess. Je länger der Schritt dauerte, desto genauer wurden die Zellen getrennt. Wir mussten einen Kompromiss zwischen Qualität der Trennung und zeitlichen Aufwand finden. Alle Parameter wurden durch den Techniker des IMBs berechnet und abhängig der Menge an MEAs und Deckzellen, dauerte die Trennung zwischen 2 und 4 Stunden. Im Schnitt brauchten wir 10 min. für eine 24 Well-Platte mit 60 000 Neuronen pro Deckglas und eine halbe Stunde für einen schmalen Ring MEA mit 420 000 Neuronen, sofern die Maschine oder die Software nicht streikten.

Die Nervenzellen reagieren empfindlich, wenn sich ihr Milieu verändert. Sowohl Temperaturunterschiede als auch Erschütterungen mussten soweit wie möglich verhindert werden. Für den Transportweg wurden die Zellen auf Eis gelegt und während des Sortiervorgangs auf 4°C Kühlung getrennt. Da der Schritt zwischen mehreren Minuten bis Stunden dauerte, wurden die einzelne Well-Platten bzw. die MEAs zwischenzeitlich in dem Inkubator des IMBs gestellt. Für den Rückweg musste dann für die Zellen eine Temperatur von 37°C gewährleistet sein. Die Platten/MEAs wurden in Alufolie gewickelt und in eine

Styroporkiste mit zwei Wärmeflaschen transportiert. Je mehr Manipulationen entstanden sind, desto schwieriger war es, die Erschütterungen zu vermeiden.

Vorschläge für das bessere Überleben von Neuronen könnte im Wechsel vom FACS mit dem MACS (magnetic activated cell sorting) bestehen, der den zellulären Stress reduziert und genauso effizient wie der Aria cell Sorter sortiert (Bowles et al., 2019). Eine exakte Zelltrennung mit dem digitalen Mikrofluid-Trenner DEPArray™, der bereits in dem Bereich der Onkologie verwendet wird, könnte eine reinere Zelltrennungsmethode gewährleisten (Fontana et al., 2017).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde der zeitliche Wechsel der GABAergen Antwort von der exzitatorischen hin zu seiner inhibitorischen Antwort in primären kortikalen Neurone untersucht und die Möglichkeit erforscht, neokortikale Neuronenkulturen mit verändertem Exzitations-/Inhibitions-Verhältnis nach FACS-basierten Zelltrennung, zu kultivieren.

In Übereinstimmung mit (Ben-Ari, 2002, Ben-Ari, 2014) konnten wir anhand *in vitro* durchgeführter Genexpressionsanalysen, immunhistochemischer und elektrophysiologischer Untersuchungen zeigen, dass eine Korrelation der NKCC1 und KCC2 Expression mit dem Wechsel der exzitatorischen zur inhibitorischen GABAergen Antwort besteht. Zudem ist es uns möglich gewesen den kontinuierlichen E/I-Wechsel primärer kortikaler Maus-Neuronen zeitlich innerhalb des 7. und 14. Kultur-Tages einzugrenzen.

Mittels FACS basierter Zelltrennung, konnte ein Protokoll für die Generierung primärer kortikaler Neurone mit Modifikation des Verhältnisses an Interneuronen und exzitatorischen Neuronen etabliert werden. Somit können Neuronenkulturen, die aus nahezu 100%, 50% oder 20% Interneuronen bestehen, generiert werden. Allerdings konnte keine ausreichende elektrische Aktivität nachgewiesen werden. Um eine vergleichbare Analyse der elektrophysiologischen und zellbiologischen Eigenschaften der Kulturen mit unterschiedlichem Anteil an Interneuronen durchzuführen, müsste die Qualität und die Quantität der Zellen innerhalb der Neuronenkultur weiter verbessert werden.

Mit der vorliegenden Arbeit erfolgte eine detaillierte Beschreibung der Reifung des GABAergen Systems von der unreifen exzitatorischen hin zur inhibitorischen GABAergen Antwort, die nun als Grundlage für weitere Studien mit diesem neuronalen Modellsystem genutzt wird (Halbhuber et al., 2019).

