

**Aktivitätsabhängige Kontrolle der Apoptose in
neonatalen kortikalen Neuronen und Etablierung eines
Biosensors zur Echtzeitanalyse der Caspase-3
Aktivierung**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

vorgelegt von

**Antje Golbs
geb. am 25.05.1981 in Leipzig**

Mainz 2008

Tag der mündlichen Prüfung:

03.04.2008

Für meine Oma

**„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das
gelöst werden will.“**

Galileo Galilei

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Arten des Programmierten Zelltodes	1
1.2 Morphologie der Apoptose	2
1.3 Signalwege der Apoptose	3
1.4 Aktivitätsabhängigkeit des neuronalen Überlebens	6
1.5 Bedeutung der Caspase-3 für die entwicklungsbedingte neuronale Apoptose	10
1.6 Bedeutung des PCD während der embryonalen und frühen postnatalen neuronalen Entwicklung	11
1.7 Entwicklung des Neokortex	11
1.8 Neuronale Aktivität während der kortikalen Entwicklung	14
1.9 Apoptose in der Entwicklung des Neokortex	15
1.10 Spontane Aktivität in Kulturen des unreifen Kortex	17
1.11 Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material	21
2.1 Chemikalien	21
2.2 Geräte	22
2.3 Enzyme, Plasmide, Antikörper und Fluorophore	23
2.4 Kits	23
2.5 Verbrauchsmaterialien	23
2.6 Versuchstiere	24
2.7 Software	24
2.8 Medien und Pufferlösungen	25
3. Methoden	27
3.1 Zellkultur	27
3.1.1 Vorbereitung der Millicell-CM Membranen	27
3.1.2 Präparation organotypischer Schnittkulturen des neonatalen Kortex der Maus	27
3.1.3 Vorbereitung der Deckgläschen	28
3.1.4 Vorbereitung des MEA-Chips	28
3.1.5 Präparation dissoziierter Kulturen des neonatalen Kortex der Maus	28
3.1.6 Kalziumphosphat-Transfektion kortikaler Neurone	29

3.1.7 Lipofektamin vermittelte Transfektion kortikaler Neurone	30
3.2 Molekularbiologie	31
3.2.1 Der Caspase3-sensor	31
3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien	32
3.2.3 Kultivierung transformierter Bakterien und Anlegen von Glycerindauerkulturen	33
3.2.4 Isolierung der Plasmid-DNS	33
3.2.5 spektrophotometrische und elektrophoretische Analyse der Plasmid-DNS	34
3.3 Pharmakologie	34
3.3.1 Pharmakologische Manipulation organotypischer Schnittkulturen	34
3.3.2 Pharmakologische Manipulation dissoziierter kortikaler Kulturen	35
3.4 Färbungen	36
3.4.1 Immunzytochemische Färbungen organotypischer neokortikaler Schnittkulturen	36
3.4.2 Immunzytochemische Färbungen dissoziierter kortikaler Kulturen	37
3.4.3 Biozytinfärbung einzelner Neurone	37
3.4.4 TUNEL-Färbung	37
3.5 Mikroskopie	38
3.5.1 Epifluoreszenzmikroskopie und Quantifizierung der a-Caspase-3 positiven Zellen	38
3.5.2 Statistische Auswertung der pharmakologischen Manipulation organotypischer kortikaler Schnittkulturen	39
3.5.3 Konfokalmikroskopie und Echtzeitanalyse des Caspase-3 abhängigen Zelltodes	40
3.5.4 Quantifizierung der Translokation des tCaspase3-sensors	41
3.6 Elektrophysiologie: Feldpotentialmessungen mit dem MEA-Chip	42
3.7 Bild- und Textverarbeitung	42
4. Ergebnisse	43
4.1 Caspase-3 abhängige Apoptose in neokortikalen organotypischen Schnittkulturen	43
4.1.1 Die aktivitätsabhängige Kontrolle der neuronalen Apoptose	46
4.1.2 Die Bedeutung ionotroper Glutamatrezeptoren für das Überleben kortikaler Neurone	47

4.1.3 Die Aktivierung von L-Typ Kalziumionenkanälen als sekundärer Weg der Überlebenssicherung	50
4.1.4 Die Bedeutung von GABAA Rezeptoren und Gap Junctions für das aktivitätsabhängige neuronale Überleben	52
4.2 Echtzeitanalyse der Caspase-3 abhängigen Apoptose in neokortikalen Neuronen	53
4.2.1 Die Quantifizierung der Translokation des tCaspase3-sensors	55
4.2.2 Die Bedeutung der Caspase-3 Aktivierung für die Translokation des tCaspase3-sensors	58
4.2.3 Der Echtzeitnachweis der Caspase-3 Aktivierung als Marker für die frühe Phase der Apoptose	61
4.2.4 Der Einfluss der Transfektion auf die Empfindlichkeit kortikaler Neurone gegenüber Staurosporin	63
4.3 Beeinflussung der Caspase-3 abhängigen Apoptose in kortikalen Neuronen durch Modulation der Netzwerkaktivität	65
4.3.1 Die immunzytochemische und elektrophysiologische Charakterisierung von dissoziierten neokortikalen Kulturen der neugeborenen Maus	65
4.3.2 Der Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf das Überleben kortikaler Neurone in der Abwesenheit trophischer Faktoren	69
5. Diskussion	73
5.1 Aktivitätsabhängigkeit des neuronalen Überlebens während der frühen postnatalen Entwicklung des Neokortex	73
5.2 Echtzeitanalyse der Caspase-3 abhängigen Apoptose in neonatalen kortikalen Neuronen	79
5.3 Der Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf das Überleben neokortikaler Neurone unter dem Entzug trophischer Faktoren	83
6. Ausblick	85
7. Zusammenfassung	86
Literaturverzeichnis	88
Danksagung	106
Lebenslauf	108

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(d)ATP	(Desoxy)Adenosintriphosphat
[K ⁺] _{ex}	extrazelluläre Kaliumkonzentration
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	
Abb.	Abbildung
a-Caspase-3	aktivierte Form der Caspase-3
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
Akt	Akt-Kinase
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AMPA/Kainat-R	AMPA/Kainat-Rezeptor
AMPA-R	AMPA-Rezeptor
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AOTF	<i>Acousto-optic tuneable filter</i>
AP	Aktionspotential
Apaf-1	<i>apoptosis protein-activating factor 1</i>
Asp175	Antikörper gegen aktivierte Caspase-3
B	
BAD	<i>Bcl-2/Bcl-x-associated death promoter</i>
BAK	<i>Bcl-2 agonist killer</i>
BAX	<i>B-cell lymphoma associated protein X</i>
BBS	<i>BES buffered saline</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIM	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
BME	<i>basal medium Eagle</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	
ca.	<i>circa</i>
Ca ²⁺	Kalzium
CAMK	Kalzium-Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CD	<i>common determinant</i>
CD95L	CD95 Ligand
Cl	Chlor
CMV	Cytomegalovirus
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
CO ₂	Kohlendioxid
CP	Kortikale Platte

Abkürzungsverzeichnis

CPP	3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonsäure
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Cs	Kanäle
CytC	Cytochrom C
D	
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DCR	<i>decoy receptor</i>
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DEV	Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat
DIABLO	<i>direct IAP binding protein of low pI</i>
DISC	<i>death inducing signalling complex</i>
div	Tage <i>in vitro</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>death receptor</i>
Dr.	Doktor
D _T	Dauer der Translokation
E	
E	Embryonaltag
E. coli	Escherichia coli
EB-Puffer	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
F	
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	Fötales Kälberserum
FKHRL1	<i>forkhead transcription factor like 1</i>
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
G	
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A -R	GABA _A -Rezeptor
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GYKI 52466	1-(4-Aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepin

H

h	Stunde
HBS(3/0)	HEPES <i>buffered saline</i> (3 mM Mg ²⁺ /0 mM Ca ²⁺)
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRK	Harakiri
hsp	Hitzeschockprotein
HtrA2	<i>high temperature requirement protein A2</i>

I

IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
ICAD	Inhibitor der Caspase aktivierten DNase
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
IP3	Inositol-3-phosphat
ISNEL	<i>in situ nick end labelling</i>
IZ	intermediäre Zone
IκB	<i>inhibitor of NFκB</i>

J

JNK	c-Jun N-terminale Kinase
-----	--------------------------

K

KCl	Kaliumchlorid
kHz	Kilohertz

L

L	Liter
LB	Luria Bertani
L-VDCC	L-Typ spannungsabhängiger Kalziumionenkanal

M

M	Molar
m	Meter
MAP-2	<i>microtubule associated protein-2</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAP Kinase Kinase
MEA	Multielektroden-Array
MEK	MAP Kinase oder ERK Kinase
MEM	<i>minimal essential medium</i>
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MPBS (-/-)	<i>modified phosphate buffered saline</i> (ohne Mg ²⁺ /ohne Ca ²⁺)
MZ	Marginalzone

Abkürzungsverzeichnis

N

n	Nano
N.A.	numerische Apertur
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Neurobasalmedium
NES	nukleäres Exportsignal
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDA-R	NMDA-Rezeptor
NVP-AMM077	[(R)-[(S)-1-(4-bromo-phenyl)-ethylamino]-(2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-5-yl)-methyl]-phosphonsäure

O

OMI	<i>OMI stress-regulated endoprotease</i>
OPG	Osteoprotegerin

P

P	postnataler Tag
p	Plasmid
PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCD	programmierter Zelltod
PEST	Penicillin-Streptomycin
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC-γ	Phospholipase C Gamma
PO ₄ ³⁻	Phosphat
PP	Präplatte
Prof.	Professor
PUMA	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>

R

R ₀	arithmetisches Mittel des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten unter Kontrollbedingungen
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	Rattensarkom
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
R _s	Rezeptoren
R _t	Quotient der Fluoreszenzintensität Nukleus/Intensität Nukleus + Soma

Abkürzungsverzeichnis

S

s	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SHC	src homologes Kollagenprotein
Smac	<i>second mitochondrial activator of caspase</i>
SP	Subplatte
Sts	Staurosporin
SVZ	Subventrikularzone

T

t ₅₀ %	Zeitpunkt an dem 50 % der beobachteten Neuronen eine Translokation des tCaspase3-sensors zeigen
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
tCaspase3-sensor	durch aktivierte Caspase-3 geschnittene Form des Caspase3-sensors
tdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF-R <i>associated death domain</i>
TRAIL	TNF <i>related apoptosis inducing ligand</i>
TRAILR	TRAIL-Rezeptor
TRAMP	transgenes Adenokarzinom der Mäuseprostata
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Trk	<i>Tropomyosin-related kinase</i>
TTX	Tetrodotoxin
TUNEL	tdT <i>deoxyuridine nick end labelling</i>
TWEAK	<i>TNF-like weak</i>

U

UK	Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
V	Volt

V

VDCC	spannungsabhängiger Kalziumionenkanal
VDSC	spannungsabhängiger Kaliumionenkanal
v _T	Translokationsgeschwindigkeit
VZ	Ventrikularzone

W

WM	weiße Substanz
----	----------------

Z

z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
Z-VAD-FMK	Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-fluormethylketon

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Schematische Darstellung der Signalwege der Apoptose	5
Abb. 2. Quellen der Neurotrophinausschüttung	7
Abb. 3.. Signalwege der Neurotrophinwirkung	8
Abb. 4. Entwicklung und Aufbau des Neokortex	13
Abb. 5. Apoptose während der Entwicklung des Neokortex	17
Abb. 6. Aufbau und Prinzip des Caspase3-sensors	32
Abb. 7. Quantitative Analyse a-Caspase-3 positiver Zellen in organotypischen Schnittkulturen	39
Abb. 8. Kortikale Organisation und zelluläre Morphologie in organotypischen neokortikalen Schnittkulturen und Abhängigkeit von externen trophischen Faktoren	45
Abb. 9. Einfluss der Netzwerkaktivität auf das neuronale Überleben	46
Abb. 10. Einfluss von ionotropen Glutamatrezeptoren auf das neuronale Überleben	48
Abb. 11. Bedeutung der Untereinhenzusammensetzung von NMDA-R für die aktivitätsabhängige Apoptose	49
Abb. 12. Bedeutung von L-VDCC für das Neurotrophin abhängige neuronale Überleben während der Blockade von NMDA-R	51
Abb. 13. Bedeutung von GABA _A -Rs und neuronalen GJs auf die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen in neokortikalen Kulturen	52
Abb. 14. Staurosporin induzierte Translokation des tCaspase3-sensors	54
Abb. 15. Quantitative Analyse der tCaspase3-sensor Translokation	56
Abb. 16. Bestimmung der Translokationsparameter:	57
Abb. 17. a-Caspase-3 spezifische Translokation des tCaspase3-sensors	59
Abb. 18. Abhängigkeit der Translokation des tCaspase3-sensors von der Caspaseaktivität	60
Abb. 19. Zeitliche Abfolge von Caspase-3 Aktivierung und apoptotischer DNS- Fragmentierung	62
Abb. 20. Unveränderte Empfindlichkeit transfizierter Neurone gegenüber Staurosporin	64
Abb. 21. Histologische Charakterisierung dissoziierter kortikaler Kulturen	66
Abb. 22. Entwicklung der spontanen Netzwerkaktivität in dissoziierten neokortikalen Kulturen	68

Abb. 23. Einfluss der $[K^+]_{ex}$ auf die Aktivierung der Caspase-3 in kortikalen Neuronen unter dem Entzug trophischer Faktoren	70
Abb. 24. Quantifizierung der EYFP-Translokation in unterschiedlichen $[K^+]_{ex}$	72
Abb. 25 Aktivitätsabhängiges Überleben in kortikalen Kulturen	78

1. Einleitung

Obwohl die transiente Natur bestimmter Organe und Gewebe, wie die der Kiemenanlagen oder des *ductus arteriosus*, während der Entwicklung von Säugetieren seit langer Zeit bekannt waren, blieb die Bedeutung des Programmierten oder Physiologischen Zelltodes (PCD) noch bis in die Anfänge des 20. Jahrhunderts weitgehend unbeachtet (Clarke und Clarke, 1996). 1842 vertrat Carl Vogt als erster die Auffassung, dass das Verschwinden des Notochords während der Entstehung der Wirbelsäule bei der Geburtshelferkröte auf der Zerstörung der Zellen und nicht auf deren Transformation in Knorpelzellen beruht (Vogt, 1842). Weder er noch seine Kollegen erkannten die Tragweite dieser Entdeckung und so konnte die systematische Erforschung des PCD nicht vor der Jahrhundertwende begonnen werden.

Collin konnte als erster zeigen, dass während der natürlichen Entwicklung des Hühnerembryos zwischen den Embryonaltagen 5 und 11 (E5-E11) Motoneurone und Neurone des Rückenmarks absterben (Collin, 1906;1907). Die erste Quantifizierung dieses Phänomens erfolgte jedoch erst 1975 durch Hamburger (Hamburger, 1975). Einen weiteren Durchbruch in der Erforschung des PCD erzielte Kerr 1972 mit der detaillierten Beschreibung absterbender Zellen. Er war auch der Erste, der den Begriff Apoptose in Abgrenzung zum pathologischen Absterben von Zellen, der Nekrose, einführte (Kerr et al., 1972). Seit dieser Zeit wurden zahlreiche Aspekte des neuronalen Zelltodes und dessen Rolle in der normalen Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) aufgeklärt (de la Rosa und de Pablo, 2000; Buss und Oppenheim, 2004).

1.1 Arten des Programmierten Zelltodes

Definitionsgemäß ist der PCD eine „Serie stereotypischer biochemischer und morphologischer Veränderungen, die zum Tod einer Zelle führt“ (Krantic et al., 2005). Als „aktiver“ Prozess ist er prinzipiell von der Nekrose, dem „passiven“ Absterben von Zellen zu unterscheiden (Kerr et al., 1972). Der PCD ist z.B. durch die rasche Entfernung der sterbenden Zellen durch Phagozyten, im Gehirn durch Mikroglia, gekennzeichnet, während die Nekrose zu Entzündungen führt (Bonfoco et al., 1995; Savill und Fadok, 2000; Li et al., 2003).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, PCD zu klassifizieren. Während in der Entwicklungsbiologie zwischen phylogenetischem (evolutionär bedingte Eliminierung), morphogenetischem (Zelltod während der morphologischen Entwicklung von Geweben und Organen) und histogenetischem (Zelltod während der Remodellierung von Geweben)

Zelltod unterschieden wird (Oppenheim, 1991; Kuan et al., 2000b), spricht man mit Bezug auf das Nervensystem von physiologischem Zelltod (andere Namen: proapoptischer, epigenetischer, entwicklungsbedingter oder natürlich vorkommender Zelltod) (Oppenheim, 1991).

Eine Unterscheidung der verschiedenen Arten des PCD ist aber auch aufgrund morphologischer und biochemischer Merkmale möglich. Die genaueste basiert auf Unterschieden der Kernmorphologie. Danach unterscheidet man zwischen klassischer Apoptose („sichelförmige“ Kondensierung des Chromatins), apoptoseähnlichem Zelltod (periphere oder partielle Kondensierung des Chromatins) und nekroseähnlichem Zelltod (keine Kondensierung des Chromatins) (Leist und Jaattela, 2001; Jaattela und Tschopp, 2003; Lockshin und Zakeri, 2004). Dabei sind die Mitochondrien maßgeblich an der Ausführung der Apoptose und des apoptoseähnlichen Zelltodes beteiligt, während der nekroseähnliche Zelltod von anderen Organellen (z.B. ER, Lysosomen oder Nukleus) ausgeht (Krantic et al., 2005; Krantic et al., 2007). Nur die Apoptose beruht auf der Aktivierung von Caspasen, Aspartat spezifischen Cysteinproteasen. Demgegenüber werden Cathepsine, lysosomale proteolytische Enzyme, und Calpaine, kalziumabhängige Proteasen, bei apoptoseähnlichem und nekroseähnlichem Zelltod aktiviert (Leist und Jaattela, 2001; Jaattela und Tschopp, 2003; Lockshin und Zakeri, 2004).

Es konnte an verschiedenen Modellen gezeigt werden, dass der Caspase unabhängige apoptoseähnliche und nekroseähnliche Zelltod in akuten Gehirnverletzungen und neurodegenerativen Erkrankungen eine zentrale Rolle spielt (Stadelmann et al., 1999; Arundine und Tymianski, 2003; Klein und Ackerman, 2003; Movsesyan et al., 2004). Demgegenüber ist die klassische Apoptose der in der Neurogenese vorherrschende Zelltod (Spreafico et al., 1995; Kuida et al., 1996; Hakem et al., 1998; Kuan et al., 2000a; Buss und Oppenheim, 2004). Es wird jedoch vermutet, dass meist mehrere Signalwege des PCD gleichzeitig aktiviert werden und die Morphologie durch den unter den gegebenen Umständen schnellsten Weg bestimmt wird (Yuan et al., 2003; Krantic et al., 2005).

1.2 Morphologie der Apoptose

Die klassische Apoptose induziert in Zellen eine Serie stereotypischer morphologischer und biochemischer Veränderungen (Kerr et al., 1972; Krantic et al., 2005). Diese Veränderungen werden genutzt, um apoptotisch sterbende Zellen zu identifizieren. Ein früher Vorgang in apoptotischen Zellen ist die Umlagerung von Phosphatidylserin, eines Membranbestandteils, von der Innenseite der Membran auf die Außenseite. Dort dient er

als „*eat me*“-Signal für phagozytierende Zellen (Li et al., 2003). Weitere morphologische Veränderungen, wie das Schrumpfen der Zelle und der Zellorganelle, die Entstehung von Ausstülpungen in der Membran, das so genannte *blebbing* und das Abschnüren apoptotischer Körperchen können mit Hilfe der Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Kerr et al., 1972; Dikranian et al., 2001).

Besonders die nukleären Veränderungen, die Kondensierung des Chromatins und die internukleosomale Fragmentierung der DNS durch Caspase aktivierte DNase, sind wichtige Charakteristika der späten Phase der Apoptose (Wyllie, 1980; Nagata et al., 2003). Letztlich werden die apoptotischen Körperchen durch phagozytierende Zellen aufgenommen und abgebaut (Bonfoco et al., 1995; Savill und Fadok, 2000; Li et al., 2003). Die morphologischen Veränderungen während der Apoptose werden durch die Aktivierung von Effektorcaspasen, darunter besonders Caspase-3 vermittelt. Die Aktivierung dieser Aspartat-spezifischen Cystein-Proteasen stellt damit ein zentrales Ereignis während des Prozesses der Apoptose dar.

Zahlreiche Nachweismethoden nutzen die typischen morphologischen Veränderungen während der Apoptose, um diese Art des PCD zu identifizieren. Die Externalisierung von Phosphatidylserin kann durch die Annexin V-Färbung nachgewiesen werden, die hauptsächlich bei *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Analysen eingesetzt wird (Schutte et al., 1998; Li et al., 2003). DNS-Fragmentierung und -Kondensierung sind Angriffspunkte für zahlreiche Nachweismöglichkeiten, wie histologische Färbungen mit Propidiumjodid, 4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Hotz et al., 1994), Hoechst33258 (Matsuo et al., 2001), *terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine nick end labelling* (TUNEL) (Gavrieli et al., 1992) und *in situ nick end labelling* (ISNEL) (Blaschke et al., 1996). Gelelektrophorese zum Nachweis von charakteristischen DNS-Fragmenten mit einer Größe von 180-200 bp (Schwartzman und Cidlowski, 1991; Hengartner, 2000) und Elektronenmikroskopie (Dikranian et al., 2001) können ebenfalls zum Nachweis der nukleären Veränderungen genutzt werden.

1.3 Signalwege der Apoptose

Die Aktivierung von Caspasen, den Schlüsselenzymen der apoptotischen Signalwege, kann auf verschiedene Arten erfolgen (Abb. 1). Beim Rezeptor vermittelten (extrinsischen) Weg binden Liganden wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), der Fas Ligand (FasL) und der TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) an Rezeptoren der TNF-Familie, z. B. TNF-R1, die *death receptors* (DR) 3, 4 und 5, TRAIL-R und Fas (CD95, Apo-1) (Hengartner, 2000;

Danial und Korsmeyer, 2004). Diese Bindung induziert die Trimerisierung der Rezeptoren und die Bindung zytosolischer Adapterproteine wie Fas *associated death domain* (FADD) und TNF-R *associated death domain* (TRADD) über homophile Interaktionen der Todesdomänen (DD). Die Adapterproteine besitzen neben der C-terminalen DD eine N-terminale *death effector domain* (DED) die die Bindung an die DED von Initiatorcaspasen-8 (FADD) und -10 (TRADD bzw. DR 3, 4 und 5) vermittelt (Earnshaw et al., 1999). Die dadurch induzierte Dimerisierung der Initiatorcaspasen führt zu deren Aktivierung (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004; Green, 2005).

Umweltfaktoren, Änderungen des Redoxgleichgewichts, die Bindung von Toxinen an Makromoleküle, Lipidoxidation und DNS-Schäden können die Signalwege der Apoptose über den intrinsischen Weg aktivieren (Nicholls und Budd, 2000; Green, 2005). Über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) erfolgt die Signaltransduktion von Stressfaktoren zur Mitochondrienmembran, deren Permeabilität über das Überleben der Zelle entscheidet (Arnoult et al., 2003; Cregan et al., 2004; Green, 2005). Kommt es zur Erhöhung der Permeabilität, werden proapoptische Proteine aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt, darunter Cytochrom C (CytC), *second mitochondrial activator of caspase/ direct IAP binding protein of low pI* (Smac/DIABLO) und *high temperature requirement protein A2/ OMI stress-regulated endoprotease* (HtrA2/OMI) (Liu et al., 1996; Susin et al., 1999; Samali et al., 1999). Der *apoptosis protein-activating factor 1* (Apaf-1) bindet das freigesetzte CytC und interagiert mit Procaspase-9 über die *caspase recruitment domain* (CARD) in Gegenwart von (Desoxy)Adenosintriphosphat ((d)ATP) (Earnshaw et al., 1999). Die Zusammenlagerung dieses als Apoptosom bezeichneten Komplexes führt zu einer Konformationsänderung der Procaspase-9, wodurch diese aktiviert wird (Brauer, 2003).

Beide Wege konvergieren in der durch die Initiatorcaspasen-8, -9 und -10 katalysierten Proteolyse und Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7. Diese spalten zahlreiche „Todessubstrate“, darunter regulatorische Enzyme, Zytoskelettproteine, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusproteine und DNase-Inhibitoren, wie den Inhibitor der Caspase aktivierten DNase (ICAD), was die Morphologie apoptotischer Zellen bedingt (Abb. 1).

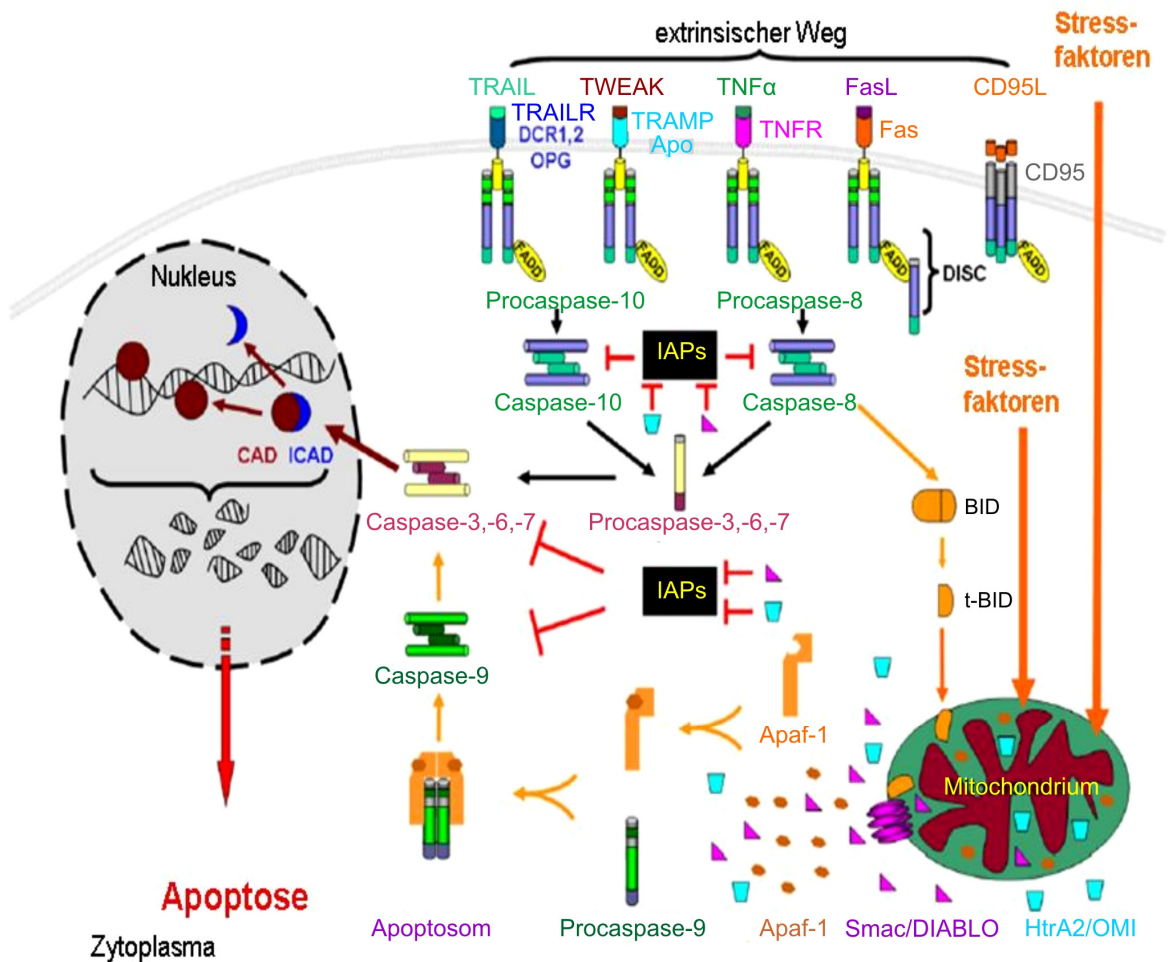


Abb. 1. Schematische Darstellung der Signalwege der Apoptose: Gezeigt sind die beiden Hauptwege der Apoptose über Rezeptoren (extrinsisch) und Mitochondrien (intrinsisch) sowie deren Verknüpfungspunkt, die Aktivierung der Caspase-3. Diese Effektorcaspase löst durch die Spaltung ihrer Substrate die morphologischen Veränderungen, die die Apoptose kennzeichnen, aus (modifiziert nach Krantic et al., 2007).

Die Mitglieder der Bcl-2 (*B-cell lymphoma*) Familie von pro- und antiapoptotischen Proteinen wirken unter anderem regulierend auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran und entscheiden somit über Tod oder Überleben im Zuge des intrinsischen Weges der Apoptose (Strasser et al., 2000; Arnoult et al., 2002; Arnoult et al., 2003; Cregan et al., 2004). Zu den Faktoren, die die Aktivität der Bcl-2 Proteine modulieren, gehören unter anderem die durch den p75-Neurotrophinrezeptor aktivierten c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK). Diese induzieren die Expression von proapoptotischen Bcl-2 Proteinen, wie *Bcl-2-interacting mediator of cell death* (BIM), Harakiri (HRK) und *p53-upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), erhöhen durch Phosphorylierung die Aktivität der proapoptotischen Bcl-2 Proteine BIM und *BH3 interacting domain death agonist* (BID) und inhibieren durch Phosphorylierung die antiapoptotisch wirkenden Proteine, Bcl-2 und Bcl-X_L (Whitfield et al., 2001; Benn und Woolf, 2004). Dies führt in

Konsequenz zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und damit zum Zelltod über den intrinsischen Weg der Apoptose. Im Gegensatz dazu benötigt der Rezeptor vermittelte Weg der Apoptose keine *de novo* RNS- bzw. Proteinsynthese, keine mitochondriale Involvierung und verläuft innerhalb kurzer Zeit (Kruidering und Evan, 2000).

1.4 Aktivitätsabhängigkeit des neuronalen Überlebens

Seit langer Zeit ist bekannt, dass elektrische Aktivität von Neuronen, synaptische Übertragung von afferenten Eingängen und der Kontakt mit Zielstrukturen eine große Rolle bei der Regulation des neuronalen Zelltodes spielen (Pittman und Oppenheim, 1979; Korsching, 1993; Voyvodic, 1996; Henderson, 1996; Oppenheim, 1996; Raff et al., 1998; Nicotera et al., 1999). Blockade der spontanen elektrischen Aktivität, z. B. durch *knock out* von spannungsabhängigen Natriumionenkanälen (VDSC) oder durch die pharmakologische Behandlung mit Tetrodotoxin (TTX), induziert Zelltod in verschiedenen neuronalen Populationen (Thompson und Holt, 1989; Planells-Cases et al., 2000; Fishbein und Segal, 2006). Auch spannungsabhängige Kalziumionenkanäle (VDCC) und ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluR) scheinen eine wichtige Rolle bei dem aktivitätsabhängigen Überleben von Neuronen zu spielen (Ikonomidou et al., 1999; Hwang et al., 1999; Mennerick und Zorumski, 2000; Ikonomidou et al., 2001; Hardingham et al., 2002; Szabo et al., 2004).

Dabei steht gemäß der Neurotrophinhypothese vor allem die Versorgung der Neurone mit trophischen Faktoren im Vordergrund (Levi-Montalcicni und Hamburger, 1953; Oppenheim, 1991; Oppenheim, 1996; Frade und Barde, 1999; Depaepe et al., 2005; Putz et al., 2005), was besonders für sympathische Neurone in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte (Cohen, 1960; Sadoul et al., 1996; Deshmukh und Johnson, Jr., 1997; Crowder und Freeman, 1998). Die Versorgung mit Neurotrophinen hängt besonders in der postnatalen Entwicklung maßgeblich von der Integration der Neurone in das sich entwickelnde Netzwerk ab; d.h. nur solche Neurone überleben, die die richtigen Zielstrukturen innervieren (Oppenheim, 1991; Davies, 2003) und genügend afferente Verbindungen besitzen (Sendtner et al., 2000), so dass sie sowohl retrograd als auch anterograd mit trophischen Faktoren versorgt werden (Abb. 2).

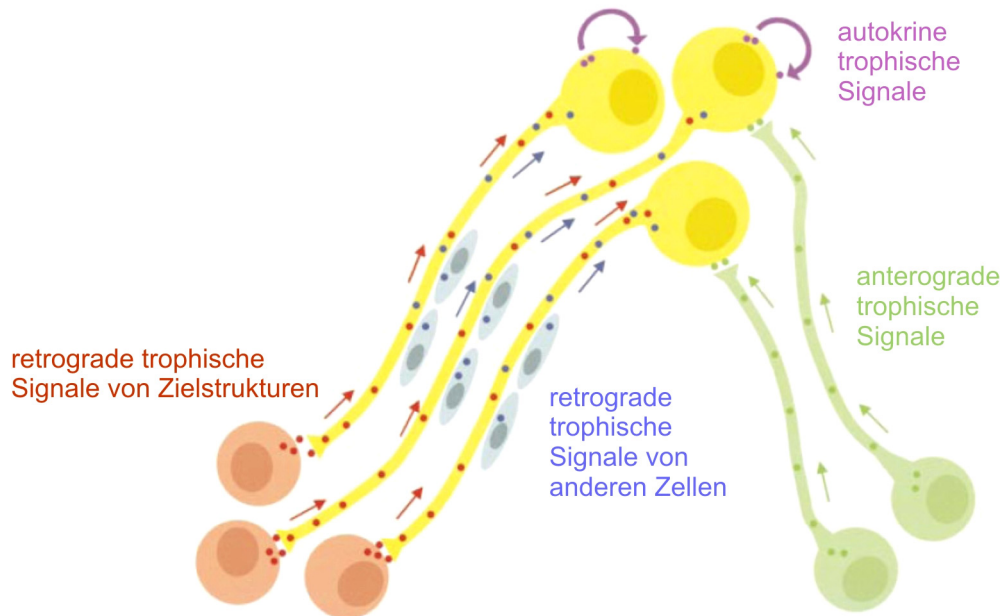


Abb. 2. Quellen der Neurotrophinausschüttung: Dargestellt sind mögliche Quellen der Versorgung mit Neurotrophinen. Ein Neuron, das in ein funktionelles Netzwerk integriert ist, erhält neurotrophe Signale von afferenten und efferenten Neuronen sowie von Zellen aus der Umgebung. Auch autokrin können Neurotrophine das Überleben von Neuronen sichern (modifiziert nach Davies, 2003).

Eines dieser für kortikale Neurone wichtigen Neurotrophine ist *brain derived neurotrophic factor* (BDNF). Die Ausschüttung dieses Neurotrophins erfolgt in Neuronen aktivitätsabhängig (Lessmann et al., 2003; Brigadski et al., 2005) und unter dem Einfluss von Kalziumionen (Ghosh et al., 1994; Ikonomidou et al., 1999; Hansen et al., 2004). Dabei ist eine wiederholte hochfrequente Stimulation der Neurone wesentlich effektiver für die BDNF-Ausschüttung als eine permanente Depolarisation (Balkowiec und Katz, 2000; Hartmann et al., 2001; Balkowiec und Katz, 2002). Homodimeres BDNF bindet an den *Tropomyosin-related kinase* B-Rezeptor (TrkB-Rezeptor) und bewirkt dadurch eine Dimerisierung dieser Rezeptoren. Die Dimerisierung der Rezeptoren führt zu einer Autophosphorylierung durch die endogene Tyrosinkinaseaktivität, die im Weiteren u. a. den Rattensarkom/MAPK (Ras/MAPK)- und den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Kinase (PI3K/Akt)-Signalweg aktiviert (Kaplan und Miller, 2000; Huang und Reichardt, 2001).

Beide Signalwege sichern das Überleben von Neuronen in mehrerer Hinsicht. Trk-Rezeptor Aktivierung inhibiert die JNK-vermittelte Apoptose nach Aktivierung des p75-Rezeptors (Yoon et al., 1998). Sowohl MAPK als auch Akt können das proapoptotische Bcl-2 Protein, *Bcl-2/Bcl-x-associated death promoter* (BAD) phosphorylieren (Abb. 3) und arbeiten synergistisch an dessen Inaktivierung durch die Bindung von Phospho-BAD

an 14-3-3 (Bonni et al., 1999). Akt-vermittelte Phosphorylierung führt außerdem zu Inaktivierung von *inhibitor of NFκB* (IκB) und damit Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor κB (NFκB), welcher die Synthese von überlebensfördernden Proteinen induziert (Abb. 3) (Middleton et al., 2000). Der proapoptotische *forkhead* Transkriptionsfaktor, *forkhead transcription factor like 1* (FKHRL1), unterliegt ebenfalls der Inhibierung durch Akt (Patapoutian und Reichardt, 2001). Weiterhin führt die Signaltransduktion über die MAPK zu einer Aktivierung von *cAMP response element-binding protein* (CREB) (Bonni et al., 1999; Patapoutian und Reichardt, 2001). CREB wiederum fördert u.a. die Transkription von antiapoptotischem Bcl-2, Inhibitor der Apoptose Protein (IAP) und BDNF (Abb. 3) (Lonze und Ginty, 2002).

