

Detektion neuroaktiver Substanzen  
durch Modifikation des Aktivitätsmusters  
neokortikaler Netzwerke auf Multielektrodenarrays -  
Charakterisierung und Optimierung eines  
neuronalen Biosensors

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Melanie Jungblut  
geboren am 24.05.1975 in Trier

Mainz, August 2006

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2006

*Man reist nicht, um anzukommen,  
sondern um zu reisen.*

Johann Wolfgang von Goethe

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Schnittstellen zwischen biologischer und unbelebter Materie.....	1
1.2	Neuronale Zellkultur.....	3
1.3	Physiologie der Neurone.....	4
1.3.1	Synapsen.....	4
1.3.2	Neurotransmitter.....	6
1.3.3	Rezeptoren.....	6
1.4	Elektrische Signale neuronaler Zellen.....	9
1.4.1	Aktionspotenzial.....	9
1.4.2	Bursts.....	10
1.5	Methoden zur Messung neuronaler Aktivität.....	12
1.5.1	Intrazelluläre Signalableitung.....	12
1.5.2	Extrazelluläre Signalableitung.....	13
1.6	Biosensoren.....	15
1.7	Strukturierung des Zellwachstums – Patterning.....	16
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	18
2.	Methoden.....	19
2.1	Neuronale Zellkultur.....	19
2.2	Oberflächenbehandlung der Zellkultur-Substrate.....	21
2.2.1	Vorbehandlung und Reinigung.....	21
2.2.2	Ganzflächige Substratbeschichtung.....	21
2.2.3	Strukturierte Substratbeschichtung.....	22
2.2.3.1	Maskendesign.....	23
2.2.3.2	Fotolithografische Herstellung des Masters.....	23
2.2.3.3	Gießen des Stempels.....	24
2.2.3.4	Mikrokontaktstempeln.....	24
2.3	Versuchsaufbau.....	25
2.3.1	Extrazelluläre Ableitung.....	25
2.3.2	Messaufbau.....	25

2.3.3	Multielektrodenarray.....	26
2.3.4	Software.....	27
2.4	Elektrophysiologische Messungen.....	28
2.4.1	Eingesetzte Substanzen.....	28
2.4.2	Durchführung der Messungen.....	30
2.4.3	Datenanalyse.....	30
2.4.4	Statistik.....	33
2.5	Immunzytochemische Färbungen.....	34
2.5.1	Präparate.....	34
2.5.2	Quantitative Analyse.....	36
2.5.2.1	Besiedelte Elektroden.....	36
2.5.2.2	Zelltypen und Zellmorphologie.....	36
2.5.3	Statistik.....	37
2.6	Rasterelektronenmikroskopie.....	37
3.	Ergebnisse.....	38
3.1	Entwicklung der kortikalen neuronalen Kulturen.....	38
3.1.1	Morphologie und Wachstum der Neurone.....	38
3.1.2	Nachweis von Synapsen.....	40
3.1.3	Auftreten des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors.....	40
3.1.4	Astrozyten.....	41
3.1.5	Oligodendrozyten.....	42
3.1.6	Elektrische Aktivität.....	43
3.2	Pharmakologische Untersuchungen an neuronalen Netzwerken auf Multi- elektrodenarrays.....	45
3.2.1	Modifikation der Netzwerkaktivität durch GABA.....	45
3.2.2	Modifikation der Netzwerkaktivität durch Muscimol.....	48
3.2.3	Modifikation der Netzwerkaktivität durch Bicucullin.....	51
3.2.4	Modifikation der Netzwerkaktivität durch Picrotoxinin.....	54
3.2.5	Modifikation der Netzwerkaktivität durch Ko-Applikation eines GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Antagonisten und GABA.....	57
3.2.6	Modifikation der Netzwerkaktivität durch Temazepam und seine Glucuronide.....	59

3.3	Zellwachstum auf strukturierten Oberflächen.....	62
3.4	Vergleich der Eigenschaften strukturierter und unstrukturierter neuronaler Netzwerke.....	64
3.4.1	Besiedelung der Elektroden.....	64
3.4.2	Astrozyten.....	65
3.4.3	Synapsen.....	67
3.4.4	Neurofilament.....	69
3.5	Elektrische Aktivität unstrukturierter und strukturierter Netzwerke geringer Zelldichte.....	70
3.6	Physiologische Eigenschaften strukturierter neuronaler Netzwerke auf Multi-elektrodenarrays.....	71
3.6.1	Entwicklung und Charakteristika der elektrischen Aktivität.....	71
3.6.2	Modifikation der Netzwerkaktivität durch GABA.....	73
3.6.3	Modifikation der Netzwerkaktivität durch Bicucullin.....	76
4.	Diskussion.....	80
4.1	Eigenschaften neokortikaler Kulturen.....	80
4.2	Modifikation der Netzwerkaktivität kortikaler Netzwerke auf Multielektrodenarrays durch am GABA <sub>A</sub> -Rezeptor bindende Substanzen.....	83
4.2.1	GABA.....	84
4.2.2	Muscimol.....	86
4.2.3	Bicucullin und Picrotoxinin.....	86
4.2.4	Temazepam und seine Glucuronide.....	88
4.3	Strukturierte neuronale Netzwerke.....	90
4.3.1	Zellwachstum auf strukturierten Oberflächen.....	90
4.3.2	Optimierung der Struktur.....	92
4.3.3	Strukturelle und morphologische Eigenschaften strukturierter neuronaler Netzwerke.....	93
4.3.4	Extrazelluläre Ableitungen der elektrischen Aktivität strukturierter neuronaler Netzwerke.....	96
4.3.5	Sensitivität strukturierter neuronaler Netzwerke gegenüber neuroaktiven Substanzen.....	98

4.4 Die Tauglichkeit kortikaler Netzwerke auf Multielektrodenarrays als zell- basierter Biosensor.....	99
5. Ausblick.....	103
6. Zusammenfassung.....	105
7. Literaturverzeichnis.....	107
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	122
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole.....	124
Danksagungen.....	127
Lebenslauf.....	129

# 1. Einleitung

## 1.1 Schnittstellen zwischen biologischer und unbelebter Materie

Komplexere biologische Lebensformen bestehen aus einer großen Vielzahl einzelner Zellen, deren sinnvolles Zusammenleben und Überleben nur durch einen Informationsaustausch und eine entsprechende Verarbeitung der Informationen gewährleistet werden kann. Dies erfolgt durch das Prinzip der chemischen oder elektrischen Signalübertragung.

Will man die Wechselwirkungen der Zellen untereinander genauer untersuchen, so benötigt man eine Schnittstelle zwischen dem biologischen System und einem Messsystem aus unbelebter Materie. Dabei muss der technische Sensor sensitiv für Veränderungen im zellulären System und an die jeweilige Fragestellung angepasst sein. Solche Sensoren können beispielsweise durch Stoffwechselfvorgänge der Zellen bedingte Ansäuerungen des extrazellulären Milieus registrieren oder den Sauerstoffverbrauch bzw. die Kohlenstoffdioxidproduktion der Zellen messen (Owicki & Parce, 1992; Bousse, 1996).

Besteht das biologische System hingegen aus elektrisch aktiven Zellen (Neurone, Herzmuskelzellen, Muskelzellen), so können die Potenzialänderungen erfasst werden. Auf makroskopischer Ebene haben Messungen der elektrischen Aktivität von Neuronen, Herzmuskelzellen und Muskelzellen in Form der Elektroenzephalographie (EEG), Elektrokardiographie (EKG) und Elektromyographie (EMG) längst in die alltägliche klinische Praxis Einzug gehalten. Dabei werden Elektroden direkt auf die Körperoberfläche aufgebracht, um die Potenzialänderungen im elektrisch aktiven Gewebe zu registrieren und dieses auf krankhafte Veränderungen hin zu untersuchen.

Will man jedoch ein detailliertes Verständnis von den zellulären Vorgängen erhalten, so muss die elektrische Aktivität unmittelbar von einzelnen Zellen oder von überschaubaren zellulären Netzwerken abgeleitet werden.

Seit mehr als 50 Jahren ist die direkte Membranpotenzialmessung an einzelnen Zellen durch die intrazelluläre Signalableitung möglich (Hodgkin *et al.*, 1952a; 1952b). Die Erfindung der Patch-Clamp-Technik (Neher & Sakmann, 1976; Hamill *et al.*, 1981) erhöhte die Potenzial- und Zeitauflösung der abgeleiteten Signale deutlich und erlaubte die direkte Messung von Einzelkanalströmen. Die Anzahl der Zellen, von denen die elektrische Aktivität abgeleitet werden kann, sowie die Dauer der Messungen sind bei den Methoden der intrazellulären Ableitungen jedoch auf wenige Stunden begrenzt.

Um die elektrische Aktivität von mehreren Orten eines zellulären Verbandes über einen längeren Zeitraum abzuleiten, kann man von Multielektrodenarrays Gebrauch machen. Dabei handelt es sich um Systeme aus Metallelektroden und Dünnschichtleiterstrukturen auf einem Glassubstrat. Die erste extrazelluläre Signalableitung von Neuronen mit Hilfe eines solchen Chips gelang im Jahr 1977 (Gross *et al.*, 1977).

Weiterhin können extrazelluläre Potenziale durch Feldeffekttransistoren auf Siliziumbasis detektiert werden. 1991 wurden erstmals Neurone eines Blutegels erfolgreich an einen Feldeffekttransistor gekoppelt und die elektrischen Signale der Zellen aufgrund der Veränderungen im elektrischen Feld mit Hilfe eines solchen Chips extrazellulär abgeleitet (Fromherz *et al.*, 1991). Sowohl Mikroelektrodenarrays als auch Feldeffekttransistoren bieten ebenfalls die Möglichkeit, die Zellen elektrisch zu stimulieren (Gross *et al.*, 1993; Fromherz & Stett, 1995). Solche hybriden Systeme aus elektrisch aktiven Zellen und Mikroelektronik eröffnen eine Vielzahl möglicher Anwendungen in der Biomedizin, Biotechnologie, sowie Hirnforschung.