Literaturverzeichnis

- ACHILLES, K., OKABE, A., IKEDA, M., SHIMIZU-OKABE, C., YAMADA, J., FUKUDA, A., LUHMANN, H. J. & KILB, W. 2007. Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na⁺-dependent K⁺-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons. *J Neurosci*, 27, 8616-27.
- ADELSBERGER, H., GARASCHUK, O. & KONNERTH, A. 2005. Cortical calcium waves in resting newborn mice. *Nat Neurosci*, 8, 988-90.
- ALLÈNE, C., CATTANI, A., ACKMAN, J. B., BONIFAZI, P., ANIKSZTEJN, L., BEN-ARI, Y. & COSSART, R. 2008. Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J Neurosci*, 28, 12851-63.
- ANDERSON, S. A., EISENSTAT, D. D., SHI, L. & RUBENSTEIN, J. L. 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science*, 278, 474-6.
- ANDREASEN, M. & NEDERGAARD, S. 2017. Furosemide depresses the presynaptic fiber volley and modifies frequency-dependent axonal excitability in rat hippocampus. *J Neurophysiol*, 117, 1512-1523.
- ASAMI, M., NAKATSUKA, T., HAYASHI, T., KOU, K., KAGAWA, H. & AGATA, K. 2002. Cultivation and characterization of planarian neuronal cells isolated by fluorescence activated cell sorting (FACS). *Zoolog Sci*, 19, 1257-65.
- BEN-ARI, Y. 2002. Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 728-739.
- BEN-ARI, Y. 2014. The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. *Neuroscience*, 279, 187-219.
- BEN-ARI, Y. 2017. NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders. *Trends Neurosci*, 40, 536-554.
- BEN-ARI, Y., GAIARSA, J. L., TYZIO, R. & KHAZIPOV, R. 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev*, 87, 1215-84.
- BEN-ARI, Y., KHALILOV, I., KAHLE, K. T. & CHERUBINI, E. 2012. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist*, 18, 467-86.
- BLANQUIE, O., LIEBMANN, L., HÜBNER, C. A., LUHMANN, H. J. & SINNING, A. 2017. NKCC1-Mediated GABAergic Signaling Promotes Postnatal Cell Death in Neocortical Cajal-Retzius Cells. *Cereb Cortex*, 27, 1644-1659.
- BORTONE, D. & POLLEUX, F. 2009. KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron*, 62, 53-71.
- BOWLES, K. R., T C W, J., QIAN, L., JADOW, B. M. & GOATE, A. M. 2019. Reduced variability of neural progenitor cells and improved purity of neuronal cultures using magnetic activated cell sorting. *PLoS One*, 14, e0213374.
- BRACCI, E., BALLERINI, L. & NISTRÌ, A. 1996. Spontaneous rhythmic bursts induced by pharmacological block of inhibition in lumbar motoneurons of the neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol*, 75, 640-7.
- BRANCHEREAU, P., CHAPRON, J. & MEYRAND, P. 2002. Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord. *J Neurosci*, 22, 2598-606.
- BRANDT, C., NOZADZE, M., HEUCHERT, N., RATTKA, M. & LÖSCHER, W. 2010. Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*, 30, 8602-12.
- BREWER, G. J., TORRICELLI, J. R., EVEGE, E. K. & PRICE, P. J. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, 35, 567-76.
- BRUNEL, N. 2000. Dynamics of networks of randomly connected excitatory and inhibitory spiking neurons. *J Physiol Paris*, 94, 445-63.
- CANCEDDA, L., FIUMELLI, H., CHEN, K. & POO, M. M. 2007. Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci*, 27, 5224-35.

- CASEY, J. R., GRINSTEIN, S. & ORLOWSKI, J. 2010. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 50-61.
- CHEN, X. & DZAKPASU, R. 2010. Observed network dynamics from altering the balance between excitatory and inhibitory neurons in cultured networks. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 82, 031907.
- CIARRUSTA, J., DIMITROVA, R., BATALLE, D., O'MUIRCHEARTAIGH, J., CORDERO-GRANDE, L., PRICE, A., HUGHES, E., KANGAS, J., PERRY, E., JAVED, A., DEMILEW, J., HAJNAL, J., EDWARDS, A. D., MURPHY, D., ARICHI, T. & MCALONAN, G. 2020. Emerging functional connectivity differences in newborn infants vulnerable to autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry*, 10, 131.