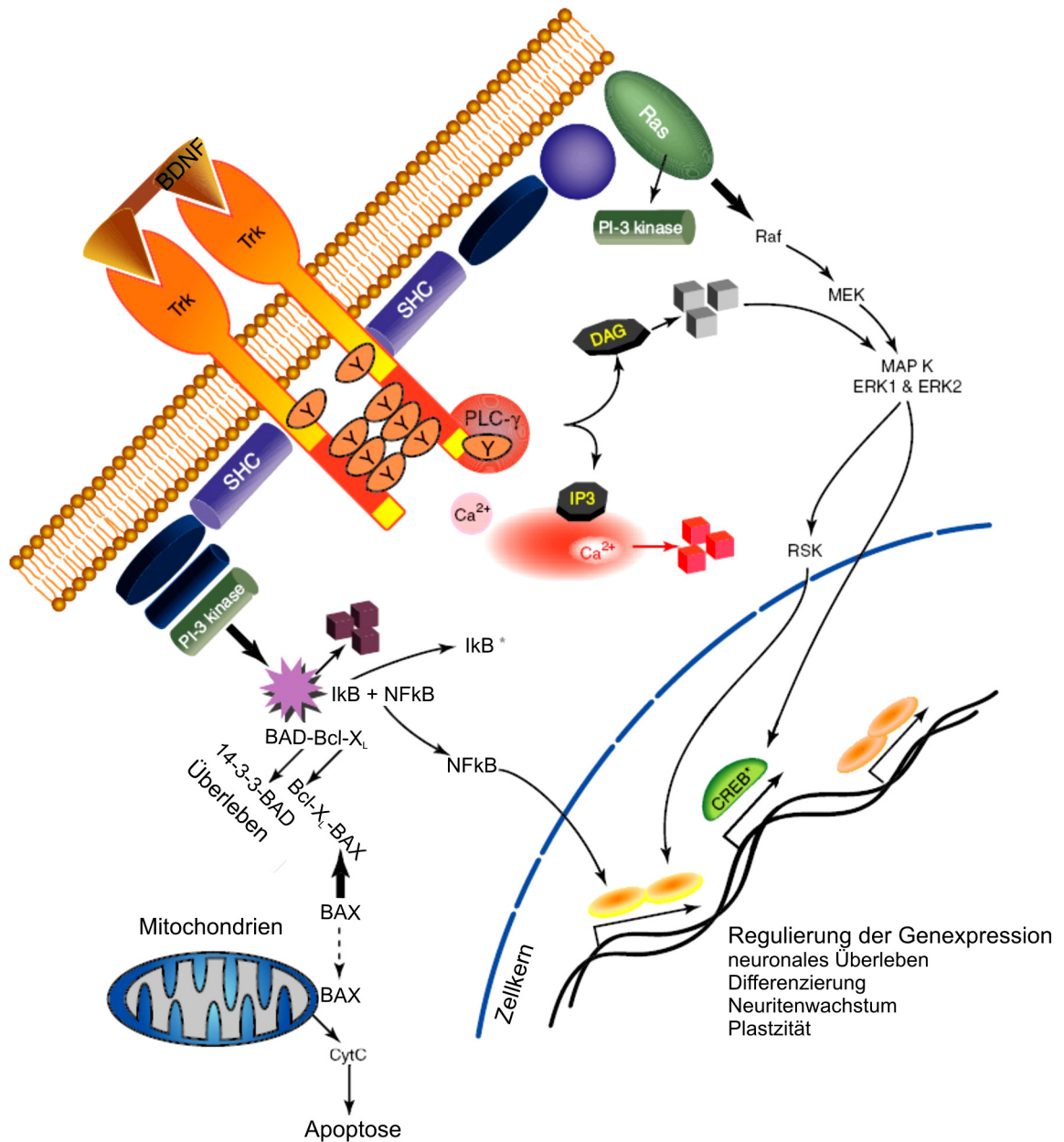


Abb. 3. Signalwege der Neurotrophinwirkung: Neurotrophine aktivieren verschiedene Signalwege. Bindet dimeres BDNF an den TrkB-Rezeptor induziert es dessen Dimerisierung und Autophosphorylierung. Adapterproteine binden an den phosphorylierten Trk-Rezeptor und aktivieren den PI3K/Akt und MAPK-Weg. Beide Signalwege führen zu einer Veränderung der Genexpression, die unter anderem die vermehrte Synthese antiapoptotischer Proteine bewirkt. Gleichzeitig hemmt die Akt-Kinase proapoptotische Bcl-2 Proteine wie BAD durch Phosphorylierung und folgende Komplexbildung mit anderen Proteinen. Dies inhibiert den mitochondrialen Weg der Apoptose (modifiziert nach Bloom et al., 2002).

Der Kalziumeinfluss über iGluRs und VDCCs aktiviert ebenso die nukleäre Kalzium-Calmodulin-abhängige Kinase IV (CAMKIV), welche ebenfalls in der Lage ist, die CREB-abhängige Proteinsynthese zu aktivieren und somit das neuronale Überleben zu sichern (Hardingham et al., 2001). Ein übermäßiger Einstrom von Kalzium, der z. B. infolge von

exzessiver Glutamatfreisetzung während akuter Verletzungen des Gehirns, wie dem Schlaganfall, zu beobachten ist, führt jedoch zum vermehrten Absterben von Neuronen (Yu et al., 1999; Nicotera et al., 1999; Benchoua et al., 2001; Hardingham und Bading, 2003).

1.5 Bedeutung der Caspase-3 für die entwicklungsbedingte neuronale Apoptose

Caspase-3 (andere Namen: CPP32, YAMA, Apopain) gehört zur Familie der Aspartat-spezifischen Cystein-Proteasen. Sie sind charakterisiert durch eine sogenannte katalytische Triade, bestehend aus Cystein, Histidin und Aspartat. Diese Aminosäuren sind grundlegend an der Hydrolyse der Peptidbindung an der C-terminalen Seite eines Aspartatrestes beteiligt (Thornberry et al., 1997). Die Aktivierung der Caspase-3 ist ein Schlüsselereignis in der Ausführung der klassischen Apoptose. Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose konvergieren in der Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7. Diese führen durch Proteolyse zahlreicher Substrate zu den typischen morphologischen Veränderungen, die eine apoptotische Zelle charakterisieren.

Die Bedeutung des Caspase-3 abhängigen Zelltodes in der Entwicklung, besonders des ZNS, konnte eindrucksvoll in *knock out* Studien gezeigt werden (Kuida et al., 1996; Pompeiano et al., 2000). Heterozygote Mäuseembryonen zeigen eine 10 %ige Abnahme, homozygote Tiere eine 30 %ige Verminderung der Apoptose gegenüber Embryonen mit funktioneller Caspase-3 (Pompeiano et al., 2000). Dies, besonders bei verminderter Apoptose in den proliferativen Schichten des Kortex, führt zu Fehlentwicklungen des Gehirns. Während der normalen Entwicklung des Gehirns wird eine starke Expression der Caspase-3 ab E12 beobachtet, einer Zeit, ab der auch viele apoptotischer Neurone im zerebralen Kortex detektierbar sind (Blaschke et al., 1996; Pompeiano et al., 2000). In der weiteren Entwicklung nimmt die Expression der Caspase-3 weiter zu, erreicht perinatal einen Höhepunkt und nimmt im Erwachsenenalter auf ein sehr niedriges Niveau ab (Mooney und Miller, 2000; Shimohama et al., 2001).

1.6 Bedeutung des PCD während der embryonalen und frühen postnatalen neuronalen Entwicklung

In höheren Vertebraten sterben während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung des ZNS Neurone und gliale Zellen ab. Dieser PCD wurde für verschiedene Organismen (Cowan et al., 1984; Ferrer et al., 1990; Oppenheim, 1991; Spreafico et al., 1995; Yaginuma et al., 1996; Blaschke et al., 1996) und in verschiedenen neuronalen Geweben beschrieben (Blaschke et al., 1996; Haydar et al., 1999; Kuan et al., 2000b). In der embryonalen Phase sterben neuronale Vorläuferzellen noch vor dem Entstehen eines funktionellen Netzwerkes. Weitere Neurone degenerieren postnatal in einer zweiten Phase vermehrten PCD während der Synaptogenese (Buss und Oppenheim, 2004). Sowohl aktivitätsabhängige (Lipton, 1986; Thompson und Holt, 1989; McConnell et al., 1989; Fishbein und Segal, 2006) als auch aktivitätsunabhängige Prozesse (Freeman et al., 1994; Blaschke et al., 1996; Voyvodic, 1996; Thomaidou et al., 1997) spielen eine Rolle bei der Entscheidung, ob ein Neuron stirbt.

Die Hauptfunktionen dieses PCD sind die Fehlerkorrektur (Hughes, 1965; Raff, 1992; Clarke et al., 1998) und das Anpassen der Größe von Neuronen- und Gliapopulationen an ihre Zielregionen bzw. die Anzahl der zu myelinisierenden Axone (Barde, 1989; Oppenheim, 1991; Barres et al., 1992; Burne et al., 1996; Raff et al., 1998; Winseck und Oppenheim, 2006). Unnötige oder fehlerhafte Verknüpfungen werden beseitigt und nur die benötigte Zahl an Neuronen überlebt, um ein funktionelles Netzwerk mit der Zielpopulation aufzubauen. Eine weitere wichtige Bedeutung des PCD während der neuronalen Entwicklung ist die Eliminierung von transienten Zellpopulationen. Diese spielen während der neuronalen Entwicklung eine wichtige, transiente Rolle, sind im adulten ZNS jedoch nicht mehr vorhanden (Marin-Padilla, 1978; Chun und Shatz, 1989; McConnell et al., 1989; Rakic und Zecevic, 2000).

1.7 Entwicklung des Neokortex

Bereits während des Gastrulastadiums entwickelt das Ektoderm an der dorsalen Mittellinie neuronale Eigenschaften. Die Neuralplatte bildet sich unter dem Einfluss zahlreicher durch mesodermale Zellen sekretierter Faktoren. Darauf folgend entsteht durch Faltung das Neuralrohr, an dessen rostralem Ende 3, später 5, Vesikel gebildet werden. Aus diesen gehen in der weiteren Entwicklung Telenzephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon und Myelencephalon hervor (Kandel et al., 2000, Wolpert et al., 1999).

Das Telenzephalon teilt sich weiterhin in einen rechten und einen linken Vesikel (Monuki und Walsh, 2001). Der zerebrale Kortex, bestehend aus Neokortex, Paleokortex (Piriformer Kortex) und Archikortex (Hippocampus), entwickelt sich aus dem dorsalen Teil des Telenzephalons, während der ventrale Teil zu den Basalganglien ausdifferenziert (Gotz und Sommer, 2005).

Während der Entwicklung des sechsschichtigen Neokortex (Boulder Committee, 1970; Allendoerfer und Shatz, 1994) bilden Neuroepithelzellen aus der Ventrikelwand des Neuralrohrs, der so genannten Ventrikularzone (VZ), eine proliferative Schicht, aus der postmitotische Neurone hervorgehen (Abb. 4A). Diese entfernen sich durch Migration von der VZ und bilden die Präplatte (PP) (Marin-Padilla, 1971; Parnavelas, 2002). Später generierte Neurone wandern in die PP und teilen diese in die unmittelbar unterhalb der Pia gelegene Marginalzone (MZ) und die tiefer gelegene Subplatte (SP). Dazwischen entsteht aus den migrierenden Neuronen die kortikale Platte (CP) (Allendoerfer und Shatz, 1994; Parnavelas, 2002). Durch weitere Proliferation in der VZ und Subventrikularzone (SVZ) (Kriegstein, 2005) und radiale Migration (Nadarajah et al., 2003; Bielas et al., 2004) der neu generierten Pyramidenzellen, differenziert die CP in weitere Schichten (Abb. 4B, C). Die zuerst entstandenen Neurone bilden die tiefe Schicht 6 und die zuletzt generierten Neurone die an die MZ angrenzenden Schichten 2/3 (Luskin und Shatz, 1985; Kriegstein und Noctor, 2004).

Interneurone, die im medialen und lateralen Ganglienhügel entstehen, wandern durch tangentielle Migration in die CP ein (Abb. 4C) (Anderson et al., 2001). In der weiteren Entwicklung des Neokortex bilden sich MZ und SP durch Transformation und Degeneration zurück. Dadurch enthalten die unterhalb der Pia gelegene Schicht 1, die aus der MZ hervorgeht und die weiße Substanz (WM), in der die SP aufgeht, im adulten Kortex nur wenige Neurone (Super et al., 1998).

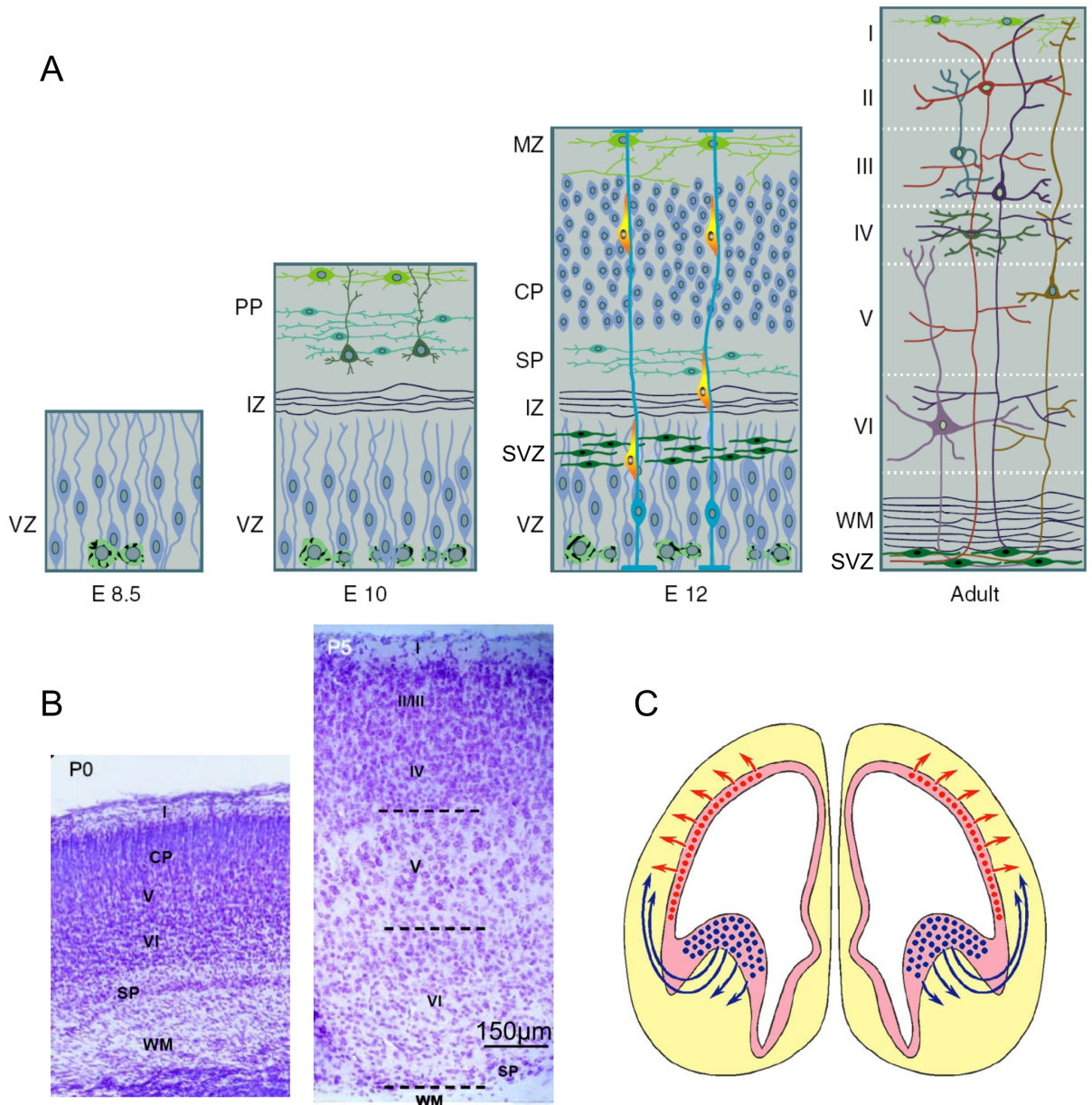


Abb. 4. Entwicklung und Aufbau des Neokortex: **A** Während der Entwicklung des sechsschichtigen Neokortex der Maus führt Proliferation in der VZ zur Bildung der Präplatte, welche durch nachfolgend radial migrierende Zellen in die MZ und SP gespalten wird. Dazwischen bildet sich die CP, die durch später generierte Neurone von innen nach außen zu 5 der 6 Schichten des adulten Neokortex ausgebaut wird. Neurone der Marginalzone und Subplatte sind im adulten Kortex kaum vorhanden. Aus der intermediären Zone bildet sich die weiße Substanz. **B** Beispiele von Nisslfärbungen des frühen postnatalen Kortex der Maus an den postnatalen Tagen 0 und 5 (P0 und P5) sind gezeigt. Deutlich ist die Größenzunahme der CP zu sehen. Die Subplatte ist an P5 nur noch als dünne Schicht oberhalb der weißen Substanz zu erkennen. **C** Gezeigt sind die Migrationswege der Neurone des Neokortex. Pyramidenzellen (rot) wandern durch gliagestützte radiale Migration in den Kortex ein, während die meisten Interneurone (blau) im medialen und caudalen Ganglienhügel entstehen und durch tangentielle Migration in den Kortex gelangen (modifiziert nach Bloom et al., 2002).

Während der Entwicklung des Neokortex bilden zunächst kortikokortikale und callosale Axone ein dichtes Netzwerk zwischen den kortikalen Neuronen (Innocenti und Price, 2005). Thalamische Axone wachsen in den Kortex. Dabei werden zunächst temporale Synapsen der thalamischen Fasern mit Subplattenneuronen gebildet (Catalano und Shatz, 1998). Erst danach kontaktieren die thalamischen Axone Neurone in der späteren Schicht 4 ihrer kortikalen Zielgebiete. Aktivitätsabhängige wie aktivitätsunabhängige Mechanismen spielen dabei eine Rolle (Catalano und Shatz, 1998; Price et al., 2006). Gleichzeitig projizieren kortikale Neurone in thalamische Nuklei (Miller, 1996; Alitto und Usrey, 2003). Dieses Netzwerk wird nach der Etablierung funktioneller Synapsen aktivitätsabhängig durch die Eliminierung axonaler Prozesse und ganzer Axone modifiziert (Wiesel und Hubel, 1963; Hubel und Wiesel, 1965; Katz und Shatz, 1996; Price et al., 2006). In der Ratte entspricht der Kortex bereits 8 Tage nach der Geburt hinsichtlich Organisation und Innervierung dem adulten Zustand (Abb. 4A) (Molnar et al., 1998).

1.8 Neuronale Aktivität während der kortikalen Entwicklung

Sich entwickelnde Neurone und Netzwerke zeigen primitive Muster synchronisierter Aktivität während einer zeitlich definierten Entwicklungsphase. Dies ist charakteristisch für die Entwicklung unterschiedlicher neuronaler Netzwerke in verschiedenen Spezies (Galli und Maffei, 1988; O'Donovan, 1989; Lippe, 1994; Ho und Waite, 1999; Garaschuk et al., 2000). Diese Aktivität ist *in vivo* noch vor der Generierung von Synapsen zu beobachten (Ben Ari, 2001). In der frühen kortikalen Embryonalentwicklung sind Neurone über *Gap Junctions* (GJ) gekoppelt und zeigen koordinierte Kalziumtransienten, die von der Bildung von Inositoltriphosphat abhängen und durch Subplattenneurone initiiert werden (Kandler und Katz, 1998; Flint et al., 1999; Dupont et al., 2006). Von diesen Kalziumtransienten wird vermutet, dass sie in der Entstehung kortikaler Kolumnen involviert sind (Christie et al., 1989; Yuste et al., 1992; Kandler und Katz, 1998; Dupont et al., 2006).

In der ersten postnatalen Woche erfolgt im Kortex der Ratte ein Wechsel der GJ abhängigen synchronisierten Aktivität zu synaptischer Netzwerkaktivität (Dupont et al., 2006; Khazipov und Luhmann, 2006). Diese ist abhängig von glutamaterger und GABAerger Transmission (Owens et al., 1996; Kandler und Katz, 1998; Flint et al., 1999). Zeitgleich mit dem Wechsel der depolarisierenden GABA-Antwort zu einer hyperpolarisierenden gegen Ende der ersten postnatalen Woche in der Maus werden auch keine weiteren synchronisierten Oszillationen beobachtet (Feller, 1999; Garaschuk et al.,

2000). Diese in Nagern beschriebene frühe synchronisierte Aktivität ist wahrscheinlich homolog zu den im menschlichen Kortex beschriebenen *delta brushes* und tritt in beiden Spezies während vergleichbarer ontogenetischer Stadien auf (Clancy et al., 2001; Khazipov und Luhmann, 2006).

Zahlreiche Prozesse während der Entwicklung des zerebralen Kortex laufen in Abhängigkeit von dieser spontanen Netzwerkaktivität ab. Dazu gehören unter anderem das Wachstum von Neuriten, die Synaptogenese, Migration und Differenzierungsprozesse von Neuronen, synaptische Plastizität und die Regulation des PCD (Oppenheim, 1991; Rakic und Komuro, 1995; Ben Ari, 2001; Katz und Crowley, 2002; Feller und Scanziani, 2005; Khazipov und Luhmann, 2006).

1.9 Apoptose in der Entwicklung des Neokortex

Unreife kortikale Neurone sterben, wenn sie nicht ausreichend mit extrinsischen Überlebensfaktoren versorgt werden (Oppenheim, 1991; Benn und Woolf, 2004). Im Gegensatz dazu überleben zahlreiche Neurone des adulten Nervensystems unabhängig von extrinsischen Überlebensfaktoren (Koike und Tanaka, 1991; Huang und Reichardt, 2001; Davies, 2003). Da PCD von proliferierenden Zellen in der VZ und SVZ vor der Ausbildung von Axonen und somit vor der Etablierung funktioneller synaptischer Verbindungen stattfindet (Kallen, 1955; Blaschke et al., 1996; Simonati et al., 1997; Thomaidou et al., 1997; Haydar et al., 1999; Rakic und Zecevic, 2000), ist dieser unabhängig von synaptischer Aktivität. Stattdessen können Fehler während der Mitose oder Differenzierung (Freeman et al., 1994; Voyvodic, 1996), Abhängigkeit von trophischen Faktoren aus den umgebenden Zellen oder intrinsische Mechanismen (Blaschke et al., 1996; Thomaidou et al., 1997) für den Tod von Vorläuferzellen verantwortlich sein.

In den proliferativen Wachstumszonen des zerebralen Kortex sterben während der Embryonalentwicklung eine signifikante Zahl mitotischer neuronaler Vorläuferzellen durch Apoptose (Abb. 5) (Blaschke et al., 1996; Thomaidou et al., 1997; Haydar et al., 1999; Kuan et al., 2000b). *Knock out* Studien an Mäusen zeigten, dass die Deletion wichtiger proapoptotischer Proteine, wie Caspase-9 (Kuida et al., 1998), Caspase-3 (Kuida et al., 1996), Apaf-1 (Cecconi et al., 1998), JNK (Kuan et al., 1999) oder die proapoptotischen Bcl-2 Proteine, *B-cell lymphoma associated protein X* (BAX) und Bcl-2 *agonist killer* (BAK) (Sun et al., 2003; Danial und Korsmeyer, 2004) zu milden bis starken Fehlentwicklungen des Gehirns, besonders im Bereich des zerebralen Kortex, führen.

Durch eine größere Anzahl von Vorläuferzellen kommt es in diesen Mäusen zu Exenzephalie, Einkerbungen der Großhirnrinde und perinataler Letalität.

Im Gegensatz dazu hängt das Überleben von differenzierten kortikalen Neuronen nach der Geburt von ihrer Integration in das entstandene Netzwerk ab (Abb. 5). In der Ratte kann ab der Geburt eine ständige Zunahme der Zahl apoptotischer Zellen im Neokortex beobachtet werden. Diese erreicht einen Höhepunkt zwischen P5 und P8 (Spreafico et al., 1995). In der neugeborenen Maus sind innerhalb der ersten beiden postnatalen Wochen apoptotische Zellen in allen kortikalen Schichten zu finden. Ihr Anteil an der neuronalen Gesamtpopulation liegt bei 25 % (Heumann et al., 1978; Heumann und Leuba, 1983; Ferrer et al., 1992; Voyvodic, 1996; Verney et al., 2000). Diese postnatale Apoptose hat die Funktionen, transiente Zellpopulationen, wie Cajal-Retzius Zellen der Marginalzone und Subplattenneurone zu eliminieren (Wahle und Meyer, 1987; Kostovic und Rakic, 1990; Meyer und Goffinet, 1998) und das entstehende Netzwerk durch das Absterben nicht-integrierter kortikaler Neurone effizienter zu gestalten (Abb. 5) (Oppenheim, 1991; Finlay, 1992). Ab P24 finden sich kaum noch apoptotische Neurone im Neokortex der Maus (Verney et al., 2000). Zusätzlich zur Apoptose kortikaler Neurone kommt es zwischen P7 und P21 zur Degeneration von ca. 20 % der sich entwickelnden Oligodendrozyten (Trapp et al., 1997).

Der Wettbewerb um afferente Verbindungen und Neurotrophine, die von Zielneuronen ausgeschüttet werden, bestimmt, welche Zellen überleben (Abb. 5) (Oppenheim, 1991; Davies, 2003). Der Entzug von trophischen Faktoren führt zur Aktivierung von proapoptotisch wirkenden JNK in Neuronen (Friedman, 2000; Roux und Barker, 2002; Bhakar et al., 2003; Becker und Bonni, 2006).

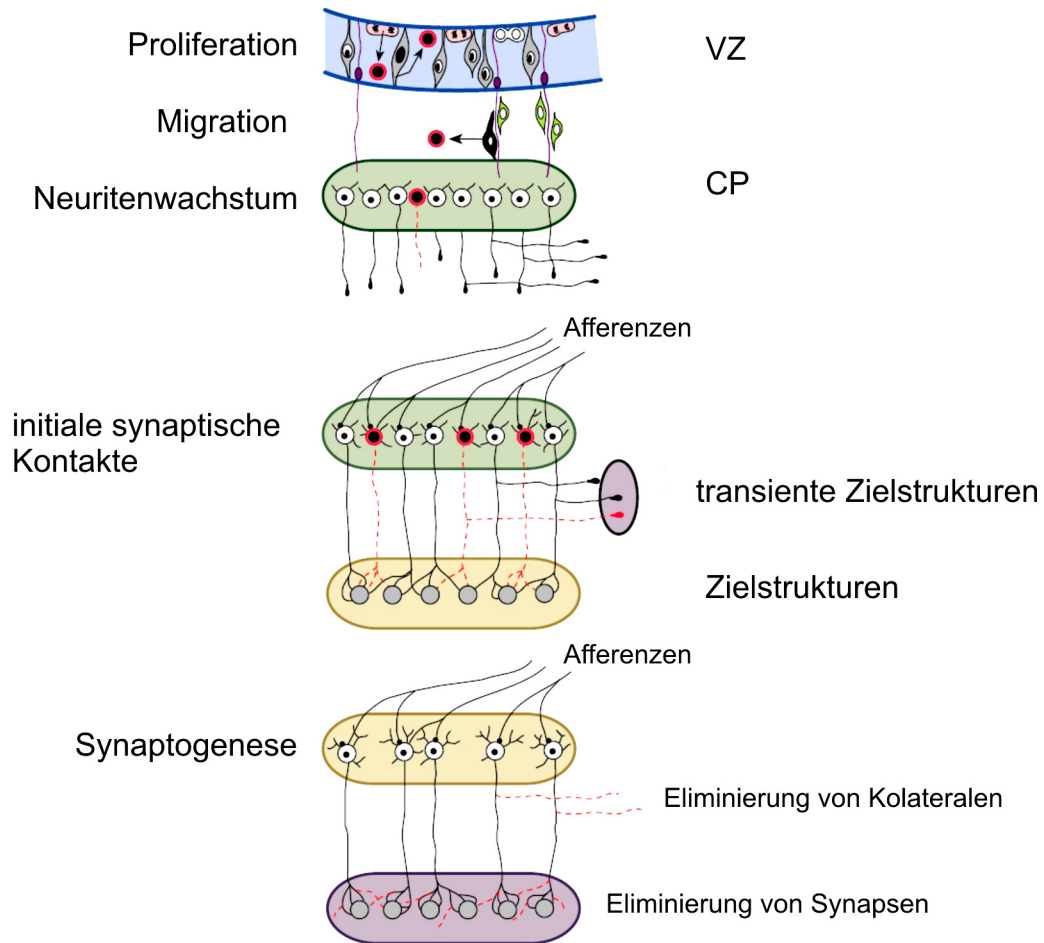


Abb. 5. Apoptose während der Entwicklung des Neokortex: In der Embryonalphase (obere Teilabbildung) durchlaufen Zellen in den proliferativen Schichten des Neokortex, unabhängig von elektrischer Aktivität, den Prozess der Apoptose (apoptotische Zellen sind rot dargestellt). Ein Teil der migrierenden Zellen stirbt noch bevor sie ihre Zielregionen erreichen. Unzureichende trophische Unterstützung während des Neuritenwachstums (mittlere Teilabbildung) kann ebenso zu neuronaler Apoptose führen wie aberrante Verknüpfungen mit anderen Neuronen. Auch Neurone transients Zielstrukturen werden durch Apoptose eliminiert. Im ausgereiften Kortex (untere Teilabbildung) findet dagegen weniger Apoptose statt, aber Axonkollaterale und Synapsen werden aktivitätsabhängig eliminiert (modifiziert nach Bloom et al., 2002).

1.10 Spontane Aktivität in Kulturen des unreifen Kortex

Kulturen des unreifen Kortex zeigen synchronisierte Netzwerkaktivität. Dies konnte vor allem mit Hilfe von MEA-Analysen (Canepari et al., 1997; Opitz et al., 2002; Arnold et al., 2005; Wagenaar et al., 2006; Heck und Sun, unveröffentlichte Beobachtungen) und Kalziummessungen (Voigt et al., 1997; Ganguly et al., 2001; Voigt et al., 2001) bei organotypischen und dissoziierten Kulturen beobachtet werden.

In dissoziierten Kulturen wird spontane Aktivität erstmalig nach 3-4 Tagen *in vitro* (div) beobachtet und synchronisierte Aktivität tritt am Ende der ersten bzw. Anfang der zweiten Woche *in vitro* auf, zeitgleich mit der Entstehung von Synapsen in den Kulturen (Voigt et al., 1997; Voigt et al., 2001; Opitz et al., 2002; Wagenaar et al., 2006). Diese Aktivität ist ebenso wie die synchronisierte Netzwerkaktivität *in vivo* abhängig von glutamaterger und GABAerger synaptischer Transmission, bleibt jedoch *in vitro* im Gegensatz zu der Situation *in vivo* mehrere Wochen bis zu mehreren Monaten bestehen (Canepari et al., 1997; Opitz et al., 2002; Gramowski et al., 2004; Wagenaar et al., 2005).

Dies ist ein grundsätzlicher Unterschied zur *in vivo* Situation, in welcher die synchronisierte Netzwerkaktivität in den ersten postnatalen Wochen von reiferen Aktivitätsmustern abgelöst wird. Es wird spekuliert, dass dieser Unterschied auf die Etablierung von Verbindungen mit anderen Hirnregionen wie dem Thalamus zurückzuführen ist, die in Kulturen fehlen (Turrigiano, 1999; Wagenaar et al., 2004). Aufgrund der präzisen Beschreibung und der leichten Beeinflussbarkeit neuronaler Aktivitätsmuster sind neuronale Kulturen ein probates Mittel, um Netzwerkaktivität in Bezug auf ihre Bedeutung für das neuronale Überleben zu studieren.

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Aus den vorangegangenen Kapiteln geht hervor, dass die Modulation der Apoptose durch neuronale Aktivität ein wichtiger Prozess während der normalen Entwicklung des ZNS und insbesondere des Neokortex ist. Die Bedeutung einiger ligandengesteuerter Rezeptoren und spannungsabhängiger Ionenkanäle für das neuronale Überleben im postnatalen Kortex wurde durch verschiedene Studien bereits untersucht, ebenso wie die überlebensfördernde Wirkung von Neurotrophinen (siehe 1.4). Auch sind bestimmte Muster spontaner neuronaler Aktivität während der Entwicklung des ZNS durch Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen worden.

Eine umfassende Aussage, welche Muster spontaner Aktivität und das Zusammenwirken welcher ligandengesteuerter Rezeptoren und spannungsabhängiger Ionenkanäle das Überleben kortikaler Neurone in der postnatalen Entwicklung beeinflussen, konnte bisher jedoch noch nicht getroffen werden. Auch war es bisher kaum möglich, durch Echtzeitanalysen den Zeitpunkt der Apoptose individueller Neurone genau zu bestimmen und mit deren spontaner Aktivität zu korrelieren. Daher sollte in der vorliegenden Dissertation in einem ersten Ansatz besonders geklärt werden, wie das Zusammenspiel verschiedener ligandengesteuerter und spannungsabhängiger Ionenkanäle das Überleben in

einem dreidimensionalen Kultursystem beeinflusst. Dazu wurden organotypische Schnittkulturen des neonatalen Kortex der Maus nach der Stoppinimethode kultiviert und mit Antagonisten verschiedener ligandengesteuerter Rezeptoren und spannungsabhängiger Ionenkanäle inkubiert. Die Aktivierung von Caspase-3, die mittels eines spezifischen Antikörpers gegen die aktivierte Caspase-3 (a-Caspase-3) nachgewiesen wurde, wurde zur Identifizierung apoptotischer Zellen genutzt.

Zunächst wurde untersucht, inwieweit sich eine Hemmung der AP-Bildung durch Inhibition von VDSCs auf das neuronale Überleben der Kultur auswirkt. Spontane Netzwerkaktivität in unreifen kortikalen Neuronen ist abhängig von GJs und später von glutamaterger und GABAerger Transmission (siehe 1.8). Daher wurde untersucht, wie sich die Blockade von GJ, iGluR und GABA_A-R auf die Zahl apoptotischer Zellen in kortikalen Schnittkulturen auswirkte. Durch eine leichte Depolarisation der Membran lässt sich ein Kalziumeinstrom in Neuronen induzieren. Es sollte getestet werden, ob eine durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration herbeigeführte Depolarisation über einen solchen Kalziuminflux zum Überleben von Neuronen beiträgt. Dazu wurde Apoptose durch Inhibition von NMDA-R ausgelöst und die Wirkung einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration auf das Überleben kortikaler Neuronen unter diesen Bedingungen untersucht. Durch gezielte Inaktivierung von spannungsabhängigen Kalziumionenkanälen des L-Typs (L-VDCC) sollte geklärt werden, ob ein Kalziumeinfluss über diese Kanäle an der beobachteten Wirkung auf das kortikale Überleben beteiligt ist. Weiterhin wurde untersucht, ob die beobachtete Regulation der neuronalen Apoptose von der Wirkung von Neurotrophen abhängt. Dazu wurden die organotypischen Kulturen mit einem Inhibitor der TrkB- und TrkC-R und einem Antagonisten der NMDA-R behandelt und einer hohen extrazellulären Kaliumkonzentration ausgesetzt.

In einem weiteren Ansatz sollte geklärt werden, wie sich die Modulation der spontanen neuronalen Aktivität in Abwesenheit trophischer Faktoren auf den Zeitpunkt der Caspase-3 Aktivierung in einzelnen Neuronen auswirkt. Dazu musste zunächst eine Methode zur Echtzeitanalyse der Aktivierung von Caspase-3 etabliert werden. Dissoziierte neonatale kortikale Kulturen wurden hierfür mit einem Plasmid (pCaspase3-sensor Vektor) transfiziert, das für einen Sensor der aktivierten Caspase-3 (Caspase3-sensor) codiert. Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie wurde das Schicksal individueller transfizierter Neurone in Abwesenheit trophischer Faktoren verfolgt. Die Modulierung der spontanen Aktivität erfolgte dabei durch Variation der extrazellulären Kaliumkonzentration und wurde durch MEA-Analysen überprüft. Dazu wurden dissoziierte Kulturen des neonatalen Kortex auf

Einleitung

MEA-Chips kultiviert und die Muster spontaner Aktivität während der neuronalen Entwicklung *in vitro* und in Gegenwart unterschiedlich hoher Kaliumkonzentrationen verfolgt. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, die Überlebensfähigkeit von einzelnen kortikalen Neuronen unter apoptoseinduzierenden Bedingungen mit den unter diesen Bedingungen auftretenden Mustern spontaner Aktivität zu korrelieren.

.