Verbindet man ein technisches System nicht mit kultivierten Zellen *in vitro*, sondern direkt mit dem Nervensystem *in vivo*, so spricht man von einer „Brain-Computer-Interface“. Eine solche Schnittstelle zwischen Gehirn und technischen Elementen kann den unterschiedlichsten Zwecken dienen. Den häufig utopischen Visionen stehen reale Ziele gegenüber, wie z. B. die Wiederherstellung von Körperfunktionen nach Lähmungen oder der Einsatz von Implantaten bei nicht funktionstüchtigen sensorischen Organen. Solche mikroelektronischen Neuroprothesen können Informationen aus der Umwelt aufnehmen, verarbeiten und als Afferenzen zum Gehirn übermitteln. Insbesondere bei Cochlea-Implantaten konnten große Fortschritte erzielt werden (Stieglitz *et al.*, 2004; Munson & Nelson, 2005). Im Fall von Retina-Implantaten sieht man sich größeren Schwierigkeiten gegenübergestellt, doch auch hier sind Erfolge zu verzeichnen (Zrenner, 2002; Alteheld *et al.*, 2004; Hungar *et al.*, 2005). Beispielsweise gilt es, die Biokompatibilität der Implantate sowie deren Langzeitstabilität weiter zu verbessern. Außerdem müssen Methoden entwickelt werden, um das Wachstum der Neurone zu kontrollieren und die richtigen Zellen genau mit den entsprechenden Elektroden zu verbinden.

Schnittstellen zwischen mikroelektronischen und zellulären Systemen bergen ein großes Potenzial sowohl für die Grundlagenforschung als auch für den Bereich der medizinischen und pharmakologischen Anwendung. Die Entwicklungen auf diesen Gebieten stehen erst am Anfang eines Weges, der sich nicht voraussagen lässt. Sicher ist jedoch, dass sowohl von technischer als auch von biologischer Seite viele Anstrengungen unternommen werden müssen, um die bestehenden Systeme zu optimieren und neue zu entwickeln.

## 1.2 Neuronale Zellkultur

Um die Vorgänge eines neuronalen Zellverbandes außerhalb des Körpers untersuchen zu können und so für Untersuchungen besser zugänglich zu machen, können die Zellen außerhalb ihrer natürlichen Umgebung in einem zweidimensionalen System unter geeigneten Bedingung kultiviert werden.

Dabei kann das ursprüngliche Gewebe aus den verschiedensten Arealen des zentralen Nervensystems entnommen werden, wie z. B. dem Cerebellum, Hippocampus, Striatum oder dem Kortex. Bei dissoziierten Kulturen muss sich das System gänzlich neu reorganisieren. Die Entwicklung ist durch das Auswachsen der Neurite und die Ausbildung synaptischer Kontakte gekennzeichnet. Die Neurone formen erneut einen Zellverband und entwickeln physiologische Eigenschaften, welche ähnlich zu denen im intakten Gewebe sind. Aufgrund dieser Gegebenheiten stellen solche Kulturen ein geeignetes Modellsystem zur Erforschung der Entwicklung neuronaler Strukturen, Funktionen und synaptischer Verbindungen dar (Dichter, 1978).

Der Zellbestand des ursprünglichen Gewebes bleibt auch in der Kultur präsent, so dass auch *in vitro* Zelltypen mit unterschiedlichen morphologischen und funktionellen Eigenschaften zu finden sind. Vorherrschend sind bei kortikalen Kulturen beispielsweise zwei morphologisch unterscheidbare neuronale Zelltypen. Man findet zum einen pyramidale Neurone mit einem triangulären Perikaryon und einem prominenten apikalen Dendriten, sowie mehreren kürzeren basalen Dendriten. Die Dendriten dieser Zellen weisen zahlreiche Spines auf (Kriegstein & Dichter, 1983). Dabei handelt es sich um etwa 1  $\mu\text{m}$  große Ausstülpungen der postsynaptischen Membran, deren Name auf ihre dornenähnliche Erscheinung zurückzuführen ist. Die große Mehrheit der exzitatorischen Synapsen ist an den Spines lokalisiert. Weiterhin existieren nicht-pyramidale Zellen mit einer mehr sternförmigen Morphologie, deren Dendriten nur spärlich mit Spines besetzt sind (de Lima & Voigt, 1997b). Während pyramidale Zellen exzitatorisch sind und Glutamat als Neurotransmitter benutzen, handelt es sich bei den meisten nicht-pyramidalen Zellen um GABAerge Interneurone (Kawaguchi, 1995; Kawaguchi & Kubota, 1997).

Neben den verschiedenen Arten von Neuronen sind in den Kulturen auch Gliazellen zu finden, die im Gegensatz zu den Neuronen die Fähigkeit zur Proliferation besitzen. Die Bedeutung der Gliazellen für die Funktion des Gehirns war lange unterschätzt. Von ihrem Entdecker Rudolf Virchow wurde ihnen zunächst lediglich eine Stütz- und Haltefunktion zugeschrieben. Heute weiß man jedoch, dass Gliazellen eine weit größere Bedeutung für die Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems haben. Sie stehen in wechselseitiger Beziehung zu den Neuronen und spielen eine wichtige Rolle in Synaptogenese und Signalverarbeitung (Pfrieger & Barres, 1997; Pfrieger, 2002; Freeman, 2006). Aufgrund dieser Gegebenheiten ist das Vorhandensein von Gliazellen in einer neuronalen Zellkultur unerlässlich für die Bildung eines funktionellen und reifen Netzwerkes.

## 1.3 Physiologie der Neurone

### 1.3.1 Synapsen

Synapsen sind die Orte, an denen die Erregungsübertragung von einem Neuron zum anderen stattfindet. Der Begriff „Synapse“ (von griechisch *syn*: zusammen, *haptein*: ergreifen, fassen, tasten) wurde im Jahr 1897 von Charles Sherrington geprägt, um die Kontaktstelle zwischen zwei Nervenzellen bzw. einer Nervenzelle und einer anderen Zelle (Muskel-, Sinnes-, Drüsenzelle) zu beschreiben. Zunächst wurde angenommen, dass die Signalübertragung durch eine direkte Weiterleitung des Stromflusses zustande kommt. 1921 konnte Otto Loewi jedoch beweisen, dass die Übertragung zwischen dem Vagusnerv und dem Herz durch Acetylcholin erfolgt und somit chemischer Natur ist.

Durch die Verbesserung der physiologischen Techniken in den 50er und 60er Jahren konnte schließlich der Beweis erbracht werden, dass beide Formen der Signaltransmission existieren. Bei der elektrischen Synapse steht das Zytoplasma beider Nervenzellen über sogenannte Gap Junctions in direktem Kontakt miteinander. Die Zellmembranen der prä- und postsynaptischen Zelle nähern sich dabei auf 2 bis 4 nm aneinander an. Sowohl die prä- als auch die postsynaptische Membran besitzen in dieser Region Connexone, so genannte Hemikanäle. Treffen die Connexone beider Membranen aufeinander, bilden sie einen Kanal mit einem Durchmesser von etwa 1,5 nm zwischen dem Zytoplasma der beteiligten Zellen. Der Strom kann sich somit ohne Verzögerung von einer Zelle zur nächsten ausbreiten (Kandel *et al.*, 2000). Nachdem die Existenz elektrischer Synapsen bewiesen werden konnte, ist ihre genaue Verteilung im Säugetiergehirn bis heute nicht gänzlich erforscht. In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, dass inhibitorische Interneurone der Großhirnrinde, des Thalamus, des Striatums und des Kleinhirns umfassend durch elektrische Synapsen

verbunden sind (Galarreta & Hestrin, 1999; Gibson *et al.*, 1999; Galarreta & Hestrin, 2001). Es wird vermutet, dass diese elektrische Kopplung der Zellen entscheidend für die Synchronisation der neuronalen Aktivität ist (Tamás *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu elektrischen Synapsen besteht bei chemischen Synapsen kein direkter Kontakt zwischen der prä- und postsynaptischen Zelle. Die Übertragung der Information über den 20 bis 40 nm breiten synaptischen Spalt erfolgt durch chemische Botenstoffe, so genannte Transmitter.

In der präsynaptischen Endigung befinden sich die synaptischen Vesikel, welche einen spezifischen Neurotransmitter enthalten. Wird die Präsynapse depolarisiert, so führt dies zum Öffnen spannungsgesteuerter Kalziumkanäle in der Axonendigung und somit zum Kalziumeinstrom. Der Anstieg der Kalziumkonzentration führt über eine biochemische Reaktionskaskade zur Konformationsänderung Kalzium-bindender Proteine, so dass die Exozytose der Vesikel mit der präsynaptischen Membran herbeigeführt wird und die Transmitter in den synaptischen Spalt abgegeben werden. An diesem Prozess der exozytotischen Fusion intrazellulärer Vesikel mit der Plasmamembran sind eine Reihe von Proteinen beteiligt, die als SNARE-Proteine (soluble NSF attachment receptor) bezeichnet werden (Söllner, 1995; Rothmann *et al.*, 1994). Die Transmittermoleküle im synaptischen Spalt gelangen durch Diffusion zur postsynaptischen Membran und können dort nur an spezifische Rezeptormoleküle binden.