- CONTRERAS, D. 2004. Electrophysiological classes of neocortical neurons. *Neural Netw*, 17, 633-46.
- COURTNEY, M. J. & COFFEY, E. T. 1999. The mechanism of Ara-C-induced apoptosis of differentiating cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci*, 11, 1073-84.
- COWAN, W. M., FAWCETT, J. W., O'LEARY, D. D. & STANFIELD, B. B. 1984. Regressive events in neurogenesis. *Science*, 225, 1258-65.
- CRAIG, M. T. & MCBAIN, C. J. 2014. The emerging role of GABAB receptors as regulators of network dynamics: fast actions from a 'slow' receptor? *Curr Opin Neurobiol*, 26, 15-21.
- CRÉPEL, V., ARONOV, D., JORQUERA, I., REPRESA, A., BEN-ARI, Y. & COSSART, R. 2007. A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron*, 54, 105-20.
- CULOTTA, L. & PENZES, P. 2020. Exploring the mechanisms underlying excitation/inhibition imbalance in human iPSC-derived models of ASD. *Mol Autism*, 11, 32.
- DE LIMA, A. D., GIESELER, A. & VOIGT, T. 2009. Relationship between GABAergic interneurons migration and early neocortical network activity. *Dev Neurobiol*, 69, 105-23.
- DE MARCO GARCÍA, N. V., KARAYANNIS, T. & FISHELL, G. 2011. Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature*, 472, 351-5.
- DENAXA, M., NEVES, G., RABINOWITZ, A., KEMLO, S., LIODIS, P., BURRONE, J. & PACHNIS, V. 2018. Modulation of Apoptosis Controls Inhibitory Interneuron Number in the Cortex. *Cell Rep*, 22, 1710-1721.
- DUAN, Z. R. S., CHE, A., CHU, P., MODOL, L., BOLLMANN, Y., BABIJ, R., FETCHO, R. N., OTSUKA, T., FUCCILLO, M. V., LISTON, C., PISAPIA, D. J., COSSART, R. & DE MARCO GARCÍA, N. V. 2020. GABAergic Restriction of Network Dynamics Regulates Interneuron Survival in the Developing Cortex. *Neuron*, 105, 75-92.e5.
- DUS, L., CANU, N., ZONA, C., CIOTTI, M. T. & CALISSANO, P. 1997. NMDA receptor modulation by a conditioned medium derived from rat cerebellar granule cells. *Eur J Neurosci*, 9, 2668-76.
- EGOROV, A. V. & DRAGUHN, A. 2013. Development of coherent neuronal activity patterns in mammalian cortical networks: common principles and local heterogeneity. *Mech Dev*, 130, 412-23.
- FARRANT, M. & KAILA, K. 2007. The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. *Prog Brain Res*, 160, 59-87.
- FEUILLETTE, S., DELARUE, M., RIOU, G., GAFFURI, A. L., WU, J., LENKEI, Z., BOYER, O., FRÉBOURG, T., CAMPION, D. & LECOURTOIS, M. 2017. Neuron-to-Neuron Transfer of FUS in Drosophila Primary Neuronal Culture Is Enhanced by ALS-Associated Mutations. *J Mol Neurosci*, 62, 114-122.
- FONTANA, F., RAPONE, C., BREGOLA, G., AVERSA, R., DE MEO, A., SIGNORINI, G., SERGIO, M., FERRARINI, A., LANZELLOTTO, R., MEDORO, G., GIORGINI, G., MANARESI, N. & BERTI, A. 2017. Isolation and genetic analysis of pure cells from forensic biological mixtures: The precision of a digital approach. *Forensic Sci Int Genet*, 29, 225-241.
- FRANKE, F., JÄCKEL, D., DRAGAS, J., MÜLLER, J., RADIVOJEVIC, M., BAKKUM, D. & HIERLEMANN, A. 2012. High-density microelectrode array recordings and real-time spike sorting for closed-loop experiments: an emerging technology to study neural plasticity. *Front Neural Circuits*, 6, 105.
- GALANOPOULOU, A. S. 2008. GABA(A) receptors in normal development and seizures: friends or foes? *Curr Neuropharmacol*, 6, 1-20.