2. Material

2.1 Chemikalien

Agar (<i>select</i>)	Sigma, Steinheim
Agarose	Gibco, Karlsruhe,
<i>Aqua ad iniactabilia</i> Braun	Braun Melsungen AG, Melsungen
AraC	Sigma, Steinheim
B27	Gibco, Karlsruhe
BES	Sigma, Steinheim
BME	Gibco, Karlsruhe
Borsäure	Sigma, Steinheim
BSA	Sigma, Steinheim
Kalziumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
CNQX	Sigma, Steinheim
CPP	Sigma, Steinheim
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma, Steinheim
DNS-Leiter (<i>mass ruler high range</i>)	Fermentas, St. Leon-Rot
EB-Puffer	Qiagen, Hilden
Einbettmedium (Fluoromount-G)	SouthernBiotech, Birmingham, USA
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
FCS	Biochrom, Berlin
GABAzin (SR95531)	Sigma, Steinheim
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Sigma, Steinheim
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
GYKI 52466	Sigma, Steinheim
Hefeextrakt	Gibco, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Ifenprodil	Sigma, Steinheim
k252a	Alomone labs, Jerusalem, Israel
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kalziumphosphat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma, Steinheim
Mefloquin	Roche, Mannheim
MEM	Gibco, Karlsruhe
MgCl ₂ -Hexahydrat	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ Monohydrat	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Sigma, Steinheim
Neurobasalmedium	Invitrogen, Karlsruhe
Nifedipin	Sigma, Steinheim
NVP-AAM077	Novartis Pharmaceuticals, Basel, Schweiz
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Phenolrot	Sigma, Steinheim
Poly-L-Ornithinhydrobromid	Sigma, Steinheim

Material

Probenpuffer 6x (<i>Loading dye 6x</i>)	Fermentas, St. Leon-Rot
Staurosporin	Sigma, Steinheim
Streptavidin-Cy3	Jackson Immunosearch Laboratories Inc., West Grove, USA
SybrGold	Molecular Probes, Karlsruhe
Triton X 100	Serva, Heidelberg
TTX	Tocris, Bristol, UK
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck, Darmstadt
Z-VAD-FMK	RD Systems, Wiesbaden

2.2 Geräte

Analysenkammer (<i>recording chamber</i>)	Luigs & Neumann, Ratlingen
Analysenwaage (JL-200)	Chyo Balance Corp., Tokio, Japan
AOTF <i>Controller</i>	Visitech International, Sunderland, UK
Autoklav (Systech 65)	Systech, Wettenberg
Badheizung	Luigs & Neumann, Ratlingen
Binokular	Zeiss, Jena
CCD-Kamera	Roper Scientific, Trenton, USA
CO ₂ Inkubator (HeraCell 240)	Kendro, Wien, Österreich
Eismaschine (AF 20)	Scotsman, Mailand, Italien
Eisschrank (Herafreeze)	Kendro, Wien, Österreich
Elektrophoresegerät (iMupid)	Helixx Technologies, Toronto, Kanada
Filterapparatur (<i>Bottletop System</i>)	Hartenstein, Würzburg
Fotokamera Geldokumentation	Epson, Meerbusch
Gewebeschneider (<i>Tissue chopper</i> , McIlwain TC752)	Vibratome, St. Luis, USA
Kühlschrank (Liebherr <i>profiline</i>)	Liebherr, Lindau
Lampe für Binokular (KL1500 electronic)	Schott, Bad Gandersheim
Laser	Laser Physics, West Jordan, USA
Luft objektiv (4x/340)	Olympus, Tokio, Japan
MEA-Chips	Ayanda Biosystems, Lausanne Schweiz
MEA1060-INV-BC	Multi Channel Systems, Reutlingen
Mikromanipulator (SM-5)	Luigs & Neumann, Ratlingen
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikroskop	Optika microscopes, Ponteranica, Italien
Mikroskop (BX51WI)	Olympus, Tokio, Japan
Mikroskop CK40	Olympus, Tokio, Japan
Millipore (<i>Synergy</i>)	Millipore, Schwalbach
Netzgerät für Weißlichtlampe (TH4-200)	Olympus, Tokio, Japan
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim
Nipkow <i>spinning disk confocal system</i> (QLC100)	Visitech International, Sunderland, UK
Osmometer	Knauer, Berlin
pH-Meter	InoLab, Weinheim
Piezo	Piezsystem, Jena
Pinzetten	Medicon eG, Tuttlingen
Pipette (Pipetman)	Gilson, Bad Camberg
Pipette (<i>research</i>)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (<i>Easypet</i>)	Eppendorf, Hamburg
Quecksilberbrenner (HBO103W/2)	Osram, München

Schere (mikro 2000)	Medicon eG, Tuttlingen
Schütteltisch (Titramax1000)	Heidolph Instruments, Schwabach
Skalpelle (Mikroskalpell)	Medicon eG, Tuttlingen
Spektrophotometer (UV1402)	Shimadzu, Duisburg
Sterilwerkbank (Herasafe HS15, Heraguard)	Kendro, Wien, Österreich
Temperaturregler	Luigs & Neumann, Ratlingen
Temperaturregler (TC02)	Multi Channel Systems, Reutlingen
Thermomixer (<i>comfort</i>)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Qualitron Inc., Korea
Tischzentrifuge (<i>Minispin plus</i>)	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Kendro, Wien, Österreich
UV-Lampe für Geldokumentation (<i>Syngene</i>)	Synoptics, Cambridge, UK
Vakuumpumpe	KNF Lab, Trenton, USA
Vorschaltgerät für Quecksilberbrenner (U-RFL-T)	Olympus, Tokio, Japan
Vortex	Cenco Instruments, Breda, Niederlande
Vortex (<i>Minishaker</i>)	IKA GmbH, Staufen
Waage	Kern und Sohn GmbH, Ballingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserimmersionsobjektiv (20x/0,5, 60x/0,9)	Olympus, Tokio, Japan
Zentrifuge (5415C)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Megafuge 1.0R Rotor 2252)	Kendro, Wien, Österreich
Zentrifuge (Sorvall SS34)	Kendro, Wien, Österreich

2.3 Enzyme, Plasmide, Antikörper und Fluorophore

anti-aktivierte-Caspase-3 (Asp175)	Cell Signaling Technology, San Diego, USA
anti-GFAP	Dako, Hamburg
anti-MAP-2 (HM-2)	Sigma, Steinheim
DNase I	Roche, Mannheim
<i>goat-anti-mouse-Alexa Fluor568/red</i>	Molecular Probes, Karlsruhe
<i>goat-anti-rabbit</i> (biotinyliert)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
pCaspase3-sensor Vektor	BD Biosciences, Heidelberg
Streptavidin-Alexa488	Molecular Probes, Karlsruhe
Streptavidin-Cy3	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Trypsin 2,5 %	Sigma, Steinheim

2.4 Kits

<i>EndoFree</i> Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
TUNEL (<i>in situ cell death TMR</i>)	Roche, Mannheim

2.5 Verbrauchsmaterialien

24-well plates	TPP, Trasadingen, Schweiz
6-well plates	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Eppendorf-Gefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf

Material

Falconröhrchen (15 und 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Handschuhe (Manoera)	Josef F. Müller AG, München
Handschuhe (<i>rotiprotect</i> Latex)	Carl Roth, Karlsruhe
Kulturfläschchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Kulturgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten (UV-Küvette Mikro)	Brand, Wertheim
<i>Millicell</i> CM	Millipore, Schwalbach
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipetten (10 und 25 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (<i>Filtropur</i> S 0,2 µm)	Fluka, Steinheim

2.6 Versuchstiere

Bodenfläche	810 cm ²
Bodenmaße	383 x 221 mm
Einstreu	grobe Holzspäne
Höhe	150 mm
Käfigtyp	Makrolon Typ III A
Mäuse	C57BL/6
Wanddicke	3 mm
Wasser	pH neutral, ohne Zusätze
Zuchtfutter	Altromin 1314 - Panacur versetzt mit Fenbendazol

2.7 Software

Bilddokumentation (<i>Metamorph</i>)	Universal Imaging Corporation, Sunnyvale, USA
Bildverarbeitung (<i>Adobe Photoshop</i> Version 7.0) <i>cell locator</i>	Adobe Systems Inc., München programmiert von Uwe Schürmann
Datenanalyse MEA (<i>Matlab</i> Version 6.5)	MathWorks, München; programmiert von Jyh-Jang Sun
Graphiklayout (<i>CorelDraw!</i> Version 12) MEA_Rack	Corel Corporation, Unterschleißheim Multi Channel Systems, Reutlingen
Referenzverwaltung (<i>Reference Manager</i> Version 10)	ISI ResearchSoft, Philadelphia, USA
Statistik (SPSS Version 12.0 <i>for students</i>)	SPSS Inc., München
Tabellenkalkulation (Excel MS Office 2003)	Microsoft, Redmond, USA
Textverarbeitung (Word MS Office 2003)	Microsoft, Redmond, USA

2.8 Medien und Pufferlösungen

ACSF ¹	1,8	mM	CaCl ₂
	25	mM	Glukose
	10	mM	HEPES
	5,3	mM	KCl
	0,812	mM	MgCl ₂ • 6 H ₂ O
	51,3	mM	NaCl
	26	mM	NaHCO ₃
	0,9	mM	NaH ₂ PO ₄ • 1 H ₂ O
Agarosegel	1	%	Agarose in TBE
2× BBS	50	mM	BES pH 7,1
	280	mM	NaCl
	1,5	mM	Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O
BME/10 % FCS	1	fach	BME
	10	%	FCS
HBS(3/0)	20	mM	HEPES
	4	mM	KCl
	135	mM	NaCl
	1	mM	Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O
	10	mM	Glukose
	3	mM	MgCl ₂
LB-Agar	15	g/l	Agar in LB-Medium
LB-Medium	5	g/l	Hefeextrakt
	5	g/l	NaCl
	10	g/l	Pepton in H ₂ O
MEM+	1	fach	MEM
	200	µM	Glutamin
MPBS (-/-)	1	mg/mL	BSA
	6	µg/mL	DNaseI
	10	mM	Glukose
	1	mM	Glutamax
	4	mM	NaOH
	1	fach	PEST
	5	mg/mL	Phenolrot
	1	mM	Pyruvat in PBS

¹ Außer dem ACSF mit 5,3 mM KCl wurde auch ACSF mit Kaliumkonzentration von 1,5 mM, 3 mM und 8 mM verwendet.

Material

NB/B27	2	%	B27
	2	mM	Glutamax
	10	µg/mL	PEST
Permeabilisierungslösung (TUNEL)	0,1	%	Triton X-100
	0,1	%	tri-Natriumzitat in H ₂ O
SybrGold	0,08	%	SybrGold in TBE
TBE	89	mM	Tris/Borat pH 8,0
	89	mM	Borsäure
	2	mM	EDTA

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Vorbereitung der *Millicell*-CM Membranen

Millicell-CM Membranen wurden unter sterilen Bedingungen in 6-*well*-Platten überführt. 400 μ L einer Poly-Ornithinlösung (100 μ g/mL) wurden direkt auf die Membranen gegeben und die 6-*well*-Platten im Inkubator über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurden die Membranen drei Mal mit sterilem Millipore Wasser gewaschen und bei Zimmertemperatur in der Sterilbank getrocknet. Einige Stunden vor der Präparation der organotypischen Schnittkulturen wurden 1,2 mL NB/B27 Medium unter den Membranen vorgelegt.

3.1.2 Präparation organotypischer Schnittkulturen des neonatalen

Kortex der Maus

Organotypische Schnittkulturen des Neokortex (Stoppini et al., 1991) wurden von neugeborenen C57Bl/6 Mäusen (P0-P1) angefertigt. Dabei galt P0 als Tag der Geburt. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die neugeborenen Mäuse wurden durch Dekapitation mit einer Schere getötet. Die Kopfhaut wurde entlang der Mittellinie mittels einer Mikroschere aufgeschnitten und zu den Seiten hin aufgeklappt. Die Schädeldecke wurde ebenfalls von caudal her entlang der Mittellinie aufgeschnitten und zu den Seiten geklappt. Mit einem gebogenen Spatel wurde das Gehirn entnommen und in eine Petrischale mit eisgekühltem MEM+ gegeben.

Alle weiteren Schritte erfolgten bei einer Temperatur von 4°C. Unter dem Binokular wurden die Hemisphären mittels zweier Pinzetten voneinander und vom Zerebellum getrennt. Der *Bulbus olfactorius* sowie ein Teil des medioventralen Gewebes wurde entfernt. Mit Hilfe einer gebogenen Pinzette wurden die Hemisphären auf dem Gewebeschneider (McIlwain) platziert, so dass die rostrocaudale Achse senkrecht zur befestigten Klinge stand. Mit Hilfe des Gewebeschneiders wurden 350 μ m dicke Koronalschnitte angefertigt. Diese wurden mit einer zuvor präparierten abgeschnittenen und feuerpolierten blauen Pipettenspitze und etwas MEM+ aufgenommen und in eine Petrischale mit eisgekühltem MEM+ überführt. Mit Hilfe einer Pinzette und eines Mikroskalpells wurden die Schnitte voneinander getrennt, wobei nur die des parietalen

Kortex weiterverwendet wurden. Mit dem Skalpell wurden durch einen Schnitt entlang des *Corpus callosum* Basalganglien, Hippocampus und Thalamus entfernt sowie durch einen weiteren Schnitt der ventrale Teil des Kortex. Die Hirnhaut wurde mit Hilfe einer Pinzette vollständig abgelöst. Mit einer abgeschnittenen und feuerpolierten Pipettenspitze wurden die Koronalschnitte des Neokortex auf die zuvor präparierten Millicell-CM Membranen aufgebracht. Die Membranen wurden in 6-well Platten mit vorgelegtem NB/B27 Medium im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchte inkubiert. Das Medium wurde nach 24 Stunden und nachfolgend alle 2 Tage gewechselt. Dabei wurde bei jedem zweiten Medienwechsel AraC (1 µM) zugesetzt.

3.1.3 Vorbereitung der Deckgläser

Runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 10 mm wurden in 70 %igem Ethanol sterilisiert, unter sterilen Bedingungen abgeflammt und in 24-well-Platten überführt. In jede Vertiefung wurden 300 µL Poly-Ornithinlösung (10 µg/mL) gefüllt und die Deckgläser über Nacht im Brutschrank inkubiert. Darauf folgend wurden die Deckgläser 3 Mal mit sterilem Millipore Wasser gewaschen und bei Zimmertemperatur in der Sterilbank getrocknet.

3.1.4 Vorbereitung des MEA-Chips

MEA-Chips wurden mehrfach verwendet. Daher war ein gründliches Reinigungsprogramm notwendig. Zunächst wurde der MEA-Chip über Nacht bei Zimmertemperatur mit 500 µL Trypsin (2,5 %) behandelt, um Zellen und Zelldebris zu entfernen. Im Anschluss wurde der MEA-Chip 3 Mal mit 1 mL Millipore Wasser für 15 min auf dem Schütteltisch gewaschen. Nachfolgend wurde der MEA-Chip für 5 Stunden bei 130 °C sterilisiert und nach dem Abkühlen mit Poly-Ornithinlösung (100 µg/mL) im Brutschrank über Nacht inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit sterilem Millipore Wasser wurde er in der Sterilbank bei Zimmertemperatur getrocknet.

3.1.5 Präparation dissoziierter Kulturen des neonatalen Kortex der Maus

Die Hemisphären neugeborener Mäuse (P0-P1) wurden, wie in 3.1.2 beschrieben, isoliert und getrennt. Die Hirnhaut, Thalamus, Hippocampus und Basalganglien wurden mit Hilfe zweier Pinzetten unter dem Binokular entfernt. Der ventrale, caudale und rostrale Teil des Kortex wurde mittels eines Mikroskalpells abgeschnitten. Der parietale Kortex wurde mit einer gebogenen Pinzette aufgenommen und in ein Falconröhrchen (15 mL) mit 0,25 %

Trypsin versetztem eiskühlem MPBS (-/-) überführt. Das Falconröhrchen wurde im Brutschrank für 12 min inkubiert. Die Trypsinierung wurde gestoppt, indem die Suspension auf Eis mit 1 mL BME/10 % FCS versetzt wurde. Das Falconröhrchen wurde 5 min bei 800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 2 mL BME/10 % FCS versetzt. Auf Eis wurden die Zellen durch 30-maliges Aufziehen mit einer abgeschnittenen und feuerpolierten blauen Pipettenspitze mechanisch isoliert. Im folgenden Schritt wurde diese Prozedur mit einer feuerpolierten Pasteurpipette wiederholt. Mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte bestimmt und durch Präplattieren der Zellen in einer Petrischale eine neuronengereicherte Suspension gewonnen.

Nach 1 Stunde wurde der Überstand der Petrischale aufgenommen und in ein Falconröhrchen (15 mL) überführt. Dieses wurde 10 min bei Raumtemperatur und 900 rpm zentrifugiert, während die Petrischale mit den adherierten glialen Zellen verworfen wurde. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet in NB/B27 Medium resuspendiert, so dass die Dichte der Suspension 2000000 Zellen pro mL betrug. In den 24-*well*-Platten mit den Poly-Ornithin beschichteten Deckgläschen wurden pro Vertiefung 300 µL NB/B27 vorgelegt und die Neurone in einer Dichte von ca. 640 Zellen pro mm² ausgesät. Für den MEA-Chip wurden 867 µL NB/B27 vorgelegt und Zellsuspension zupipettiert, um die gleiche Zelldichte, wie auf den Deckgläschen zu erhalten. Das Medium wurde nach 24 Stunden gewechselt. Nach 7 div erfolgte ein weiterer Medienwechsel, bei dem die Hälfte des konditionierten Mediums gegen neues NB/B27 ausgetauscht wurde.

3.1.6 Kalziumphosphat-Transfektion kortikaler Neurone

Die Kalziumphosphat-Transfektion dient dem Transfer von Plasmid-DNS in eukaryotische Zellen für die transiente Expression der auf dem Plasmid codierten Gene. Das Prinzip dieser Transfektionsmethode beruht auf der Bildung von Kalziumphosphatpräzipitaten, in denen die DNS eingeschlossen wird und von den Zellen aufgenommen werden kann (Chen und Okayama, 1988). Dissoziierte kortikale Kulturen wurden an 7 div mit dem pCaspase3-sensor Vektor (siehe 3.2.1) mit Hilfe der Kalziumphosphat-Transfektion transfiziert (Haubensak et al., 1998; Kohrmann et al., 1999). Unter sterilen Bedingungen wurden pro Deckgläschen zunächst 0,6 µg des isolierten Plasmids in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 5,9 µL *aqua ad iniactabilia* verdünnt. Unter sorgfältigem Schütteln wurden 0,7 µL einer 2,5 M CaCl₂ Lösung und folgend 7,4 µL 2x BBS hinzupipettiert. Darauf folgte eine

5-minütige Inkubation der DNS-Lösung bei Zimmertemperatur. Im Anschluss wurden 160 μL konditioniertes Medium der zu transfizierenden Kultur tropfenweise unter sorgfältigem Schütteln zu der DNS-Lösung hinzugegeben. Das restliche Medium wurde abgenommen und in ein zweites Eppendorfgefäß überführt. Die DNS-Lösung wurde auf die dissoziierten Kulturen geträufelt. Nach einer 2-stündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Deckgläschen mehrmals mit 37 °C warmem HBS(3/0) gewaschen und in dem abgenommenen vorgewärmten Medium, das 1:1 mit neuem NB/B27 versetzt wurde, weiterkultiviert. Die Untersuchung der transfizierten Zellen erfolgte 12 bis 20 Stunden nach der Transfektion.

3.1.7 Lipofektamin vermittelte Transfektion kortikaler Neurone

Die Lipofektamin-vermittelte Transfektion eignet sich für schwer zu transfizierende Zellen. Das Prinzip basiert auf der Komplexbildung der DNS mit den verwendeten kationischen Lipiden, die durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden (Kaech et al., 1996). Dissoziierte kortikale Kulturen wurden an 12 und 13 div unter sterilen Bedingungen mit der Lipofektion nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Zunächst wurde das konditionierte Medium abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. 400 μL NB/B27 Medium ohne Penicillin-Streptomycin (PEST) wurden zu der Kultur hinzupipettiert. In einem weiteren Eppendorfgefäß wurden pro Deckgläschen 0,8 μg pCaspase3-sensor Vektor vorgelegt und unter sorgfältigem Schütteln auf 50 μL mit NB-Medium ohne Zusätze aufgefüllt. In ein zweites Eppendorfgefäß wurden 2 μL Lipofektamin pipettiert und ebenfalls unter sorgfältigem Schütteln mit NB-Medium ohne Zusätze auf 50 μL aufgefüllt. Beide Ansätze wurden 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden die Plasmid- und Lipofektaminlösung unter Schütteln vereinigt und 20 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden 100 μL des Transfektionsgemischs zu dem Deckgläschen hinzupipettiert und der Transfektionsansatz im Brutschrank 3 bis 4 Stunden inkubiert. Danach wurde die DNS-Lösung durch das zu Anfang abgenommene konditionierte Medium ersetzt und mit 100 μL frischem NB/B27 versetzt. Nach 12 bis 20 Stunden werden die transfizierten Neurone der dissoziierten Kultur untersucht.

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 Der Caspase3-sensor

Der Caspase3-sensor ist ein Substrat der aktivierten Caspase-3. Das Plasmid (pCaspase3-sensor Vektor) (Abb. 6A) kodiert für die grün-gelbe Variante (*enhanced yellow fluorescent protein*, EYFP) des *Aequorea victoria green fluorescent protein* (GFP). Drei Kopien des *nuclear localisation signals* (NLS) von Simian Virus 40 *large T*-Antigen befinden sich am 3' Ende des EYFP-Gens. Eine 36 Nukleotid große Sequenz am 5' Ende codiert für das Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat-Motif (DEVD-Motif) der Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP), das ein Substrat der Caspase-3 darstellt (Lazebnik et al., 1994; Talanian et al., 1997). An dessen 5' Ende ist das *nuclear export signal* (NES) der MAP Kinase Kinase (MAPKK) fusioniert. Im exprimierten Fusionsprotein (Caspase3-sensor) dominiert das NES über das NLS, so dass der Caspase3-sensor im Zytosol verbleibt. Wenn Caspase-3 aktiviert wird, schneidet sie das DEVD-Motif (Lazebnik et al., 1994; Thornberry et al., 1997; Vaughan et al., 2002; Fang et al., 2006), wodurch das EYFP enthaltende Fragment (tCaspase3-sensor) unter dem Einfluss des nicht mehr inhibierten NLS in den Zellkern transloziert (Abb. 6B). Der Vektor enthält außerdem Sequenzen für die Vervielfältigung in *E. coli* und für Neomycin- bzw. Kanamycinresistenz (Abb. 6B).

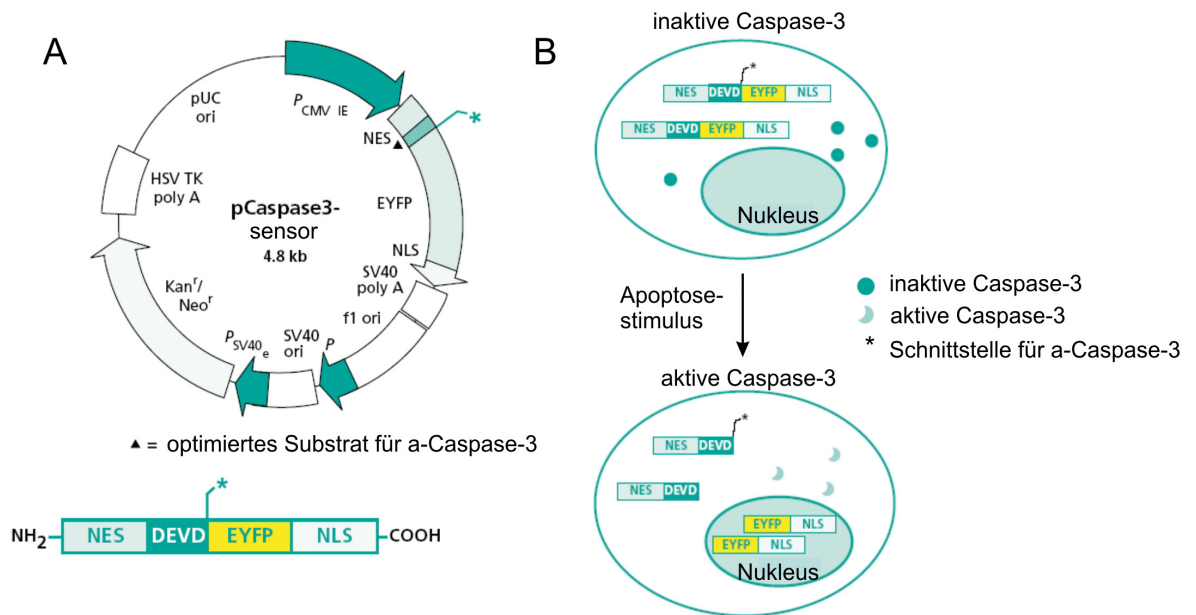


Abb. 6. Aufbau und Prinzip des Caspase3-sensors: **A** Schematisch dargestellt sind die Vektorkarte und das codierte Fusionsprotein des Caspase3-sensors. Der Vektor codiert für ein Fusionsprotein, bestehend aus dominantem NES, einer Schnittstelle für α -Caspase-3, EYFP und einem C-terminalen NLS. Die codierenden Sequenzen stehen unter der Kontrolle eines CMV-Promoters. **B** Solange Caspase-3 inaktiv ist, verbleibt das Fusionsprotein im Cytosol. Durch Apoptosestimuli und die folgende Aktivierung von Caspase-3 wird das Protein geschnitten und transloziert unter dem Einfluss des NLS in den Nucleus. (modifiziert nach www.bdbiosciences.com)

3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Um kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien mit dem pCaspase3-sensor Vektor zu transformieren, wurden 5 μ g DNS (siehe 3.2.4) zu 150 μ L einer Suspension kompetenter Bakterien gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock (90 s bei 42 °C) in einem Thermoschüttler unterzogen. Im Anschluss wurden sie nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 μ L vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotikum zugesetzt und die Bakteriensuspension 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Darauf folgend wurden die Bakterien zunächst zentrifugiert (2 min bei 10000 rpm) und nach Verwerfen des Überstandes mit Ausnahme von etwa 100 μ L in verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:10 und 1:100) auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (75 μ g/mL) ausplattiert und über Nacht kultiviert.

3.2.3 Kultivierung transformierter Bakterien und Anlegen von Glycerindauerkulturen

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden Klone transformierter E. coli Bakterien von den Agarplatten gepickt und Starterkulturen angelegt. Dazu wurden die Zahnstocher in Kulturröhrchen gegeben, mit 5 mL LB-Medium mit Kanamycin (50 µg/mL) versetzt und 8 h bei 37°C auf einem Schüttler kultiviert. Zum Anlegen von Glycerindauerkulturen wurde 1 mL der Starterkultur abgenommen, die Bakterien sedimentiert, mit 0,5 mL LB-Medium ohne Antibiotikum resuspendiert und mit 0,5 mL Glycerin gemischt. Diese Dauerkulturen wurden bei -80 °C gelagert. Die restliche Starterkultur wurde in 200 mL LB-Medium mit Kanamycin (50 µg/mL) gegeben. Diese Suspension wurde über Nacht bei 37 °C auf dem Schütteltisch bei einer Schüttelfrequenz von ca. 300 rpm kultiviert.

3.2.4 Isolierung der Plasmid-DNS

Die Isolierung der Plasmid-DNS erfolgte mit dem Endotoxin-freien Plasmidisolierungskit von Qiagen. Zunächst wurde die Übernachtskultur 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Pellet in 10 mL Resuspendierungspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 mL Lysepuffer erfolgte die 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Durch Zufügen von 4 mL gekühltem Präzipitationspuffer und 10-minütige Inkubation bei Zimmertemperatur wurden genomische DNS, Proteine und Zelldebris ausgefällt. Das Lysat wurde durch den QiaFilter vom Präzipitat getrennt. Nach Zugabe von 2,5 mL ER Puffers folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. In der Zwischenzeit erfolgte die Äquilibrierung der Säule mit 10 mL Äquilibrierungspuffer. Die Säule wurde mit dem Lysat beladen und nach dem Durchlauf 2 Mal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Überführen der Säule auf ein neues Zentrifugenröhrchen erfolgte die Elution der Plasmid-DNS mit Elutionspuffer. Durch Zugabe von 10,5 mL Isopropanol und anschließender 60-minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C wird die Plasmid-DNS präzipitiert. Das Pellet wurde mit 5 mL 70%igem Ethanol gewaschen und 30 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Sediment für 5-10 min an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNS wurde in 400 µL EB-Puffer aufgenommen und analysiert.

3.2.5 spektrophotometrische und elektrophoretische Analyse der Plasmid-DNS

Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNS erfolgte mit Hilfe der UV-Spektrophotometrie. Hierzu wurden die Extinktionen einer 1:100 Verdünnung der Probe mit EB-Puffer bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Konzentration der Plasmid-DNS ergab sich aus der Gleichung $c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = E_{260\text{nm}} \cdot V \cdot F$, wobei V der Verdünnungsfaktor und F ein Faktor für DNS von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ist. Die Reinheit der isolierten Plasmid-DNS ergab sich aus dem Quotienten E_{260}/E_{280} . Mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels wurde die Integrität der DNS elektrophoretisch überprüft. Hierzu wurden 10 μL einer 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNS-Lösung mit 2 μL 6 x Probenpuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und etwa 30 min bei ca. 100 V aufgetrennt. Als DNS-Leiter diente der *mass ruler high range* von Fermentas. Im Anschluss wurde das Gel 45 min in einer SybrGold-Lösung inkubiert und die angefärbten Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht.

3.3 Pharmakologie

3.3.1 Pharmakologische Manipulation organotypischer Schnittkulturen

Organotypische Schnittkulturen des neonatalen Kortex der Maus wurden nach einer Kulturzeit von 4 bis 5 div unterschiedlichen Antagonisten ausgesetzt. Bei allen Versuchen wurde das Kulturmedium durch NB-Medium ohne B27 ersetzt. Kontrollkulturen wurden mit dem gleichen Volumen des Lösungsmittels des entsprechenden Antagonisten behandelt. Nach 6, 12 und 24 Stunden wurden die Kulturen 30 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und nachfolgend mittels immunzytochemischer Verfahren untersucht. Im Folgenden sind die verwendeten Antagonisten, ihre Wirkung, die finale Konzentration sowie das verwendete Lösungsmittel aufgelistet. Alle Antagonisten wurden als Stammlösung bei -20 °C gelagert.

Antagonist	Wirkung	c [μM]	Lösungsmittel
CNQX	Inhibition von AMPA/Kainat-Rezeptoren (AMPA/Kainat-R)	10	DMSO
(\pm) CPP	Inhibition von NMDA-Rezeptoren (NMDA-R)	20	H ₂ O

Methoden

GABAzin	Inhibition von GABA _A -Rezeptoren (GABA _A -R)	100	DMSO
GYKI 52466	Inhibition von AMPA Rezeptoren (AMPA-R)	80	DMSO
Ifenprodil	Inhibition der NR2B Untereinheit des NMDA-R	3	H ₂ O
k252a	Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität von Trk-Rezeptoren	0,2	DMSO
Mefloquin	Inhibition von Connexin 36	25	DMSO
Nifedipin	Inhibition spannungsabhängiger L-Typ Ca ²⁺ Kanäle (L-VDCC)	10	DMSO
NVP-AMM077	Inhibition der NR2A Untereinheit des NMDA-R	0,4	H ₂ O
Staurosporin	Kinaseinhibitor	0,1	DMSO
TTX	Inhibition spannungsabhängiger Na ⁺ Kanäle (VDSC)	1	Zitratpuffer
Z-VAD-FMK	Caspaseinhibitor	50	DMSO

3.3.2 Pharmakologische Manipulation dissoziierter kortikaler Kulturen

Dissoziierte kortikale Kulturen der neonatalen Maus wurden nach 7 bzw. 12 bis 13 div mit dem pCaspase3-sensor transfiziert und 12 bis 20 Stunden später mit Hilfe der Konfokalmikroskopie untersucht. Dabei wurden die Kulturen mit künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF) umspült. In einigen Experimenten wurde das ACSF mit Staurosporin (Endkonzentration: 100 nM), einem Kinaseinhibitor und bekanntem Apoptosestimulus (Koh et al., 1995; Krohn et al., 1998; Budd et al., 2000) versetzt. Zusätzlich wurden in weiteren Experimenten 50 µM Z-VAD-FMK, ein Breitband-Caspaseinhibitor, zugesetzt bzw. die Kaliumkonzentration des ACSF variiert (1,5; 3; 5,3 und 8 mM). Nachfolgend wurden die Deckgläschen mit den Kulturen 15 min in 4 % PFA fixiert und weiteren histologischen Untersuchungen unterzogen.

3.4 Färbungen

3.4.1 Immunzytochemische Färbungen organotypischer neokortikaler Schnittkulturen

Die Färbung der organotypischen Schnittkulturen erfolgte, nachdem diese vorsichtig von der Millicell-CM Membran abgehoben und in 24 *well* Platten überführt wurden. Nach der 30-minütigen Fixierung mit 4 % PFA wurden die organotypischen neokortikalen Schnittkulturen in *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und zunächst mit einer 0,1 %igen Lösung Triton X-100 in PBS für 30 min bei Zimmertemperatur auf dem Schütteltisch permeabilisiert. Darauf folgte die 1-stündige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % BSA in PBS ebenfalls unter Schütteln bei Zimmertemperatur. Der Erstantikörper wurde in einer Verdünnung von 1 zu 400 in 0,1 % Triton X-100 und 5 % BSA in PBS appliziert. Verwendet wurden ein spezifischer Antikörper gegen die aktive Form der Caspase-3 (Asp175) (Marin-Teva et al., 2004) und zur Charakterisierung der Kultur ein polyklonaler Antikörper gegen *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am folgenden Morgen wurden die Schnitte drei Mal je 15 min mit PBS gewaschen und danach der Zweitantikörper, ein polyklonaler biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 in 0,1 % Triton X-100 und 5 % BSA in PBS zugesetzt. Die 2-stündige Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur auf dem Schütteltisch. Danach wurden die Schnitte erneut drei Mal 15 min mit PBS gewaschen und schließlich mit 1 zu 800 in 0,1 % Triton X-100 und 5 % BSA in PBS verdünntem Alexa488-gekoppeltem Streptavidin für 30 min bei Zimmertemperatur auf dem Schütteltisch inkubiert. Nachdem die Schnitte weitere drei Male mit PBS gewaschen wurden, wurden sie mit dem weiten Ende einer Pasteurpipette aufgenommen und mit Hilfe des Einbettmediums, Fluoromount-G, auf einen Objektträger aufgebracht. Im Falle der Doppelfärbung von Caspase-3 und GFAP wurden die Schnitte nach der Färbung für a-Caspase-3 erneut 15 min in 4 % PFA fixiert und danach der zweiten Färbung für GFAP unterzogen. Als zweiter Fluorophor dient dabei Cy3-gekoppeltes Streptavidin in gleicher Verdünnung wie oben beschrieben.

3.4.2 Immunzytochemische Färbungen dissoziierter kortikaler Kulturen

Dissoziierte kortikale Kulturen wurden zunächst nach der 15-minütigen Fixierung mit 4 % PFA mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 2 min. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 2-stündige Inkubation mit 5 % BSA in PBS blockiert. Im Anschluss wurde der Erstantikörper, Asp175, GFAP oder ein gegen das *microtubule associated protein-2* (MAP-2) gerichteter Mausantikörper, in einer Verdünnung von 1 zu 400 in 0,1 % Triton X-100 und 5 % BSA in PBS appliziert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurde der Zweitantikörper, biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen- oder Alexa568-gekoppelter-anti-Maus-Antikörper zugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch inkubiert. Nach weiterem 3-maligem Waschen mit PBS wurden die dissoziierten Kulturen 30 min mit Alexa488-gekoppeltem Streptavidin (1 zu 800 in 0,1 % Triton X-100 und 5 % BSA in PBS) inkubiert. Im Anschluss wurden die Kulturen weitere 3 Mal mit PBS gewaschen, kurz in Wasser eingetaucht und mittels Fluoromount-G auf Objektträgern immobilisiert.

3.4.3 Biozytinfärbung einzelner Neurone

Einzelne Neurone von dissoziierten Kulturen des Neokortex der neugeborenen Maus wurden an 14 div mit Hilfe einer Mikropipette mit Biozytin gefüllt und im Anschluss mit 4 % PFA fixiert. Nach 2-minütiger Permeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 in PBS erfolgte die 2-stündige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mittels 5 % BSA in PBS. Danach wurden die Neurone 30 min mit Alexa488-gekoppeltem Streptavidin (1 zu 800 in 0,1 % Triton X-100 und 5 % BSA in PBS) inkubiert. Nach 3-maligem Waschen wurden die Deckgläschen mittels Fluoromount-G auf einen Objektträger aufgebracht.

3.4.4 TUNEL-Färbung

Das Prinzip der TUNEL-Färbung beruht auf der Detektion der DNS-Fragmentierung während der Apoptose. Die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) fügt an 3' *blunt ends* der DNS-Fragmente bzw. an Strangbrüche Desoxynukleotide an. Im Fall des TUNEL wird markiertes Desoxyuridin eingebaut. Erstmals wurde diese Methode von Gavrieli 1992 etabliert (Gavrieli et al., 1992). Die Prozedur wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden die fixierten dissoziierten Kulturen 2 Mal mit PBS gewaschen und im Anschluss 2 min auf Eis mit dem Permeabilisierungspuffer inkubiert. Danach wurde sofort 2 Mal mit PBS gewaschen. Im Folgenden wurde die

Reaktionslösung zugegeben (90 % TMR-markiertes Desoxyuridin-Lösung und 10 % Enzymlösung) und die Kulturen 1 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Kulturen wurden erneut 3 Mal in PBS gewaschen, dann kurz in Wasser getaucht und schließlich mit Hilfe des Einbettmediums Fluoromount-G auf Objektträger aufgebracht.

3.5 Mikroskopie

3.5.1 Epifluoreszenzmikroskopie und Quantifizierung der a-Caspase-3 positiven Zellen

Die Quantifizierung der Zellen in organotypischen und dissoziierten neokortikalen Kulturen, die immunzytochemisch positiv für die aktivierte Form der Caspase-3 (a-Caspase-3) waren, erfolgte an einem aufrechten Mikroskop (Olympus BX51 WI) mit einer Quecksilberlampe. Grüne und Rote Fluoreszenz werden durch eine Quecksilberlampe bei 488 nm (Anregungsfilter: HQ 470/40) und 568 nm (Anregungsfilter: 565/30) angeregt. Die immunzytochemisch gefärbten Präparate wurden in 60-facher Vergrößerung (60-fach/0,9 N.A. Wasserimmersionsobjektiv, Olympus) betrachtet. Dies korrespondierte mit einem Gesichtsfeld von 125 μm^2 . In organotypischen Schnittkulturen wurden 18 dieser Felder hinsichtlich a-Caspase-3 positiver Zellen untersucht und ausgezählt (Abb. 7). Die Lage der Felder war dabei so gewählt, dass in allen untersuchten Schnittkulturen die gleichen 18 Felder, die alle Schichten des Neokortex mit einschlossen, ausgezählt wurden. Mit Hilfe des Mikromanipulators SM-5 wurde für jedes Feld der Fokus so manipuliert, dass alle gefärbten Zellen eines Feldes für die gesamte Tiefe der Schnittkultur gezählt werden konnten.

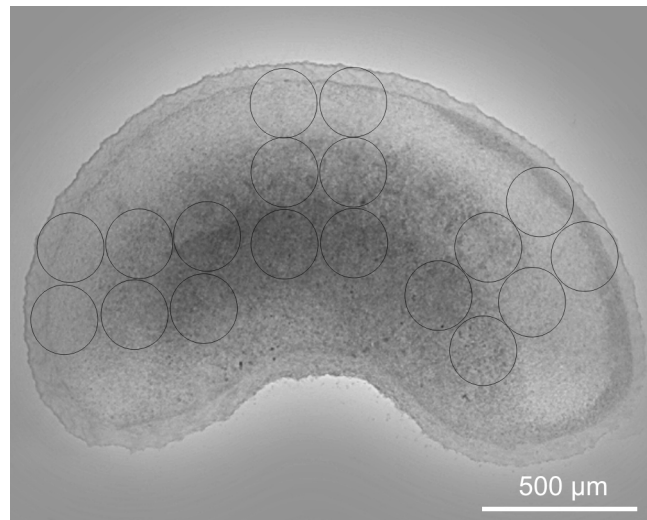


Abb. 7. Quantitative Analyse α -Caspase-3 positiver Zellen in organotypischen Schnittkulturen: Gezeigt ist die Durchlichtaufnahme einer 5 div alten organotypischen Schnittkultur. Die 18 Kreise markieren die Gesichtsfelder, in denen bei 60-facher Vergrößerung mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie die Anzahl der aktiven-Caspase-3 positiven Zellen bestimmt werden.

Zellen in dissoziierten neokortikalen Kulturen, die mit dem pCaspase3-sensor Vektor transfiziert waren, wurden auf dem gesamten Deckgläschen ausgezählt. Dabei wurde die Unterscheidung zwischen α -Caspase-3 positiven und negativen Zellen anhand der Lokalisation des Caspase3-sensors getroffen. Im Vergleich dazu wurden dissoziierte Kulturen, die immunzytochemisch mit Asp175 gefärbt wurden, in Gesichtsfeldern bei 60-facher Vergrößerung ausgezählt und der Prozentsatz der α -Caspase-3 positiven, apoptotischen Zellen ergab sich relativ zur Gesamtzahl der untersuchten Zellen, die im Durchlichtbild desselben Feldes ausgezählt wurden.