Die Bindung des Transmitters an den Rezeptor führt entweder auf direktem oder indirektem Weg zur Änderung der Aktivität von Ionenkanälen. Im Fall einer direkten Aktivierung liegen ligandengesteuerte Kanäle, auch ionotrope Rezeptoren genannt, vor. Hierbei ist der Rezeptor Teil desselben Makromoleküls, das den Kanal formt. Durch die Bindung des Transmitters kommt es zum Öffnen oder Schließen des Kanals, der nur für bestimmte Ionen permeabel ist. Metabotrope Rezeptoren stehen dagegen nicht in direkter Verbindung zu einem Ionenkanal, sondern aktivieren diesen bei Bindung eines Transmittermoleküls an den Rezeptor indirekt über eine biochemische Reaktionskaskade, an der z.B. G-Proteine (Guanyl-nucleotid-bindendes Protein) und verschiedene Enzyme beteiligt sind.

Durch die direkte oder indirekte Aktivierung von Ionenkanälen kommt es zum Ionenstrom und somit zur Verschiebung der Ionenverhältnisse an der postsynaptischen Membran.

Die Übersetzung des präsynaptischen elektrischen Signals in ein chemisches Signal bietet die Möglichkeit der Signalverstärkung und Signalmodulation durch intrazelluläre Signalkaskaden. Andererseits kommt es jedoch zur kurzen Verzögerung der Signalübertragung. Die Latenzzeit kann zwischen 0,3 ms und mehreren Millisekunden liegen (Kandel *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Neurotransmitter

Die bei einer Depolarisation der Präsynapse in definierten Mengen abgegebenen Neurotransmitter gelangen in den synaptischen Spalt und binden an spezifische Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Dies führt zur Konformationsänderung eines Ionenkanals, der entweder direkt oder über sekundäre Botenstoffe mit dem Rezeptor in Verbindung steht. Die daraus resultierenden Ionenströme durch die Membran führen in Abhängigkeit von der Verteilung des permeierenden Ionentyps und dem gegenwärtigen Membranpotenzial entweder zu exzitatorischen oder inhibitorischen postsynaptischen Potenzialen. Im Fall eines EPSP (exzitatorisches postsynaptisches Potenzial) wird das Potenzialgefälle zwischen dem Zellinnern und dem umgebenden Milieu verringert (Depolarisation), im Fall eines IPSP (inhibitorisches postsynaptisches Potenzial) wird es verstärkt (Hyperpolarisation).

Eine große Vielfalt an Substanzen wirkt im ZNS als Neurotransmitter, dabei sind die Aminosäure Glutamat sowie die  $\gamma$ -Aminosäure Gamma-Aminobuttersäure (GABA) hervorzuheben. Glutamat wird als Transmitter an vielen erregenden Synapsen ausgeschüttet. Die Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt erfolgt sowohl durch die Aufnahme des Transmitters von Neuronen als auch von umgebenden Gliazellen. In den Gliazellen erfolgt zunächst der Abbau zu Glutamin, welches wiederum in die präsynaptische Endigung transportiert und dort erneut zum Aufbau von Glutamat verwendet wird.

GABA hingegen dient in weiten Teilen des Gehirns als Neurotransmitter an inhibitorischen Synapsen. Die Aminosäure wird in der präsynaptischen Zelle aus dem ubiquitär vorhandenen Glutamat unter Katalyse der Glutamat-Decarboxylase synthetisiert. Die Wirkung von GABA auf die postsynaptische Zelle wird durch die GABA-Transporter (GAT-1, GAT-2, GAT-3) vermittelte Aufnahme des Neurotransmitters in die präsynaptische Endigung oder umgebende Gliazellen begrenzt. Der GABA-Abbau erfolgt unter Verwendung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat und Succinat-Semialdehyd (Siegel *et al.*, 1999).

### 1.3.3 Rezeptoren

Sowohl für Glutamat als auch für GABA existieren ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Im Folgenden werden die Glutamat-Rezeptoren nur kurz vorgestellt und die GABA-Rezeptoren eingehender beschrieben, da diese aufgrund des gewählten experimentellen Ansatzes eine größere Relevanz für diese Arbeit haben.

Bei den ionotropen Glutamatrezeptoren unterscheidet man entsprechend der Empfindlichkeit gegenüber dem Glutamatagonisten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) die sogenannten NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren. Zu den non-NMDA-Rezeptoren zählen die Kainat- und AMPA-

Rezeptoren, deren Namensgebung sich an den entsprechenden Agonisten anlehnt. Bei der Bindung von Glutamat kommt es zur Öffnung des Rezeptorkanals, der für die Kationen Natrium und Kalium permeabel ist. Bei den meisten Neuronen führt dies zu einem Nettoauswärtsstrom von Kalium-Ionen bzw. zu einem Nettoeinstrom von Natrium-Ionen. Dabei übersteigt die Leitfähigkeit für Natrium-Ionen die für Kalium-Ionen, so dass die postsynaptische Membran depolarisiert wird. NMDA-Rezeptoren sind ebenfalls direkt an einen Ionenkanal gekoppelt, der im geöffneten Zustand den Durchtritt von Natrium- und Kalium-Ionen, sowie auch von Kalzium-Ionen erlaubt. Sie besitzen ferner Bindungsstellen für Glycin, Zink- und Magnesium-Ionen, die die Funktion dieses Kanals modifizieren können (Kandel *et al.*, 2000).

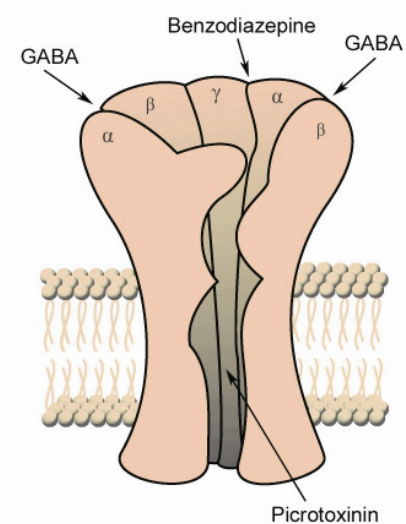
Neben diesen ionotropen Glutamat-Rezeptoren existieren auch metabotrope Rezeptoren, die Ionenkanäle über ein second-messenger-System aktivieren. Während die Bindung von Glutamat an einen ionotropen Glutamat-Rezeptor immer zu einem EPSP in der postsynaptischen Zelle führt, kann aus der Aktivierung eines metabotropen Rezeptors sowohl ein EPSP als auch ein IPSP resultieren.

Diejenigen Rezeptoren, die die Aminosäure GABA spezifisch binden, werden als GABA-Rezeptoren bezeichnet. Man unterscheidet drei verschiedene GABA-Rezeptoren.

Im Fall der ligandengesteuerten GABA<sub>A</sub>-Kanäle kommt es bei Bindung von GABA an den Rezeptor zur Öffnung des Chloridkanals und bei adulten Neuronen zum Einstrom von Chlorid-Ionen in die postsynaptische Zelle, woraus ein IPSP resultiert.

Bei GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren handelt es sich um Heteropentamere, das heißt, die Ionenkanäle sind aus fünf verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Es wurde eine Vielzahl von Untereinheiten identifiziert ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\rho$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  und  $\pi$ ), die wiederum heterogen sind ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\rho_{1-3}$ ). (Pirker *et al.*, 2000; Kash *et al.*, 2004). Daraus ergibt sich eine enorme Anzahl möglicher Assembly-Kombinationen. Die meisten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im Gehirn sind jedoch aus zwei  $\alpha$ -, zwei  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit aufgebaut, wobei beide  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheiten für die Funktionsfähigkeit und die Aktivierung des Rezeptors durch GABA erforderlich sind (Kash *et al.*, 2004). Jede der fünf Untereinheiten besteht wiederum aus 4 Transmembrandomänen.

Der Rezeptor-Komplex besitzt mehrere verschiedene Bindungsstellen und ist der Wirkort für eine Vielzahl von Substanzen. Von den beiden Bindungsstellen für GABA, welche jeweils



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung eines GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Komplexes

zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert sind (Kash *et al.*, 2004), unterscheidet man die Bindungsstelle für Benzodiazepine, Barbiturate, Picrotoxinin und neuroaktive Steroide, sowie Ethanol (Siegel *et al.*, 1999) (s. Abb. 1.1). Neben diesen Stoffen wurden viele GABA-Agonisten sowie Antagonisten beschrieben. Einer der selektivsten Agonisten ist das Pilzgift Muscimol, welches nicht dem Transport durch den GABA-Transporter unterliegt. Bicucullin ist ein typischer kompetitiver Antagonist. Es konkurriert direkt mit GABA um die Bindung am Rezeptor-Komplex. Substanzen wie Bicucullin oder Picrotoxinin, die die hemmende Wirkung von GABA unterbinden, gelten als Krampfgifte, die im Gehirn epileptische Aktivitätszustände induzieren (Meldrum *et al.*, 2001). Dysfunktionen im GABAergen System spielen eine große Rolle beim Krankheitsbild der Epilepsie (Treiman, 2001).

Die große Mehrheit der Interneurone im Gehirn verwendet GABA als Neurotransmitter (Owens *et al.*, 2002). Diese GABAergen Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Aktivität eines neuronalen Netzwerkes (Mody & Pearce, 2004) und sind entscheidend für die Ausbildung einer synchronisierten Netzwerkaktivität (Ben-Ari *et al.*, 2004). GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind bei der Mehrzahl der Neurone zu finden. Im Neokortex sind sie in den apikalen Dendriten, Somata und am zellkörpernahen Axonsegment von Pyramidenzellen und an Interneuronen lokalisiert (Ben-Ari *et al.*, 2004; Mody & Pearce, 2004).