- GARASCHUK, O., LINN, J., EILERS, J. & KONNERTH, A. 2000. Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nature neuroscience*, 3, 452-459.

- GLASSER, J. S. & MURRAY, C. K. 2011. Central nervous system toxicity associated with liposomal amphotericin B therapy for cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 84, 566-8.
- GOLSHANI, P., GONÇALVES, J. T., KHOSHKHOO, S., MOSTANY, R., SMIRNAKIS, S. & PORTERA-CAILLIAU, C. 2009. Internally mediated developmental desynchronization of neocortical network activity. *J Neurosci*, 29, 10890-9.
- GRAVELAND, G. A. & DIFIGLIA, M. 1985. The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res*, 327, 307-11.
- GRESSENS, P., MESPLES, B., SAHIR, N., MARRET, S. & SOLA, A. 2001. Environmental factors and disturbances of brain development. *Semin Neonatol*, 6, 185-94.
- HALBHUBER, L., ACHTNER, C., LUHMANN, H. J., SINNING, A. & KILB, W. 2019. Coincident Activation of Glutamate Receptors Enhances GABA. *Front Cell Neurosci*, 13, 497.
- HARNETT, E. M., ALDERMAN, J. & WOOD, T. 2007. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 55, 90-7.
- HARRIS, K. D., HOCHGERNER, H., SKENE, N. G., MAGNO, L., KATONA, L., BENGTSOON GONZALES, C., SOMOGYI, P., KESSARIS, N., LINNARSSON, S. & HJERLING-LEFFLER, J. 2018. Classes and continua of hippocampal CA1 inhibitory neurons revealed by single-cell transcriptomics. *PLoS Biol*, 16, e2006387.
- HAWSER, S. & ISLAM, K. 1999. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*, 43, 411-3.
- HEKMAT-SCAFE, D. S., LUNDY, M. Y., RANGA, R. & TANOUYE, M. A. 2006. Mutations in the K⁺/Cl⁻ cotransporter gene *kcc* increase seizure susceptibility in *Drosophila*. *J Neurosci*, 26, 8943-54.
- HESDORFFER, D. C., STABLES, J. P., HAUSER, W. A., ANNEGERS, J. F. & CASCINO, G. 2001. Are certain diuretics also anticonvulsants? *Ann Neurol*, 50, 458-62.
- HÜBNER, C. A., STEIN, V., HERMANS-BORGMAYER, I., MEYER, T., BALLANYI, K. & JENTSCH, T. J. 2001. Disruption of *KCC2* reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*, 30, 515-24.
- JANG, J. W., KIM, J. Y., YOON, J., YOON, S. Y., CHO, C. H., HAN, E. T., AN, S. S. & LIM, C. S. 2014. Flow cytometric enumeration of parasitemia in cultures of *Plasmodium falciparum* stained with SYBR Green I and CD235A. *ScientificWorldJournal*, 2014, 536723.
- KAILA, K., RUUSUVUORI, E., SEJA, P., VOIPIO, J. & PUSKARJOV, M. 2014. GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Curr Opin Neurobiol*, 26, 34-41.
- KAMIOKA, H., MAEDA, E., JIMBO, Y., ROBINSON, H. P. & KAWANA, A. 1996. Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neurosci Lett*, 206, 109-12.
- KHALILOV, I., CHAZAL, G., CHUDOTVOROVA, I., PELLEGRINO, C., CORBY, S., FERRAND, N., GUBKINA, O., NARDOU, R., TYZIO, R., YAMAMOTO, S., JENTSCH, T. J., HÜBNER, C. A., GAIARSA, J. L., BEN-ARI, Y. & MEDINA, I. 2011. Enhanced Synaptic Activity and Epileptiform Events in the Embryonic *KCC2* Deficient Hippocampus. *Front Cell Neurosci*, 5, 23.
- KHAZIPOV, R., KHALILOV, I., TYZIO, R., MOROZOVA, E., BEN-ARI, Y. & HOLMES, G. L. 2004. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 19, 590-600.
- KHAZIPOV, R. & LUHMANN, H. J. 2006. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends in neurosciences*, 29, 414-418.