3.5.2 Statistische Auswertung der pharmakologischen Manipulation organotypischer kortikaler Schnittkulturen

Da keine offensichtlichen Unterschiede hinsichtlich der Zahl apoptotischer Zellen zwischen den untersuchten Feldern einer organotypischen Schnittkultur ersichtlich waren, wurden alle Daten einer Schnittkultur zusammengefasst und der statistischen Analyse mit dem SPSS Programm unterzogen. Student t-test und ANOVA mit nachfolgendem Newman-Keuls *post hoc* Test wurden für Datensätze, die einer Normalverteilung entsprachen, angewendet. Ansonsten wurde der Mann-Whitney bzw. Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn *post hoc* Test für die statistische Auswertung genutzt. Die Darstellung der Daten erfolgte jeweils als arithmetisches Mittel der untersuchten Felder \pm

SEM. In den meisten Histogrammen wurde die Kontrolle = 100 % gesetzt und alle weiteren Konditionen als Prozentsatz derselben angegeben.

3.5.3 Konfokalmikroskopie und Echtzeitanalyse des Caspase-3 abhängigen Zelltodes

Aufnahmen von immunzytochemisch gefärbten organotypischen und dissoziierten neokortikalen Kulturen wurden mit Hilfe eines Nipkow *Spinning Disk* konfokalen Systems (QLC100, Visitech) an einem aufrechten Mikroskop (Olympus BX51 WI) mittels einer digitalen CCD Kamera (*CoolSnap* HQ) erhalten. Ein elektronischer *Shutter* (UniBlitz, Electronics) wurde über das Bilderfassungsprogramm *Metamorph* gesteuert. Rote und grüne Fluoreszenz wurden durch einen Krypton/Argon Laser bei einer Wellenlänge von 568 nm (Emissionsfilter HQ620/60) bzw. 488 nm (Emissionsfilter HQ525/50) angeregt. Wasserimmersionsobjektive (20- und 60-fach, Olympus) sowie ein 4-fach Luftobjektiv (Olympus) wurden für die Aufnahmen genutzt.

Dissoziierte Kulturen, die mit dem pCaspase3-sensor Vektor transfiziert worden waren, wurden in Echtzeit über einen Zeitraum von bis zu 12 Stunden mit Hilfe des konfokalen Systems analysiert. Dazu wurden die Deckgläschen in einer Analysenkammer (Luigs und Neumann) immobilisiert und durch ein Perfusionssystem mit ACSF umspült (Durchflussrate: 1,5 mL/min). Die Ionenzusammensetzung des ACSF war der des NB/B27 nachempfunden (Brewer et al., 1993). Die Temperatur der Kammer wurde mittels eines Temperaturreglers (Luigs und Neumann) bei 37 °C gehalten. Die Positionen transfizierter Neurone wurden mittels eines computergesteuerten Mikromanipulators (SM-5) und des Programms *cell locator* gespeichert und wiederholt angesteuert. Mit Hilfe der CCD Kamera und des *Metamorph* Programms wurden Stapel- (*stacks*) und Einzelbilder der Neurone zu verschiedenen Zeiten des Experiments aufgenommen. Die Zeitintervalle zwischen 2 Aufnahmen variierten dabei je nach Fragestellung zwischen 15 Minuten bei der Charakterisierung der Translokation des tCaspase3-sensors und einer Stunde bei 12 Stundenanalysen der Kulturen. Nach Abschluss des Experiments wurden die Deckgläschen in 4 % PFA fixiert.

3.5.4 Quantifizierung der Translokation des tCaspase3-sensors

Stapelbilder wurden zunächst mit Hilfe der *stack arithmetics* Funktion des Metamorph Programms durch eine Linearaddition der Fluoreszenzintensitäten auf ein Einzelbild reduziert. Um die Translokation des tCaspase3-sensors zu analysieren, wurden für jeden Zeitpunkt die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten des Nukleus und des gesamten Somas ermittelt. Von beiden Werten wurde die Hintergrundfluoreszenz abgezogen. Der

gebildete Quotient: $R_t = \frac{\bar{I}_{Nukleus}}{\bar{I}_{Soma}}$ wurde normiert, da R_t für verschiedene Neurone sehr

stark variierte. Dazu wurde R_t durch das arithmetische Mittel der Quotienten unter Kontrollbedingungen, R_0 beim Zeitpunkt $t = -100$ bis 0 min, dividiert. Daraus ergab sich

die Gleichung $\frac{R_t}{R_0} = \frac{\bar{I}_{Nukleus}(t)/\bar{I}_{Soma}(t)}{\bar{I}_{Nukleus}(0)/\bar{I}_{Soma}(0)}$ für alle in den Graphen angegebenen Punkte. Aus

diesen ließ sich der Startpunkt der Translokation (T) mit Hilfe der Gleichung

$\frac{R_T}{R_0} = \bar{R}_0 + 4 \cdot SD$ bestimmen; d.h. der Zeitpunkt, an welchem der normierte Quotient

dem arithmetischen Mittel aller Kontrollquotienten + 4 Mal der Standardabweichung entsprach, wurde als T angesehen. Weiterhin konnte aus den Graphen ein Plateauwert für den Quotienten ermittelt werden. Dabei wurde die Dauer der Translokation (D_T) als die Differenz der Zeiten bei 90 und 10 % des Plateauwertes definiert. Aus diesem Wert ergab sich nachfolgend die Translokationsgeschwindigkeit (v_T) als Quotient aus der Differenz der Ratio bei 90 und 10 % und der Translokationsdauer

$$D_T = t_{90} - t_{10} \text{ und } v_T = \frac{(R_t/R_0)_{90} - (R_t/R_0)_{10}}{D_T}.$$

Durch nicht-lineare Regressionsanalyse mit Hilfe des SPSS Programms ergab sich, dass der Zeitverlauf der Translokation des tCaspase3-sensors durch eine Boltzmannverteilung,

der allgemeinen Gleichung: $\frac{R_t}{R_0} = a + \frac{(b-a)}{1 + e^{\frac{c-t}{d}}}$ beschrieben wurde, wobei a der

normalisierte Startwert, b der Plateauwert, c eine spezifische Konstante für das jeweils untersuchte Neuron und d die Anstiegssteilheit der Kurve war. Für alle analysierten Neurone wurden auch nach Anpassung der Daten an diese Gleichung Startzeit, Translokationsdauer und Translokationsgeschwindigkeit berechnet. Bei allen weiteren Histogrammen zur Untersuchung der dissoziierten kortikalen Kulturen wurden Student t-Test bzw. ANOVA mit nachfolgendem Newman-Keuls *post hoc* Test oder Kruskal-Wallis

Test mit anschließendem Dunn *post hoc* Test für die statistische Analyse der Daten verwendet. Alle Histogramme wurden als arithmetisches Mittel \pm SEM dargestellt.

3.6 Elektrophysiologie: Feldpotentialmessungen mit dem MEA-Chip

Mit Hilfe des MEA-Chips wurden die Aktivitätsmuster von dissoziierten neokortikalen Kulturen an verschiedenen Kulturtagen durch Feldpotentialmessungen analysiert. Die Kulturen wuchsen auf MEA-Chips mit einer Grundfläche von 254 mm², 60 extrazellulären Titaniumnitrit-Elektroden mit einem Abstand von 200 μ m zur nächsten Elektrode, einem Elektrodendurchmesser von 30 μ m und einer integrierten Referenzelektrode. Die Analyse erfolgte mittels eines MEA 1060-INV-BC Systems, das auf ein inverses Mikroskop (Optika *microscopes*) montiert war. Zur Datenerhebung diente das MEA_Rack Programm. Die spontanen Änderungen der Feldpotentiale in dissoziierten kortikalen Kulturen (4 div-15 div) wurden jeden Tag jeweils 15 min lang mit einer Abtastrate von 25 kHz gemessen. Nur Signale, die den Schwellenwert, gesetzt bei der 6-fachen Standardabweichung von der Grundlinie, überschritten, wurden als *spike* registriert. Die weitere Auswertung der *spikes* erfolgte durch das *Matlab* Version 6.5 Programm.

3.7 Bild- und Textverarbeitung

Die mit dem Metamorph Programm aufgenommenen Bilder wurden mittels des Bildbearbeitungsprogramm Photoshop 7.0 bearbeitet und mit Hilfe von CorelDraw beschriftet. Zur Textverarbeitung und Tabellenkalkulation wurde MS Office 2003 verwendet. Die Referenzverwaltung erfolgte mit Referenz Manager.

4. Ergebnisse

4.1 Caspase-3 abhängige Apoptose in neokortikalen organotypischen Schnittkulturen

Um die Rolle elektrischer Aktivität und die Bedeutung verschiedener ligandengesteuerter und spannungsabhängiger Ionenkanäle für die Apoptose während der frühen Entwicklung des Neokortex zu untersuchen, wurden organotypische Schnittkulturen des somatosensorischen Kortex der neugeborenen Maus angefertigt (Abb. 8). Biozotin gefüllte Pyramidenzellen in den organotypischen Schnittkulturen zeigten die typische Morphologie dieses Neuronentyps mit ausgeprägten dendritischen Verzweigungen und Axonen, die sich über mehrere kortikale Schichten bis zu 850 μm Länge erstreckten (Abb. 8A, Detailansicht).

Um Caspase-3-abhängige Apoptose zu untersuchen, wurden die organotypischen Kulturen im Anschluss an die pharmakologische Manipulation fixiert und mit Hilfe eines Antikörpers gegen α -Caspase-3 gefärbt (Abb. 8B). Da die Aktivierung der Caspase-3 ein frühes Ereignis während des Apoptoseprozesses darstellt (Marin-Teva et al., 2004), zeigten viele immunzytochemisch gefärbte Neurone eine normal erscheinende Morphologie (Abb. 8B, Detailansicht). In einem vorangegangenen Experiment an akuten Schnitten des frühen postnatalen Kortex konnte beobachtet werden, dass Neurone in einem fortgeschrittenen Stadium der Apoptose eine Kolokalisation der TUNEL- und immunzytochemischen α -Caspase-3 Färbung sowie eine Fragmentierung des Nukleus zeigten (Abb. 8E). Mit Hilfe einer Doppelfärbung gegen α -Caspase-3 und den Astrozytenmarker GFAP konnte ausgeschlossen werden, dass bei der Quantifizierung der apoptotischen Neurone unter apoptoseinduzierenden Bedingungen eine Verfälschung der Ergebnisse durch apoptotische gliale Zellen eintrat (Abb. 8F-I).

Zunächst wurde die Zahl der Neuronen mit α -Caspase-3 zu verschiedenen Zeitpunkten der normalen *in vitro* Entwicklung bestimmt. Während der ersten 2 Tage nach der Präparation der Schnittkulturen zeigten diese eine sehr hohe α -Caspase-3 Immunreaktivität in allen Schichten der Kultur. Diese verringerte sich nach 4 div und blieb nachfolgend konstant. Alle nachfolgenden Experimente wurden an 4 bis 6 div ausgeführt, einer Zeit, in der die Zahl α -Caspase-3 positiver Zellen auf ein basales Niveau abgefallen war (Abb. 8C). Weiterhin ist von kortikalen Schnittkulturen dieses Alters bekannt, dass sie spontane

Aktivität zeigen, welche der Situation im frühen postnatalen Nagerneokortex *in vivo* ähnelt (Khazipov und Luhmann, 2006).

Organotypische Schnittkulturen wurden 6, 12 und 24 Stunden in der Abwesenheit von B27 in Neurobasalmedium (NB) kultiviert, fixiert und im Anschluss immunzytochemisch hinsichtlich der Anzahl Caspase-3 positiver Zellen untersucht. Durch dieses Experiment sollte die Abhängigkeit der Schnittkulturen von der externen Bereitstellung trophischer Faktoren überprüft werden. Die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen blieb unter B27-Entzug über die beobachteten 24 Stunden weitgehend konstant und war nicht signifikant verschieden von der in NB/B27 kultivierten Kontrolle (Abb. 8D). Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Applikation von TTX in der Gegenwart von B27 keinen Effekt auf das Überleben kortikaler Neurone in organotypischen Kulturen hatte. Dies deutet darauf hin, dass B27 für den Verlust der überlebensfördernden Wirkung spontaner Aktivität kompensieren kann. Folglich wurden alle pharmakologischen Manipulationen in NB-Medium ohne B27 durchgeführt.

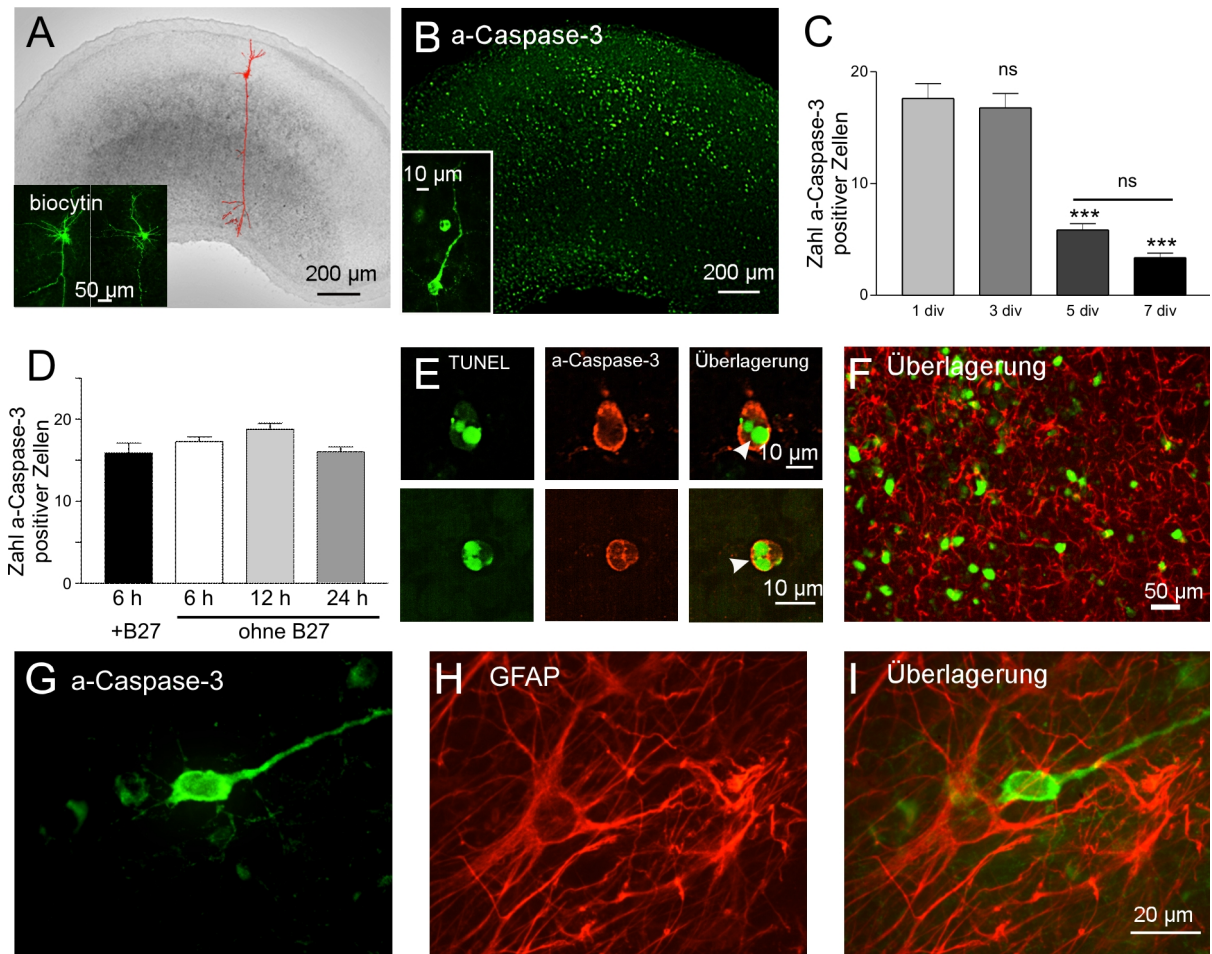


Abb. 8. Kortikale Organisation und zelluläre Morphologie in organotypischen neokortikalen Schnittkulturen und Abhängigkeit von externen trophischen Faktoren: **A** Gezeigt ist das Übersichtsbild einer 5 div alten Kultur und der globalen Morphologie. Eingefügt ist das Bild einer Biozytin gefüllten Pyramidenzelle mit verzweigtem Axon, das sich über alle Schichten der Schnittkultur erstreckt. Weitere Beispiele Biozytin gefüllter Neurone sind in der Detailansicht in stärkerer Vergrößerung zu sehen. **B** In allen Schichten der Schnittkultur findet man apoptotische Zellen, die durch die a-Caspase-3 Antikörperfärbung sichtbar gemacht werden können. In stärkerer Vergrößerung (Detailansicht) erkennt man die erhaltene neuronale Morphologie einiger Zellen. **C** Gezeigt ist die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen pro Gesichtsfeld in organotypischen Kulturen an ausgewählten div. Deutlich ist eine signifikante Abnahme a-Caspase-3 positiver Zellen nach 5 div zu erkennen (Kruskal-Wallis Test $p < 0,0001$; Dunn *post hoc* Test $p \geq 0,05$ zwischen den div wie angegeben; ns $p > 0,05$; *** $p < 0,001$ $n \geq 3$ für alle Zeiten). **D** Der Entzug von B27 für eine Dauer von bis zu 24 Stunden erhöht nicht die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen zwischen den einzelnen Inkubationszeiten (Kruskal-Wallis Test $p > 0,05$; Dunn *post hoc* Test $p \geq 0,05$ zwischen den Zeitpunkten; $n \geq 5$ für alle Zeiten) und im Vergleich zur Kontrolle (Mann-Whitney Test $p > 0,05$; $n \geq 5$ für alle Zeiten). **E** In einer späten Phase der Apoptose zeigen Zellen in Schnitten des postnatalen Kortex Caspase-3 Aktivität und DNS-Fragmentierung, die durch die TUNEL-Färbung nachgewiesen werden kann. Auch eine Fragmentierung des Zellkerns ist zu erkennen (Pfeilspitzen). **F-I** Unter apoptoseauslösenden Bedingungen (CPP/CNQX für **F**; TTX für **G-I**) sind a-Caspase-3 immunreaktive Zellen mit neuronaler Morphologie zu erkennen (**G**). Man findet jedoch keine Kolokalisation mit dem Astrozytenmarker GFAP (**F, I**).

4.1.1 Die aktivitätsabhängige Kontrolle der neuronalen Apoptose

Die Blockade spontaner Netzwerkaktivität durch Inhibition von VDSCs führt in verschiedenen Neuronenpopulationen zu Apoptose (Thompson und Holt, 1989; Planells-Cases et al., 2000; Fishbein und Segal, 2006). Durch pharmakologische Manipulation wurde die Netzwerkaktivität der organotypischen Schnittkulturen verändert. Damit sollte untersucht werden, in wie weit das Überleben kortikaler Neurone in Kultur abhängig von der elektrischen Aktivität ist.

Organotypische Schnittkulturen wurden an 4-6 div mit TTX, einem Inhibitor von VDSCs, behandelt und nach 6, 12 und 24 Stunden fixiert und immunzytochemisch hinsichtlich der Aktivierung von Caspase-3 untersucht (Abb. 9A, B). Zu allen untersuchten Zeiten war die Anzahl a-Caspase-3 positiver Zellen signifikant höher als die der Kontrollen, die ohne Antagonisten kultiviert wurden (Abb. 9C). Im Durchschnitt betrug die Zahl der a-Caspase-3 positiven Neurone $246,7 \pm 8,9$ (6 h), $228,6 \pm 11,2$ (12 h) und $261,6 \pm 9,8$ (24 h) % der Kontrollwerte. Durch Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen GFAP konnte ausgeschlossen werden, dass gliale Zellen mit in die Quantifizierung der Apoptose eingingen. Es konnte keine Kolokalisation von immunzytochemisch hinsichtlich a-Caspase-3 und GFAP gefärbten Zellen festgestellt werden (Abb. 8F-I).

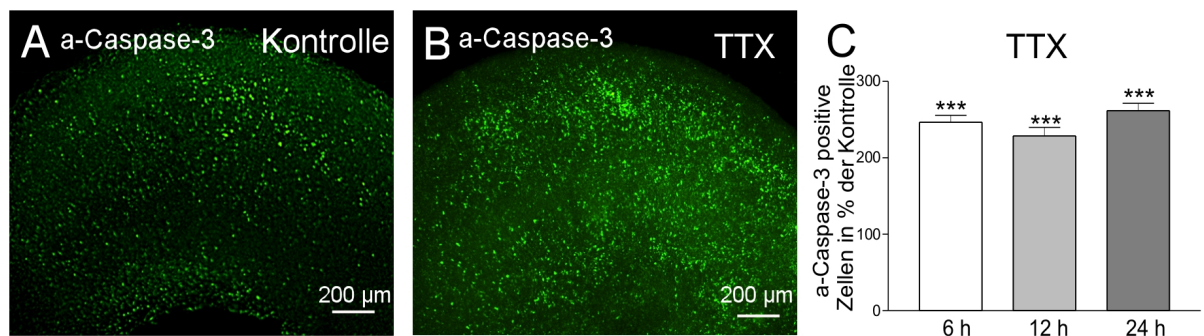


Abb. 9. Einfluss der Netzwerkaktivität auf das neuronale Überleben: A, B Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen von Schnittkulturen, die unter Kontrollbedingungen oder in der Gegenwart von 1 μM TTX kultiviert wurden. Deutlich zu sehen ist die homogene Verteilung a-Caspase-3 positiven Zellen in allen Schichten der Kultur und die deutliche Zunahme der a-Caspase-3 Immunreaktivität unter Bedingungen der Suppression spontaner Netzwerkaktivität. C Das abgebildete Histogramm zeigt den Prozentsatz apoptotischer Neurone im Vergleich zur Kontrolle. Nach 6, 12 und 24 Stunden in der Gegenwart von TTX ergibt sich eine signifikante Erhöhung der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen (Mann Whitney Test $p < 0,0001$; $n = 12$ Schnittkulturen für alle Zeiten).

Somit hatte die Inhibition von VDSCs durch TTX und die damit verbundene Suppression spontaner Netzwerkaktivität in organotypischen Schnittkulturen einen signifikanten negativen Effekt auf das Überleben kortikaler Neurone.

4.1.2 Die Bedeutung ionotroper Glutamatrezeptoren für das Überleben kortikaler Neurone

Die Inhibition ionotroper Glutamatrezeptoren in organotypischen kortikalen Schnittkulturen hat eine Suppression der spontanen Netzwerkaktivität zur Folge (Heck et al., 2007). Um den Einfluss ionotroper Glutamatrezeptoren auf das Überleben kortikaler Neurone zu untersuchen, wurden 4 bis 6 div alte Schnittkulturen des somatosensorischen Kortex der neugeborenen Maus mit Antagonisten von AMPA/Kainat- und NMDA-Rs inkubiert. Nach 6, 12 und 24 Stunden wurden die so behandelten Schnittkulturen fixiert und immunzytochemisch auf die Aktivierung der Caspase-3 untersucht.

Sowohl der AMPA/Kainat-R Antagonist CNQX als auch der spezifische AMPA-R Inhibitor GYKI 52466 führten zu einem signifikanten Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle (Abb. 10A, B). Dies konnte für alle drei untersuchten Zeiträume (6, 12 und 24 h) nachgewiesen werden. Durch immunzytochemische Doppelfärbungen mit dem Astrozytenmarker GFAP konnte gezeigt werden, dass die a-Caspase-3 positiven Zellen keine Astrozyten waren (Abb. 8I). Auch der NMDA-R Antagonist CPP löste an allen untersuchten Zeitpunkten einen signifikanten Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen in den Schnittkulturen aus (Abb. 10C-F). Durch Aufnahmen bei stärkerer Vergrößerung konnte gezeigt werden, dass a-Caspase-3 positive Zellen unter diesen Bedingungen neuronale Morphologie aufwiesen und dass a-Caspase-3 vornehmlich im Soma der Neurone zu finden war (Abb. 10E). Zudem zeigten einige der a-Caspase-3 positiven Zellen eine gut erhaltene neuronale Morphologie (Abb. 10E, Pfeil), während andere durch typische Anzeichen fortgeschrittener Apoptose charakterisiert waren.

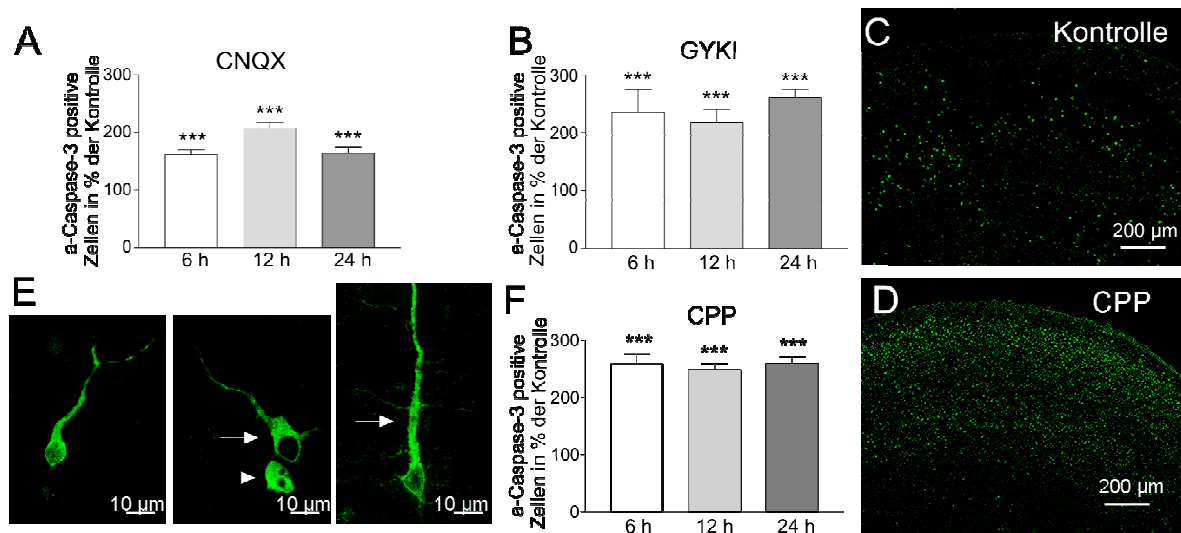


Abb. 10. Einfluss von ionotropen Glutamatrezeptoren auf das neuronale Überleben: **A** Die Inhibition von AMPA/Kainat-Rs für 6, 12 und 24 Stunden durch 10 μ M CNQX führt für alle untersuchten Zeiträume zu einem signifikanten Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen in den kortikalen Schnittkulturen (Mann-Whitney Test $p < 0.0001$; $n = 9$ Schnittkulturen für alle Zeiten). **B** Derselbe Effekt wurde bei der Applikation von 80 μ M GYKI 52466, einem spezifischen AMPA-R Antagonisten, beobachtet (Mann-Whitney Test $p < 0.001$; $n = 6$ Schnittkulturen für alle Zeiten). **C-E** Im Vergleich zu den Kontrollschnitten (**C**) zeigen organotypische kortikale Kulturen, die in Gegenwart des NMDA-R Antagonisten CPP (20 μ M) kultiviert wurden (**D**), einen starken Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen. Diese sind homogen über alle Schichten der Schnittkultur verteilt. Bei stärkerer Vergrößerung (**E**) ist deutlich die neuronale Morphologie der a-Caspase-3 positiven Zellen zu erkennen. Einige der Neurone zeigen eine gut erhaltene Morphologie (Pfeile) während andere typische morphologische Veränderungen der Apoptose, wie verkleinerte Somata und die Degeneration von Dendriten, erkennen lassen (Pfeilspitze). **F** Die Quantifizierung a-Caspase-3 positiver Zellen zeigt für alle untersuchten Zeiten eine signifikante Erhöhung der Zahl a-Caspase-3 positiver Neurone in den Schnittkulturen, die mit CPP behandelt wurden (Mann-Whitney Test $p < 0.0001$; $n = 9$ Schnittkulturen für alle Zeiten).

Im Weiteren sollte der Einfluss unterschiedlicher NMDA-R Untereinheiten auf das Überleben von kortikalen Neuronen untersucht werden. Dazu wurden spezifisch die NR2A-Untereinheit mit 400 nM NVP-AMM077 (Berberich et al., 2005) bzw. die NR2B-Untereinheit mit 3 μ M Ifenprodil (Williams, 1993) inhibiert. NVP-AMM077 Applikation für 6, 12 und 24 Stunden induzierte einen signifikanten Anstieg in der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen verglichen mit der Kontrolle (Abb. 11A). Der Prozentsatz a-Caspase-3 positiver Zellen in den NVP-AMM077 behandelten Kulturen war im Vergleich zu den Kontrollen nach 6-stündiger Inkubation mit dem Antagonisten am stärksten erhöht ($219,1 \pm 6,5$ %) und nahm nach 12 h ($171,8 \pm 6,3$ %) und 24 h ($144,5 \pm 6,3$ %) signifikant ab. Die Behandlung der organotypischen Schnittkulturen mit Ifenprodil ergab nach 6-stündiger Inkubation keinen signifikanten Unterschied in der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen

verglichen mit den Kontrollen. Erst bei Einwirkzeiten von 12 und 24 Stunden war die Anzahl der a-Caspase-3 positiven Zellen signifikant erhöht (Abb. 11B).

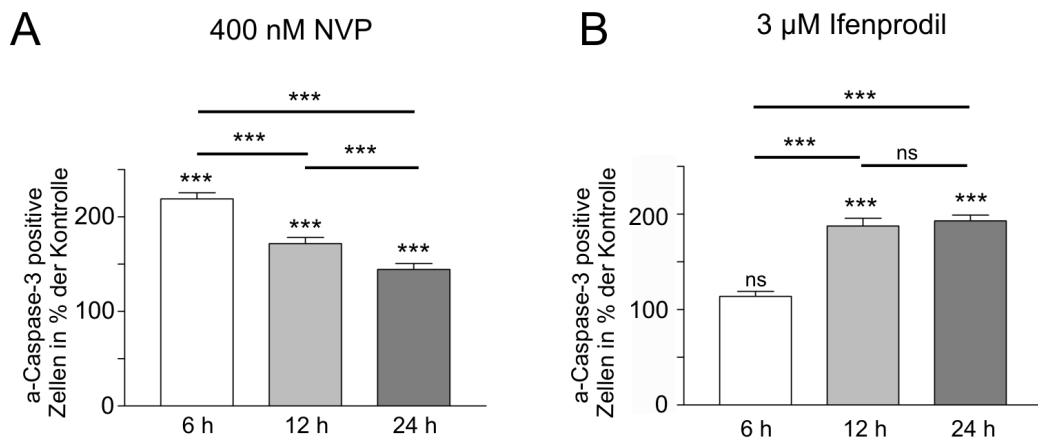


Abb. 11. Bedeutung der Untereinheitenzusammensetzung von NMDA-R für die aktivitätsabhängige Apoptose: **A** Organotypische Schnittkulturen wurden mit 400 nM des NR2A-Antagonisten NVP-AMM077 inkubiert und immunzytochemisch hinsichtlich der Aktivierung von Caspase-3 untersucht. Deutlich ist ein zeitabhängiger Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen zu sehen. Dieser war zu allen Zeitpunkten signifikant höher als in den Kontrollen (Mann-Whitney Test $p < 0.001$; $n = 12$ Schnittkulturen für alle Zeiten). Mit zunehmender Inkubationszeit nahm die Anzahl a-Caspase-3 positiver Zellen signifikant ab (Kruskal-Wallis Test $p < 0.0001$; Dunn *post hoc* Test $p < 0.001$ zwischen den Zeitpunkten; $n = 12$ Schnittkulturen für alle Zeiten). **B** Inkubation der organotypischen Schnittkulturen mit dem NR2B-Antagonisten Ifenprodil (3 μ M) führt nach 12 und 24 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen gegenüber den Kontrollen (Mann-Whitney Test $p < 0.001$; $n \geq 9$ Schnittkulturen für alle Zeiten). Bei kurzer Inkubationszeit (6 h) ist die Zahl a-Caspase-3 positiver Neurone signifikant niedriger als bei 12 und 24 Stunden (Kruskal-Wallis test, $p < 0.0001$; Dunn *post hoc* Test $p < 0.001$ zwischen 6 und 12 bzw. 6 und 24 h).

Zusammenfassend konnte anhand der Untersuchungen gezeigt werden, dass iGluRs einen Einfluss auf das Überleben unreifer kortikaler Neurone ausüben und dass dabei verschiedene Untereinheiten der NMDA-Rs eine Rolle spielen. Während schon nach kurzzeitiger Blockade von NR2A-Untereinheiten die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen in den Schnittkulturen signifikant erhöht war, bedurfte es einer langfristigen Blockade von NR2B-Untereinheiten, um eine Aktivierung von Caspase-3 zu induzieren.

4.1.3 Die Aktivierung von L-Typ Kalziumionenkanälen als sekundärer Weg der Überlebenssicherung

Zusammengenommen zeigten die bisherigen Ergebnisse, dass der Kalziueinfluss durch iGluRs und insbesondere durch NMDA-Rs ein wichtiger Regulator des aktivitätsabhängigen Überlebens in neokortikalen Schnittkulturen ist. Zur weiteren Untersuchung der aktivitätsabhängigen Kontrolle der Apoptose wurden kortikale Schnittkulturen der neugeborenen Maus an 4-6 div durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_{ex}$) auf 25 mM depolarisiert. Nur wenige a-Caspase-3 positive Zellen konnten unter diesen Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 12A, B). Die Quantifizierung der a-Caspase-3 positiven Zellen zeigte, dass unter dem depolarisierenden Einfluss einer erhöhten $[K^+]_{ex}$, die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant verringert war (Abb. 12C).

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob die Depolarisation durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auch das neuronale Überleben unter der Blockade von NMDA-Rs positiv beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden kortikale Schnittkulturen mit CPP und 25 mM $[K^+]_{ex}$ inkubiert, nach 6 Stunden fixiert und die Aktivierung von Caspase-3 immunzytochemisch nachgewiesen. CPP induzierte einen signifikanten Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen. In Kulturen, die CPP und einer hohen $[K^+]_{ex}$ ausgesetzt waren, war die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen auf das Kontrollniveau reduziert. Um zu testen, ob dieser durch hoch $[K^+]_{ex}$ vermittelte überlebensfördernde Effekt in der organotypischen Kultur auf die Aktivität von L-VDCCs zurückzuführen war, wurde der spezifische L-VDCC Antagonist Ifenprodil (10 μ M) zusammen mit CPP und hoch $[K^+]_{ex}$ appliziert. Unter diesen Bedingungen wurde ein deutlicher Anstieg der Anzahl a-Caspase-3 positiver Zellen beobachtet. Demgegenüber hatte die Applikation von Nifedipin in Abwesenheit von CPP und hoch $[K^+]_{ex}$ keinen Effekt auf die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen (Abb. 12D). Daraus folgt, dass die überlebensfördernde Auswirkung der Depolarisation der Neuronenmembran bei unterdrückter NMDA-R Aktivierung durch L-VDCCs vermittelt wird.

Als nächstes wurde geklärt, inwieweit die Freisetzung von trophischen Faktoren, die für die Differenzierung und das neuronale Überleben im ZNS von Bedeutung sind (BDNF, NT-3 und NT-4/5) (Minichiello und Klein, 1996; Lessmann et al., 2003), auch das Überleben von neokortikalen Neuronen unter NMDA-R Blockade und hoch $[K^+]_{ex}$ beeinflussen. Dazu wurden die kortikalen Schnittkulturen mit 200 nM k252a, einem Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität der TrkB- und TrkC-Rezeptoren, inkubiert und für 6 h

in CPP und hoch $[K^+]_{ex}$ enthaltendem Medium kultiviert. Es konnte erneut beobachtet werden, dass die Erhöhung von $[K^+]_{ex}$ die Zahl a-Caspase-3 positiver Neurone während der Inhibierung der NMDA-R Aktivierung signifikant senkte. Durch die Inkubation mit k252a konnte dieser Effekt verhindert werden (Abb. 12E). Die Signalwirkung von BDNF, NT-3 und NT-4/5 ist also maßgeblich an der überlebensfördernden Wirkung der durch erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration ausgelösten Depolarisation beteiligt.

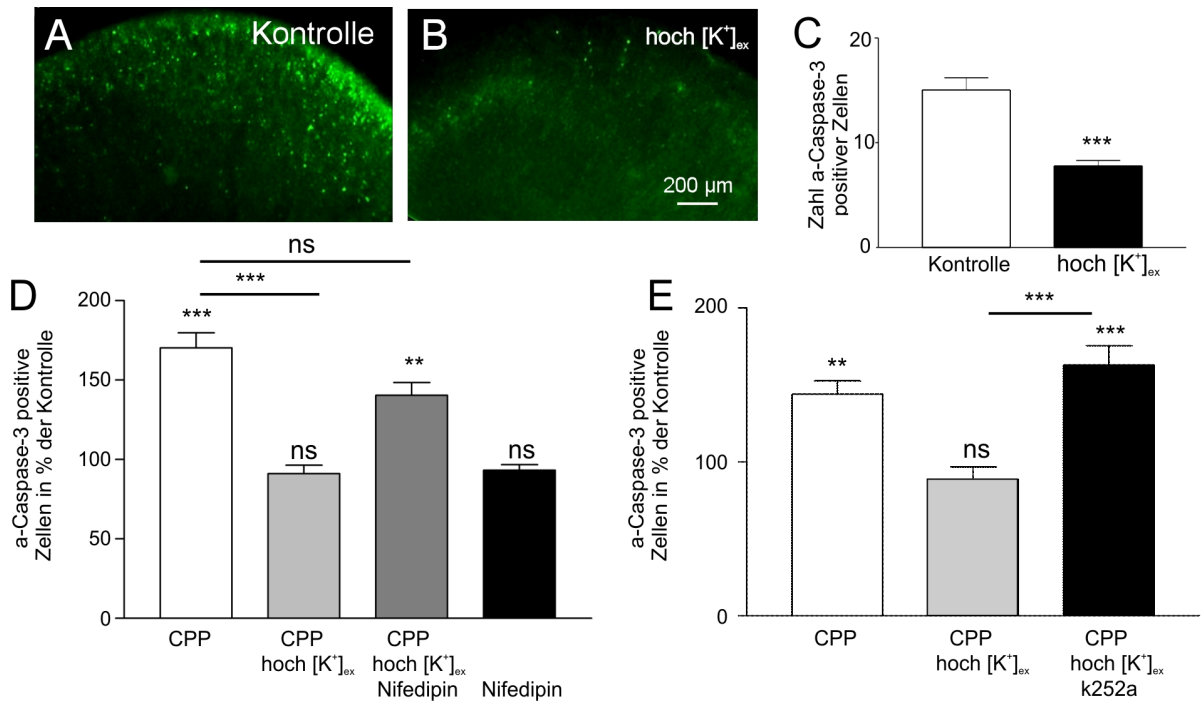


Abb. 12. Bedeutung von L-VDCC für das Neurotrophin abhängige neuronale Überleben während der Blockade von NMDA-R: **A, B** Schnittkulturen des somatosensorischen Kortex der neugeborenen Maus wurden unter Kontrollbedingungen (**A**) und in Gegenwart von 25 mM $[K^+]_{ex}$ (**B**) kultiviert und immunzytochemisch auf die Aktivierung der Caspase-3 untersucht. Deutlich ist die reduzierte Anzahl a-Caspase-3 positiver Zellen in der kortikalen Kultur unter hoch $[K^+]_{ex}$ (**B**) zu erkennen. **C** Die Quantifizierung der a-Caspase-3 positiven Zellen in Kontroll- und hoch $[K^+]_{ex}$ -Kulturbedingungen zeigt die signifikante Abnahme der Anzahl a-Caspase-3 positiver Zellen unter dem Einfluss hoher $[K^+]_{ex}$ (Mann Whitney Test $p < 0,0001$; $n = 4$). **D** Die Auszählung a-Caspase-3 positiver Zellen nach 6-stündiger Behandlung mit 10 μ M CPP zeigt einen signifikanten Anstieg verglichen mit den Kontrollen. Eine gleichzeitige Inkubation der Schnittkulturen mit 25 mM $[K^+]_{ex}$ verhinderte den durch CPP induzierten Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen. Dieser Effekt war Nifedipin sensitiv (10 μ M), wogegen die Inkubation mit Nifedipin allein keine Auswirkungen auf das neuronale Überleben hatte (Kruskal-Wallis Test $p < 0,0001$; Dunn *post hoc* Test zwischen den Konditionen wie angegeben; $n = 4$ Schnittkulturen für alle Bedingungen). **E** Der überlebensfördernde Effekt von hoch $[K^+]_{ex}$ auf Neurone unter NMDA-R Blockade konnte durch den Tyrosinkinasehemmer k252a (200 nM), der TrkB- und TrkC-Rezeptoren inhibiert, verhindert werden. Die Zahl der a-Caspase-3 positiven Neuronen stieg unter Zugabe dieses Antagonisten signifikant an (ANOVA $p < 0,0001$; Newman-Keuls *post hoc* Test zwischen den Konditionen wie angegeben; $n \geq 3$ Schnittkulturen für alle Bedingungen; ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$; ns = $p > 0.05$).