In der neonatalen Entwicklung werden GABAerge Synapsen in einem frühen Entwicklungsstadium exprimiert und vor den glutamatergen angelegt. Vermutlich spielt die frühe Aktivität der Interneurone, welche GABA als Neurotransmitter benutzen, eine wichtige Rolle in der Kontrolle der neuronalen Aktivität in einem frühen Entwicklungsstadium (Varju *et al.*, 2001; Ben-Ari *et al.*, 2004). Bei neonatalen Neuronen kann GABA auch exzitatorische Wirkung entfalten. Aufgrund der hohen intrazellulären Chlorid-Konzentration bei unreifen Neuronen kommt es bei Öffnung des GABA<sub>A</sub>-Ionenkanals zu einem Ausstrom von Chlorid-Ionen und somit zur Erregung der Zelle. Im Laufe der Entwicklung verschiebt sich der Chlorid-Gradient, so dass GABA fortan einen hemmenden Einfluss vermittelt (Gallo & Haydar, 2003; Stein & Roger, 2003; Mody & Pearce, 2004; Yamada *et al.*, 2004).

Im Jahr 1981 entdeckten Hill und Bowery metabotrope Rezeptoren, die GABA ebenfalls spezifisch binden und sich in ihrem pharmakologischen Profil deutlich von den ionotropen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren unterscheiden (Hill & Bowery, 1981). Sie benannten diese aus einem Transmembran-Protein mit 7 Transmembrandomänen bestehenden Rezeptoren als GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren. Der Second-Messenger-Prozess wird durch ein G-Protein vermittelt und führt zu einer Aktivierung von nukleotidgesteuerten Kalium-Kanälen und über einen K<sup>+</sup>-Ausstrom zu einem IPSP. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sind ebenfalls präsynaptisch lokalisiert. Hier kommt es neben der Aktivierung der Kalium-Kanäle auch zu einem Verschließen der spannungsgesteuerten Kalzium-Kanäle, wodurch die Neurotransmitter-Ausschüttung

herabgesetzt wird (Alger & Le Beau, 2001). GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren zeigen keine Sensitivität gegenüber GABA<sub>A</sub>-Antagonisten und -Modulatoren. Als selektiver Agonist fungiert hier Baclofen.

Schon im Jahr 1975 entdeckten Johnston und Kollegen, dass das GABA-Analogon CACA (cis-4-aminocrotonic acid) in der Lage ist, eine dritte Gruppe GABA-sensitiver Ionenkanäle zu aktivieren (Johnston *et al.*, 1975). Diese Rezeptoren, für die im Jahr 1984 der Begriff des GABA<sub>C</sub>-Rezeptors geprägt wurde (Drew *et al.*, 1984), sind sowohl insensitive für Bicucullin als auch für Baclofen. Auch Benzodiazepine, Barbiturate und Neurosteroiden haben keinen Effekt auf diesen Ionenkanal. Im Vergleich zu GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind sie jedoch sensitiver gegenüber GABA (Johnston, 1996; Bormann, 2000).

GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren sind ebenfalls ionotrope Rezeptoren, die eine ähnliche räumliche Struktur wie der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor besitzen und wie dieser aus fünf Untereinheiten aufgebaut sind. Allerdings wurden für diesen Rezeptor lediglich drei verschiedene Untereinheiten identifiziert ( $\rho_{1-3}$ ) (Bormann & Feigenspan, 2001). GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren sind vor allem in der Retina von Vertebraten zu finden (Bormann & Feigenspan, 1995).

## 1.4 Elektrische Signale neuronaler Zellen

### 1.4.1 Aktionspotenzial

Die Fähigkeit zur Ausbildung von Aktionspotenzialen ist die definierte Eigenschaft elektrisch aktiver Zellen. Die Ursachen für die Ausbildung und die besonderen Eigenschaften eines Aktionspotenzials sind auf das Vorhandensein spannungsgesteuerter Ionenkanäle in der Plasmamembran der Zelle zurückzuführen. Die Kanäle erfahren in Abhängigkeit vom Membranpotenzial Konformationsänderungen und sind im geöffneten Zustand selektiv permeabel für bestimmte Ionen.

Auch im unerregten Zustand besitzt die Zellmembran eine gewisse Ruheleitfähigkeit, insbesondere für Kalium-Ionen. Diese selektive Permeabilität der Zellmembran sowie die unterschiedliche Ionenverteilung zwischen dem intra- und extrazellulären Milieu bedingen die Ausbildung eines bestimmten Membranpotenzials im unerregten Zustand, welches auch als Ruhemembranpotenzial bezeichnet wird. Wird die Membran am Axonhügel nach der zeitlichen und räumlichen Summation aller eingehenden EPSPs und IPSPs über einen bestimmten Schwellenwert depolarisiert, so entsteht ein Aktionspotenzial.

Die Erniedrigung des Membranpotenzials führt zunächst zu einer erhöhten Leitfähigkeit spannungsgesteuerter Natriumkanäle und somit zu einem Einstrom von Natrium-Ionen in die Zelle. Ein positiver Rückkopplungseffekt zwischen der zunehmenden Depolarisation des

Membranpotenzials und der zunehmenden Leitfähigkeit der Natrium-Kanäle bedingt die kontinuierliche Depolarisation der Membran bis zu einem bestimmten Wert. Durch die Änderung des Membranpotenzials hin zu positiven Werten nimmt die Leitfähigkeit der spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle zeitlich verzögert ebenfalls zu, so dass das Membranpotenzial durch den auswärts gerichteten Kaliumstrom wieder repolarisiert wird.

Aktionspotenziale verlaufen stets stereotyp mit einer bestimmten Amplitude und einer charakteristischen Dauer von 1-2 ms, unabhängig von der Stärke des Eingangssignals. Hierbei spricht man von einem „Alles-oder-nichts-Prinzip“. Die Amplitude und Dauer eines Inputsignals ist dabei in der Frequenz und Anzahl der Aktionspotenziale kodiert.

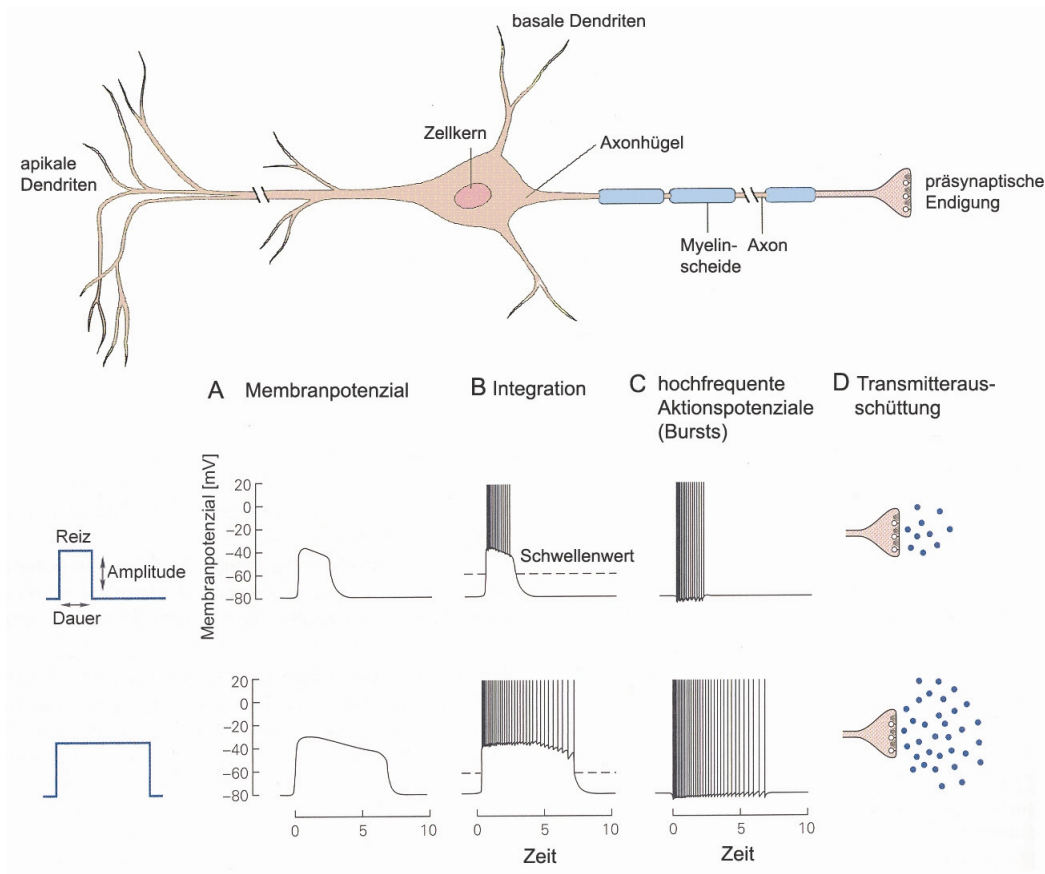
Die Fortleitung erfolgt ohne eine Änderung der Amplitude oder Frequenz über die gesamte Länge des Axons bis hin zur synaptischen Endigung, wo es im Fall einer chemischen Synapse zur aktivitätsabhängigen Freisetzung des Neurotransmitters und somit zur Übertragung des Signals auf die postsynaptische Zelle kommt. Die Leitungsgeschwindigkeit beträgt bei dicken markhaltigen Axonen bis zu 100 m/s und in dünnen marklosen Fasern etwa 1 m/s. Auf jedes Aktionspotenzial folgt für 1-2 ms die absolute Refraktärzeit, während der die Membran nicht erregbar ist und kein weiteres Signal generiert werden kann.