- KHIRUG, S., AHMAD, F., PUSKARJOV, M., AFZALOV, R., KAILA, K. & BLAESSE, P. 2010. A single seizure episode leads to rapid functional activation of *KCC2* in the neonatal rat hippocampus. *J Neurosci*, 30, 12028-35.
- KILB, W., KIRISCHUK, S. & LUHMANN, H. J. 2011. Electrical activity patterns and the functional maturation of the neocortex. *Eur J Neurosci*, 34, 1677-86.
- KILB, W., KIRISCHUK, S. & LUHMANN, H. J. 2013. Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. *Front Neural Circuits*, 7, 139.
- KIRISCHUK, S., LUHMANN, H. J. & KILB, W. 2014. Cajal-Retzius cells: update on structural and functional properties of these mystic neurons that bridged the 20th century. *Neuroscience*, 275, 33-46.

- KIRISCHUK, S., SINNING, A., BLANQUIE, O., YANG, J. W., LUHMANN, H. J. & KILB, W. 2017. Modulation of Neocortical Development by Early Neuronal Activity: Physiology and Pathophysiology. *Front Cell Neurosci*, 11, 379.
- KIRMSE, K., KUMMER, M., KOVALCHUK, Y., WITTE, O. W., GARASCHUK, O. & HOLTHOFF, K. 2015. GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo. *Nat Commun*, 6, 7750.
- KOLBAEV, S. N., LUHMANN, H. J. & KILB, W. 2011. Activity-dependent scaling of GABAergic excitation by dynamic Cl⁻ changes in Cajal-Retzius cells. *Pflugers Arch*, 461, 557-65.
- KREITZER, A. C. & MALENKA, R. C. 2008. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60, 543-54.
- KUAN, C. Y., ROTH, K. A., FLAVELL, R. A. & RAKIC, P. 2000. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci*, 23, 291-7.
- LANIADO-LABORÍN, R. & CABRALES-VARGAS, M. N. 2009. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*, 26, 223-7.
- LAVDAS, A. A., GRIGORIOU, M., PACHNIS, V. & PARNAVELAS, J. G. 1999. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*, 19, 7881-8.
- LI, H., TORNBERG, J., KAILA, K., AIRAKSINEN, M. S. & RIVERA, C. 2002. Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci*, 16, 2358-70.
- LI, S., KUMAR T, P., JOSHEE, S., KIRSCHSTEIN, T., SUBBURAJU, S., KHALILI, J. S., KLOEPFER, J., DU, C., ELKHAL, A., SZABÓ, G., JAIN, R. K., KÖHLING, R. & VASUDEVAN, A. 2018. Endothelial cell-derived GABA signaling modulates neuronal migration and postnatal behavior. *Cell Res*, 28, 221-248.
- LIM, L., MI, D., LLORCA, A. & MARÍN, O. 2018. Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron*, 100, 294-313.
- LIU, R., WANG, J., LIANG, S., ZHANG, G. & YANG, X. 2019. Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From Expression to Function. *Front Neurol*, 10, 1407.
- LODATO, S., ROUAUX, C., QUAST, K. B., JANTRACHOTECHATCHAWAN, C., STUDER, M., HENSCH, T. K. & ARLOTTA, P. 2011. Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. *Neuron*, 69, 763-79.
- LOMBARDI, A., JEDLICKA, P., LUHMANN, H. J. & KILB, W. 2018. Giant Depolarizing Potentials Trigger Transient Changes in the Intracellular Cl⁻. *Front Cell Neurosci*, 12, 420.
- LOTURCO, J. J., OWENS, D. F., HEATH, M. J., DAVIS, M. B. & KRIEGSTEIN, A. R. 1995. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, 15, 1287-98.
- LUHMANN, H. J., FUKUDA, A. & KILB, W. 2015. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci*, 9, 4.
- LUHMANN, H. J., KIRISCHUK, S. & KILB, W. 2018. The Superior Function of the Subplate in Early Neocortical Development. *Front Neuroanat*, 12, 97.
- LUHMANN, H. J., KIRISCHUK, S., SINNING, A. & KILB, W. 2014. Early GABAergic circuitry in the cerebral cortex. *Current opinion in neurobiology*, 26, 72-78.
- LUHMANN, H. J., SINNING, A., YANG, J. W., REYES-PUERTA, V., STÜTTGEN, M. C., KIRISCHUK, S. & KILB, W. 2016. Spontaneous Neuronal Activity in Developing Neocortical Networks: From Single Cells to Large-Scale Interactions. *Front Neural Circuits*, 10, 40.