4.1.4 Die Bedeutung von GABA_A Rezeptoren und *Gap Junctions* für das aktivitätsabhängige neuronale Überleben

Die Bedeutung GABAerger Signalleitung für die Generierung spontaner Netzwerkaktivität im unreifen Kortex wurde mehrfach beschrieben (Ben Ari, 2001; Voigt et al., 2001; Opitz et al., 2002). Um zu untersuchen, ob GABA_A-Rs einen Einfluss auf das aktivitätsabhängige Überleben kortikaler Neurone haben, wurden organotypische Schnittkulturen 6, 12 und 24 Stunden mit GABAzin, einem GABA_A-R Antagonisten kultiviert und nach der Fixierung immunzytochemisch auf die Aktivierung von Caspase-3 hin untersucht. An allen betrachteten Zeitpunkten war die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen signifikant höher als in den Kontrollkulturen (Abb. 13A).

Da in einer frühen Entwicklungsphase die Synchronisierung spontaner neuronaler Netzwerkaktivität von GJ vermittelt wird (Kandler und Katz, 1998; Flint et al., 1999; Dupont et al., 2006), sollte in einem weiteren Experiment geklärt werden, wie sich die Blockade von neuronalen GJ mittels des Connexin 36 spezifischen Inhibitors Mefloquin auf das kortikale Überleben auswirkt. Die immunzytochemische Überprüfung der a-Caspase-3 positiven Zellen in Kulturen, deren GJs durch Mefloquin inhibiert waren, ergab eine signifikante Erhöhung der Anzahl a-Caspase-3 positiver Zellen nach 24 Stunden der Mefloquineinwirkung (Abb. 13B).

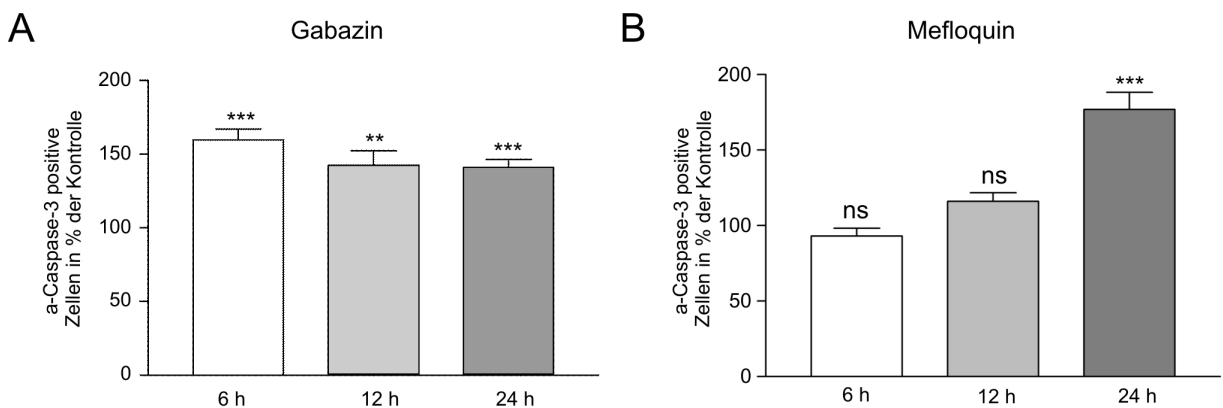


Abb. 13. Bedeutung von GABA_A-Rs und neuronalen GJs auf die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen in neokortikalen Kulturen: **A** Die Inhibition von GABA_A-R mit 100 μ M GABAzine führt zu einem signifikanten Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Neurone in organotypischen neokortikalen Schnittkulturen nach 6, 12 und 24 h (Mann-Whitney Test ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$; $n = 12$ Schnittkulturen für alle Zeiten). **B** Die Inkubation organotypischer Schnittkulturen des neonatalen Neokortex mit 25 μ M Mefloquin, einem Antagonisten neuronaler GJ führt nach 24 h zu einem signifikanten Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Neurone. Nach 6 und 12 h ist keine signifikante Erhöhung der Anzahl a-Caspase-3 positiver Zellen zu beobachten (Mann-Whitney Test ns = $p > 0.05$, *** = $p < 0.001$; $n \geq 12$ Schnittkulturen für alle Zeiten).

4.2 Echtzeitanalyse der Caspase-3 abhängigen Apoptose in neokortikalen Neuronen

Um Aussagen über kinetische Parameter des Apoptoseprozesses treffen zu können, wurde ein Assay entwickelt, mit welchem die Aktivierung der Caspase-3 in Neuronen mit Hilfe eines EYFP-enthaltenden Caspase3-Aktivitätssensors beobachtet werden konnte. In nicht-neuronalen Zelllinien konnte dieses durch ein Plasmid codierte Protein bereits erfolgreich als Nachweis für die Caspase-3 abhängige Apoptose angewandt werden (Vos et al., 2003; Almeida et al., 2005; Elam et al., 2005).

Sieben Tage alte dissoziierte Kulturen des neonatalen Mäusekortex wurden durch die Kalziumphosphatpräzipitation mit dem pCaspase3-sensor Vektor transfiziert. Nach einem weiteren Tag in Kultur wurden die transfizierten Neurone untersucht. EYFP-positive Zellen konnten bereits 9 Stunden nach der Transfektion beobachtet werden. Alle transfizierten Neurone zeigten eine ähnliche Lokalisation der Fluoreszenz im Soma und den proximalen Fortsätzen, so dass die somatodendritische Morphologie der Zellen gut zu beobachten war (Abb. 14). Der Nukleus zeigte keine oder eine nur schwache Fluoreszenz. Im Weiteren wurde die Lokalisation des Caspase3-sensors unter apoptosestimulierenden Bedingungen analysiert. Dazu wurden die transfizierten dissoziierten Kulturen in eine Analysenkammer überführt, immobilisiert und mit oxygeniertem ACSF umspült. Diese enthielt unter Kontrollbedingungen 0,1 % DMSO. Bis zu 7 h änderte sich unter diesen Bedingungen die Lokalisation des Caspase3-sensors nicht (Abb. 14A und 15A).

Um die Aktivierung der Caspase-3 in den transfizierten Neuronen zu forcieren und damit die Effizienz des Caspase3-sensors als Nachweis für die Apoptose zu testen, wurde dem ACSF Staurosporin in einer Konzentration von 100 nM zugesetzt. Staurosporin ist ein potenter Kinaseinhibitor und bekannter Auslöser der Caspase-3 abhängigen Apoptose (Koh et al., 1995; Krohn et al., 1998; Budd et al., 2000). Nach der Zugabe von Staurosporin wurden von ausgewählten Neuronen Bilder im Abstand von 15 min aufgenommen und die durch die Caspase-3 Aktivierung induzierte Translokation des EYFP-Signals in den Nukleus beobachtet (Abb. 14B, C). Diese wurde häufig eingeleitet durch die Bildung eines stark fluoreszierenden perinukleären Rings (Abb. 14C, Pfeilspitze), der eine plötzliche Erhöhung der Fluoreszenz im Nukleus folgte (Abb. 14B Pfeile). Im Folgenden intensivierte sich die Fluoreszenz des Nukleus, bis nach ca. 30 min die Translokation des tCaspase3-sensors fast vollständig erfolgt war und nur ein schwaches EYFP-Signal im Soma detektierbar war. Danach verblieb das Fluoreszenzsignal stabil im Nukleus.

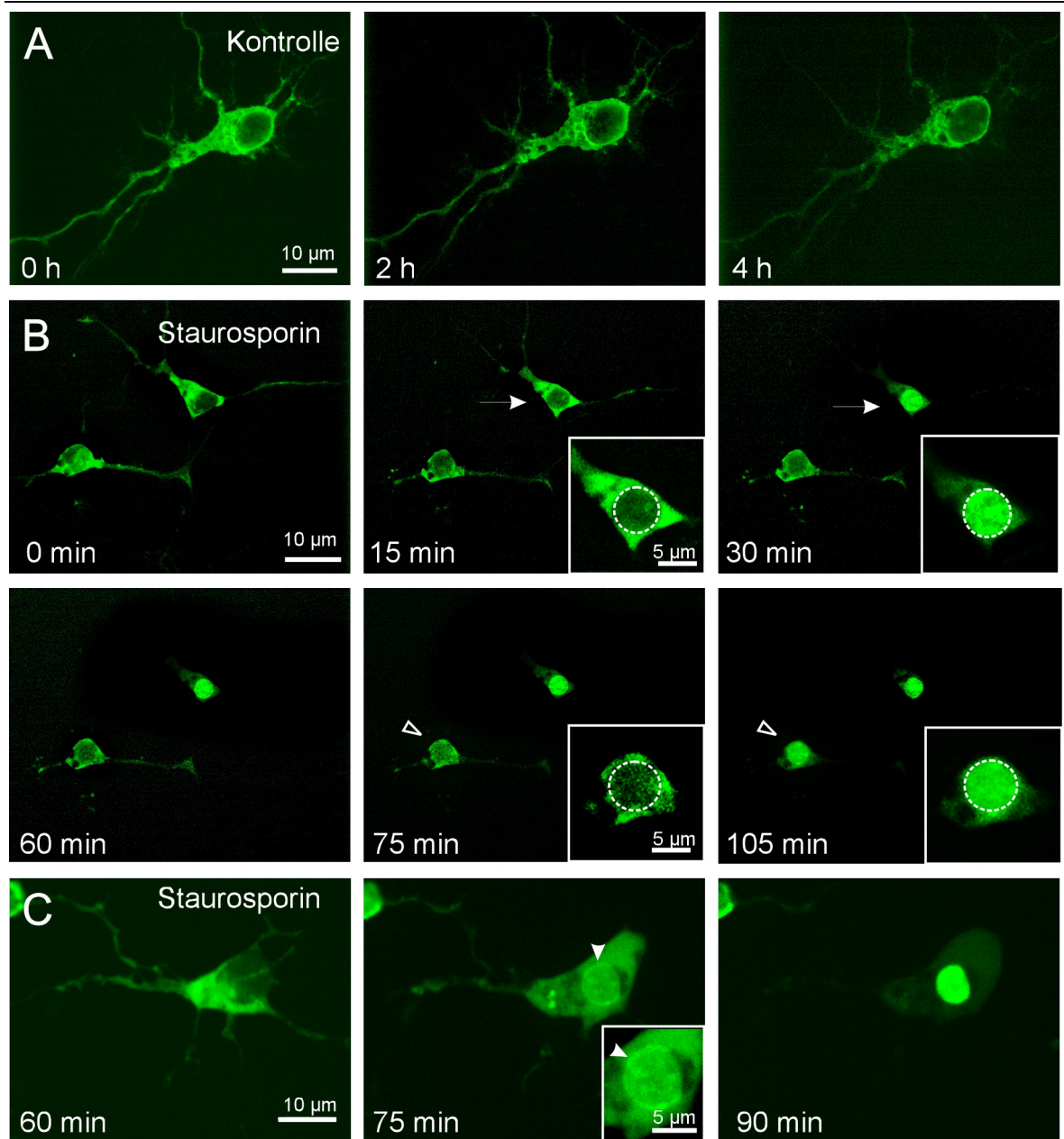


Abb. 14. Staurosporin induzierte Translokation des tCaspase3-sensors: **A** Unter Kontrollbedingungen verbleibt das EYFP-Signal im Soma und den proximalen Dendriten des Neurons. **B** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von individuellen Neuronen, die vor (0 min) und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Applikation von 100 nM Staurosporin, einem Breitband-Kinaseinhibitor, aufgenommen wurden. Bei einem der Neurone (Pfeil) kann die Translokation des tCaspase3-sensors in den Nucleus zwischen 15 und 30 min nach der Zugabe von Staurosporin beobachtet werden, während ein anderes Neuron (ungefüllte Pfeilspitze) die Translokation der Fluoreszenz zwischen 75 und 105 min nach der Applikation von Staurosporin zeigt. Die Detailansichten in **(B)** geben die Neurone in stärkerer Vergrößerung wieder. Der Nucleus ist durch einen unterbrochenen Kreis hervorgehoben. **C** Ein Neuron ist zu 3 Zeitpunkten nach der Zugabe von Staurosporin gezeigt. Während bei 60 min die EYFP-Fluoreszenz auf das Soma und die proximalen Dendriten beschränkt ist, wird 75 min nach der Staurosporinapplikation die Bildung eines stark fluoreszierenden perinukleären Ringes beobachtet (gefüllte Pfeilspitze und Detailansicht). Weitere 15 min später ist die Translokation des tCaspase3-sensors abgeschlossen.

Damit bietet die Untersuchung der Lokalisation des Caspase3-sensors eine einfach anzuwendende Methode, um den Zeitpunkt der Caspase-3 Aktivierung in kortikalen Neuronen zeitnah zu bestimmen.

4.2.1 Die Quantifizierung der Translokation des tCaspase3-sensors

Das Verhältnis der EYFP-Fluoreszenz des Nukleus und des gesamten Somas wurde für jeden Zeitpunkt und jedes untersuchte Neuron mit Hilfe des Metamorph Programms berechnet. Unter Kontrollbedingungen (ACSF mit 0,1 % DMSO) betrug der nicht normierte Quotient im Mittel $0,68 \pm 0,04$ ($n = 13$). Während der Translokation des tCaspase3-sensors in den Nukleus erhöhte sich der nicht-normierte Quotient auf $1,56 \pm 0,05$ ($n = 13$).

Da die Fluoreszenzintensität innerhalb der transfizierten Neuronenpopulation stark variierte, wurde das Verhältnis R_t durch Division durch den Quotienten unter Kontrollbedingungen R_0 normiert, um für jedes untersuchte Neuron einen Startwert von 1 zu erhalten. In Abb. 15 sind die normierten Werte für die beobachteten Neurone und betrachteten Zeiten aufgetragen. Für die Beobachtung der Zellen unter Kontrollbedingungen ergab sich für bis zu 7 h ein konstantes Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von etwa 1 (Abb. 15A). Während der Translokation stieg dieser Wert sprunghaft auf Werte bis zu 3,4 an (Abb. 15B).

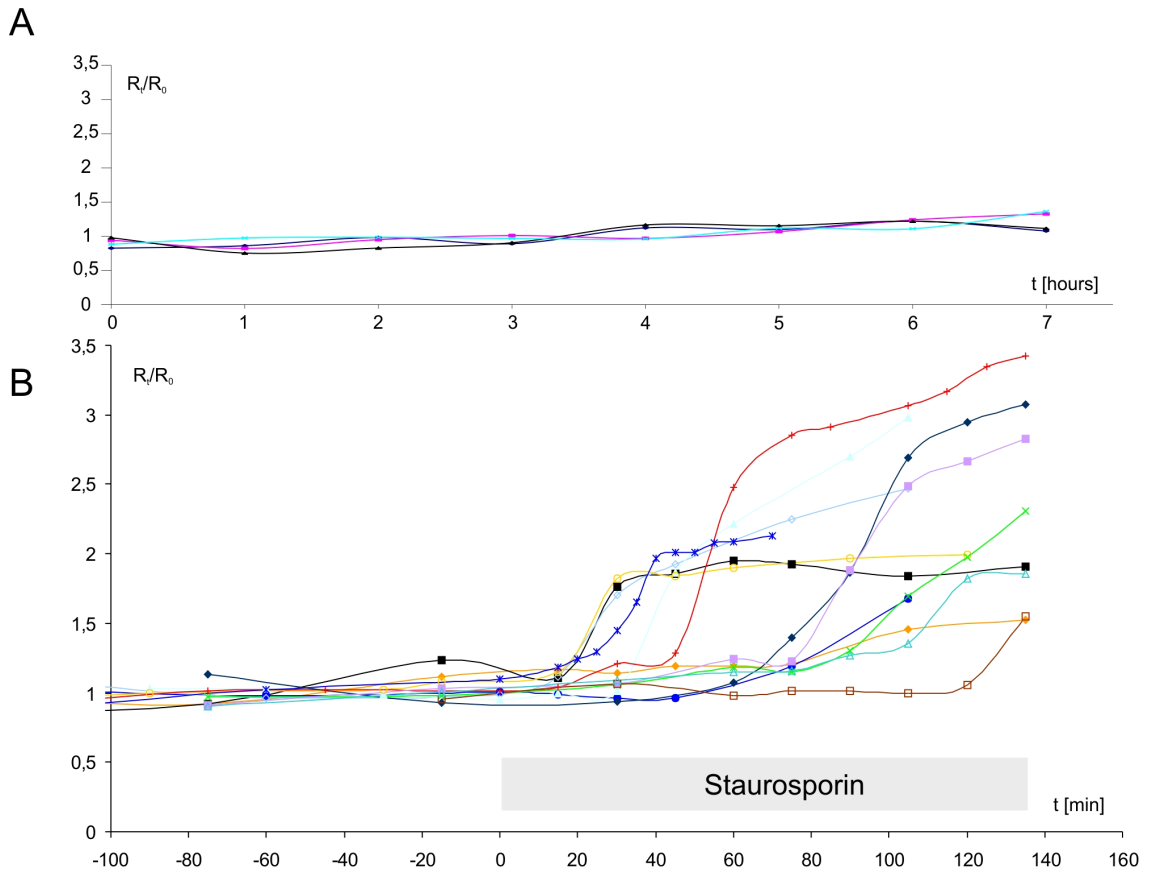


Abb. 15. Quantitative Analyse der tCaspase3-sensor Translokation: Der Quotient der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten des Nukleus und des gesamten Somas ist gegen die Zeit aufgetragen. Dieser wird mittels der Division durch den Durchschnitt des Quotienten unter Kontrollbedingungen normiert. **A** Die Beobachtung von transfizierten Neuronen unter Kontrollbedingungen ergab, dass das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Nukleus und Soma über bis zu 7 h konstant bleibt (n = 4). **B** Neurone, die den Caspase3-sensor exprimieren, werden für die Zeit -100 bis 0 min unter Kontrollbedingungen beobachtet. Beim Zeitpunkt t = 0 min wird dem ACSF 100 nM Staurosporin zugesetzt (grauer Balken). Die Applikation dieses Kinasehemmers induziert die Caspase-3 vermittelte proteolytische Spaltung des Caspase3-sensors und damit die Translokation des EYFP-Signals in den Nukleus. Dieser Prozess wird deutlich durch einen sprunghaften Anstieg des Quotienten R_t/R_0 . Die Translokation ist beendet, wenn die Kurve einen Plateauwert erreicht hat. Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität von verschiedenen Neuronen gegenüber Apoptosestimulatoren wie Staurosporin zeigt T einen hohen Grad an Variabilität.

Aus dem in 15B dargestellten Graphen wurden T , D_T und v_T ermittelt. Zusätzlich ergaben sich die rechnerischen Werte dieser Parameter aus der Ermittlung der einzelnen Variablen der Boltzmannverteilung (Abb. 16A) für die Anstiegskinetik des Fluoreszenzsignals in jedem untersuchten Neuron. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 gegenüber gestellt. Generell gab es bei der Ermittlung von T und D_T keine signifikanten Unterschiede zwischen berechneten und aus dem Graphen abgeleiteten Werten. Sie betragen für $T = 61,2 \pm 9,9$ min (n =13; Minimum/Maximum: 20,0 - 127,0 min) für den Graphen und $T = 48,4 \pm 11,8$

Ergebnisse

min ($n = 10$; Min/Max: 7,8 - 121,6 min) für die berechneten Werte. Für die Translokationsdauer ergaben sich aus dem Graphen $D_T = 31,7 \pm 6,9$ min ($n = 5$; Min/Max: 18,0 - 56,2 min), aus der Boltzmannverteilung $D_T = 46,6 \pm 8,0$ min ($n = 10$; Min/Max: 17,8 - 86,8 min). Lediglich die mit der Boltzmannverteilung berechnete $v_T = 0,029 \pm 0,003$ min⁻¹ ($n = 10$; Min/Max: 0,011 - 0,042 min⁻¹) war signifikant kleiner als die aus dem Graphen ermittelte $v_T = 0,064 \pm 0,013$ min⁻¹ ($n = 5$; Min/Max: 0,039 - 0,100 min⁻¹). Daraus folgend ergibt sich mit der Boltzmannverteilung eine einfache Möglichkeit, kinetische Parameter für die Translokation des tCaspase3-sensors in Näherung rechnerisch zu bestimmen.

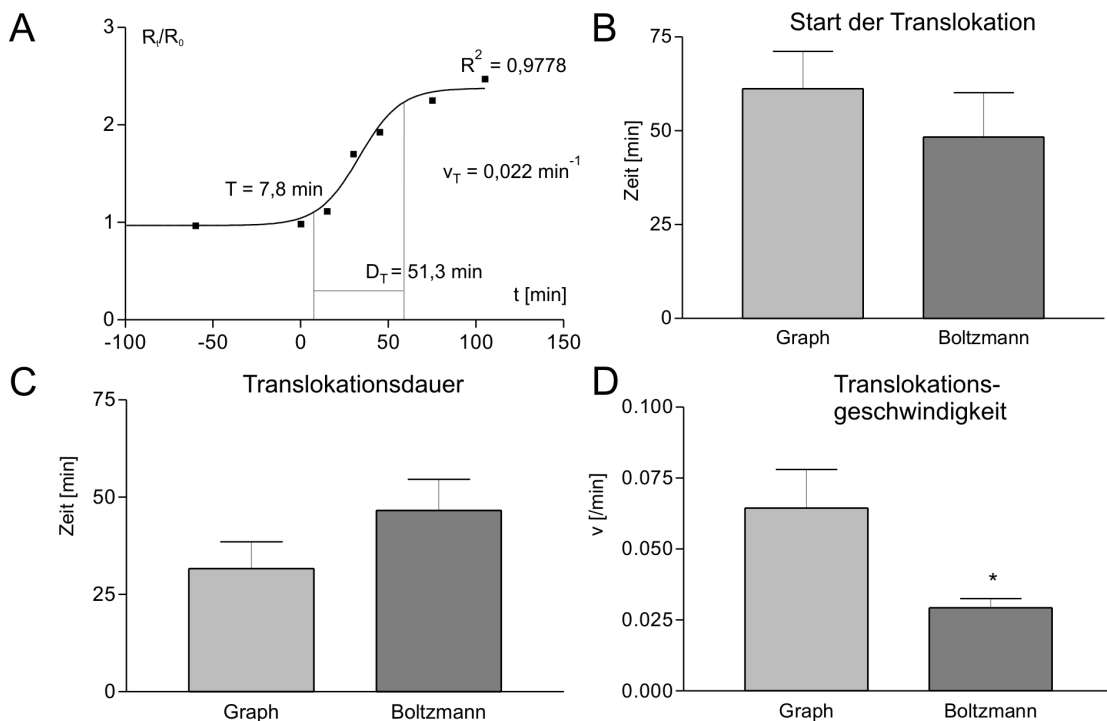


Abb. 16. Bestimmung der Translokationsparameter: **A** Gezeigt ist die nicht-lineare Regressionsanalyse (oben links) für die Werte eines Neurons aus (**Abb 15B**). Im Graph angegeben sind das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die mit Hilfe der Variablen der Boltzmannverteilung berechneten Werte für T , D_T und v_T . **B-D** Aufgetragen sind die Mittelwerte für den Beginn des Translokationsprozesses (**B**), die Translokationsdauer (**C**) und -geschwindigkeit (**D**), die aus den Graphen (**Abb 15B**) oder durch nicht-lineare Regressionsanalyse bestimmt wurden. Für T und D_T finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den abgelesenen und berechneten Werten (Student t-Test $p > 0,05$; $n \geq 10$ für T ; $n \geq 5$ für D_T). Nur für die v_T ergab sich ein signifikant kleinerer Wert durch die Berechnung im Vergleich zu dem aus dem Graphen abgeleiteten (Mann Whitney-Test $p < 0,05$; $n \geq 5$).

4.2.2 Die Bedeutung der Caspase-3 Aktivierung für die Translokation des tCaspase3-sensors

Um zu untersuchen, ob die Translokation des tCaspase3-sensors spezifisch für die Aktivierung von Caspase-3 ist, wurden transfizierte Neurone für 30 min mit 100 nM Staurosporin behandelt, fixiert und immunzytochemisch mit einem gegen a-Caspase-3 gerichteten Antikörper gefärbt. Im Folgenden wurde das Verteilungsmuster des Caspase3-sensors mit der Antikörperfärbung gegen a-Caspase-3 verglichen. In Zellen, die eine somatische Lokalisation des EYFP-Signals zeigten, konnte immunzytochemisch keine Aktivierung der Caspase-3 nachgewiesen werden (Abb. 17A). Zellen, bei denen eine Translokation des tCaspase3-sensors in den Nukleus stattfand, waren auch immunzytochemisch positiv gegenüber a-Caspase-3 (Abb. 17B, C). Auch Beispiele für Zellen mit fragmentiertem Nukleus konnten aufgrund der nukleären EYFP-Fluoreszenz des tCaspase3-sensors beobachtet werden (Abb. 17C, Pfeilspitze).

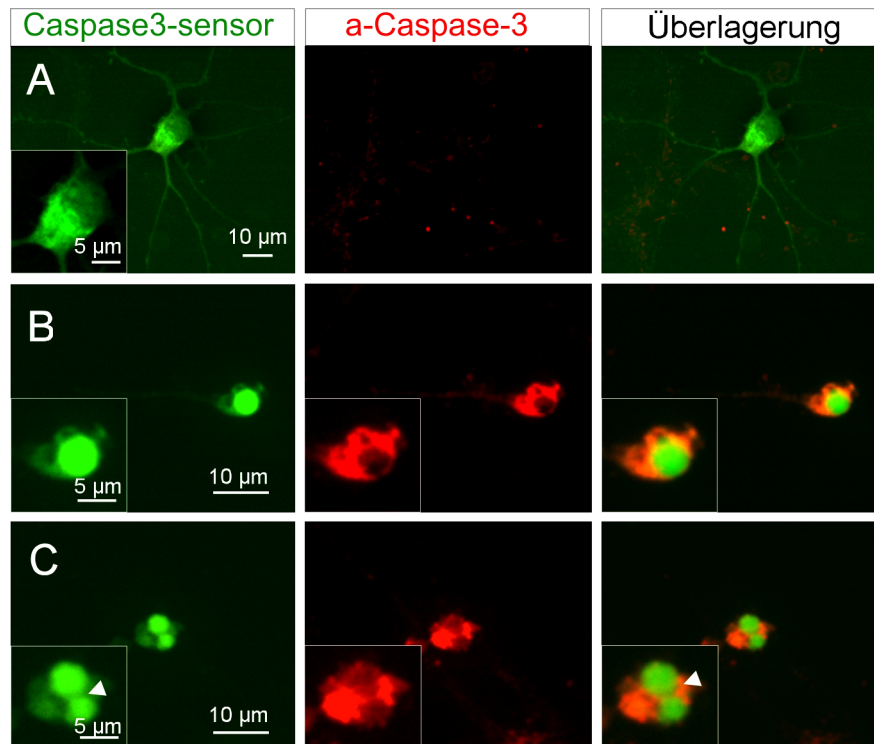


Abb. 17. a-Caspase-3 spezifische Translokation des tCaspase3-sensors: Transfizierte Neurone wurden für 30 min 100 nM Staurosporin ausgesetzt, fixiert und immunzytochemisch hinsichtlich der Aktivierung von Caspase-3 untersucht. In den linken Bildern sind die Fluoreszenzaufnahmen unter Anregung von EYFP (Caspase3-sensor) zu sehen. In der Mitte gezeigt sind die Fluoreszenzbilder des immunzytochemischen Nachweises der a-Caspase-3 für den gleichen Ausschnitt und rechts die Überlagerungsbilder der beiden Färbungen. Die Detailansichten zeigen die Somata der Zellen in stärkerer Vergrößerung. **A** a-Caspase-3 Immunreaktivität kann in Neuronen mit somatischer Lokalisation des Caspase3-sensors nicht beobachtet werden. **B** In Neuronen, die eine Translokation des tCaspase3-sensors zeigen, kann die Aktivierung von Caspase-3 auch immunzytochemisch nachgewiesen werden. **C** In einigen Zellen mit nukleärer EYFP-Fluoreszenz und immunzytochemisch detektierter a-Caspase-3 kann eine Fragmentierung des Zellkerns (Pfeilspitze) beobachtet werden.

Um die Abhängigkeit der Translokation des tCaspase3-sensors von der proteolytischen Aktivität der a-Caspase-3 weiter zu untersuchen, wurden transfizierte Neurone in Gegenwart oder Abwesenheit des Breitband-Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK (50 µM) (Bossy-Wetzel et al., 2004) mit 100 nM Staurosporin behandelt. Neurone, die Z-VAD-FMK ausgesetzt waren, zeigten eine stabile somatische Lokalisation des Caspase3-sensors (Abb. 18A). Demgegenüber war in Neuronen, die mit 100 nM Staurosporin behandelt wurden, eine Translokation des EYFP-Signals zu beobachten (Abb. 18B). Diese Translokation in Gegenwart von Staurosporin konnte durch die Präinkubation mit 50 µM Z-VAD-FMK verhindert werden (Abb. 18C). Die vollständige Unterdrückung der durch Staurosporin induzierten Translokation des tCaspase3-sensors durch die Applikation von

Z-VAD-FMK konnte anhand von 35 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 18D). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die Translokation des tCaspase3-sensors spezifisch für die Aktivierung von Caspase-3 ist und von der proteolytischen Aktivität der Caspasen abhängt.

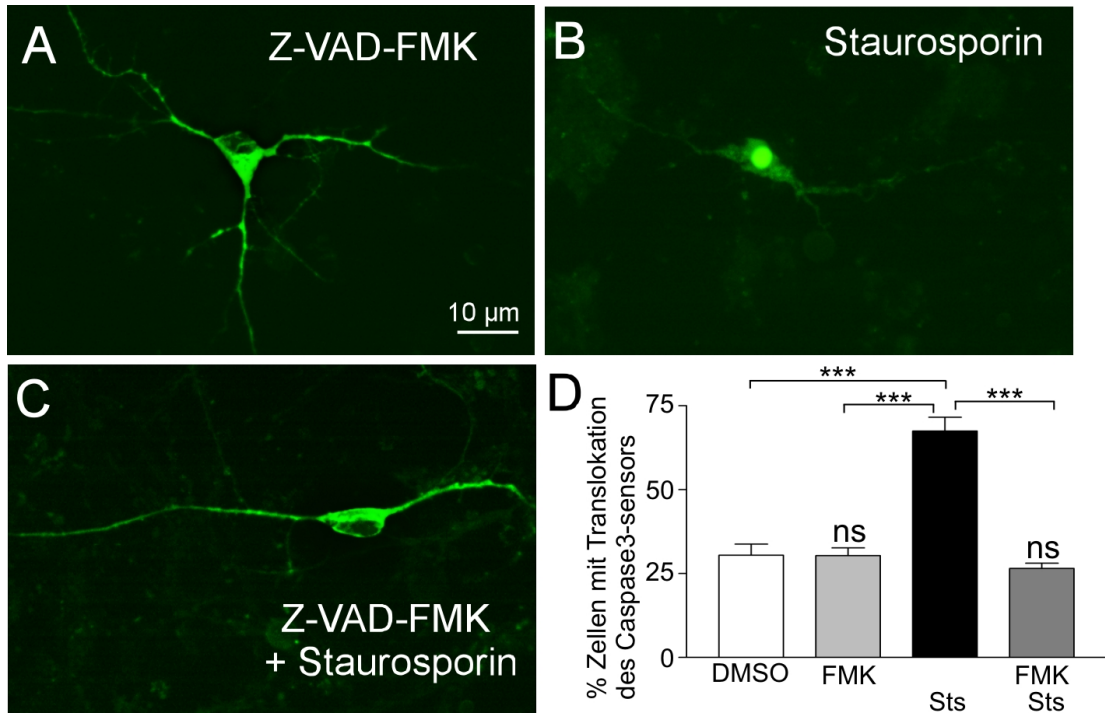


Abb. 18. Abhängigkeit der Translokation des tCaspase3-sensors von der Caspaseaktivität: Transfizierte Neurone wurden entweder mit dem Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK (50 μ M) oder 100 nM Staurosporin (Sts) oder mit einer Kombination der beiden Inhibitoren behandelt. **A** Applikation von Z-VAD-FMK verändert die somatische Lokalisation des Caspase3-sensors nicht. **B** Staurosporin induziert die Translokation des EYFP-Signals in den Nucleus. **C** Dieser Effekt kann inhibiert werden, wenn die Kulturen zusätzlich zu Staurosporin mit Z-VAD-FMK präinkubiert werden. Die Fluoreszenz des Caspase3-sensors bleibt unter diesen Bedingungen stabil im Soma lokalisiert. **D** Der Graph zeigt die Neurone mit nukleärer Lokalisation des EYFP-Signals als Prozentsatz der Gesamtzahl transfizierter Neurone unter den beschriebenen Bedingungen. In Gegenwart des Caspaseinhibitors Z-VAD-FMK kann keine Staurosporin-induzierte EYFP-Translokation beobachtet werden (ANOVA $p < 0,0001$, Newman-Keuls *post hoc* Test, ns = $p > 0,05$; *** = $p < 0,001$; $n \geq 35$ Neurone für jede Bedingung).

4.2.3 Der Echtzeitnachweis der Caspase-3 Aktivierung als Marker für die frühe Phase der Apoptose

Um die Translokation des tCaspase3-sensors mit anderen Methoden der Apoptosedetektion vergleichen zu können, wurden transfizierte Kulturen mit Staurosporin behandelt und nach der Fixierung mit dem TUNEL-Assay hinsichtlich der während der Apoptose auftretenden DNS-Fragmentierung untersucht (Abb. 19). Neurone, in denen eine auf das Soma beschränkte EYFP-Fluoreszenz zu beobachten war, wurden durch das TUNEL-Assay nicht angefärbt (Abb. 19A, B). Viele Neurone, die eine Translokation des tCaspase3-sensors zeigten, aber noch keine morphologischen Veränderungen, waren ebenfalls TUNEL-negativ (Abb. 19C). Nur Neurone mit nukleärer EYFP-Fluoreszenz, die ihre neuronale Morphologie verloren hatten, wurden auch durch das TUNEL-Assay gefärbt (Abb. 19D). Dabei ist in diesem Beispiel auch eine deutliche Größenabnahme der Zelle in D gegenüber den in A, B und C gezeigten Neuronen zu beobachten. Neben den transfizierten Neuronen wurden auch einige Zellkerne von Zellen, die den Caspase3-sensor nicht exprimierten, durch das TUNEL-Assay gefärbt (Abb. 19, Pfeile). Bei diesen Zellen konnte somit ebenfalls eine DNS-Fragmentierung nachgewiesen werden. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die DNS-Fragmentierung im zeitlichen Verlauf der Apoptose nach der Aktivierung der Caspase-3 erfolgt.