#### 1.4.2 Bursts

Wird am Axonhügel nach Integration aller eingehenden Signale der Schwellenwert überschritten, so wird ein Aktionspotenzial generiert. Überdauert die Depolarisation die absolute Refraktärzeit, so kann ein weiteres Aktionspotenzial ausgelöst werden. Die Dauer und Amplitude des eingehenden Potenzials wird somit am Axonhügel in die Frequenz und Anzahl der Aktionspotenziale übersetzt, die aufgrund der Refraktärzeit auf etwa 500 Signale pro Sekunde limitiert ist. Hochfrequente Folgen von Aktionspotenzialen bezeichnet man als Bursts, die das hervorstechende Merkmal der elektrischen Aktivität kortikaler Netzwerke darstellen. An der synaptischen Endigung bestimmt die Anzahl der eingehenden Aktionspotenziale pro Zeiteinheit die Menge des in den synaptischen Spalt abgegebenen Neurotransmitters (s. Abb. 1.2).

Einzelne Aktionspotenziale treten in einem neuronalen Netzwerk zeitlich unkorreliert auf und werden nach der synaptischen Übertragung als unterschwelliges Signal oftmals nicht weiter übermittelt. Bursts hingegen entstehen durch Koinzidenz multipler exzitatorischer Inputs und werden bei der synaptischen Übertragung nicht als unterschwellige Signale herausgefiltert, sondern können sich verlässlich über das gesamte Netzwerk ausbreiten (Lisman, 1997). Die Burstaktivität wird von Neuronen generiert, welche aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften als Schrittmacher (pacemaker) fungieren. Die Fähigkeit dieser Neurone Bursts

zu generieren beruht auf spannungs- und zeitabhängigen Ionenströmen (Ramirez, *et al.*, 2004). Aufgrund der synaptischen Verknüpfung der Neurone eines Netzwerkes resultiert aus dem spontanen Auftreten eines Bursts häufig ein synchrones Burstereignis über das gesamte Netzwerk. Eine entscheidende Rolle für die Kontrolle und Synchronisation der Aktivität eines neuronalen Netzwerkes wird GABAergen Interneuronen zugeschrieben (Ben-Ari *et al.*, 2004; Mody & Pearce, 2004).



**Abb. 1.2:** Transformation eines elektrischen Stimulus in eine bestimmte Anzahl von Aktionspotenzialen, die eine definierte Frequenz aufweisen.

- [A] Das Membranpotenzial verändert sich proportional zur Dauer und Amplitude des Inputs.
- [B] Die Dauer und Amplitude des eingehenden Signals wird am Axonhügel in die Frequenz und Anzahl der Aktionspotenziale übersetzt.
- [C] Hochfrequente Folgen von Aktionspotenzialen werden als Bursts bezeichnet. Alle Aktionspotenziale besitzen die gleiche Amplitude und Dauer.
- [D] Die Anzahl der eingehenden Aktionspotenziale pro Zeiteinheit an der präsynaptischen Endigung bestimmt die Menge des in den synaptischen Spalt abgegebenen Neurotransmitters.

[modifiziert nach Kandel *et al.*, 2000]

Die synchronisierte Burstaktivität neuronaler Netzwerke, wird als eine grundlegende Eigenschaft von Kodierungsprozessen und Prozessen zur Informationsverarbeitung im Gehirn angesehen (Singer, 1999; Sturm & König, 2001; Buzsáki & Draguhn, 2004) und wird in vielen verschiedenen Hirnregionen, sowie auch in neuronalen Kulturen diverser Hirnareale beobachtet. Dabei können sich morphologisch gleiche Zellen in ihrer Fähigkeit zur endogenen Burstgenerierung unterscheiden. Bei Kulturen neokortikaler Neurone beispielsweise unterscheidet man pyramidale Zellen, die intrinsische Burstaktivität zeigen, von solchen, die regelmäßige Aktionspotenziale mit niedrigerer Frequenz generieren (Guatteo *et al.*, 1994; Franceschetti *et al.*, 1995). Auch bei Interneuronen können abhängig von der Fähigkeit zur Burstgeneration mehrere Subtypen unterschieden werden (Kawaguchi & Kubota, 1997; Gibson *et al.*, 1999; Markram *et al.*, 2004).

Bursts sind ebenfalls an synaptischer Plastizität beteiligt (Pike *et al.*, 1999) und spielen in der Pathogenese der Epilepsie (Yaari & Beck, 2002) sowie in der Entwicklung neuronaler Netzwerke *in vitro* eine bedeutende Rolle (Chiappalone *et al.*, 2005).

Die Analyse der Burstaktivität stellt folglich ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung grundlegender, sowie dynamischer Eigenschaften eines neuronalen Netzwerkes dar.

## 1.5 Methoden zur Messung neuronaler Aktivität

### 1.5.1 Intrazelluläre Signableitung

Neuronale elektrische Aktivität kann sowohl extrazellulär als auch intrazellulär gemessen werden. Bei klassischen Ansätzen der intrazellulären Ableitung wird die Spitze einer mit Elektrolytlösung gefüllten Mikroelektrode in ein Neuron gestochen, so dass das Membranpotenzial der Zelle durch Messung der Spannung zwischen der Glaspipette und einer Referenzelektrode im Medium bestimmt werden kann.

Bei der von Neher und Sakmann entwickelten Patch-Clamp-Technik wird die Spitze einer Glaskapillare nicht in die Zelle eingestochen, sondern nahe an die Zellmembran herangebracht (Hamill *et al.*, 1981). Durch Ansaugen wird ein leichter Unterdruck in der Glaspipette erzeugt, so dass sich die Membran an die Innenwand der Kapillare (Patch-Pipette) anschmiegt. Dadurch entsteht zwischen dem Inneren der Pipette und der Außenlösung ein elektrischer Widerstand in der Größenordnung von mehreren GigaOhm (Gigaseal), so dass Leckströme in das die Zelle umgebende Medium nahezu unterbunden werden können und die Messung von Strömen durch einzelne Ionenkanäle möglich wird. Durch starkes Ansaugen kann der Membranfleck an der Pipettenöffnung durchbrochen werden und ein direkter ohmscher Kontakt zwischen dem Zellinneren und der Elektrolytlösung in der Pipette

hergestellt werden, wobei der Gigaseal bestehen bleibt. Dadurch werden Ableitungen über die gesamte Zellmembran möglich. Die Patch-Clamp-Technik revolutionierte die Erforschung der Ionenströme und anderer elektrischer Phänomene an der Zellmembran.

### 1.5.2 Extrazelluläre Signableitung

Bei extrazellulären Ableitungen positioniert man Elektroden oder Glaspipetten nahe am Zellkörper und misst das elektrische Feldpotenzial in der Nähe der Zellmembran.

Die extrazelluläre Signableitung von neuronalen Zellen mit Hilfe von Multielektrodenarrays (MEAs) erlaubt die simultane Detektion der Aktivität von mehreren Stellen eines Netzwerkes, wobei die Metallelektroden über die Extrazellulärflüssigkeit kapazitiv an die Änderungen des Membranpotenzials gekoppelt sind. Diese Systeme aus Metallelektroden und Dünnschichtleiterstrukturen auf einem Glassubstrat wurden erstmals von Gross entwickelt (Gross *et al.*, 1977).

Durch die MEA-Technologie kann zum einen mit geringem manuellen Aufwand ein schneller Zugriff auf die Messparameter erfolgen und zum anderen eine hohe Informationsdichte erhalten werden. Die Aktivität eines Neurons kann im Kontext der Aktivität des gesamten Netzwerkes erfasst und interpretiert werden, um so Einblicke in die dynamischen Eigenschaften eines Netzwerkes zu erhalten. Weiterhin können Veränderungen in der spontanen Aktivität neuronaler Kulturen zur Detektion neuroaktiver Substanzen herangezogen werden.

Die gleichzeitige Ableitung der elektrischen Aktivität von vielen Zellen eines Netzwerkes liefert zwar einerseits eine Vielzahl an Informationen, doch gilt es andererseits auch die enormen Datenmengen anhand geeigneter Parameter zu interpretieren. Die Leistungsfähigkeit der modernen Computertechnologie und die Entwicklung neuer Analysemethoden haben jedoch viele Möglichkeiten geschaffen, die Netzwerkaktivität in seiner Feinstruktur zu untersuchen und raum-zeitliche Aktivitätsmuster zu analysieren (z. B. Aertsen *et al.*, 1994; Egert *et al.*, 2002; Tateno *et al.*, 2002).