- LÓPEZ-BENDITO, G., SHIGEMOTO, R., KULIK, A., PAULSEN, O., FAIRÉN, A. & LUJÁN, R. 2002. Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development. *Eur J Neurosci*, 15, 1766-78.
- LÖSCHER, W. & KÖHLING, R. 2010. Functional, metabolic, and synaptic changes after seizures as potential targets for antiepileptic therapy. *Epilepsy Behav*, 19, 105-13.
- LÖSCHER, W., POTTSCHKA, H., SISODIYA, S. M. & VEZZANI, A. 2020. Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. *Pharmacol Rev*, 72, 606-638.
- LÖSCHER, W., PUSKARJOV, M. & KAILA, K. 2013. Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology*, 69, 62-74.

- MARKRAM, 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.
- MEINECKE, D. L. & PETERS, A. 1987. GABA immunoreactive neurons in rat visual cortex. *J Comp Neurol*, 261, 388-404.
- MELETIADIS, J., ANTACHOPOULOS, C., STERGIOPOULOU, T., POURNARAS, S., ROILIDES, E. & WALSH, T. J. 2007. Differential fungicidal activities of amphotericin B and voriconazole against *Aspergillus* species determined by microbroth methodology. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3329-37.
- MILLER, M. W. 1986. Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons. *Science*, 233, 1308-11.
- MOLITOR, H. & KUNA, S. 1949. Pharmacologic studies of the neurotoxic properties of streptomycin; the relationship between acute and delayed neurotoxic effects. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 78, 197-202.
- MURATA, Y. & COLONNESE, M. T. 2020. GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in vivo. *Sci Adv*, 6, eaba1430.
- OGAWA, M., MIYATA, T., NAKAJIMA, K., YAGYU, K., SEIKE, M., IKENAKA, K., YAMAMOTO, H. & MIKOSHIBA, K. 1995. The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron*, 14, 899-912.
- OLDE ENGBERINK, A. H. O., MEIJER, J. H. & MICHEL, S. 2018. Chloride cotransporter KCC2 is essential for GABAergic inhibition in the SCN. *Neuropharmacology*, 138, 80-86.
- PARNAS, D. & LINIAL, M. 1997. Culture density regulates both the cholinergic phenotype and the expression of the CNTF receptor in P19 neurons. *J Mol Neurosci*, 8, 115-30.
- PFEFFER, C. K., STEIN, V., KEATING, D. J., MAIER, H., RINKE, I., RUDHARD, Y., HENTSCHKE, M., RUNE, G. M., JENTSCH, T. J. & HÜBNER, C. A. 2009. NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development. *J Neurosci*, 29, 3419-30.
- PFRIEGER, F. W. & BARRES, B. A. 1996. New views on synapse-glia interactions. *Curr Opin Neurobiol*, 6, 615-21.
- PICARDO, M. A., GUIGUE, P., BONIFAZI, P., BATISTA-BRITO, R., ALLENE, C., RIBAS, A., FISHELL, G., BAUDE, A. & COSSART, R. 2011. Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus. *Neuron*, 71, 695-709.
- REUHL, K. R., VAPIWALA, M., RYZLAK, M. T. & SCHAFFNER, C. P. 1993. Comparative neurotoxicities of amphotericin B and its mono-methyl ester derivative in rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 37, 419-28.
- RICE, D. & BARONE, S. 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*, 108 Suppl 3, 511-33.
- RITTER, B. & ZHANG, W. 2000. Early postnatal maturation of GABA-mediated inhibition in the brainstem respiratory rhythm-generating network of the mouse. *Eur J Neurosci*, 12, 2975-84.
- RIVERA, C., VOIPIO, J., PAYNE, J. A., RUUSUVUORI, E., LAHTINEN, H., LAMSA, K., PIRVOLA, U., SAARMA, M. & KAILA, K. 1999. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397, 251-5.
- ROCKEL, A. J., HIORNS, R. W. & POWELL, T. P. 1980. The basic uniformity in structure of the neocortex. *Brain*, 103, 221-44.