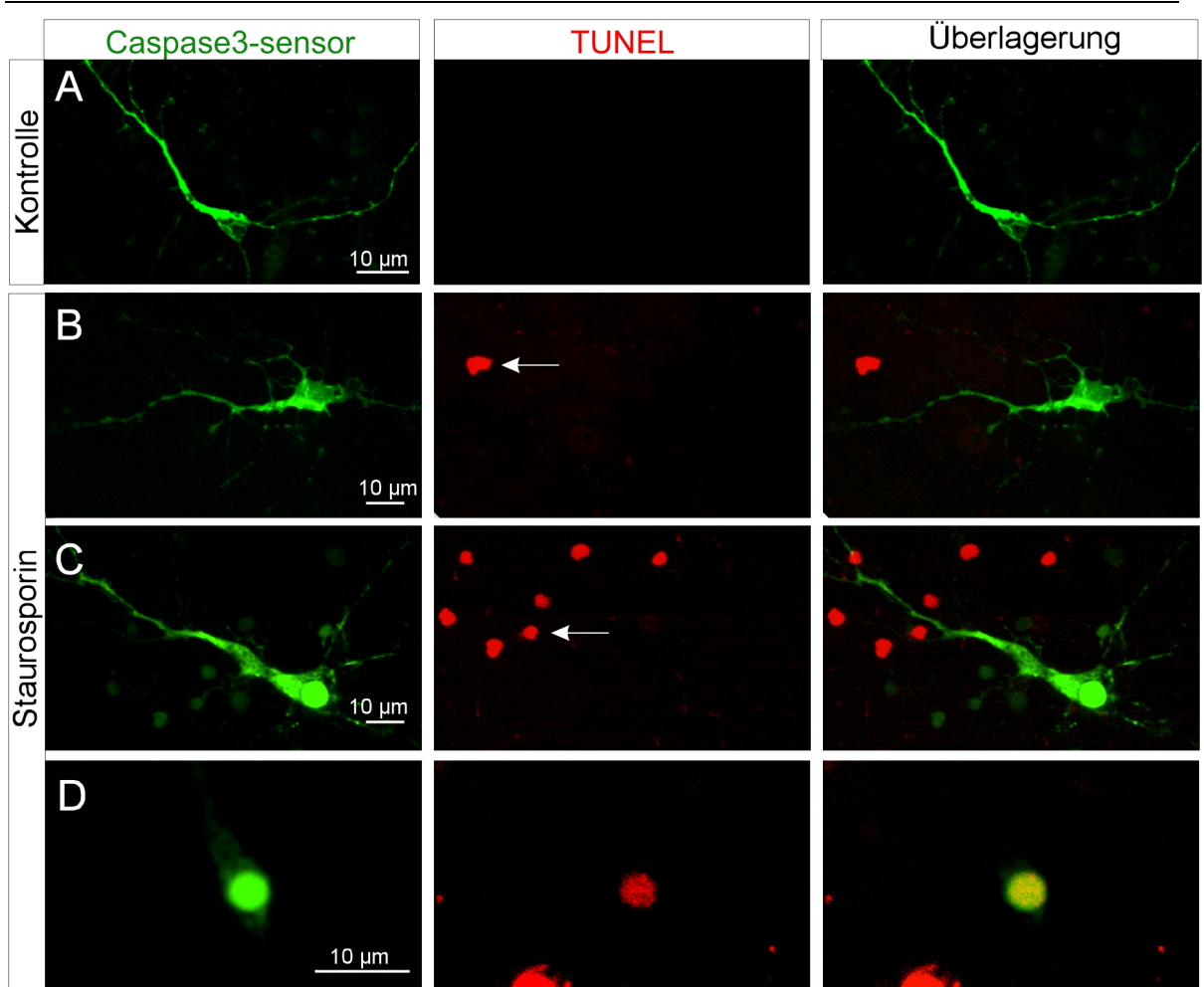


Abb. 19. Zeitliche Abfolge von Caspase-3 Aktivierung und apoptotischer DNS-Fragmentierung: In den linken Bildern sind Fluoreszenzaufnahmen von mit dem pCaspase3-sensor Vektor transfizierten Neuronen zu sehen. Die mittleren Abbildungen zeigen die dazugehörigen TUNEL-Färbungen desselben Gesichtsfeldes. In den rechten Bildern sind beide Aufnahmen überlagert. **A** Transfizierte Neurone zeigen unter Kontrollbedingungen keine Translokation des EYFP-Signals. **B** Nach der Zugabe von Staurosporin kann in Neuronen, die eine somatische Lokalisation des Caspase3-sensors zeigen, keine DNS-Fragmentierung mit der TUNEL-Methode nachgewiesen werden. **C** Neurone, die eine Translokation des tCaspase3-sensors zeigen, bei denen aber die neuronale Morphologie noch erhalten ist, sind TUNEL-negativ. **D** In Neuronen, die eine Translokation des EYFP-Signals zeigen und ihre neuronale Morphologie verloren haben, kann eine DNS-Fragmentierung durch das TUNEL-Assay nachgewiesen werden. Die Pfeile in **(B)** und **(C)** zeigen Zellkerne von nicht transfizierten TUNEL-positiven Zellen.

4.2.4 Der Einfluss der Transfektion auf die Empfindlichkeit kortikaler Neurone gegenüber Staurosporin

Um zu untersuchen, ob das verwendete Transfektionsprotokoll einen Einfluss auf das Überleben der Neurone hatte oder deren Empfindlichkeit gegenüber apoptotischen Stimuli veränderte, wurde die Aktivierung von Caspase-3 in transfizierten und nicht-transfizierten Neuronen einer Kultur bzw. zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Kulturen verglichen (Abb. 20).

Transfizierte und nicht-transfizierte Kulturen wurden in Kontrollbedingungen oder 100 nM Staurosporin für 1 h kultiviert. Nach der Fixierung wurden die nicht-transfizierten Kulturen mittels der Immunzytochemie auf die Aktivierung von Caspase-3 hin untersucht. Bei den transfizierten Kulturen wurde die Zahl der Zellen, die eine Translokation des EYFP-Signals zeigten, ermittelt. Unter Kontrollbedingungen war die Zahl der Zellen mit a-Caspase-3 bei den transfizierten Kulturen gegenüber den nicht transfizierten Kulturen leicht, aber nicht signifikant erhöht (Abb. 20A). Bei Zugabe von Staurosporin zeigten sowohl transfizierte als auch nicht-transfizierte Kulturen eine signifikante Erhöhung der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen gegenüber ihren jeweiligen Kontrollen. Diese Erhöhung war zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Kulturen nicht signifikant verschieden (Abb. 20B).

In einem weiteren Experiment wurden transfizierte und nicht-transfizierte Zellen einer Kultur miteinander verglichen. Alle Zellen einer Kultur wurden für eine Stunde Kontrollbedingungen oder 100 nM Staurosporin ausgesetzt. Nach der Fixierung erfolgte der immunzytochemische Nachweis der Caspase-3 Aktivierung. Zellen mit a-Caspase-3 wurden als Prozent der Gesamtzellzahl ausgezählt. Nicht-transfizierte Zellen (EYFP-negativ) wurden anhand der a-Caspase-3 immunzytochemischen Färbung als a-Caspase-3 positiv oder a-Caspase-3 negativ klassifiziert. Transfizierte Neurone (EYFP-positiv) wurden direkt anhand der Translokation des tCaspase3-sensors als a-Caspase-3 positiv oder a-Caspase-3 negativ eingeordnet. Die Gesamtzahl EYFP-positiver Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. Zusätzlich wurde auch bei den EYFP-positiven Zellen die Anzahl immunzytochemisch a-Caspase-3 gefärbter Zellen ermittelt.

Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten transfizierte und nicht-transfizierte Zellen einer Kultur einen 2-fachen Anstieg des Prozentsatzes von Zellen mit a-Caspase-3 (Abb. 20C). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Transfektion mit dem pCaspase3-sensor Vektor keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit der kortikalen Neurone gegenüber Staurosporin hatte.

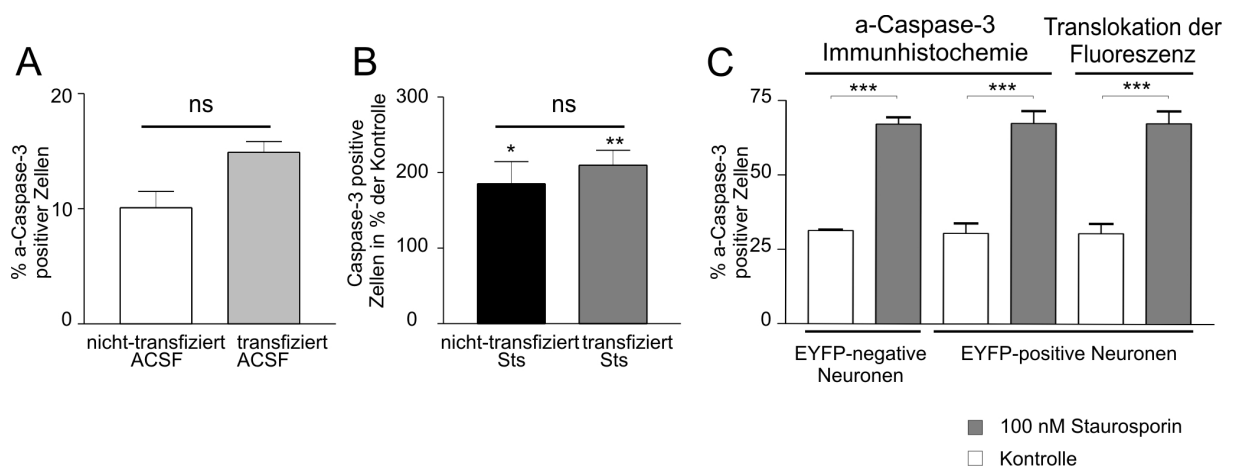


Abb. 20. Unveränderte Empfindlichkeit transfizierter Neurone gegenüber Staurosporin: **A** Nicht-transfizierte Kulturen wurden mittels immunzytochemischer Färbung auf die Aktivierung von Caspase-3 hin untersucht. Bei transfizierten Kulturen wurde die Translokation des EYFP-Signals zur Identifizierung von Neuronen mit a-Caspase-3 genutzt. Transfizierte Kulturen und nicht-transfizierte Kulturen zeigen unter Kontrollbedingungen vergleichbare Prozentzahlen a-Caspase-3 positiver Neurone (Student t-Test $p > 0,05$; $n \geq 4$ Kulturen für jede Bedingung). **B** Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollkulturen induziert Staurosporin einen signifikanten Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen in transfizierten und nicht-transfizierten Kulturen (Student t-Test * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; $n \geq 4$ Kulturen für jede Bedingung). Dieser ist zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Kulturen nicht signifikant verschieden (Student t-Test $p > 0,05$). **C** Diese Ergebnisse wurden anhand von nicht-transfizierten und transfizierten Zellen einer Kultur verifiziert. Staurosporin führt zu einem signifikanten Anstieg in der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen. Dies konnte durch die Translokation des EYFP-Signals in transfizierten und immunzytochemisch in transfizierten und nicht-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen unter Kontrollbedingungen ist zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen ebenso wenig verschieden wie der Prozentsatz a-Caspase-3 positiver transfizierter und nicht-transfizierter Zellen nach Zugabe von Staurosporin (ANOVA $p < 0,001$; Newman-Keuls *post hoc* Test *** = $p < 0,001$; $p > 0,05$ für die Kontrollen und $p > 0,05$ für die mit Staurosporin behandelten Zellen; $n = 40$ Neurone aus mindestens 2 Kulturen je Bedingung).

4.3 Beeinflussung der Caspase-3 abhängigen Apoptose in kortikalen Neuronen durch Modulation der Netzwerkaktivität

Um zu klären, wie verschiedene Aktivitätsmuster das Überleben von Neuronen regulieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die spontane Netzwerkaktivität kortikaler Kulturen durch unterschiedliche $[K^+]_{ex}$ moduliert und das Überleben der kortikalen Neuronen untersucht. Dissoziierte Kulturen des neonatalen Kortex von Mäusen (P0-P1) wurden nach 13 bis 14 div mit dem pCaspase3-sensor Vektor transfiziert und in ACSF mit verschiedenen $[K^+]_{ex}$ inkubiert. Damit ließ sich untersuchen, wie sich die Depolarisation der Zellmembran unter dem Entzug trophischer Faktoren auf das neuronale Überleben auswirkte.

Mit Hilfe von MEA-Chips wurden die dissoziierten Kulturen auf die Entwicklung spontaner Netzwerkaktivität hin untersucht. Dazu wurden Feldpotentialmessungen der Kulturen an verschiedenen div durchgeführt.

4.3.1 Die immunzytochemische und elektrophysiologische Charakterisierung von dissoziierten neokortikalen Kulturen der neugeborenen

Maus

Dissoziierte Kulturen des neonatalen Kortex der Maus wurden 2 Wochen kultiviert. Um die Kultur hinsichtlich der Zellmorphologie zu charakterisieren, wurden individuelle Neurone mit Biozytin gefüllt und durch fluoreszenzmarkiertes Streptavidin nachgewiesen (Abb. 21). Ein Biozytin gefülltes Neuron der 14 div alten Kultur zeigte eine komplexe tripolare Morphologie mit langen weit verzweigten Neuriten (Abb. 21A).

Mit Hilfe immunzytochemischer Färbungen sollte die Kultur hinsichtlich des Vorhandenseins von Neuronen und glialen Zellen untersucht werden. Nach der Fixierung der 13 bis 14 div alten Kulturen wurden diese immunzytochemisch hinsichtlich des astrozytenspezifischen Proteins GFAP und des neuronalen MAP-2 Proteins untersucht. Die Doppelfärbung mit Antikörpern gegen GFAP und MAP-2 ließ erkennen, dass die Kultur sowohl Neurone als auch Astrozyten enthielt. Die Morphologie der Astrozyten ähnelte der von glialen Zellen, die in organotypischen Schnittkulturen immunzytochemisch untersucht worden waren (Abb. 21B-E, vgl. Abb. 8F-I). In der stärkeren Vergrößerung zeigt sich die räumliche Nähe von Neuronen und glialen Fortsätzen (Abb. 21C-E). Dies konnte ebenfalls in den organotypischen Schnittkulturen beobachtet werden. Daraus ergibt sich, dass die dissoziierten Kulturen hinsichtlich der Morphologie von Neuronen und glialen Zellen den organotypischen Schnittkulturen ähneln.

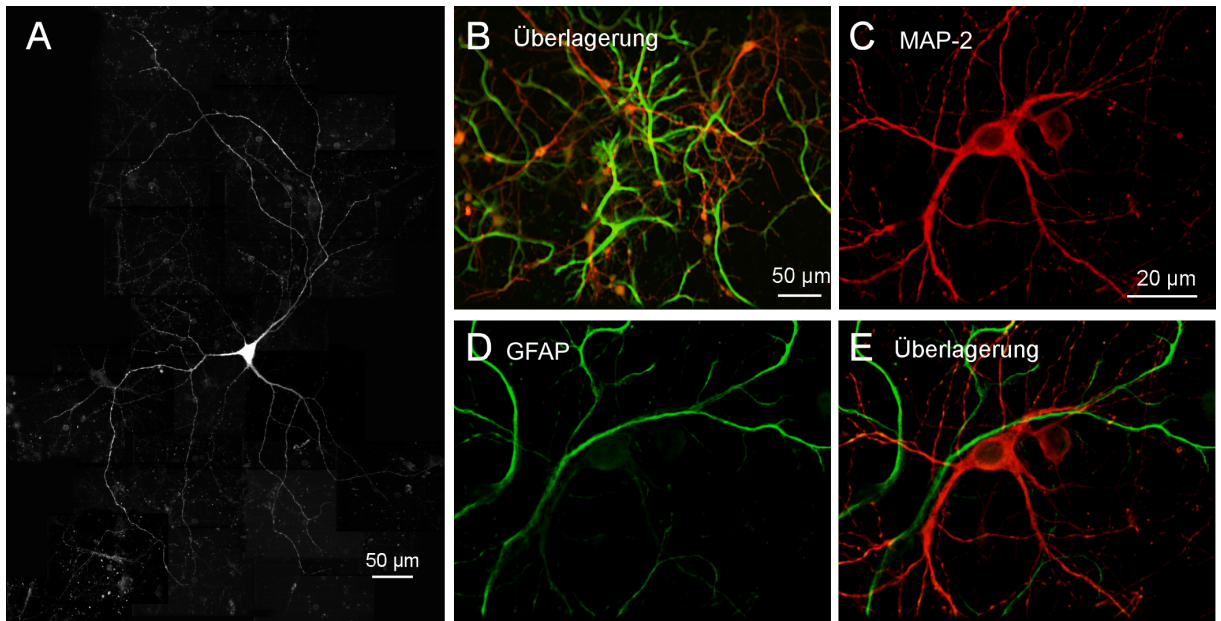


Abb. 21. Histologische Charakterisierung dissoziierter kortikaler Kulturen: **A** Ein Neuron einer 14 div alten kortikalen dissoziierten Kultur wurde mit Bioxytin gefüllt und durch Streptavidin-Alexa488 sichtbar gemacht. Deutlich ist die tripolare Morphologie des Neurons mit langen weit verzweigten Neuriten zu sehen. **B** Gezeigt ist das Überlagerungsbild der MAP-2 (rot) und GFAP-Färbung (grün) des gleichen Gesichtsfeldes einer 14 div alten dissoziierten Kultur bei 20-facher Vergrößerung. Viele Neurone und gliale Zellen bilden ein dichtes Netzwerk. **C** In der stärkeren Vergrößerung der MAP-2 Antikörperfärbung sind 2 Neurone und zahlreiche Neuriten zu erkennen. **D** Das zu (C) gehörige Bild der GFAP-Antikörperfärbung zeigt gliale Fortsätze und die faserige Anordnung des GFAP. **E** Im Überlagerungsbild von (C) und (D) zeigt sich die räumliche Nähe neuronaler Neuriten und glialer Fortsätze.

Um die Entwicklung spontaner Netzwerkaktivität in dissoziierten kortikalen Kulturen zu charakterisieren, wurden kortikale Neurone auf Poly-Ornithin beschichteten MEA-Chips kultiviert. Abbildung 20A zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme einer Kultur dissoziierter Neurone auf einem MEA-Chip an 14 div. Bei stärkerer Vergrößerung lässt sich erkennen, dass viele Neurone auf und in der Nähe der Elektroden zu finden waren (Abb. 22A, Detailansicht).

Die elektrische Aktivität der Kultur wurde jeden Tag durch Feldpotentialmessungen an den 60 Elektroden des MEA-Chips aufgezeichnet und analysiert. An 4-5 div ließ sich durch das MEA-System erste spontane Aktivität in den Kulturen nachweisen. Diese Aktivität war auf einzelne Elektroden (3 ± 1 Elektroden, $n = 9$) beschränkt (Abb. 22B). In den folgenden div konnte diese Feldpotentialaktivität an zunehmend mehr Elektroden beobachtet werden (Abb. 22C), wobei sich Muster spontaner Aktivität zeigten, die über Bereiche des MEA-Chips hinweg korreliert waren (Abb. 22D). Nach 13-14 div zeigten durchschnittlich 33 ± 4 Elektroden ($n = 9$) elektrische Aktivität. Die Frequenz der Entladungen stieg während der

ersten Woche *in vitro*. Sie betrug ca. 6 *spikes/s* an 5 div und stieg auf 10 *spikes/s* an 8 div an. Zu diesem Zeitpunkt wechselte die elektrische Aktivität von einem regelmäßigen Entladungsmuster zu unregelmäßigen Entladungen, bei denen sich Phasen hoher Frequenz mit solchen niedriger Frequenz abwechselten (Abb. 22F).

Ab dem Ende der zweiten Woche *in vitro* war die elektrische Aktivität über viele Elektroden hinweg korreliert (Abb. 22E). An 14 div zeigte sich ein komplexes Muster der spontanen Netzwerkaktivität mit über viele Elektroden korrelierten *bursts*. Während solcher *bursts* zeigte die Kultur eine hochfrequente Aktivität zahlreicher Neurone mit bis zu 250 *spikes/s*. Nach einem 15 s langen *burst* zeigte die Kultur für ca. 20 s kaum Aktivität (< 1 *spike/s*) (Abb. 22F). Da sich die beobachtete spontane Netzwerkaktivität an den folgenden div nicht weiter veränderte, wurden alle folgenden Experimente an 13 bis 14 div alten Kulturen durchgeführt.

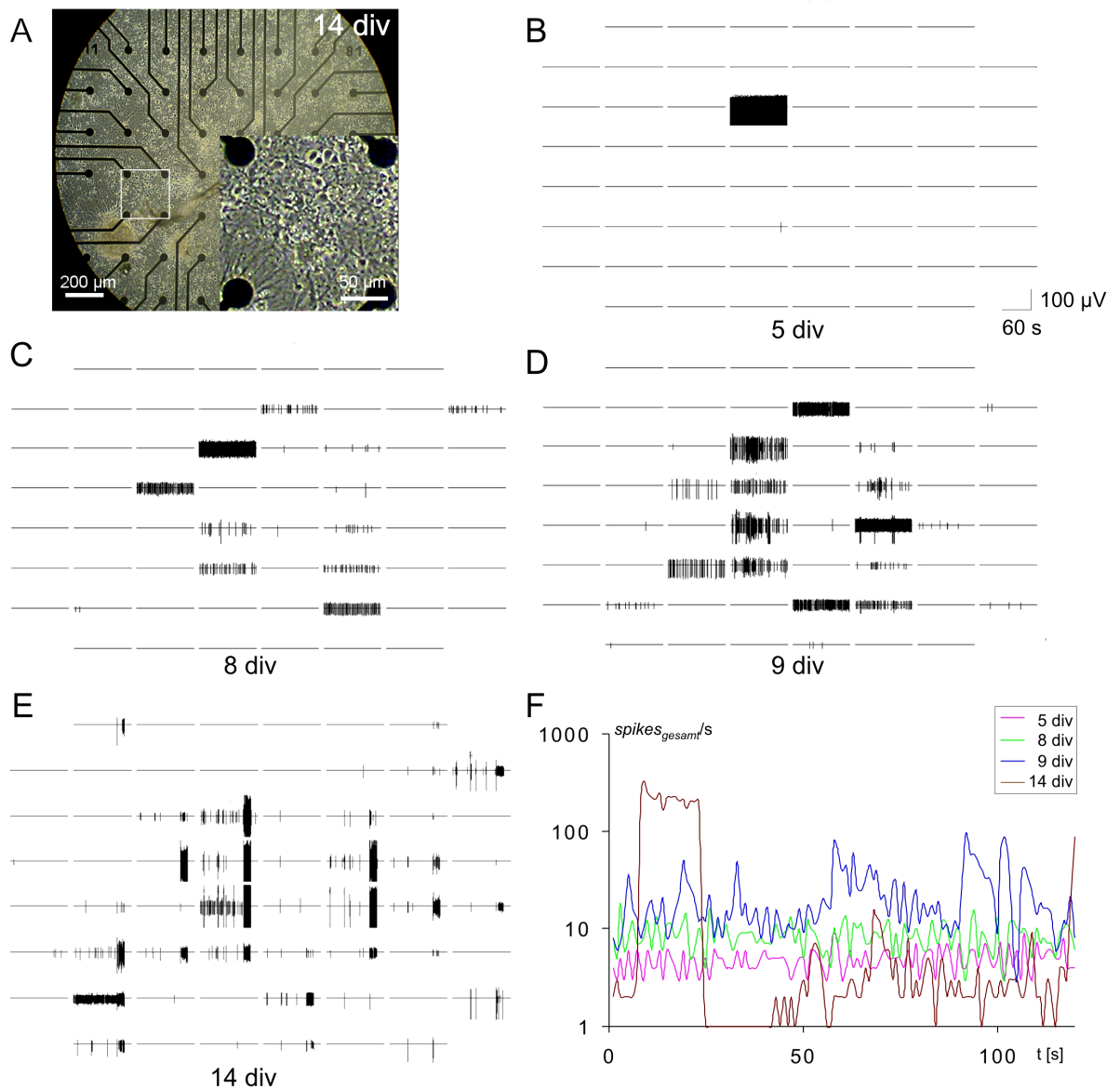


Abb. 22. Entwicklung der spontanen Netzwerkaktivität in dissoziierten neokortikalen Kulturen: **A** Gezeigt ist die lichtmikroskopische Aufnahme einer 14 div alten Kultur. Zahlreiche Neurone befinden sich in unmittelbarer Nähe zu den Elektroden. **B** In einer 5 div alten Kultur zeigen sich spontane Feldpotentialänderungen nur an wenigen Elektroden. **C** An einer größeren Zahl von Elektroden können bei der 8 div alten Kultur Feldpotentialänderungen gemessen werden. **D** Nach 9 div kann an einigen Elektroden korrelierte Aktivität gemessen werden. **E** Eine 14 div alte Kultur zeigt über viele Elektroden hinweg korrelierte Muster spontaner Aktivität. **F** In Abhängigkeit von der Kulturzeit nimmt die Anzahl der *spikes* pro im gesamten Netzwerk zu. Nach 14 div wechseln Netzwerkbursts mit Phasen niedriger Netzwerkaktivität.

4.3.2 Der Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf das Überleben kortikaler Neurone in der Abwesenheit trophischer Faktoren

Um zu untersuchen, ob die Depolarisation der Zellmembran durch Änderung der extrazellulären Ionenzusammensetzung einen Einfluss auf das Überleben von kortikalen Neuronen unter apoptosestimulierenden Bedingungen hat, wurden 13 bis 14 div alte dissoziierte kortikale Kulturen mit dem pCaspase3-sensor Vektor transfiziert und nach 24 h untersucht. Dazu wurden sie in eine Analysenkammer überführt, immobilisiert und bei 37 °C mit ACSF verschiedener $[K^+]_{ex}$ (1,5 mM, 3,0 mM, 5,3 mM und 8,0 mM) umspült. Innerhalb eines Experiments blieb $[K^+]_{ex}$ konstant. Fluoreszenzbilder ausgewählter Neurone wurden in Abständen von 1 h aufgenommen. Der gesamte Zeitraum eines Experiments betrug 12 h.

Es zeigte sich, dass das Überleben von Neuronen, die in Abwesenheit trophischer Faktoren 12 h lang beobachtet wurden, maßgeblich von $[K^+]_{ex}$ abhängig war. In Abb. 23 dargestellt sind Aufnahmen von repräsentativen Neuronen für jede der untersuchten Kaliumkonzentrationen. Es zeigte sich, dass Neurone in $[K^+]_{ex} = 1,5$ mM oder $[K^+]_{ex} = 3,0$ mM deutlich schneller eine Caspase-3 Aktivierung aufwiesen als solche, die $[K^+]_{ex} = 5,3$ mM oder $[K^+]_{ex} = 8,0$ mM ausgesetzt waren. In $[K^+]_{ex} = 1,5$ mM kam es bereits nach 5 Stunden zu einer durch die Aktivierung von Caspase-3 ausgelösten Translokation des tCaspase3-sensors (Abb. 23A). Zur Verdeutlichung der Zunahme der nukleären EYFP-Fluoreszenz ist das Soma in einer Detailaufnahme gezeigt (Abb. 23A Detailansicht). In $[K^+]_{ex} = 3,0$ mM wurde die Translokation des EYFP-Signals ebenfalls bereits nach 5 Stunden beobachtet (Abb. 23B), wohingegen in höheren $[K^+]_{ex}$ die Aktivierung der Caspase-3 erst nach 8 h ($[K^+]_{ex} = 5,3$ mM) bzw. 7 h ($[K^+]_{ex} = 8,0$ mM) induziert wurde (Abb. 23C, D).

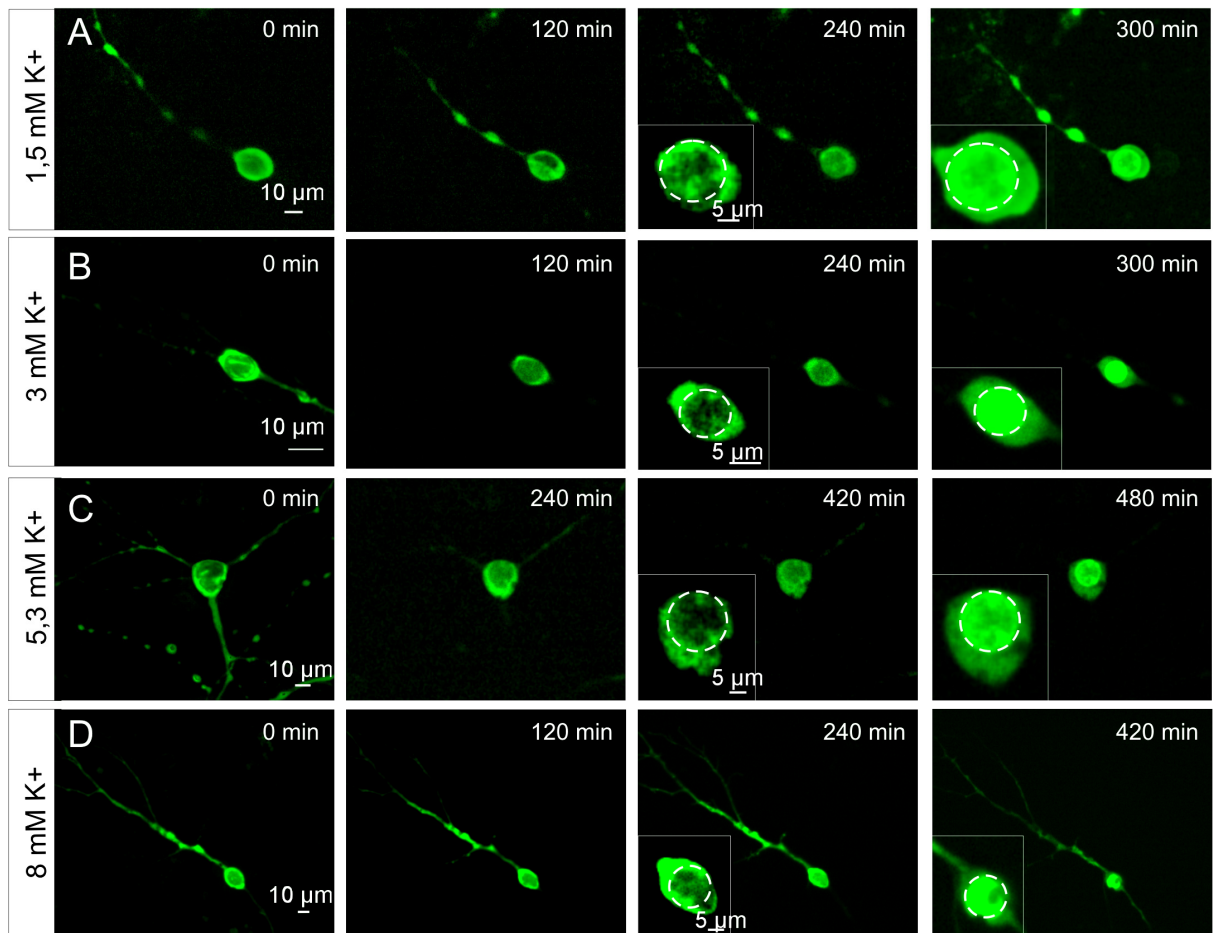


Abb. 23. Einfluss der $[K^+]_{ex}$ auf die Aktivierung der Caspase-3 in kortikalen Neuronen unter dem Entzug trophischer Faktoren: **A** Ein mit dem pCaspase3-sensor Vektor transfiziertes Neuron zeigt in ACSF mit $[K^+]_{ex} = 1,5$ mM bereits nach 5 h eine Translokation des EYFP-Signals in den Nukleus. Dies ist besonders deutlich anhand der Detailansichten zu erkennen. Der unterbrochene Kreis deutet die Lage des Zellkernes an. **B** Eine ähnlich frühe Aktivierung von Caspase-3 wird in einem Neuron beobachtet, das einer $[K^+]_{ex} = 3,0$ mM ausgesetzt ist. **C** Lediglich in erhöhten $[K^+]_{ex} = 5,3$ mM, was der $[K^+]_{ex}$ des Kulturmediums (NB/B27) entspricht, erfolgt die Aktivierung von Caspase-3 erst nach 8 h. **D** Durch eine weitere Erhöhung der $[K^+]_{ex}$ auf 8 mM lässt sich die Translokation des tCaspase3-sensors nicht weiter verzögern. Sie erfolgt nach 7 h.

Die Quantifizierung der Translokation des tCaspase3-sensors erfolgte durch die visuelle Analyse der für jedes Neuron aufgenommenen Bilder. Es zeigte sich, dass bei $[K^+]_{ex} = 1,5$ mM und $[K^+]_{ex} = 3,0$ mM, 50 % aller a-Caspase-3 positiven Neurone innerhalb der ersten 3 bis 5 h eine Aktivierung der Caspase-3 zeigten ($t_{50\%} = 180$ min für $[K^+]_{ex} = 1,5$ mM und $t_{50\%} = 285$ min für $[K^+]_{ex} = 3,0$ mM), während dieser Wert für $[K^+]_{ex} = 5,3$ mM bei 480 min und für $[K^+]_{ex} = 8,0$ mM bei 486 min lag. Dies zeigte sich auch anhand der Verteilung der Zeitpunkte der EYFP-Translokation, die für alle Neurone in den unterschiedlichen $[K^+]_{ex}$ aufgetragen ist (Abb. 24A). Beim Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für jede

der vier Untersuchungsreihen ergab sich, dass Neurone in $[K^+]_{ex} = 1,5 \text{ mM}$ und $= 3,0 \text{ mM}$ signifikant früher eine Aktivierung der Caspase-3 zeigten ($\bar{T} = 310,7 \pm 33,4 \text{ min}$ für $[K^+]_{ex} = 1,5 \text{ mM}$ und $\bar{T} = 346,7 \pm 24,8 \text{ min}$ für $[K^+]_{ex} = 3,0 \text{ mM}$), als solche, die $[K^+]_{ex} = 5,3 \text{ mM}$ ($\bar{T} = 498,8 \pm 34,2 \text{ min}$) oder $[K^+]_{ex} = 8,0 \text{ mM}$ ($\bar{T} = 498,6 \pm 31,8 \text{ min}$) ausgesetzt waren (Abb. 24B). Der Unterschied zwischen $[K^+]_{ex} = 1,5 \text{ mM}$ und $= 3 \text{ mM}$ bzw. zwischen $[K^+]_{ex} = 5,3 \text{ mM}$ und $= 8,0 \text{ mM}$ war dabei nicht signifikant.

Um zu untersuchen, ob die beobachteten individuellen Neurone repräsentativ für die jeweilige Kultur waren, wurde die Zahl a-Caspase-3 positiver Neurone nach 12-stündiger Inkubation mit den verschiedenen $[K^+]_{ex}$ bestimmt. Dazu wurde für jede $[K^+]_{ex}$ die Prozentzahl der über 12 h beobachteten Neurone (Abb. 24C; ausgesuchte Neurone), die eine EYFP-Translokation zeigten, ermittelt. Diese wurde verglichen mit dem prozentualen Anteil der transfizierten Neurone der gesamten Kultur, die eine Translokation des tCaspase3-sensors zeigten (Abb. 24C; gesamte Kultur). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Prozentsatz der ausgesuchten Neurone, die die Translokation des tCaspase3-sensors zeigten und der Prozentzahl aller Zellen einer Kultur, bei denen die Translokation des EYFP-Signals beobachtet wurde (Abb. 24C). Daraus ergibt sich, dass die ausgesuchten transfizierten Neurone repräsentativ für alle transfizierten Neurone einer Kultur waren.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass das Überleben kortikaler Neurone unter dem Entzug von trophischen Faktoren durch die Veränderung von $[K^+]_{ex}$ beeinflusst werden kann. Bei den untersuchten $[K^+]_{ex}$ vermittelten höhere $[K^+]_{ex}$ ein längeres Überleben unter dem Entzug trophischer Faktoren während, niedrige $[K^+]_{ex}$ eine frühere Aktivierung der Caspase-3 bewirkten.

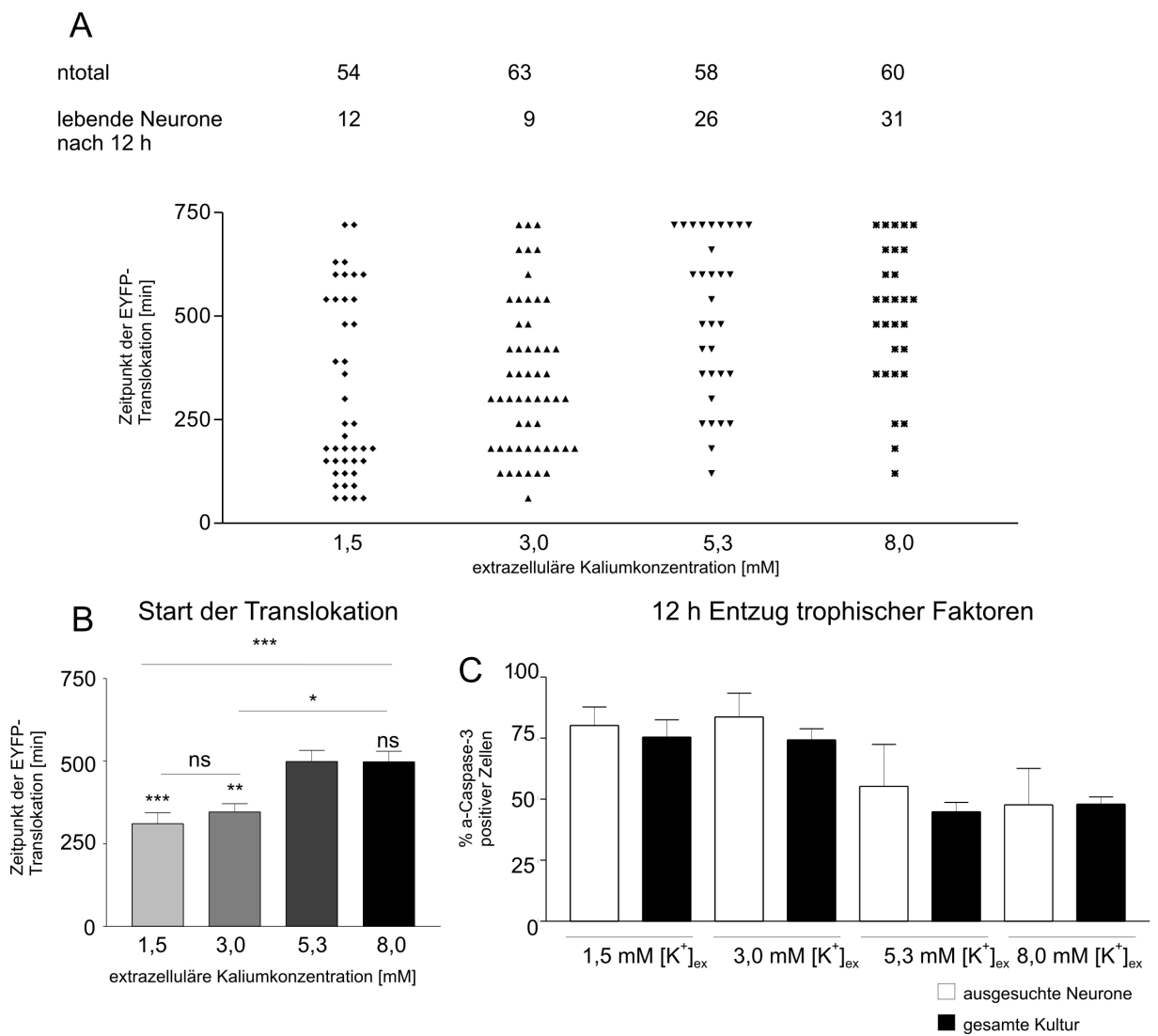


Abb. 24. Quantifizierung der EYFP-Translokation in unterschiedlichen $[K^+]_{ex}$: **A** Gezeigt ist das Verteilungsmuster der Zeitpunkte der EYFP-Translokation für alle in den unterschiedlichen $[K^+]_{ex}$ beobachteten Neurone. Deutlich zu sehen ist, dass bei $[K^+]_{ex} = 1,5$ mM und 3,0 mM die Mehrheit der beobachteten Zellen eine Aktivierung der Caspase-3 zu frühen Zeitpunkten des Experiments zeigen. Demgegenüber zeigen Zellen in $[K^+]_{ex} = 5,3$ mM und 8,0 mM eine Translokation des tCaspase-3-sensors vor allem gegen Ende der 12-stündigen Beobachtungszeit ($n = 4$ Kulturen für jede $[K^+]_{ex}$). Zusätzlich angegeben sind die Gesamtzahl der beobachteten Neurone und die Zahl der nach 12 h lebenden Neurone für jede $[K^+]_{ex}$. **B** Dargestellt ist der Durchschnitt der Zeitpunkte der EYFP-Translokation. Es zeigt sich, dass die Aktivierung der Caspase-3 in $[K^+]_{ex} = 1,5$ mM und = 3,0 mM signifikant früher erfolgt als in $[K^+]_{ex} = 5,3$ mM und 8,0 mM. (Kruskal-Wallis Test $p < 0,0001$, Dunn *post hoc* Test ns = $p > 0,05$, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; $n \geq 54$ Neurone für jede $[K^+]_{ex}$). **C** Gezeigt ist der Vergleich der prozentualen Anteile der Neurone, die nach 12-stündigem Experiment eine Aktivierung der Caspase-3 aufweisen. Die ausgesuchten Zellen weisen keinen signifikant verschiedenen Anteil a-Caspase-3 positiver Zellen im Vergleich zu den dazugehörigen Deckgläsern auf. Auch zwischen den einzelnen $[K^+]_{ex}$ ist der Anteil der Neurone mit a-Caspase-3 nicht signifikant verschieden, weder bei den ausgesuchten Neuronen noch hinsichtlich des gesamten Deckgläschens (Kruskal-Wallis Test $p > 0,05$, Dunn *post hoc* Test alles ns = $p > 0,05$; $n = 4$ Kulturen für jede $[K^+]_{ex}$).