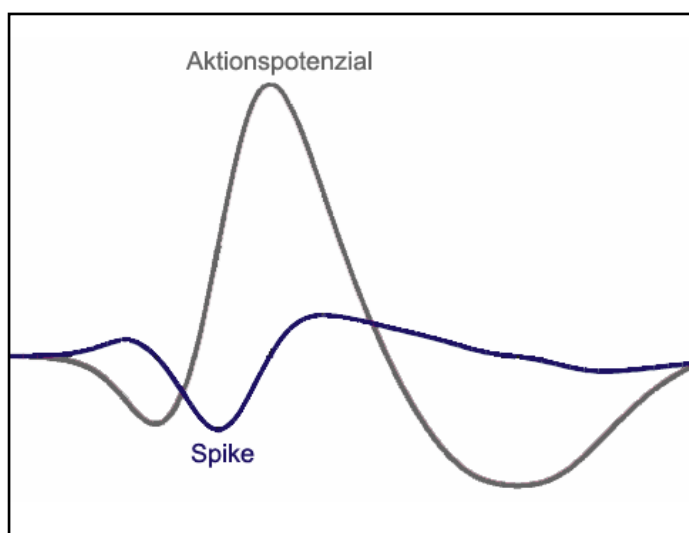
Ein weiterer großer Vorteil der Messmethode liegt in der nicht-invasiven Kopplung der organischen und anorganischen Materie. Die Zellen werden nicht angegriffen, so dass die Kulturen für einen Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen oder gar Monaten zu Messungen herangezogen werden können. Der invasive Eingriff wird vermieden, indem die Zellmembran möglichst nahe an eine externe planare Elektrode gebracht wird. Bei den abgeleiteten elektrischen Signalen handelt es sich um elektrische Feldpotenziale. Ursache für die Entstehung dieser Potenziale sind die transmembranen Ionenströme, die im Neuron infolge synaptischer Inputs an Dendriten und Zellkörper bzw. bei der Auslösung und

Weiterleitung von Aktionspotenzialen im Axon entstehen. Dabei fließt ionischer und kapazitiver Strom an der Membran der Kontaktregion. Der Gesamtstrom muss durch die Elektrolytschicht zwischen Zelle und Elektrode gelangen und erzeugt an der Elektrode eine Spannung (Fromherz, 2002).

Das extrazelluläre Abbild eines Aktionspotenzials wird als *Spike* bezeichnet. Ein *Spike* stellt mit einer Dauer von 1-2 ms das kürzeste, signifikante Muster einer extrazellulären Ableitung dar. Der Signalverlauf entspricht in etwa dem differenzierten Signal des Aktionspotenzials (s. Abb. 1.3) (Jügelt, 2001). Die Signalamplitude eines detektierten Spikes ist variabel und steht in antiproportionaler Abhängigkeit zur Distanz zwischen Elektrode und Zelle. Daneben haben auch Faktoren wie die Zellgeometrie und die Isolation der Elektrode Einfluss auf die Amplitude des Signals.

Im Gegensatz zur Patch-Clamp-Methode, die eine direkte Messung der Ionenströme durch die Zellmembran ermöglicht, gestaltet sich die Interpretation von Amplitude und Form der Feldpotenziale schwieriger. Zum einen ist die Signalamplitude stark abhängig von der Distanz zwischen Zelle und Elektrode, zum anderen können die von einer Elektrode gemessenen Signale die Aktivität mehrerer Zellen widerspiegeln. Will man die Signale einzelnen Zellen zuordnen, so muss man von der Methode des Spike-Sorting Gebrauch machen (Letelier & Weber, 2000; Takahashi & Sakurai, 2005).

Neben diesen Systemen aus Metallelektroden und Dünnschichtleiterstrukturen können als Substrat auch Feldeffekttransistoren (FETs) auf Siliziumbasis eingesetzt werden, um die Aktivität elektrisch aktiver Zellen extrazellulär zu messen (Fromherz *et al.*, 1991).



**Abb. 1.3:** Signalverlauf eines Aktionspotenzials (grau) und eines Spikes (blau).

Ein Spike entspricht in etwa der an einer horizontalen Achse gespiegelten 1. Ableitung eines Aktionspotenzials. Die Signalamplitude steht in antiproportionaler Abhängigkeit zur Distanz zwischen Elektrode und Zelle. Die Signaldauer beträgt 1-2 ms. [vgl. Jügelt, 2001]

## 1.6 Biosensoren

Unter einem Biosensor versteht man im Allgemeinen ein System, in dem eine biologische Komponente zur Detektion der zu bestimmenden Substanz eingesetzt wird. Dabei ist das biologische System mit einem Signalumwandler (Transducer) und einem Signalverstärker verbunden. Bei den biologischen Systemen kann es sich beispielsweise um Antikörper, Enzyme, ganze Zellen oder auch Gewebe bzw. Organe handeln. Die Messung erfolgt in drei Schritten. Durch die Erkennung des Analyten durch das biologische System kommt es zu einer physikochemischen Veränderung, die durch einen Transducer in ein detektierbares Signal umgewandelt wird. Schließlich erfolgt die Signalverstärkung. Die Spezifität und Empfindlichkeit eines Biosensors ist durch die biologische Komponente bedingt.

Unter Verwendung ganzer Zellen als biologisches Erkennungssystem kann der Biosensor beispielsweise Anwendung in der Zellbiologie, Pharmakologie und Toxikologie finden oder zur Detektion schädlicher Substanzen in der Umwelt eingesetzt werden (Bousse, 1996).

In jedem Fall ist man an einem System interessiert, das eine einfache Handhabung ermöglicht und mit einem geringen Arbeits- sowie Kostenaufwand eingesetzt werden kann. Weiterhin muss der Biosensor hochgradig sensitiv in Bezug auf die zu untersuchende Substanz sein, reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse liefern, sowie über einen längeren Zeitraum stabil bleiben. Kommen neuronale Zellen zum Einsatz, so liegt ein nicht lineares dynamisches System vor, das aufgrund der schnellen Signalübertragung und Signalverarbeitung komplexe Aktivitätsmuster generiert (Gross & Rhoades, 1995). Die Modifikation dieser bei den meisten neuronalen Geweben spontan generierten Netzwerkaktivität kann als Grundlage zur Detektion neuroaktiver Substanzen herangezogen werden. Hybride Systeme aus neuronalen Zellen und Multielektrodenarrays wurden in der Vergangenheit schon erfolgreich zur sensitiven und dosisabhängigen Detektion pharmakologischer Substanzen eingesetzt (z. B. Morefield *et al.*, 2000; Keefer *et al.*, 2001; O'Shaughnessy *et al.*, 2003; Stett *et al.*, 2003; Xia & Gross, 2003; Gopal & Gross, 2004; Martinoia *et al.*, 2005a; 2005b), dennoch wurden sie bisher nicht als ein zuverlässiges System für Studien in der klinischen Pharmakologie und Toxikologie akzeptiert. Den Anwendungs-Maßstäben genügend könnten diese neuronalen Biosensoren jedoch wertvolle Hinweise auf die pharmakologische Wirksamkeit zu testender Substanzen liefern und die Lücke zwischen biochemischen Analyseverfahren und Tierversuchen schließen.

## 1.7 Strukturierung des Zellwachstums – Patterning

Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) oder anderen Zellen spielen eine wichtige Rolle im Verhalten einer Zelle. Eine über Zelladhäsionsrezeptoren (cell adhesion molecules (CAMs)) vermittelte Adhäsion sorgt dabei für eine dynamische und wechselseitige Kommunikation zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett. Man versteht darunter einen rezeptor-vermittelten Kontakt zwischen den Molekülen der ECM und den Aktinfasern des Zytoskeletts. Die Adhäsion einer Zelle ist essentiell für ihr Überleben, das Wachstum, die Differenzierung und ihre Funktion.

Auf der anorganischen Substratoberfläche eines Multielektrodenarrays wachsende Neurone befinden sich in einer unphysiologischen Umgebung. Um die Adhäsion und das Wachstum der Zellen zu ermöglichen, muss die Substratoberfläche mit Adhäsionsproteinen behandelt werden. Bei einer ganzflächigen Substratbeschichtung sind diese Prozesse keiner weiteren äußeren Kontrolle unterworfen und erfolgen zufällig. Modifiziert man jedoch die Oberflächeneigenschaften eines Substrates, so kann die Zelladhäsion und das Zellwachstum geometrisch beeinflusst werden und den Zellen bestimmte Wachstumspfade vorgegeben werden. Bei einem solchen Prozess spricht man von Zellpatterning.

Dabei gibt es viele Möglichkeiten, Einfluss auf die Lokalisation der Zellen zu nehmen. Im Allgemeinen unterscheidet man Methoden, bei denen man die Substrate topografisch strukturiert (Curtis & Wilkinson, 1997), von solchen, bei denen die Oberflächeneigenschaften chemisch modifiziert werden. Bei Letzterem spricht man von einem physikochemischen Patterning (Jung *et al.*, 2001). Hierbei werden Substratregionen geschaffen, welche die Zelladhäsion und das Wachstum unterstützen, während die übrige Substratoberfläche für diese Prozesse nicht die adäquaten Bedingungen bietet. Sowohl Methoden zum topografischen als auch zum chemischen Patterning nahmen in den 60er Jahren ihre Anfänge (Rosenberg, 1963; Carter, 1965) und wurden im Laufe der Zeit stetig weiterentwickelt.

Da in dieser Arbeit ausschließlich das physikochemische Patterning zum Einsatz kam, wird im Folgenden lediglich die Entwicklung dieser Methode näher betrachtet. Eine der wichtigsten Entwicklungen auf dem Gebiet des strukturierten Wachstums von Neuronen war die Arbeit von Kleinfeld und seinen Mitarbeitern (Kleinfeld *et al.*, 1988), die sich zum ersten Mal die Techniken der Fotolithografie kombiniert mit einer Silanchemie zu Nutze machten, um das Wachstum von Neuronen auf einem zweidimensionalen Substrat geometrisch zu kontrollieren. Die Methode der Fotolithografie wurde in den folgenden Jahren häufig angewendet, um strukturierte neuronale Netzwerke zu schaffen und ihre Eigenschaften zu untersuchen (z. B. Corey *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2001).