- RÜEGG, U. T. & HEFTI, F. 1984. Growth of dissociated neurons in culture dishes coated with synthetic polymeric amines. *Neurosci Lett*, 49, 319-24.
- SAALFRANK, D., KONDURI, A. K., LATIFI, S., HABIBEY, R., GOLABCHI, A., MARTINIUC, A. V., KNOLL, A., INGEBRANDT, S. & BLAU, A. 2015. Incubator-independent cell-culture perfusion platform for continuous long-term microelectrode array electrophysiology and time-lapse imaging. *R Soc Open Sci*, 2, 150031.
- SAHARA, S., YANAGAWA, Y., O'LEARY, D. D. & STEVENS, C. F. 2012. The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32, 4755-4761.
- SCHWIEGER, J., ESSER, K. H., LENARZ, T. & SCHEPER, V. 2016. Establishment of a long-term spiral ganglion neuron culture with reduced glial cell number: Effects of AraC on cell composition and neurons. *J Neurosci Methods*, 268, 106-16.

- SERGEEVA, O. A., KLYUCH, B. P., FLEISCHER, W., ERIKSSON, K. S., KOROTKOVA, T. M., SIEBLER, M. & HAAS, H. L. 2006. P2Y receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus. *Eur J Neurosci*, 24, 1413-26.
- SIBILLA, S. & BALLERINI, L. 2009. GABAergic and glycinergic interneuron expression during spinal cord development: dynamic interplay between inhibition and excitation in the control of ventral network outputs. *Prog Neurobiol*, 89, 46-60.
- SIPILÄ, S. T., HUTTU, K., YAMADA, J., AFZALOV, R., VOIPIO, J., BLAESSE, P. & KAILA, K. 2009. Compensatory enhancement of intrinsic spiking upon NKCC1 disruption in neonatal hippocampus. *J Neurosci*, 29, 6982-8.
- SMITH, K. R., JONES, K. A., KOPEIKINA, K. J., BURETTE, A. C., COPITS, B. A., YOON, S., FORREST, M. P., FAWCETT-PATEL, J. M., HANLEY, J. G., WEINBERG, R. J., SWANSON, G. T. & PENZES, P. 2017. Cadherin-10 Maintains Excitatory/Inhibitory Ratio through Interactions with Synaptic Proteins. *J Neurosci*, 37, 11127-11139.
- SONNEWALD, U., OLSTAD, E., QU, H., BABOT, Z., CRISTÒFOL, R., SUÑOL, C., SCHOUSBOE, A. & WAAGEPETERSEN, H. 2004. First direct demonstration of extensive GABA synthesis in mouse cerebellar neuronal cultures. *J Neurochem*, 91, 796-803.
- STALEY, K. J., SOLDI, B. L. & PROCTOR, W. R. 1995. Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA receptors. *Science*, 269, 977-81.
- STIL, A., LIABEUF, S., JEAN-XAVIER, C., BROCARD, C., VIEMARI, J. C. & VINAY, L. 2009. Developmental up-regulation of the potassium-chloride cotransporter type 2 in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience*, 164, 809-21.
- SUN, J.-J. J., KILB, W. & LUHMANN, H. J. 2010. Self-organization of repetitive spike patterns in developing neuronal networks in vitro. *The European journal of neuroscience*, 32, 1289-1299.
- TAMAMAKI, N., YANAGAWA, Y., TOMIOKA, R., MIYAZAKI, J., OBATA, K. & KANEKO, T. 2003. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol*, 467, 60-79.
- UM, J. W. 2017. Roles of Glial Cells in Sculpting Inhibitory Synapses and Neural Circuits. *Front Mol Neurosci*, 10, 381.
- VAN VOORHIS, A. C., KENT, J. S., KANG, S. S., GOGHARI, V. M., MACDONALD, A. W. & SPONHEIM, S. R. 2019. Abnormal neural functions associated with motor inhibition deficits in schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Brain Mapp*, 40, 5397-5411.
- VANCHA, A. R., GOVINDARAJU, S., PARSA, K. V., JASTI, M., GONZÁLEZ-GARCÍA, M. & BALLESTERO, R. P. 2004. Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. *BMC Biotechnol*, 4, 23.