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die Rolle von elektrischer Aktivität, Neurotransmitterrezeptoren und spannungsabhängigen Kalziumionenkanälen auf das neuronale Überleben untersucht. Dazu wurden organotypische Schnittkulturen des neonatalen Kortex immunzytochemisch auf die Aktivierung der Caspase-3 untersucht.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Studie erstmals eine Methode in Neuronen etabliert, die die Aktivierung der Caspase-3 über die nukleäre Translokation eines fluoreszenten Caspase-3 Substrates in Echtzeit ermöglicht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass neokortikale Neurone in der frühen Entwicklung aktivitätsabhängige, Caspase-3 vermittelte Apoptose durchlaufen. Die Aktivierung von iGluRs, GABA_A-Rs und VDCCs sowie von GJs fördern das neuronale Überleben neonataler kortikaler Neurone. Weiterhin zeigt sich, dass der Caspase3-sensor eine einfache, spezifische und verlässliche Methode darstellt, um Caspase-3 abhängige Apoptose in individuellen Neuronen zu beobachten. Die Ergebnisse dieser Studie legen ebenfalls nahe, dass das Überleben neonataler kortikaler Neurone durch Veränderung der extrazellulären Kaliumkonzentration beeinflusst werden kann.

5.1 Aktivitätsabhängigkeit des neuronalen Überlebens während der frühen postnatalen Entwicklung des Neokortex

Apoptose spielt eine große Rolle in der normalen Entwicklung des zerebralen Kortex von Tieren und Menschen (Ferrer et al., 1992; Spreafico et al., 1995; Thomaidou et al., 1997; Rakic und Zecevic, 2000; Verney et al., 2000; Chan et al., 2002). Die Bedeutung der Caspase-3 bei diesem Physiologischen Zelltod konnte besonders anhand von *knock out* Modellen demonstriert werden (Kuida et al., 1996; Kuan et al., 2000b), die starke Fehlentwicklungen des Gehirns zeigten und perinatal starben. Durch den frühen Tod dieser *knock out* Mäuse sind Untersuchungen des Caspase-3 abhängigen Zelltodes in der postnatalen Entwicklung allerdings nicht möglich.

Es gibt jedoch Studien, die eine zweite Phase des Caspase-3 abhängigen PCD in der frühen postnatalen Entwicklung während der Zeit der Modulation des entstehenden Netzwerkes aufzeigen konnten (Heumann et al., 1978; Heumann und Leuba, 1983; Ferrer et al., 1992; Spreafico et al., 1995; Voyvodic, 1996; Verney et al., 2000; Davies, 2003). Dies wird weiterhin gestützt durch die Beobachtung, dass eine erhöhte Expression der Caspase-3 (Shimohama et al., 2001) und des proapoptotischen BAX (Vekrellis et al., 1997) während

der frühen postnatalen Entwicklung des Nagerneokortex beobachtet wird, welche für Caspase-3 nach der zweiten postnatalen Woche und für BAX im adulten Tier auf ein basales Level abfällt. Während der ersten postnatalen Woche kann weiterhin eine hohe Konzentration von a-Caspase-3 im Neokortex detektiert werden (Mooney und Miller, 2000). Eine wichtige Rolle für das neuronale Überleben spielt in dieser frühen Entwicklungsphase besonders die elektrische Aktivität (Mennerick und Zorumski, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden organotypische Schnittkulturen des somatosensorischen Kortex von neugeborenen Mäusen genutzt, um die Mechanismen, die das neuronale Überleben während der frühen postnatalen kortikalen Entwicklung beeinflussen, detailliert zu untersuchen. Dazu wurde die Aktivierung der Caspase-3 als frühes Schlüsselereignis der neuronalen Apoptose untersucht (Wang, 2000; Lakhani et al., 2006).

Die Verteilung a-Caspase-3 positiver Zellen in den Kontrollschnittkulturen ähnelte dabei weitgehend der *in vivo* Situation (Heck et al., 2007). Wurden Aktionspotentiale und evozierte Freisetzung von Transmittern durch TTX, einen Blocker spannungsabhängiger Natriumionenkanäle, inhibiert, stieg die Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen in allen Schichten der organotypischen Schnittkultur signifikant an.

Dieses Ergebnis stimmt mit einer Studie überein, die zeigen konnte, dass Mäuse, deren spannungsabhängige Natriumionenkanäle einer genetischen Deletion unterlagen, ein massives Absterben neuronaler Zellen zeigten (Planells-Cases et al., 2000). Auch in dissoziierten kortikalen Kulturen von neugeborenen Ratten konnte ein vermehrtes Absterben von Neuronen unter dem Einfluss von TTX ohne Beeinträchtigung des glialen Überlebens nachgewiesen werden (Fishbein und Segal, 2006). Diesem Effekt ging ein Rückzug dendritischer Verzweigungen und *spines voraus*. Dabei war die Apoptose in den dissoziierten kortikalen Kulturen nicht auf bestimmte Arten von Neuronen begrenzt, sondern betraf alle Subpopulationen gleichermaßen (Fishbein und Segal, 2006).

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch Studien, in denen beobachtet wurde, dass der unreife Kortex oszillatorische Netzwerkaktivität zeigt (Kilb und Luhmann, 2003; Hanganu et al., 2006; Dupont et al., 2006; Khazipov und Luhmann, 2006). Auch in organotypischen kortikalen Schnittkulturen ist eine solche spontane Netzwerkaktivität gefunden worden. Diese kann durch die Zugabe von TTX inhibiert werden (Heck et al., 2007). Es konnte ebenfalls in Studien gezeigt werden, dass Ratten, die in einem abwechslungsreichen Umfeld gehalten werden, nicht nur eine generell erhöhte Gehirnaktivität aufweisen, sondern auch eine verminderte Apoptose und ein besseres neuronales Überleben (Young et al., 1999; Petreanu und Alvarez-Buylla, 2002).

Im Weiteren deuten die Daten in der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Aktivität von GJs essentiell für das langfristige neuronale Überleben ist, da die Blockade des Connexin 36, eines wichtigen Bestandteils neuronaler GJs, nach 24 Stunden zu Caspase-3 abhängiger Apoptose führte. GJs sind im unreifen Kortex neugeborener Nager maßgeblich an der Generierung synchronisierter Aktivität beteiligt (Kandler und Katz, 1998; Dupont et al., 2006). Eine weitere Funktion von GJs ist der direkte Austausch von überlebensfördernden oder proapoptotischen Molekülen (Krysko et al., 2005).

Die Bedeutung von GABA_A-Rs im Hinblick auf das neuronale Überleben in organotypischen Schnittkulturen konnte ebenfalls geklärt werden. Diese ligandengesteuerten Chloridionenkanäle sind neben den iGluRs maßgeblich an der Generierung der synchronisierten Netzwerkaktivität im unreifen Kortex nach der Synaptogenese beteiligt (Owens et al., 1996; Kandler und Katz, 1998; Flint et al., 1999). Eine Blockade von GABA_A-R führt in organotypischen Schnittkulturen zu einem Anstieg der Zahl α -Caspase-3 positiver Zellen. In Untersuchungen wurde zudem mittels elektrophysiologischer Methoden festgestellt, dass sich das Muster der spontanen Netzwerkaktivität in organotypischen Schnittkulturen durch die Blockade von GABA_A-R nachhaltig verändert (Heck et al., 2007). Weiterhin ist in verschiedenen Studien im unreifen Kortex eine exzitatorische Wirkung von GABA nachgewiesen worden (Luhmann und Prince, 1991; Owens et al., 1996; Achilles et al., 2007), so dass eine synergistische Wirkung von iGluRs und GABA_A-Rs auf das Überleben unreifer neokortikaler Neurone möglich erscheint.

Die Signaltransduktion infolge der Aktivierung von iGluRs spielt eine entscheidende Rolle für das Überleben kortikaler Neurone in Schnittkulturen des neonatalen Kortex. Nach der Inhibierung von AMPA/Kainat- oder NMDA-Rs kommt es in den organotypischen Schnittkulturen zu einem 2- bis 2,5-fachen Anstieg der Zahl α -Caspase-3 positiver Zellen.

Bisherige Studien zeigten, dass AMPA-R Aktivität eine Stimulation von L-VDCCs und eine erleichterte Aktivierung von NMDA-Rs bedingt (Nowak et al., 1984; Herron et al., 1986; Marshall et al., 2003). Durch Blockade von AMPA/Kainat-Rs oder AMPA-Rs konnte bereits gezeigt werden, dass das Überleben von Körnerzellen des Zerebellums (Marshall et al., 2003) und GABAerger Neurone des unreifen Neokortex (de Lima et al., 2004) von der Aktivität dieser Rezeptoren abhängt.

Desweiteren konnte eine essentielle Rolle besonders der NMDA-Rs während des aktivitätsabhängigen Überlebens in der frühen kortikalen Entwicklung in neuronalen Kulturen (Hwang et al., 1999; Yoon et al., 2003) und *in vivo* (Ikonomidou et al., 1999;

Tome et al., 2006) demonstriert werden. Bei Mäusen ohne funktionelle NMDA-Rs konnte ebenfalls eine 2-fache Erhöhung der Zahl apoptotischer Zellen festgestellt werden. Dieser Zelltod war Caspase-3 und BAX-abhängig (Adams et al., 2004; Rivero Vaccari et al., 2006). Diese Erkenntnisse sind besonders im Hinblick auf das fötale Alkoholsyndrom bedeutsam, das durch intrauterinen Kontakt mit Ethanol, der als NMDA-R Antagonist und GABA_A-R Agonist wirkt, ausgelöst wird (Streissguth und O'Malley, 2000). Charakterisiert ist dieser pathologische Zustand durch kognitive Verhaltensstörungen infolge einer Reduzierung der Gehirnmasse aufgrund der massiven Erhöhung des programmierten Zelltodes während der Embryonalentwicklung (Young und Olney, 2006).

Selektive Blockade von NR2A oder NR2B Untereinheiten von NMDA-R führte zu dem erwarteten Ansteigen der Zahl a-Caspase-3 positiver Neurone in kortikalen Schnittkulturen, allerdings mit unterschiedlichem zeitlichen Muster. Anscheinend spielen diese NMDA-R Untereinheiten verschiedene Rollen während des aktivitätsabhängigen Überlebens. Die Blockade von NR2A enthaltenden NMDA-Rs führte zu einem schnellen Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen nach 6 h und einem folgenden Abfallen der Anzahl a-Caspase-3 positiver Neurone nach 12 h und 24 h. Im Gegenzug konnte nach der Inhibition von NR2B enthaltenden NMDA-Rs eine verzögerte Erhöhung der Zahl a-Caspase-3 positiver Zellen beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass NMDA-Rs sowohl kurzzeitige als auch langfristige Einflüsse auf das neuronale Überleben ausüben können (Papadia et al., 2005; Soriano et al., 2006). Dabei spielen unterschiedliche Signalwege eine Rolle. Die Signaltransduktion über die NR2B Untereinheit erfolgt spezifisch über ERK (Krapivinsky et al., 2003) und führt zu einer Phosphorylierung von CREB, welches die Expression überlebensfördernder Proteine induziert (Hardingham und Bading, 2003; Papadia et al., 2005). Demgegenüber wird die kurzfristige neuroprotektive Wirkung von NMDA-Rs über den PI3K/Akt-Weg vermittelt und verläuft unabhängig von der CREB-Phosphorylierung und nukleären Kalziumtransienten (Papadia et al., 2005). Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass langfristige neuroprotektive Effekte von NMDA-Rs über NR2B realisiert werden, während NR2A Untereinheiten eine kurzfristige Neuroprotektion vermittelt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen weiterhin, dass trotz der Blockade von NMDA-Rs, kortikale Neurone durch alternative überlebensfördernde Signalwege gerettet werden können. Eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration hatte ein besseres Überleben von kortikalen Neuronen unter Kontrollbedingungen zur Folge. Durch die

Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration bei gleichzeitiger Applikation von CPP wurden deutlich weniger α -Caspase-3 positive Zellen beobachtet als in CPP allein. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits in verschiedenen Kulturen unterschiedlicher Neurone gezeigt werden (Koh et al., 1995; Kew et al., 1996; Hwang et al., 1999).

Dieser überlebensfördernde Effekt einer erhöhten $[K^+]_{ex}$ konnte durch Nifedipin, einen Antagonisten von L-VDCCs, unterdrückt werden. Daraus folgt, dass der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration infolge der durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration ausgelösten Membrandepolarisation über L-VDCCs erfolgt. Diese stellen einen alternativen überlebensfördernden Signalweg zu NMDA-Rs dar (Ghosh et al., 1994; Tao et al., 1998). Der Kalziumeinstrom über L-VDCCs oder NMDA-Rs führt über verschiedene Signalwege zur Phosphorylierung von CREB und damit zur Expression überlebensfördernder Proteine sowie zur Inhibition der Synthese proapoptotischer Proteine (Ghosh et al., 1994; Tao et al., 1998; Hardingham et al., 2001; Marshall et al., 2003). Eine erhöhte Phosphorylierung von CREB konnte unter diesen Bedingungen in kortikalen organotypischen Schnittkulturen demonstriert werden (Heck et al., 2007).

Der überlebensfördernde Effekt der erhöhten $[K^+]_{ex}$ war weiterhin abhängig von den Signalwegen über den TrkB- bzw. TrkC-Rezeptor, was eindrucksvoll durch den Anstieg der Anzahl α -Caspase-3 positiver Neurone nach Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität dieser BDNF-, NT-3 und NT-4/5 spezifischen Rezeptoren gezeigt werden konnte. Nach Erhöhung der $[K^+]_{ex}$ wurde in organotypischen Schnittkulturen des neonatalen Mäuse neokortex eine transiente Erhöhung der Netzwerkaktivität beobachtet (Heck et al., 2007). Der Einfluss von neuronaler Aktivität auf die Freisetzung von BDNF konnte in vielen Studien gezeigt werden (Balkowiec und Katz, 2000; Hartmann et al., 2001; Lessmann et al., 2003; Brigadski et al., 2005; Kolarow et al., 2007).

Daraus ergibt sich, dass sich in einem physiologischen Netzwerk die Signalwege über den NMDA-R und L-VDCC ergänzen und der Einstrom von Kalziumionen eine essentielle Komponente des neuronalen Überlebens darstellt (Abb. 25) (Hara und Snyder, 2007).

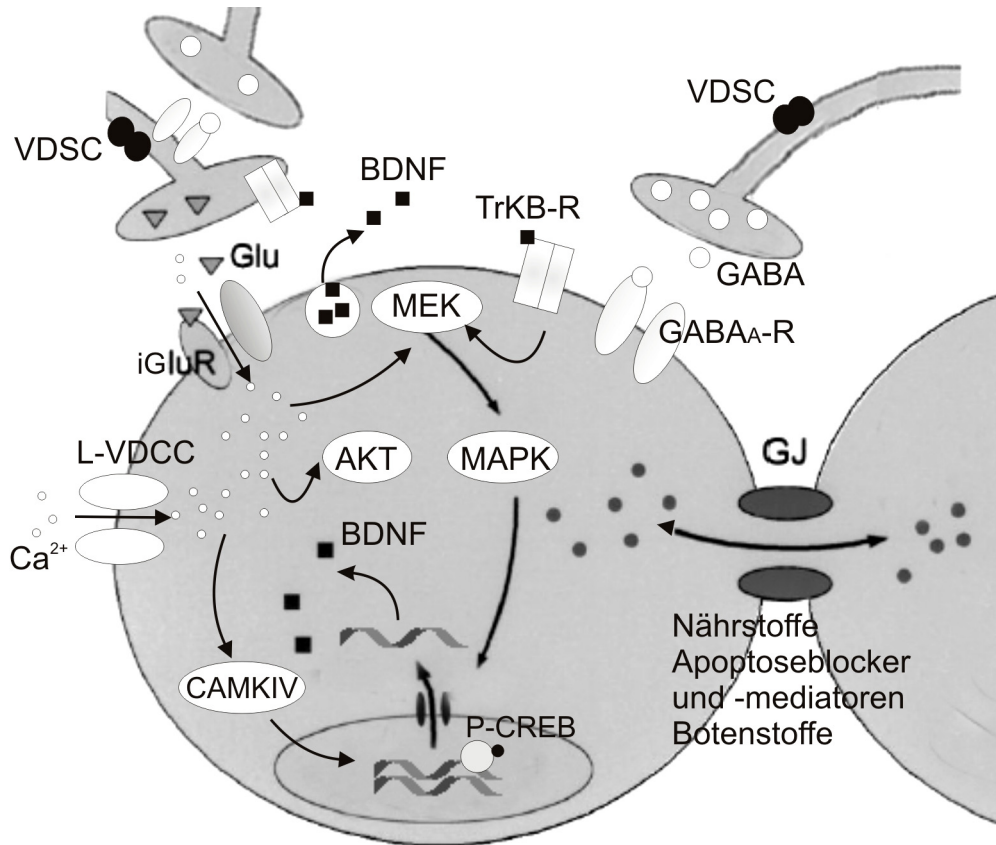


Abb. 25 Aktivitätsabhängiges Überleben in kortikalen Kulturen: Schematisch dargestellt sind vereinfacht die Somata zweier über GJ gekoppelter kortikaler Neurone sowie Synapsen weiterer Neurone des Netzwerkes. Die wichtigsten Signalwege des aktivitätsabhängigen Überlebens sind ebenso gezeigt. Die Pfeile stehen jeweils für die Aktivierung entsprechender Proteine bzw. für die Ausschüttung von BDNF und den GJ vermittelten Transport. Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, tragen zahlreiche Ionenkanäle dazu bei, das Überleben kortikaler Neurone zu sichern. Spannungsabhängige Natriumkanäle (VDSC) sind essentiell für die Generierung von Netzwerkaktivität. Für die Synchronisation dieser Aktivität spielen $GABA_A$ -Rs, iGluRs und GJs eine wichtige Rolle. L-VDCCs und iGluRs aktivieren über den Einstrom von Kalziumionen verschiedene Signalwege, die unter anderem zur CREB-vermittelten Synthese von überlebensfördernden Proteinen führen. Eines dieser Proteine ist BDNF, das aktivitätsabhängig freigesetzt wird und über Trk-Rezeptoren (Trk-R) Signalwege des neuronalen Überlebens autokrin und präsynaptisch aktiviert (modifiziert nach Kandler und Katz, 1998).

5.2 Echtzeitanalyse der Caspase-3 abhängigen Apoptose in neonatalen kortikalen Neuronen

Caspasen sind heterotetramere Proteasen, die konstitutiv als Procaspasen exprimiert werden (Riedl und Shi, 2004). Unter Apoptose stimulierenden Bedingungen dimerisieren Initiatorcaspasen und aktivieren sich dadurch autokatalytisch (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004; Green, 2005). Im Folgenden schneiden sie die Effektorcaspasen proteolytisch, wodurch diese aktiviert werden (Shi, 2004) und durch Hydrolyse verschiedener Proteine die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose induzieren.

Verschiedene Detektionsmethoden sind verfügbar, um diese Veränderungen kenntlich zu machen. Allerdings eignen sie sich kaum für Untersuchungen der Kinetik der Apoptose, da sie nur in fixiertem Gewebe anwendbar sind, zum Teil unspezifisch auch andere Arten des Zelltodes detektieren (Dikranian et al., 2001; Ikonomidou et al., 2001) oder nur für eine späte Phase der Apoptose anwendbar sind (Collins et al., 1997). Einige Nachweismethoden des apoptotischen Zelltodes in lebenden Zellen nutzen die Detektion der aktivierten Caspase-3, eines Schlüsselenzyms apoptotischer Signalwege. Bei diesen Nachweismethoden werden meist fluorochrome Substrate oder Inhibitoren der Caspase-3 eingesetzt (Tyas et al., 2000; Amstad et al., 2001). Die Aktivierung der Caspase-3 wird durch Änderungen der Fluoreszenzintensität oder im Falle des *fluorescence resonance energy transfers* (FRET) der relativen Fluoreszenzintensitäten zweier Fluorophore bestimmt (Kawai et al., 2004; Elphick et al., 2006). Allerdings benötigt man für diese Nachweismethode feine Messsysteme und einen hohen technischen Aufwand.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe dissoziierter Kulturen des neonatalen Kortex eine Methode etabliert, die eine einfache Nachweismethode der Caspase-3 Aktivierung in Echtzeitexperimenten ermöglicht. Dissoziierte Kulturen des neonatalen Kortex der Maus wurden mittels der Kalziumphosphatpräzipitation mit dem pCaspase3-sensor Vektor transfiziert. Dieses Plasmid wurde bereits erfolgreich zum Nachweis der Apoptose in nicht-neuronalen Zelllinien genutzt (Vos et al., 2003; Almeida et al., 2005; Elam et al., 2005). Die Translokation dieses Proteins infolge der Caspase-3 Aktivierung wurde mit Hilfe eines Konfokalmikroskops in individuellen Neuronen observiert und nachfolgend quantifiziert. Um die Translokation des tCaspase3-sensors zu verfolgen, ist Konfokalität hilfreich, aber nicht notwendig. Epifluoreszenzmikroskopie ist ausreichend, um die Diffusion des Proteins in den Zellkern zu beobachten. Die quantitative Analyse der Translokation wurde genutzt, um die Methode genauer zu charakterisieren. Sie ist jedoch nicht zwingend erforderlich, um die Aktivierung der Caspase-3 zu detektieren.

Um die Spezifität der Methode zu beurteilen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Als Apoptosestimuli diente in allen Experimenten Staurosporin, ein Kinaseinhibitor, der die Apoptose über den mitochondrialen Weg initiiert (Koh et al., 1995; Krohn et al., 1998; Budd et al., 2000). Durch einen Breitband-Caspaseinhibitor (Z-VAD-FMK) konnte nachgewiesen werden, dass die Translokation des tCaspase3-sensors von der Aktivität der Caspasen abhing. Nach Inkubation mit dem Caspaseinhibitor zeigten signifikant weniger Neurone eine Translokation des Fluoreszenzsignals in Gegenwart von Staurosporin als ohne diesen Antagonisten.

Das DEVD-Motif des Caspase3-sensors wird selektiv von Caspase-3 gespalten (Lazebnik et al., 1994; Thornberry et al., 1997; Vaughan et al., 2002; Fang et al., 2006). Allerdings wird es auch von Caspase-7 erkannt (Thornberry et al., 1997). Dabei besitzt in der Maus, im Gegensatz zum Menschen, Caspase-7 *in vitro* dieselbe Substratspezifität und Effektivität wie Caspase-3 (Houde et al., 2004). Caspase-7 ist jedoch nur in einigen Mauslinien im ZNS ebenso stark exprimiert wie Caspase-3 (Lakhani et al., 2006). In anderen Mauslinien und in der Ratte ist Caspase-7 hingegen nicht oder nur in geringen Mengen im Gehirn detektierbar (Juan et al., 1997; Shimohama et al., 2001; Houde et al., 2004). Diese genetischen Unterschiede verschiedener Inzuchtlinien erklären auch, warum in einigen *knock out* Studien ein Defizit an Caspase-3 Aktivität zu perinataler Letalität führte (Kuida et al., 1996; Pompeiano et al., 2000), während in anderen ein nur milder oder von der Kontrollgruppe nicht zu unterscheidender Phänotyp beobachtet wurde (Houde et al., 2004; Lakhani et al., 2006).

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass die Translokation des tCaspase3-sensors zu 100 % mit dem immunzytochemischen Nachweis der aktivierten Caspase-3 korrelierte. Daraus folgt, dass in dissoziierten Kulturen des neonatalen Kortex die Translokation des tCaspase3-sensors ein spezifischer Nachweis für die Aktivierung der Caspase-3 ist.

Der Vorteil, Apoptose anhand der Aktivierung der Caspase-3 nachzuweisen, liegt in der Tatsache, dass Zellen in einer frühen Phase des apoptotischen Prozesses beobachtet werden können, noch bevor starke morphologische Veränderungen ausgeprägt sind (Davoli et al., 2002; Lakhani et al., 2006). So konnten in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten Zellen beobachtet werden, die eine Translokation des Fluoreszenzsignals zeigten, morphologisch von den a-Caspase-3 negativen Zellen nicht zu unterscheiden waren und noch keine Fragmentierung der DNS zeigten. Diese DNS-Fragmentierung wurde mit Hilfe der TUNEL-Färbung überprüft, die einen späten Zeitpunkt der Apoptose

markiert. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Kollokalisierung der Translokation des tCaspase3-sensors mit der TUNEL-Färbung nur in Zellen nachgewiesen werden, die ihre neuronale Morphologie bereits weitgehend verloren hatten. Daraus folgt, dass der Caspase3-sensor eine zeitnahe Detektion der Aktivierung der Caspase-3 erlaubt, noch bevor sich die zelluläre Morphologie und die nukleäre Struktur verändern.

Eine Frage, die sich für die Anwendbarkeit dieser Methode ergibt, ist die Länge der Zeitspanne zwischen Initiierung des Apoptoseprogramms und der Beobachtung der tCaspase3-sensor Translokation. Zwei Prozesse tragen zu diesem Zeitintervall bei. Der erste ist die Zeitspanne zwischen der Initiierung der Apoptose und der Aktivierung der Caspase-3. Zweitens spielt die Zeit, die für die Spaltung und den nukleären Transport des Caspase3-sensors benötigt wird, eine große Rolle. Dabei ist es wichtig, genau zu definieren, welches Ereignis als Startpunkt der Apoptose zu verstehen ist. Zahlreiche Arbeiten bezeichnen die während der frühen Phase der Apoptose auftretenden Veränderungen der Mitochondrien als den „*point of no return*“ der Caspase-3 abhängigen Apoptose (Kroemer und Reed, 2000; Cregan et al., 2004; Broker et al., 2005; Green, 2005).

Aus bestehenden Arbeiten geht hervor, dass das Zeitintervall zwischen den ersten mitochondrialen Veränderungen und der Aktivierung von Caspasen ca. zehn Minuten beträgt (Green, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Fusionsproteine, die an das NLS des *Simian virus large T-antigen* gekoppelt sind, effektiv in den Zellkern transportiert werden (Lanford et al., 1986; Lanford et al., 1990; Yoneda et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit konnten kurze Translokationszeiten von ca. 30 bzw. 45 Minuten für das EYFP Signal beobachtet werden, was dafür spricht, dass der tCaspase3-sensor schnell und effektiv in den Zellkern transportiert wird.

Um Aussagen über die Kinetik der Caspase-3 abhängigen Apoptose mit dem Caspase3-sensor treffen zu können, ist es weiterhin von Bedeutung, auszuschließen, dass das Transfektionsprotokoll mit der Überlebensfähigkeit der Neurone interferiert. Dazu wurde die Zahl der Neurone mit a-Caspase-3 unter Kontroll- und apoptoseinduzierenden Kulturbedingungen in transfizierten und nicht transfizierten Kulturen bestimmt. In beiden Kulturkonditionen zeigte sich unter dem Einfluss von Staurosporin ein deutlicher Anstieg der Zahl a-Caspase-3 positiver Neurone. Dieser war in transfizierten Neuronen nicht verschieden von nicht transfizierten Neuronen. Auch unter Kontrollbedingungen war die Zahl a-Caspase-3 positiver Neurone in der Population der transfizierten Neurone nicht signifikant verschieden von der der nicht transfizierten Neurone. Zusammengefasst

folgt aus diesen Ergebnissen, dass das Transfektionsprotokoll die Überlebensfähigkeit oder Empfindlichkeit der kortikalen Neurone gegenüber apoptotischen Stimuli nicht veränderte. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Transfektion mit dem pCaspase3-sensor Vektor ein zuverlässiges, spezifisches und einfach anzuwendendes Mittel ist, um kinetische Parameter der Caspase-3 abhängigen Apoptose zu untersuchen.

5.3 Der Einfluss der extrazellulären Kaliumkonzentration auf das Überleben neokortikaler Neurone unter dem Entzug trophischer Faktoren

Die Bedeutung neurotropher Faktoren für das Überleben vieler Neuronenpopulationen ist seit Langem bekannt (Levi-Montalcini und Hamburger, 1953; Oppenheim, 1991; Oppenheim, 1996; Frade und Barde, 1999; Depaepe et al., 2005; Putz et al., 2005). Prominentestes Beispiel dafür sind sympathische Neurone, die ohne die ständige Versorgung mit *nerve growth factor* (NGF) sterben (Sadoul et al., 1996; Deshmukh und Johnson, Jr., 1997; Crowder und Freeman, 1998). In der postnatalen Entwicklung ändert sich die überlebenssichernde Rolle der Neurotrophine für zahlreiche Neuronenpopulationen zu einer Beeinflussung von Differenzierung und neuronaler Funktion (Huang und Reichardt, 2001; Murer et al., 2001; Lessmann et al., 2003).

Dies und die Tatsache, dass unterschiedliche Neurone trotz des Entzugs trophischer Faktoren überleben, wenn $[K^+]_{ex}$ erhöht wird (Gallo et al., 1987; Koike et al., 1989; Kew et al., 1996), führten neben der Neurotrophinhypothese zu der Formulierung der „Kalzium *set point*“ Hypothese (Koike et al., 1989; Bonfoco et al., 1995; Koh et al., 1995; Hwang et al., 1999). Diese besagt, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration entscheidend für den Grad der Neurotrophinabhängigkeit eines Neurons ist. Demnach sind niedrige intrazelluläre Kalziumkonzentrationen für die Abhängigkeit von trophischen Faktoren verantwortlich, während sehr hohe Kalziumkonzentrationen exzitotoxisch wirken. Im intermediären Bereich vermitteln die Kalziumkonzentrationen hingegen eine Unabhängigkeit von Neurotrophinen (Koike et al., 1989). Tatsächlich konnte an sympathischen Neuronen in Kultur gezeigt werden, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration mit zunehmender Kulturzeit ansteigt und mit der Unabhängigkeit von NGF korreliert ist (Koike und Tanaka, 1991).

Erhöhte $[K^+]_{ex}$ führen durch die chronische Depolarisation der Membran zu einem L-VDCC vermittelten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Phillipson und Sandler, 1975; Nishi und Berg, 1981; Nowycky et al., 1985). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Überleben von kortikalen Neuronen in Abwesenheit neurotropher Faktoren maßgeblich von der extrazellulären Kaliumkonzentration abhängt. NB/B27 beinhaltet 5,3 mM Kalium (Brewer et al., 1993). Diese Konzentration wurde daher auch als Standardkonzentration gewählt. In 5,3 mM und einer höheren $[K^+]_{ex}$, 8 mM, überlebten viele der untersuchten Neurone bis zu 12 Stunden ohne trophische Faktoren.

Die Caspase-3 Aktivierung in nicht überlebenden Neuronen erfolgte außerdem zu einem signifikant späteren Zeitpunkt als in den niedrigeren $[K^+]_{ex}$, 3 mM und 1,5 mM.

Apoptose aufgrund niedriger $[K^+]_{ex}$ im Zusammenhang mit dem Entzug trophischer Faktoren wurde bisher vor allem an Körnerzellen des Zerebellums untersucht (Gallo et al., 1987; Isaev et al., 2000; D'Mello et al., 2000; Yamagishi et al., 2005; Bazan-Peregrino et al., 2007). Von diesen Neuronen ist bekannt, dass sie sehr hohe $[K^+]_{ex}$ zum Überleben *in vitro* benötigen. Werden sie niedrigen $[K^+]_{ex}$ ausgesetzt, werden überlebenssichernde Signalwege über die PI3K inhibiert (Harris et al., 2002). Des Weiteren werden Signalwege aktiviert, die über JNK zum apoptotischen Zelltod der Neurone führen (Estus et al., 1994; Watson et al., 1998; Yamagishi et al., 2005). Dieser scheint über Caspase-3 abhängige und unabhängige Mechanismen zu verlaufen (Miller et al., 1997; D'Mello et al., 2000; Harris et al., 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein Caspase-3 abhängiger Zelltod von kortikalen Neuronen in niedrigen $[K^+]_{ex}$ und in Abwesenheit von trophischen Faktoren beobachtet werden, während höhere $[K^+]_{ex}$ eine neuroprotektive Wirkung unter dem Entzug trophischer Faktoren vermittelten.

6. Ausblick

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist $[K^+]_{ex}$ ein entscheidender Faktor für das Überleben kortikaler Neurone in der Phase der Neurotrophinabhängigkeit. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass kortikale Netzwerke mit steigender $[K^+]_{ex}$ leichter erregbar, aber weniger synchronisiert sind (Canepari et al., 1997). Weiterhin ist bekannt, dass eine starke Erhöhung der $[K^+]_{ex}$ in hippocampalen Schnitten zu epileptiformer Aktivität führt, die durch GABA_A-Rs reguliert wird (Khazipov et al., 2004; Isaev et al., 2007).

Daher ist es interessant, die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen dissoziierten kortikalen Netzwerke mittels eines MEA-Systems auf die Korrelation spontaner Aktivität innerhalb des Netzwerkes bzw. die Veränderung der Aktivitätsmuster in unterschiedlichen $[K^+]_{ex}$ zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits demonstriert werden, dass die dissoziierte neokortikale Kultur nach 1 Woche *in vitro* zunehmend korrelierte Aktivität zeigte. Am Ende der zweiten Woche *in vitro* hatten sich bestimmte Muster von über viele Elektroden hinweg korrelierter Aktivität entwickelt. Diese zunehmende Synchronisierung der elektrischen Netzwerkaktivität in neokortikalen Kulturen wurde bereits beschrieben (Voigt et al., 1997; Opitz et al., 2002; Wagenaar et al., 2005; Sun unveröffentlichte Beobachtungen).

Erste Experimente mit 2 Wochen alten neokortikalen Kulturen in unterschiedlichen $[K^+]_{ex}$ deuten darauf hin, dass die Aktivität des neuronalen Netzwerkes in ACSF mit einer $[K^+]_{ex}$ von 1,5 mM und 3 mM wesentlich geringer ist als in dem Kulturmedium NB/B27. Dagegen entspricht sie in 5,3 mM $[K^+]_{ex}$ der in NB/B27 gemessenen spontanen Aktivität. Dies steht in Übereinstimmung mit oben genannten Studien, die ebenfalls eine Zunahme der elektrischen Aktivität von Neuronen in Abhängigkeit von der $[K^+]_{ex}$ nachweisen konnten.

Weiterhin kann durch kalziumsensitive Farbstoffe, wie *Calcium Green*, überprüft werden, ob diese Aktivitätsmuster mit transienten Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration korrelieren. Diese können dann mit möglichen anti- oder proapoptischen Effekten in Verbindung gesetzt werden. Dies könnte z. B. durch die Untersuchung des Gehaltes an phosphoryliertem CREB in den mit unterschiedlichen $[K^+]_{ex}$ inkubierten kortikalen Kulturen erfolgen. In weiteren Experimenten könnte versucht werden, Nervenzellen in niedrigen $[K^+]_{ex}$ elektrisch zu stimulieren und gleichzeitig die Aktivierung der Caspase-3 zu untersuchen und so Aktivitätsmuster zu bestimmen, die für das Überleben kortikaler Neurone entscheidend sind.

7. Zusammenfassung

Der programmierte Zelltod spielt eine entscheidende Rolle während der normalen Entwicklung des zentralen Nervensystems. Elektrische Aktivität und die Versorgung mit trophischen Faktoren sind ausschlaggebend für das Überleben eines Neurons. Besonders der Netzwerkaktivität, die die Freisetzung von Neurotrophinen bewirkt, scheint eine Schlüsselfunktion in der aktivitätsabhängigen Kontrolle der Apoptose zuzukommen.

Um zu untersuchen, welche zellulären Prozesse die aktivitätsabhängige Apoptose in organotypischen Schnittkulturen des neonatalen zerebralen Kortex verhindern können, wurde in der vorliegenden Arbeit immunzytochemisch das Auftreten von α -Caspase-3, einem Schlüsselenzym der Apoptose, nach pharmakologischer Beeinflussung von Ionenkanälen und membranständigen Rezeptoren analysiert.

Die vollständige Unterdrückung neuronaler Aktivität führte zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl α -Caspase-3 positiver Zellen. Ein ähnlicher Anstieg der Zahl α -Caspase-3 positiver Neurone konnte durch Applikation von CNQX, einem Antagonisten von ionotropen nicht-NMDA Glutamatrezeptoren, oder CPP, einem NMDA-R Blocker, induziert werden. Damit konnte die Bedeutung der iGluRs für das Überleben unreifer kortikaler Neurone gezeigt werden.