Eine weitere prominente Methode zur Strukturierung von Substratoberflächen stellt das Mikrokontaktstempeln (micro-contact-printing,  $\mu$ CP) dar. Hierbei nutzt man einen aus einem

Elastomer bestehenden strukturierten Stempel, um organische Moleküle in einer definierten Geometrie auf die Oberfläche zu übertragen (Kumar & Whitesides, 1993). Hinsichtlich eines Zellpatternings hat man sich diese Technik zu Nutze gemacht, um Adhäsionsproteine kontrolliert auf Oberflächen aufzubringen und das Wachstum der Zellen auf diese bestempelte Fläche zu beschränken. Dabei wurden Glas- oder Goldoberflächen zunächst chemisch vorbehandelt, um dann den Adhäsionspromotor Poly-D-Lysin (PDL) im gewünschten strukturierten Muster chemisch zu binden (Branch *et al.*, 1998; Wheeler *et al.*, 1999; Branch *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 2004). Der Hintergrund wurde zur Erhöhung der zellabweisenden Eigenschaften meist mit Polyethylenglykol beschichtet. Ein weiterer Ansatz bestand darin, das Protein Laminin, welches einen Bestandteil der extrazellulären Matrix darstellt, direkt auf ein Polystyrolsubstrat zu stempeln (Lauer *et al.*, 2001; Lauer *et al.*, 2002; Vogt *et al.*, 2003). Durch eine Kombination der Multielektrodenteknologie und einem neuronalen Patterning können die Zellen gezielt zu den Elektroden dirigiert werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Signableitung erhöht und eine bessere Zell-Elektroden-Kopplung erreicht wird (Jung *et al.*, 2001). Ferner kann eine Langzeitbeobachtung eines kontrollierten neuronalen Netzwerks auf einem Chip die Möglichkeit eröffnen, den Einfluss der Veränderungen synaptischer Verbindungen auf die Signalverarbeitung genauer zu untersuchen (Curtis, 2002).

Während es viele Ansätze gab, ein neuronales Netzwerk in strukturierter Form auf einer homogenen Substratoberfläche wachsen zu lassen, wurden bisher jedoch nur wenige erfolgreiche Versuche unternommen, dies bei heterogenen Substraten wie MEAs oder FETs in die Tat umzusetzen (Scholl *et al.*, 2000; Merz *et al.*, 2002; Nam *et al.*, 2004).

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl Multielektrodenarrays ein einfach zu handhabendes Werkzeug darstellen, die Aktivität elektrisch aktiver Zellen nicht-invasiv über einen ausgedehnten Zeitraum von vielen Zellen eines Netzwerkes abzuleiten, wurden sie bisher nicht als ein zuverlässiges Testsystem für pharmakologische Studien akzeptiert. Als ein Ziel dieser Arbeit sollte die Tauglichkeit neuronaler Netzwerke auf Multielektrodenarrays als ein zellbasiertes Biosensorsystem hinsichtlich der Sensitivität und Verlässlichkeit durch pharmakologische Untersuchungen getestet werden.

Um den Zeitpunkt zu bestimmen, zu dem ein reifes Netzwerk vorliegt, sollte die Entwicklung der Netzwerke *in vitro* zunächst anhand struktureller und morphologischer Eigenschaften, sowie hinsichtlich der elektrischen Aktivität untersucht werden. An ausgereiften kortikalen Netzwerken sollten pharmakologische Experimente vorgenommen werden, die zeigen sollten, ob die Netzwerkaktivität durch bekannte Pharmaka reproduzierbar sowie dosisabhängig modifiziert wird und diese Veränderungen eine Unterscheidung der Substanzen erlauben. Da das GABAerge System eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle und Synchronisation der Netzwerkaktivität spielt, sollten beispielhaft verschiedene auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor einwirkende Substanzen eingesetzt werden. Die Netzwerkantwort sollte dabei hinsichtlich der Spikerate und auf Bursts beruhender Parametern analysiert werden.

Zur Optimierung eines Systems, in dem die Adhäsions- und Wachstumsprozesse der Neurone aufgrund einer ganzflächigen Substratbeschichtung unkontrolliert erfolgen, sollte ein strukturiertes neuronales Wachstum auf Multielektrodenarrays realisiert werden, das eine Kontrolle über diese Prozesse erlaubt. Dies begründet sich auf der Zielsetzung, die Zelldichte so weit wie möglich zu reduzieren, um extrazelluläre Ableitungen von einem Netzwerk mit einer überschaubaren Zellanzahl zu ermöglichen. Dazu sollten die Oberflächeneigenschaften der Multielektrodenarrays so modifiziert werden, dass die Zelladhäsion und das Auswachsen der Neurite geometrisch kontrolliert werden konnte, um die Zellen gezielt zu den Elektroden zu dirigieren und den Neuriten definierte Wachstumspfade vorzugeben. Auf der Grundlage morphologischer und elektrophysiologischer Untersuchungen sollte die Entwicklung und Funktionalität der strukturierten Netzwerke untersucht und im Vergleich zu unstrukturierten Netzwerken betrachtet werden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf der Tagung „Functional Polymeric Surfaces in Biotechnology“ in Zürich und der Tagung „Substrate-Integrated Multielectrode Arrays“ in Reutlingen präsentiert (Jungblut *et al.*, 2003; 2004).

## 2. Methoden

### 2.1 Neuronale Zellkultur

Da der Neokortex eine zur Präparation leicht zugängliche Hirnregion ist und dissoziierte Zellen dieser Gehirnregion embryonaler Ratten in Kultur erneut ein funktionales neuronales Netzwerk ausbilden, wurden in dieser Arbeit neokortikale Kulturen als zelluläres System herangezogen.

Zur Gewinnung der Zellkulturen wurde eine CD Ratte (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) am 18. Trächtigkeitstag nach Betäubung durch zervikale Dislokation getötet. Die Embryonen wurden entnommen und in Calcium- und Magnesium-freie Hanks balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen, Deutschland) mit 10 mM Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure (HEPES) (Invitrogen) überführt. Bei den im Folgenden beschriebenen Präparationsschritten war stets darauf zu achten, dass das Gewebe in eisgekühltem HBSS verblieb.

Der Kopf eines Embryos wurde abgetrennt und von Haut und Schädeldecke befreit, so dass das Gehirn entnommen werden konnte. Nach dem Entfernen der Hirnhaut wurden die beiden kortikalen Hemisphären abgetrennt und die Hippocampi entfernt. Lediglich der prefrontale Teil des Kortex wurde zur enzymatischen Behandlung in Neurobasalmedium (Invitrogen), das mit Cystein-aktiviertem Papain (L-Cystein: 0.2 mg/ml, Papain: 2 U/ml, Sigma, Deutschland) und DNase I (10 mg/ml, Roche, Deutschland) versetzt wurde, überführt. Durch Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteurpipette wurde das Gewebe vorsichtig zerkleinert und für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Die Enzymlösung wurde vorsichtig abpipettiert und die Gewebestücke einmal mit frischem Neurobasalmedium gewaschen. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteurpipette, deren Öffnungsdurchmesser um die Hälfte reduziert wurde, wurden die Zellen aus dem Gewebeverband heraus vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe eines

Zellsiebes der Porengröße 40 µm (BD Biosciences, Deutschland) von evtl. noch vorhandenen Zellklumpen befreit und für 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Neurobasalmedium aufgenommen.

Um die genaue Zelldichte zu ermitteln, wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (Invitrogen) vermischt. Da vitale Zellen im Gegensatz zu toten den Farbstoff nicht aufnehmen und somit farblos erscheinen, konnte ihre Dichte nun mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt werden.

In einem Volumen von 50 µl wurden die Zellen in einer Dichte von 200 oder 1000 Zellen/mm<sup>2</sup> auf die oberflächenbehandelten Substrate gegeben. Eine hohe Zelldichte von 1000 Zellen/mm<sup>2</sup> wurde auf Multielektrodenarrays (MEAs) aufgebracht, die ganzflächig mit Poly-D-Lysin beschichtet waren und später für pharmakologische Untersuchungen an unstrukturierten neuronalen Netzwerken verwendet wurden. Auf bestempelte MEAs und auf Substrate, die zu einem Vergleich der Eigenschaften strukturierter und unstrukturierter Netzwerke herangezogen wurden, wurde dagegen eine geringere Zelldichte von 200 Zellen/mm<sup>2</sup> gegeben.

Nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit wurde das Medium auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und in den folgenden zwei Wochen zweimal wöchentlich gewechselt. Ab einem Zeitpunkt von 14 Tagen in Kultur erfolgte der Mediumwechsel alle 2 Tage.

Das verwendete serumfreie mit B27-Supplement (Invitrogen) und 0,5 mM Glutamin (Invitrogen) versetzte Neurobasalmedium garantiert eine optimale Versorgung der Neuronen, sowie im Vergleich zu serumhaltigen Medien eine eingeschränkte Proliferation der Gliazellen (Brewer *et al.*, 1993; Brewer, 1995). Auf den Zusatz anti-mitotischer Agenzien konnte somit verzichtet werden.

Um die Verdunstung des Wassers aus dem Kulturmedium und zugleich die Gefahr der Kontamination durch Bakterien oder Pilzsporen herabzusetzen, wurde auf die MEAs ein zuvor autoklavierter Teflonring aufgesetzt, der mit einer transparenten, für CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> selektiv permeablem FEP Teflon<sup>®</sup> (fluorinated ethylene propylene) Folie bespannt war (Potter & DeMarse, 2001).