- VARDAKAS, K. Z., KALIMERIS, G. D., TRIARIDES, N. A. & FALAGAS, M. E. 2018. An update on adverse drug reactions related to β -lactam antibiotics. *Expert Opin Drug Saf*, 17, 499-508.
- VIEMARI, J. C., MENUET, C. & HILAIRE, G. 2013. [Electrophysiological, molecular and genetic identifications of the pre-Böttinger complex]. *Med Sci (Paris)*, 29, 875-82.
- VOGELS, T. P. & ABBOTT, L. F. 2009. Gating multiple signals through detailed balance of excitation and inhibition in spiking networks. *Nat Neurosci*, 12, 483-91.
- VOGELS, T. P., SPREKELER, H., ZENKE, F., CLOPATH, C. & GERSTNER, W. 2011. Inhibitory plasticity balances excitation and inhibition in sensory pathways and memory networks. *Science*, 334, 1569-73.
- WALLBERG, F., TENEV, T. & MEIER, P. 2016. Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, pdb.prot087387.
- WAMSLEY, B. & FISHELL, G. 2017. Genetic and activity-dependent mechanisms underlying interneuron diversity. *Nat Rev Neurosci*, 18, 299-309.
- WATANABE, M., ZHANG, J., MANSURI, M. S., DUAN, J., KARIMY, J. K., DELPIRE, E., ALPER, S. L., LIFTON, R. P., FUKUDA, A. & KAHLE, K. T. 2019. Developmentally regulated KCC2 phosphorylation is essential for dynamic GABA-mediated inhibition and survival. *Sci Signal*, 12.
- WEIR, K., BLANQUIE, O., KILB, W., LUHMANN, H. J. & SINNING, A. 2014. Comparison of spike parameters from optically identified GABAergic and glutamatergic neurons in sparse cortical cultures. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 460.

- WEIR, K., BLANQUIE, O., KILB, W., LUHMANN, H. J. & SINNING, A. 2015. Response: "Commentary: Comparison of spike parameters from optically identified GABAergic and glutamatergic neurons in sparse cortical cultures". *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 224.
- WINN, R. E., BOWER, J. H. & RICHARDS, J. F. 1979. Acute toxic delirium. Neurotoxicity of intrathecal administration of amphotericin B. *Arch Intern Med*, 139, 706-7.
- WONG, F. K., BERCSENYI, K., SREENIVASAN, V., PORTALÉS, A., FERNÁNDEZ-OTERO, M. & MARÍN, O. 2018. Pyramidal cell regulation of interneuron survival sculpts cortical networks. *Nature*, 557, 668-673.
- WOO, N. S., LU, J., ENGLAND, R., MCCLELLAN, R., DUFOUR, S., MOUNT, D. B., DEUTCH, A. Y., LOVINGER, D. M. & DELPIRE, E. 2002. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus*, 12, 258-68.
- WU, W. L., ZISKIND-CONHAIM, L. & SWEET, M. A. 1992. Early development of glycine- and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. *J Neurosci*, 12, 3935-45.
- XING, J. & GERSTEIN, G. L. 1996. Networks with lateral connectivity. I. dynamic properties mediated by the balance of intrinsic excitation and inhibition. *J Neurophysiol*, 75, 184-99.
- XU, Y., ZHAO, M., HAN, Y. & ZHANG, H. 2020. GABAergic Inhibitory Interneuron Deficits in Alzheimer's Disease: Implications for Treatment. *Front Neurosci*, 14, 660.
- YAMADA, J., OKABE, A., TOYODA, H., KILB, W., LUHMANN, H. J. & FUKUDA, A. 2004. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol*, 557, 829-41.
- YU, Y., MIGLIORE, M., HINES, M. L. & SHEPHERD, G. M. 2014. Sparse coding and lateral inhibition arising from balanced and unbalanced dendrodendritic excitation and inhibition. *J Neurosci*, 34, 13701-13.
- ZEISEL, A., MUÑOZ-MANCHADO, A. B., CODELUPPI, S., LÖNNERBERG, P., LA MANNO, G., JURÉUS, A., MARQUES, S., MUNGUBA, H., HE, L., BETSHOLTZ, C., ROLNY, C., CASTELO-BRANCO, G., HJERLING-LEFFLER, J. & LINNARSSON, S. 2015. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*, 347, 1138-42.