Ifenprodil und NVP-AAM077, Inhibitoren der NMDA-Rezeptoruntereinheiten, NR2B und NR2A, zeigten die Bedeutung dieser Untereinheiten für eine lang- (NR2B) bzw. kurzfristige (NR2A) Überlebenssicherung. Eine chronische Depolarisierung der Neurone durch die Erhöhung der $[K^+]_{ex}$ führte zum Überleben von Zellen, die anderenfalls unter dem Einfluss einer NMDA-Rezeptorblockade eine Aktivierung der Caspase-3 zeigten. Dieser Effekt wurde durch Inhibition von L-VDCCs oder TrkB- und TrkC-Rs aufgehoben. Zusammengenommen deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass das Zusammenspiel von iGluRs und L-VDCCs nötig ist, um das Überleben unreifer kortikaler Neurone zu sichern und dass die Signalübertragung über L-VDCCs und TrkB- und TrkC-Rs den Verlust des Signalweges über NMDA-Rs kompensieren kann.

Im Weiteren wurde eine Methode etabliert, mit deren Hilfe eine Echtzeitanalyse der Caspase-3 abhängigen Apoptose in kortikalen Neuronen ermöglicht wurde. Dazu wurden dissoziierte kortikale Kulturen mit dem pCaspase3-sensor Vektor transfiziert. Das durch dieses Plasmid codierte fluoreszente Protein wird durch Caspase-3 gespalten, und der tCaspase3-sensor transloziert daraufhin in den Nukleus. Im Gegensatz zu anderen fluoreszenten Molekülen, die zur Detektion der Caspase-3 Aktivierung genutzt werden, erlaubt der Caspase3-sensor die Echtzeitanalyse der Apoptose ohne großen

experimentellen Aufwand und ohne sensitive Messgeräte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Caspase3-sensor spezifisch für die Aktivierung der Caspase-3 ist und die Überlebensfähigkeit der transfizierten Neurone durch das Transfektionsprotokoll nicht beeinflusst wird. Weiterhin erfolgte die Translokation des tCaspase3-sensors zeitnah zu der Aktivierung der Caspase-3, was diesen Vektor zu einem wertvollen Marker für einen frühen Zeitpunkt des apoptotischen Prozesses macht. Somit eignet sich dieser Vektor für Fragestellungen, bei denen die Kinetik der Caspase-3 abhängigen Apoptose untersucht werden soll.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Vektor genutzt, um den Einfluss der $[K^+]_{ex}$ auf den Zeitpunkt der Aktivierung von Caspase-3 unter dem Entzug trophischer Faktoren zu studieren. So zeigen kortikale Neurone in hohen $[K^+]_{ex}$ und der Abwesenheit trophischer Faktoren eine signifikant spätere Aktivierung der Caspase-3 als in niedrigen $[K^+]_{ex}$. Dadurch konnte erstmals gezeigt werden, dass das Überleben unreifer kortikaler Neurone und der Zeitpunkt der Caspase-3 Aktivierung unter dem Entzug trophischer Faktoren maßgeblich von der $[K^+]_{ex}$ abhängt.

Literaturverzeichnis

Achilles K, Okabe A, Ikeda M, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Fukuda A, Luhmann HJ, Kilb W (2007) Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na⁺-dependent K⁺-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons. *J Neurosci* 27: 8616-8627.

Adams SM, Rivero Vaccari JC, Corriveau RA (2004) Pronounced cell death in the absence of NMDA receptors in the developing somatosensory thalamus. *J Neurosci* 24: 9441-9450.

Alitto HJ, Usrey WM (2003) Corticothalamic feedback and sensory processing. *Curr Opin Neurobiol* 13: 440-445.

Allendoerfer KL, Shatz CJ (1994) The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu Rev Neurosci* 17: 185-218.

Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S (2005) Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem* 280: 41342-41351.

Amstad PA, Yu G, Johnson GL, Lee BW, Dhawan S, Phelps DJ (2001) Detection of caspase activation in situ by fluorochrome-labeled caspase inhibitors. *Biotechniques* 31: 608-10, 612, 614, passim.

Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128: 353-363.

Arnold FJL, Hofmann F, Bengtson CP, Wittmann M, Vanhoutte P, Bading H (2005) Microelectrode array recordings of cultured hippocampal networks reveal a simple model for transcription and protein synthesis-dependent plasticity. *J Physiol (Lond)* 564: 3-19.

Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J* 22: 4385-4399.

Arnoult D, Parone P, Martinou JC, Antonsson B, Estaquier J, Ameisen JC (2002) Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol* 159: 923-929.

Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34: 325-337.

Balkowiec A, Katz DM (2000) Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J Neurosci* 20: 7417-7423.

Balkowiec A, Katz DM (2002) Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci* 22: 10399-10407.

- Barde YA (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2: 1525-1534.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) Cell death in the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol* 23: 1221-1230.
- Bazan-Peregrino M, Gutierrez-Kobeh L, Moran J (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in the protective action of N-methyl-D-aspartate in the apoptotic death of cerebellar granule neurons induced by low potassium. *J Neurosci Res* 85: 332-341.
- Becker EB, Bonni A (2006) Pin1 mediates neural-specific activation of the mitochondrial apoptotic machinery. *Neuron* 49: 655-662.
- Ben Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24: 353-360.
- Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onteniente B (2001) Specific Caspase Pathways Are Activated in the Two Stages of Cerebral Infarction. *J Neurosci* 21: 7127-7134.
- Benn SC, Woolf CJ (2004) Adult neuron survival strategies - slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci* 5: 686-700.
- Berberich S, Punnakkal P, Jensen V, Pawlak V, Seeburg PH, Hvalby O, Kohr G (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 25: 6907-6910.
- Bhakar AL, Howell JL, Paul CE, Salehi AH, Becker EB, Said F, Bonni A, Barker PA (2003) Apoptosis induced by p75^{NTR} overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. *J Neurosci* 23: 11373-11381.
- Bielas S, Higginbotham H, Koizumi H, Tanaka T, Gleeson JG (2004) Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 593-618.
- Blaschke AJ, Staley K, Chun J (1996) Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 122: 1165-1174.
- Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmund MJ (2002) *Fundamental Neuroscience (CD-ROM)*. Academic Press Inc., USA: Auflage 2
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7162-7166.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286: 1358-1362.
- Bossy-Wetzel E, Talantova MV, Lee WD, Scholzke MN, Harrop A, Mathews E, Gotz T, Han J, Ellisman MH, Perkins GA, Lipton SA (2004) Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels. *Neuron* 41: 351-365.

- Boulder Committee (1970). Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anatomical Record*, 166: 257-262.
- Brauer M (2003) In vivo monitoring of apoptosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 323-331.
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35: 567-576.
- Brigadski T, Hartmann M, Lessmann V (2005) Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *J Neurosci* 25: 7601-7614.
- Broker LE, Kruyt FAE, Giaccone G (2005) Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin Cancer Res* 11: 3155-3162.
- Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA (2000) Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *PNAS* 97: 6161-6166.
- Burne JF, Staple JK, Raff MC (1996) Glial cells are increased proportionally in transgenic optic nerves with increased numbers of axons. *J Neurosci* 16: 2064-2073.
- Buss RR, Oppenheim RW (2004) Role of programmed cell death in normal neuronal development and function. *Anat Sci Int* 79: 191-197.
- Canepari M, Bove M, Maeda E, Cappello M, Kawana A (1997) Experimental analysis of neuronal dynamics in cultured cortical networks and transitions between different patterns of activity. *Biol Cybern* 77: 153-162.
- Catalano SM, Shatz CJ (1998) Activity-dependent cortical target selection by thalamic axons. *Science* 281: 559-562.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94: 727-737.
- Chan WY, Lorke DE, Tiu SC, Yew DT (2002) Proliferation and apoptosis in the developing human neocortex. *Anat Rec* 267: 261-276.
- Chen CA, Okayama H (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6: 632-638.
- Christie MJ, Williams JT, North RA (1989) Electrical coupling synchronizes subthreshold activity in locus coeruleus neurons in vitro from neonatal rats. *J Neurosci* 9: 3584-3589.
- Chun JJ, Shatz CJ (1989) Interstitial cells of the adult neocortical white matter are the remnant of the early generated subplate neuron population. *J Comp Neurol* 282: 555-569.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105: 7-17.
- Clarke PG, Clarke S (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* 193: 81-99.

- Clarke PG, Posada A, Primi MP, Castagne V (1998) Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother* 52: 356-362.
- Cohen, S. (1960) Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46, 302-311.
- Collin R (1906) Histolyse de certains neuroblastes an cours du développement du tube nerveux chez le poulet. *CR Soc Biol (Paris)* 60:1080-1081
- Collin R (1907) Recherches cytologiques sur le développement de la cellule nerveuse. *Névraxe* 8:181-309
- Collins JA, Schandi CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC (1997) Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 45: 923-934.
- Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DD, Stanfield BB (1984) Regressive events in neurogenesis. *Science* 225: 1258-1265.
- Cregan SP, Dawson VL, Slack RS (2004) Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23: 2785-2796.
- Crowder RJ, Freeman RS (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci* 18: 2933-2943.
- D'Mello SR, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P (2000) Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA fragmentation but not for cell death in neurons deprived of potassium. *J Neurosci Res* 59: 24-31.
- Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219.
- Davies AM (2003) Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *EMBO J* 22: 2537-2545.
- Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, Xanthoudakis S, Nicholson D, Robertson GS, Ng GY, Xu D (2002) Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience* 115: 125-136.
- de la Rosa EJ, de Pablo F (2000) Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci* 23: 454-458.
- de Lima AD, Opitz T, Voigt T (2004) Irreversible loss of a subpopulation of cortical interneurons in the absence of glutamatergic network activity. *Eur J Neurosci* 19: 2931-2943.
- Depaepe V, Suarez-Gonzalez N, Dufour A, Passante L, Gorski JA, Jones KR, Ledent C, Vanderhaeghen P (2005) Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* 435: 1244-1250.
- Deshmukh M, Johnson EM, Jr. (1997) Programmed cell death in neurons: focus on the pathway of nerve growth factor deprivation-induced death of sympathetic neurons. *Mol Pharmacol* 51: 897-906.

- Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, Labruyere J, Qin YQ, Ikonomidou C, Olney JW (2001) Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis* 8: 359-379.
- Dupont E, Hanganu IL, Kilb W, Hirsch S, Luhmann HJ (2006) Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature* 439: 79-83.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.
- Elam C, Hesson L, Vos MD, Eckfeld K, Ellis CA, Bell A, Krex D, Birrer MJ, Latif F, Clark GJ (2005) RRP22 is a farnesylated, nucleolar, Ras-related protein with tumor suppressor potential. *Cancer Res* 65: 3117-3125.
- Elphick LM, Meinander A, Mikhailov A, Richard M, Toms NJ, Eriksson JE, Kass GE (2006) Live cell detection of caspase-3 activation by a Discosoma-red-fluorescent-protein-based fluorescence resonance energy transfer construct. *Anal Biochem* 349: 148-155.
- Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM, Jr. (1994) Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 127: 1717-1727.
- Fang B, Boross PI, Tozser J, Weber IT (2006) Structural and Kinetic Analysis of Caspase-3 Reveals Role for S5 Binding Site in Substrate Recognition. *Journal of Molecular Biology* 360: 654-666.
- Feller MB (1999) Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22: 653-656.
- Feller MB, Scanziani M (2005) A precritical period for plasticity in visual cortex. *Curr Opin Neurobiol* 15: 94-100.
- Ferrer I, Bernet E, Soriano E, del Rio T, Fonseca M (1990) Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* 39: 451-458.
- Ferrer I, Soriano E, Del Rio JA, Alcantara S, Auladell C (1992) Cell death and removal in the cerebral cortex during development. *Prog Neurobiol* 39: 1-43.
- Finlay BL (1992) Cell death and the creation of regional differences in neuronal numbers. *J Neurobiol* 23: 1159-1171.
- Fishbein I, Segal M (2006) Miniature Synaptic Currents Become Neurotoxic to Chronically Silenced Neurons. *Cereb Cortex*.
- Flint AC, Dammerman RS, Kriegstein AR (1999) Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors in neocortical development causes neuronal calcium oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12144-12149.
- Frade JM, Barde YA (1999) Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 126: 683-690.

- Freeman RS, Estus S, Johnson EM, Jr. (1994) Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* 12: 343-355.
- Friedman WJ (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci* 20: 6340-6346.
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384: 201-232.
- Galli L, Maffei L (1988) Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. *Science* 242: 90-91.
- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7: 2203-2213.
- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M (2001) GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105: 521-532.
- Garaschuk O, Linn J, Eilers J, Konnerth A (2000) Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* 3: 452-459.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501.
- Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME (1994) Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263: 1618-1623.
- Gotz M, Sommer L (2005) Cortical development: the art of generating cell diversity. *Development* 132: 3327-3332.
- Gramowski A, Jugelt K, Weiss DG, Gross GW (2004) Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. *Eur J Neurosci* 19: 2815-2825.
- Green DR (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121: 671-674.
- Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94: 339-352.
- Hamburger V (1975) Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J Comp Neurol* 160: 535-546.
- Hanganu IL, Ben Ari Y, Khazipov R (2006) Retinal waves trigger spindle bursts in the neonatal rat visual cortex. *J Neurosci* 26: 6728-6736.
- Hansen HH, Briem T, Dzierko M, Sifringer M, Voss A, Rzeski W, Zdzisinska B, Thor F, Heumann R, Stepulak A, Bittigau P, Ikonomidou C (2004) Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 16: 440-453.

- Hara MR, Snyder SH (2007) Cell Signaling and Neuronal Death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 117-141.
- Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H (2001) Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci* 4: 261-267.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26: 81-89.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5: 405-414.
- Harris C, Maroney AC, Johnson EM (2002) Identification of JNK-dependent and -independent components of cerebellar granule neuron apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 83: 992-1001.
- Hartmann M, Heumann R, Lessmann V (2001) Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* 20: 5887-5897.
- Haubensak W, Narz F, Heumann R, Lessmann V (1998) BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical neurons. *J Cell Sci* 111 (Pt 11): 1483-1493.
- Haydar TF, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P (1999) The role of cell death in regulating the size and shape of the mammalian forebrain. *Cereb Cortex* 9: 621-626.
- Heck N, Golbs A, Riedemann T, Sun JJ, Lessmann V, Luhmann HJ (2007) Activity-Dependent Regulation of Neuronal Apoptosis in Neonatal Mouse Cerebral Cortex. *Cereb Cortex* bhm165.
- Henderson CE (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Neuron* 17: 579-585.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- Herron CE, Lester RA, Coan EJ, Collingridge GL (1986) Frequency-dependent involvement of NMDA receptors in the hippocampus: a novel synaptic mechanism. *Nature* 322: 265-268.
- Heumann D, Leuba G (1983) Neuronal death in the development and aging of the cerebral cortex of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol* 9: 297-311.
- Heumann D, Leuba G, Rabinowicz T (1978) Postnatal development of the mouse cerebral neocortex. IV. Evolution of the total cortical volume, of the population of neurons and glial cells. *J Hirnforsch* 19: 385-393.
- Ho SM, Waite PM (1999) Spontaneous activity in the perinatal trigeminal nucleus of the rat. *Neuroreport* 10: 659-664.
- Hotz MA, Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z (1994) Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes. *Cytometry* 15: 237-244.

Houde C, Banks KG, Coulombe N, Rasper D, Grimm E, Roy S, Simpson EM, Nicholson DW (2004) Caspase-7 expanded function and intrinsic expression level underlies strain-specific brain phenotype of caspase-3-null mice. *J Neurosci* 24: 9977-9984.

Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.

Hubel DH, Wiesel TN (1965) Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J Neurophysiol* 28: 1041-1059.

Hughes A (1965) A quantitative study of the development of the nerves in the hind-limb of *eleutherodactylus martinicensis*. *J Embryol Exp Morphol* 13: 9-34.

Hwang JY, Kim YH, Ahn YH, Wie MB, Koh JY (1999) N-Methyl-D-aspartate receptor blockade induces neuronal apoptosis in cortical culture. *Exp Neurol* 159: 124-130.

Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2001) Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 62: 401-405.

Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283: 70-74.

Innocenti GM, Price DJ (2005) Exuberance in the development of cortical networks. *Nat Rev Neurosci* 6: 955-965.

Isaev D, Isaeva E, Khazipov R, Holmes GL (2007) Shunting and hyperpolarizing GABAergic inhibition in the high-potassium model of ictogenesis in the developing rat hippocampus. *Hippocampus* 17: 210-219.

Isaev NK, Stelmashook EV, Halle A, Harms C, Lautenschlager M, Weih M, Dirnagl U, Victorov IV, Zorov DB (2000) Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in cultured rat cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium. *Neurosci Lett* 283: 41-44.

Jaattela M, Tschopp J (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 4: 416-423.

Juan TS, McNiece IK, Argento JM, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Fletcher FA (1997) Identification and mapping of Casp7, a cysteine protease resembling CPP32 beta, interleukin-1 beta converting enzyme, and CED-3. *Genomics* 40: 86-93.

Kaech S, Kim JB, Cariola M, Ralston E (1996) Improved lipid-mediated gene transfer into primary cultures of hippocampal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 35: 344-348.

Kallen B (1955) Cell degeneration during normal ontogenesis of the rabbit brain. *J Anat* 89: 153-161.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) *Principals of neural science*, McGraw-Hill Professional, USA; 4. Auflage; Kapitel 52: 1019ff

Kandler K, Katz LC (1998) Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication. *J Neurosci* 18: 1419-1427.

Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10: 381-391.

Katz LC, Crowley JC (2002) Development of cortical circuits: lessons from ocular dominance columns. *Nat Rev Neurosci* 3: 34-42.

Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-1138.

Kawai H, Suzuki T, Kobayashi T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kawanishi T (2004) Simultaneous imaging of initiator/effector caspase activity and mitochondrial membrane potential during cell death in living HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* 1693: 101-110.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.

Kew JN, Smith DW, Sofroniew MV (1996) Nerve growth factor withdrawal induces the apoptotic death of developing septal cholinergic neurons in vitro: protection by cyclic AMP analogue and high potassium. *Neuroscience* 70: 329-339.

Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben Ari Y, Holmes GL (2004) Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 19: 590-600.

Khazipov R, Luhmann HJ (2006) Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci* 29: 414-418.

Kilb W, Luhmann HJ (2003) Carbachol-induced network oscillations in the intact cerebral cortex of the newborn rat. *Cereb Cortex* 13: 409-421.

Klein JA, Ackerman SL (2003) Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest* 111: 785-793.

Koh JY, Wie MB, Gwag BJ, Sensi SL, Canzoniero LM, Demaro J, Csernansky C, Choi DW (1995) Staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Exp Neurol* 135: 153-159.

Kohrmann M, Haubensak W, Hemraj I, Kaether C, Lessmann VJ, Kiebler MA (1999) Fast, convenient, and effective method to transiently transfect primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 58: 831-835.

Koike T, Martin DP, Johnson EM, Jr. (1989) Role of Ca²⁺ channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: evidence that levels of internal Ca²⁺ determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6421-6425.

Koike T, Tanaka S (1991) Evidence that nerve growth factor dependence of sympathetic neurons for survival in vitro may be determined by levels of cytoplasmic free Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3892-3896.

- Kolarow R, Brigadski T, Lessmann V (2007) Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J Neurosci* 27: 10350-10364.
- Korsching S (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 13: 2739-2748.
- Kostovic I, Rakic P (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol* 297: 441-470.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R (2005) Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28: 670-676.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R (2007) Apoptosis-inducing factor: A matter of neuron life and death. *Prog Neurobiol* 81: 179-196.
- Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben Ari Y, Clapham DE, Medina I (2003) The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* 40: 775-784.
- Kriegstein AR (2005) Constructing circuits: neurogenesis and migration in the developing neocortex. *Epilepsia* 46 Suppl 7: 15-21.
- Kriegstein AR, Noctor SC (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* 27: 392-399.
- Kroemer G, Reed JC (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6: 513-519.
- Krohn AJ, Preis E, Prehn JH (1998) Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J Neurosci* 18: 8186-8197.
- Kruidering M, Evan GI (2000) Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB Life* 50: 85-90.
- Krysko DV, Leybaert L, Vandenabeele P, D'Herde K (2005) Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. *Apoptosis* 10: 459-469.
- Kuan CY, Flavell RA, Rakic P (2000a) Programmed cell death in mouse brain development. In: *Mouse Brain Development* (Goffinet AM, Rakic P, eds), pp 145-162. Heidelberg: Springer.
- Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P (2000b) Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends in Neurosciences* 23: 291-297.
- Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22: 667-676.

- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94: 325-337.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384: 368-372.
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA (2006) Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311: 847-851.
- Lanford RE, Kanda P, Kennedy RC (1986) Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell* 46: 575-582.
- Lanford RE, Feldherr CM, White RG, Dunham RG, Kanda P (1990) Comparison of diverse transport signals in synthetic peptide-induced nuclear transport. *Experimental Cell Research* 186: 32-38.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347.
- Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 589-598.
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 69: 341-374.
- Levi-Montalcini, R, Hamburger, V (1953) A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 123, 233– 287.
- Li MO, Sarkisian MR, Mehal WZ, Rakic P, Flavell RA (2003) Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* 302: 1560-1563.
- Lippe WR (1994) Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J Neurosci* 14: 1486-1495.
- Lipton SA (1986) Blockade of electrical activity promotes the death of mammalian retinal ganglion cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9774-9778.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157.
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004) Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23: 2766-2773.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35: 605-623.
- Luhmann HJ, Prince DA (1991) Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol* 65: 247-263.

Luskin MB, Shatz CJ (1985) Neurogenesis of the cat's primary visual cortex. *J Comp Neurol* 242: 611-631.

Marin-Padilla M (1971) Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization. *Z Anat Entwicklungsgesch* 134: 117-145.

Marin-Padilla M (1978) Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)* 152: 109-126.

Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41: 535-547.

Marshall J, Dolan BM, Garcia EP, Sathe S, Tang X, Mao Z, Blair LA (2003) Calcium channel and NMDA receptor activities differentially regulate nuclear C/EBPbeta levels to control neuronal survival. *Neuron* 39: 625-639.

Matsuo A, Watanabe A, Takahashi T, Futamura M, Mori S, Sugiyama Y, Takahashi Y, Saji S (2001) A simple method for classification of cell death by use of thin layer collagen gel for the detection of apoptosis and/or necrosis after cancer chemotherapy. *Jpn J Cancer Res* 92: 813-819.

McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ (1989) Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245: 978-982.

Mennerick S, Zorumski CF (2000) Neural activity and survival in the developing nervous system. *Mol Neurobiol* 22: 41-54.

Meyer G, Goffinet AM (1998) Prenatal development of reelin-immunoreactive neurons in the human neocortex. *J Comp Neurol* 397: 29-40.

Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, Wyatt S, Pennica D, Jaffray E, Hay RT, Davies AM (2000) Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol* 148: 325-332.

Miller R (1996) Cortico-thalamic interplay and the security of operation of neural assemblies and temporal chains in the cerebral cortex. *Biol Cybern* 75: 263-275.

Miller TM, Moulder KL, Knudson CM, Creedon DJ, Deshmukh M, Korsmeyer SJ, Johnson EM, Jr. (1997) Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J Cell Biol* 139: 205-217.

Minichiello L, Klein R (1996) TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons. *Genes Dev* 10: 2849-2858.

Molnar Z, Adams R, Blakemore C (1998) Mechanisms underlying the early establishment of thalamocortical connections in the rat. *J Neurosci* 18: 5723-5745.

Monuki ES, Walsh CA (2001) Mechanisms of cerebral cortical patterning in mice and humans. *Nat Neurosci* 4 Suppl: 1199-1206.

Mooney SM, Miller MW (2000) Expression of bcl-2, bax, and caspase-3 in the brain of the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res* 123: 103-117.

Movsesyan VA, Stoica BA, Faden AI (2004) MGLuR5 activation reduces beta-amyloid-induced cell death in primary neuronal cultures and attenuates translocation of cytochrome c and apoptosis-inducing factor. *J Neurochem* 89: 1528-1536.

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 63: 71-124.

Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R. O., and Parnavelas, J. G. Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cerebral Cortex* 13[6], 607-611. 2003.

Ref Type: Magazine Article

Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10: 108-116.

Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80: 315-360.

Nicotera P, Leist M, Manzo L (1999) Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 20: 46-51.

Nishi R, Berg DK (1981) Effects of high K⁺ concentrations on the growth and development of ciliary ganglion neurons in cell culture. *Dev Biol* 87: 301-307.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-465.

Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Long-opening mode of gating of neuronal calcium channels and its promotion by the dihydropyridine calcium agonist Bay K 8644. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 2178-2182.

O'Donovan MJ (1989) Motor activity in the isolated spinal cord of the chick embryo: synaptic drive and firing pattern of single motoneurons. *J Neurosci* 9: 943-958.

Opitz T, de Lima AD, Voigt T (2002) Spontaneous development of synchronous oscillatory activity during maturation of cortical networks in vitro. *J Neurophysiol* 88: 2196-2206.

Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453-501.

Oppenheim RW (1996) Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron* 17: 195-197.

Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16: 6414-6423.

- Papadia S, Stevenson P, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2005) Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* 25: 4279-4287.
- Parnavelas JG (2002) The origin of cortical neurons. *Braz J Med Biol Res* 35: 1423-1429.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11: 272-280.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 22: 6106-6113.
- Phillipson OT, Sandler M (1975) The influence of nerve growth factor, potassium depolarization and dibutyryl (cyclic) adenosine 3',5'-monophosphate on explant cultures of chick embryo sympathetic ganglia. *Brain Res* 90: 273-281.
- Pittman R, Oppenheim RW (1979) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. IV. Evidence that a functional neuromuscular interaction is involved in the regulation of naturally occurring cell death and the stabilization of synapses. *J Comp Neurol* 187: 425-446.
- Planells-Cases R, Caprini M, Zhang J, Rockenstein EM, Rivera RR, Murre C, Masliah E, Montal M (2000) Neuronal death and perinatal lethality in voltage-gated sodium channel alpha(II)-deficient mice. *Biophys J* 78: 2878-2891.
- Pompeiano M, Blaschke AJ, Flavell RA, Srinivasan A, Chun J (2000) Decreased apoptosis in proliferative and postmitotic regions of the Caspase 3-deficient embryonic central nervous system. *J Comp Neurol* 423: 1-12.
- Price DJ, Kennedy H, Dehay C, Zhou L, Mercier M, Jossin Y, Goffinet AM, Tissir F, Blakey D, Molnar Z (2006) The development of cortical connections. *Eur J Neurosci* 23: 910-920.
- Putz U, Harwell C, Nedivi E (2005) Soluble CPG15 expressed during early development rescues cortical progenitors from apoptosis. *Nat Neurosci* 8: 322-331.
- Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400.
- Raff MC, Durand B, Gao FB (1998) Cell number control and timing in animal development: the oligodendrocyte cell lineage. *Int J Dev Biol* 42: 263-267.
- Rakic P, Komuro H (1995) The role of receptor/channel activity in neuronal cell migration. *J Neurobiol* 26: 299-315.
- Rakic S, Zecevic N (2000) Programmed cell death in the developing human telencephalon. *Eur J Neurosci* 12: 2721-2734.
- Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907.
- Rivero Vaccari JC, Casey GP, Aleem S, Park WM, Corriveau RA (2006) NMDA receptors promote survival in somatosensory relay nuclei by inhibiting Bax-dependent developmental cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16971-16976.

Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67: 203-233.

Sadoul R, Fernandez PA, Quiquerez AL, Martinou I, Maki M, Schroter M, Becherer JD, Irmeler M, Tschopp J, Martinou JC (1996) Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *EMBO J* 15: 3845-3852.

Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S (1999) Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J* 18: 2040-2048.

Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-788.

Schutte B, Nuydens R, Geerts H, Ramaekers F (1998) Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *J Neurosci Methods* 86: 63-69.

Schwartzman RA, Cidlowski JA (1991) Internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity in apoptotic thymocytes: detection and endocrine regulation. *Endocrinology* 128: 1190-1197.

Sendtner M, Pei G, Beck M, Schweizer U, Wiese S (2000) Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res* 301: 71-84.

Shi Y (2004) Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 117: 855-858.

Shimohama S, Tanino H, Fujimoto S (2001) Differential expression of rat brain caspase family proteins during development and aging. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 1063-1066.

Simonati A, Rosso T, Rizzuto N (1997) DNA fragmentation in normal development of the human central nervous system: a morphological study during corticogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23: 203-211.

Soriano FX, Papadia S, Hofmann F, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2006) Preconditioning Doses of NMDA Promote Neuroprotection by Enhancing Neuronal Excitability. *J Neurosci* 26: 4509-4518.

Spreafico R, Frassoni C, Arcelli P, Selvaggio M, De Biasi S (1995) In situ labeling of apoptotic cell death in the cerebral cortex and thalamus of rats during development. *J Comp Neurol* 363: 281-295.

Stadelmann C, Deckwerth TL, Srinivasan A, Bancher C, Bruck W, Jellinger K, Lassmann H (1999) Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death. *Am J Pathol* 155: 1459-1466.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37: 173-182.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69: 217-245.

- Streissguth AP, O'Malley K (2000) Neuropsychiatric implications and long-term consequences of fetal alcohol spectrum disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* 5: 177-190.
- Sun W, Gould TW, Vinsant S, Prevet D, Oppenheim RW (2003) Neuromuscular Development after the Prevention of Naturally Occurring Neuronal Death by Bax Deletion. *J Neurosci* 23: 7298-7310.
- Super H, Soriano E, Uylings HB (1998) The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Brain Res Rev* 27: 40-64.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446.
- Szabo I, Adams C, Gulbins E (2004) Ion channels and membrane rafts in apoptosis. *Pflugers Arch* 448: 304-312.
- Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 272: 9677-9682.
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20: 709-726.
- Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JFR, Parnavelas JG (1997) Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17: 1075-1085.
- Thompson I, Holt C (1989) Effects of intraocular tetrodotoxin on the development of the retinocollicular pathway in the Syrian hamster. *J Comp Neurol* 282: 371-388.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272: 17907-17911.
- Tome CML, Bauer C, Nottingham C, Smith C, Blackstone K, Brown L, Hlavaty C, Nelson C, Daker R, Sola R (2006) Mk801-induced caspase-3 in the postnatal brain: Inverse relationship with calcium binding proteins. *Neuroscience* 141: 1351-1363.
- Trapp BD, Nishiyama A, Cheng D, Macklin W (1997) Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol* 137: 459-468.
- Turrigiano GG (1999) Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci* 22: 221-227.
- Tyas L, Brophy VA, Pope A, Rivett AJ, Tavaré JM (2000) Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO Rep* 1: 266-270.
- Vaughan AT, Betti CJ, Villalobos MJ (2002) Surviving apoptosis. *Apoptosis* 7: 173-177.

Vekrellis K, McCarthy MJ, Watson A, Whitfield J, Rubin LL, Ham J (1997) Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development* 124: 1239-1249.

Verney C, Takahashi T, Bhide PG, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. (2000) Independent controls for neocortical neuron production and histogenetic cell death. *Dev Neurosci* 22: 125-138.

Vogt C (1842) *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricans)*. Jent und Gassmann, Solothurn

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

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

Vos MD, Ellis CA, Elam C, Ulku AS, Taylor BJ, Clark GJ (2003) RASSF2 is a novel K-Ras-specific effector and potential tumor suppressor. *J Biol Chem* 278: 28045-28051.

Voyvodic JT (1996) Cell death in cortical development: How much? Why? So what? *Neuron* 16: 693-696.

Wagenaar DA, Madhavan R, Pine J, Potter SM (2005) Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *J Neurosci* 25: 680-688.

Wagenaar DA, Pine J, Potter SM (2004) Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. *J Neurosci Methods* 138: 27-37.

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

Wahle P, Meyer G (1987) Morphology and quantitative changes of transient NPY-ir neuronal populations during early postnatal development of the cat visual cortex. *J Comp Neurol* 261: 165-192.

Wang KK (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23: 20-26.

Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubin LL, Ham J (1998) Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 18: 751-762.

Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, Ham J (2001) Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 29: 629-643.

Wiesel TN, Hubel DH (1963) Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol* 26: 1003-1017.

Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44: 851-859.

Winseck AK, Oppenheim RW (2006) An in vivo analysis of Schwann cell programmed cell death in embryonic mice: the role of axons, glial growth factor, and the pro-apoptotic gene Bax. *Eur J Neurosci* 24: 2105-2117.

Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessel T, Lawrence P, Meyerowitz E (1999) *Entwicklungsbiologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin, Deutschland; Kapitel 11: 393ff.

Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.

Yaginuma H, Tomita M, Takashita N, McKay SE, Cardwell C, Yin QW, Oppenheim RW (1996) A novel type of programmed neuronal death in the cervical spinal cord of the chick embryo. *J Neurosci* 16: 3685-3703.

Yamagishi S, Matsumoto T, Numakawa T, Yokomaku D, Adachi N, Hatanaka H, Yamada M, Shimoke K, Ikeuchi T (2005) ERK1/2 are involved in low potassium-induced apoptotic signaling downstream of ASK1-p38 MAPK pathway in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res* 1038: 223-230.

Yoneda Y, Semba T, Kaneda Y, Noble RL, Matsuoka Y, Kurihara T, Okada Y, Imamoto N (1992) A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus efficiently. *Exp Cell Res* 201: 313-320.

Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao MV (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 18: 3273-3281.

Yoon WJ, Won SJ, Ryu BR, Gwag BJ (2003) Blockade of ionotropic glutamate receptors produces neuronal apoptosis through the Bax-cytochrome C-caspase pathway: the causative role of Ca²⁺ deficiency. *Journal of Neurochemistry* 85: 525-533.

Young C, Olney JW (2006) Neuroapoptosis in the infant mouse brain triggered by a transient small increase in blood alcohol concentration. *Neurobiol Dis* 22: 548-554.

Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 5: 448-453.

Yu SP, Yeh C, Strasser U, Tian M, Choi DW (1999) NMDA receptor-mediated K⁺ efflux and neuronal apoptosis. *Science* 284: 336-339.

Yuan J, Lipinski M, Degterev A (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* 40: 401-413.

Yuste R, Peinado A, Katz LC (1992) Neuronal domains in developing neocortex. *Science* 257: 665-669.

Danke

Meinem Doktorvater, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in Ihrem Labor durchzuführen und für Ihr Engagement im Graduiertenkolleg, was für mich eine tolle Erfahrung war.

Meinem Zweitbetreuer, für die problemlose Übernahme meiner Zweitkorrektur und -betreuung.

Meinem direkten Betreuer, für die unmittelbare und fantastische Betreuung meiner Doktorarbeit; ohne dich wäre sie wohl so nie zustande gekommen.

Den Postdocs des Labors, für die Mühe, meine Dissertation durchzulesen und zu korrigieren und für eure Hilfe bei elektrophysiologischen Fragestellungen.

Den technischen Assistenten, für exzellente technische Assistenz in der Zellkultur, Molekularbiologie und Histologie.

Dem Verantwortlichen, für die Betreuung der Zellkultur und des Konfokalmikroskops.

Den gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors, für eure Hilfe bei Zellkulturtechniken und Methoden der Molekularbiologie, für Programmierarbeit und große Hilfe mit dem MEA-System, sowie für tolle Gespräche auf dem Balkon.

Ehemaligen Diplomanden, für die Übernahme unliebsamer Arbeiten wie der Auszählung apoptotischer Zellen und für die tolle Zeit.

Unserem Computerspezialisten, für deine wichtigen Computerdienste und Hilfe beim Ausdruck dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an alle Studenten des GRK für eine tolle Atmosphäre im Labor.

Danke an alle Übungsleiter und Judoka des TV Nieder-Olm für einen Ausgleich zur Laborarbeit.

Meinen Freunden für die Stunden außerhalb der Arbeitszeit.

Der Steinlaus für den Fall der Berliner Mauer.

Und ein besonders großes Dankeschön an meine Eltern und meinen Bruder, dafür dass ihr immer für mich da seid!

Lebenslauf

gegenwärtige Tätigkeit Wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Luhmann, Johannes Gutenberg-Universität Mainz; Institut für Physiologie und Pathophysiologie

Angaben zur Person

Name **Antje Golbs**
Adresse Duesbergweg 6
 55128 Mainz, Deutschland
Tel. (dienstl.) +49-6131-3926410
Fax (dienstl.) +49-6131-39-26071
E-mail: golbs@uni-mainz.de
geboren am, in 25.05.1981, Leipzig, Deutschland (DDR)
Nationalität Deutsch

Ausbildung

März 2004 Abschluss: Diplom Biochemikerin
Oktober 1999 - März 2004 Studium der Biochemie an der Universität Leipzig
Juli 1999 Abitur
1992 - 1999 Max-Klinger-Gymnasium Leipzig
1991 - 1992 85. Oberschule
1987 - 1991 85. Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule „Palmiro Togliatti“

Auslandsaufenthalte

Oktober 2006 - Januar 2007 Forschungsaufenthalt an der Universität von Hamamatsu, Japan
September 2001 - September 2002 „study of biochemistry“ am „University College Cork“ (Sokrates Erasmus Programm)

Stipendien

September 2004 - August 2007 Stipendiat des Graduiertenkollegs „Entwicklungs-abhängige und krankheitsinduzierende Modifikationen im Nervensystem“ (GRK1044/1)

Publikationen

Golbs, A., Heck, N. und Luhmann, H.J. (2007). A new technique for real-time analysis of caspase-3 dependent neuronal cell death. *J.Neurosci.Methods* 161, 234-243.

Heck, N., **Golbs, A.**, Riedemann, T., Sun, J. J., Lessmann, V. und Luhmann, H. J. (2007). Activity-Dependent Regulation of Neuronal Apoptosis in Neonatal Mouse Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex* bhm165.

Präsentationen

Golbs, A., Heck, N., Riedemann, T., Sun, J. J., Leßmann, V und Luhmann, H. J. (2008). Caspase-3 dependent apoptosis in activity deprived neonatal cortical cultures, Apoptosis World, Luxemburg

Golbs, A., Heck, N. und Luhmann, H. J. (2007). Real-time analysis of caspase-3 dependent neuronal cell death, Neurizons, Göttingen

Golbs, A., Riedemann, T., Kilb, W., Luhmann, H. J. und Heck, N. (2006). Blocking electrical activity induces apoptosis in organotypic cortical slice cultures, 7. FENS, Wien, Österreich

Golbs, A. (2006). Simultaneous measurement of Chloride fluxes and caspase-3 activation in primary neocortical cultures COE-Konferenz, Hamamatsu, Japan

Golbs, A., Rothermel, A., Weigel, W., Kurz, R., Ruffer, M. und Robitzki, A. (2004). Suppression of apoptosis - A study of neuronal cell death in three-dimensional retinal spheres, 3. Biotechnologietag am BBZ, Leipzig

Auszeichnungen

1999 Auszeichnung: Bester Chemieschüler am "Max Klinger Gymnasium" Leipzig vom "Fonds der Chemischen Industrie im Verband der Chemischen Industrie e.V."

Lehrtätigkeiten

seit Oktober 2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Praktikumsbetreuung Physiologie für Mediziner an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

September 2004 - Dezember 2004 und März 2005 - Dezember 2005 wissenschaftliche Hilfskraft Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Oktober 2003 - November 2003 studentische Hilfskraft am BBZ, Universität Leipzig