## 2.2 Oberflächenbehandlung der Zellkultur-Substrate

### 2.2.1 Vorbehandlung und Reinigung

Da die Siliziumnitrid-Oberfläche der verwendeten Multielektrodenarrays (MEAs) im unbehandelten Zustand hydrophobe Eigenschaften besaßen, waren sie in diesem Zustand nicht für die Beschichtung mit Proteinen und die Zelladhäsion geeignet. Zunächst musste für hydrophilere Oberflächeneigenschaften Sorge getragen werden. Dies wurde zum einen dadurch erreicht, dass die MEAs über einen Zeitraum von einigen Tagen in MilliQ-Wasser gelagert werden. Zum anderen wurden sie am Tag vor Zellaussaat einer 5-minütigen Plasmabehandlung (200-G Plasma System, Technics Plasma GmbH, Deutschland) unterzogen. Bei diesem Verfahren werden Moleküle auf der Oberfläche gespalten, woraus eine polarere und somit hydrophilere Oberfläche resultiert. Weiterhin garantiert die Plasmabehandlung eine Reinigung, sowie eine Sterilisation der Substrate. Um jedoch wirklich sicherzustellen, dass die MEAs steril waren, wurden sie einer Dampfsterilisation im Autoklaven (HV25, Wolf, Deutschland) unterzogen. Anschließend erfolgte die Beschichtung mit Poly-D-Lysin.

Um die MEAs nach dem Gebrauch von Zellen und Proteinen zu befreien, wurden sie zunächst einer 30-minütigen Reinigung mit einer 3%igen BM-Lösung (Biomed Labordiagnostik GmbH, Deutschland) in MilliQ-Wasser unterzogen. Anschließend erfolgte eine ebenfalls 30-minütige Behandlung mit Ultrasonol<sup>®</sup> (pH 7, Carl Roth GmbH & Co, Deutschland).

### 2.2.2 Ganzflächige Substratbeschichtung

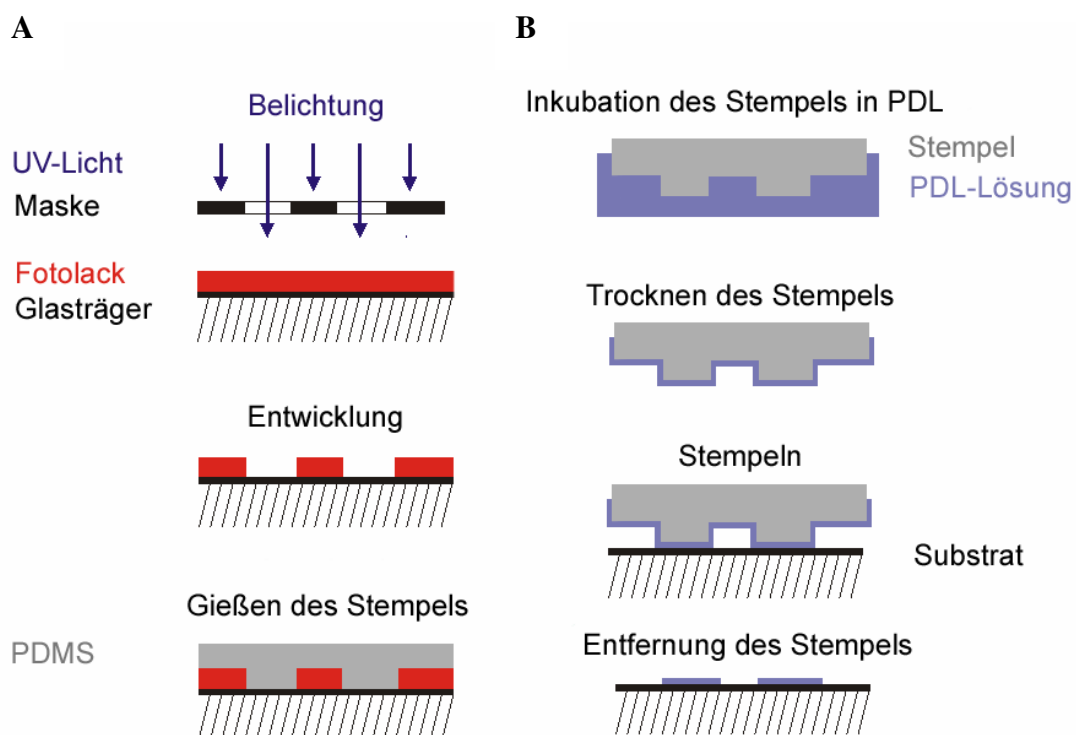
Poly-D-Lysin (PDL) (70,000-150,000 MW, Sigma) wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in MilliQ-Wasser ganzflächig über Nacht bei Raumtemperatur auf die Substrate gegeben. Am nächsten Tag wurde die PDL-Lösung abgenommen und die Substrate dreimal mit MilliQ-Wasser gewaschen, um nicht gebundenes PDL zu entfernen. Bevor die Zellsuspension aufgebracht wurde, wurde die Oberfläche im Stickstoffstrom getrocknet. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

### 2.2.3 Strukturierte Substratbeschichtung

Um mikrometerfeine Poly-D-Lysin-Strukturen exakt und reproduzierbar auf die MEAs aufzubringen, wurde die Methode des Mikrokontaktstempels (micro-contact-printing,  $\mu$ CP) angewendet.

Dabei wurde in diesem Fall die Poly-Aminosäure Poly-D-Lysin (PDL) mit Hilfe eines aus einem Elastomer gegossenen strukturierten Stempels auf die gewünschte Oberfläche übertragen.

Für diesen Vorgang waren mehrere Arbeitsschritte erforderlich. Zunächst wurde eine Chrommaske mit den gewünschten Strukturen entworfen. Dieses Muster wurde durch ein fotolithografisches Verfahren in einen Fotolack übertragen, der als Master für die Abformung des Musters in PDMS dient. Letztendlich wurde PDL mit Hilfe dieses Stempels auf das Substrat übertragen (s. Abb. 2.1).

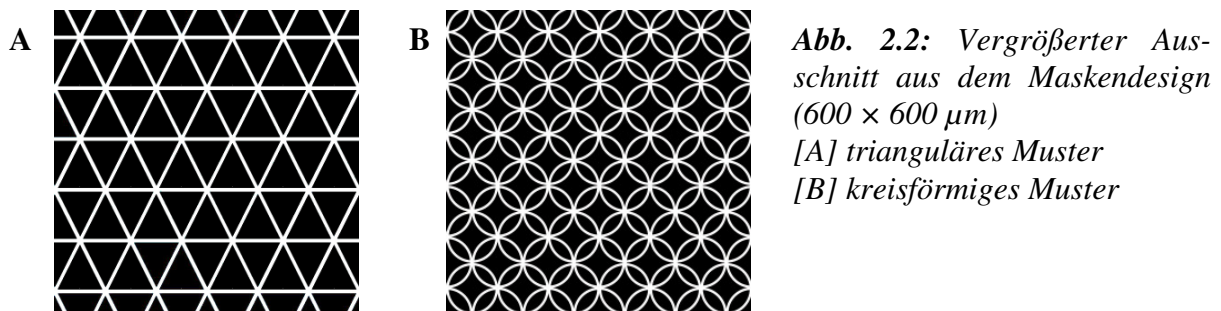


**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der strukturierten Substratbeschichtung.  
 [A] Fotolithografische Herstellung des Masters und Gießen des Stempels.  
 [B] Mikrokontaktstempeln

### 2.2.3.1 Maskendesign

Das Design der verschiedenen Strukturen wurde mit AutoCAD LT 2002 (Autodesk) vorgenommen. Es wurden zwei verschiedene Strukturen entworfen. Dabei handelte es sich einmal um eine trianguläre Struktur (s. Abb. 2.2 A), die aus gleichschenkligen Dreiecken mit einer basalen Kantenlänge von  $100\ \mu\text{m}$  und einer Höhe von ebenfalls  $100\ \mu\text{m}$  zusammengesetzt ist. Daneben wurde eine kreisförmige Struktur aus verschränkten Kreisen mit einem Durchmesser von  $100\ \mu\text{m}$  konzipiert (s. Abb. 2.2 B).

Beide Strukturen wurden jeweils in einer Linienbreite von 4 bzw.  $6\ \mu\text{m}$  gezeichnet. Durch Vervielfältigung der Elementarstruktur erhielt man eine Gesamtfläche von  $1\ \text{cm}^2$  pro Struktur. Die Herstellung der Dark Field Chrommaske erfolgte durch DeltaMask (Enschede, Niederlande).



### 2.2.3.2 Fotolithografische Herstellung des Masters

Bei diesem aus der Halbleitertechnik und Mikrosystemtechnik bekannten lithografischen Reproduktionsverfahren werden mittels Belichtung Strukturinformationen von einer Fotomaske in einen Fotolack übertragen.

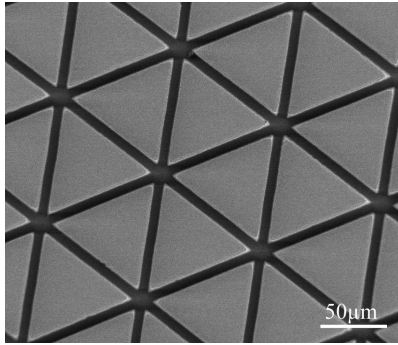
Der Fotolack (AZ 9260; Clariant GmbH, Deutschland) wurde zunächst durch Rotationsbeschichtung (spin-coating) auf  $1\ \text{mm}$  dicke Glasträger der Größe  $30 \times 40\ \text{mm}$  aufgebracht. Dazu wurde der Glasträger mittels Vakuumsaugung auf einem Drehteller fixiert und ein Tropfen des Fotolacks aufgegeben. Durch das Schleudern bei einer Drehzahl von  $1800\ \text{rpm}$  für eine Minute erhielt man einen gleichmäßig verteilten Lackfilm von  $10\ \mu\text{m}$  Dicke.

Die Fotolackschicht wurde für 12 Minuten bei  $100\ ^\circ\text{C}$  getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt.

Die Belichtung des Lacks erfolgte durch die Chrommaske mit der gewünschten Struktur mit Hilfe eines Mask Aligners (MA-25, Karl Süss GmbH, Deutschland) im Kontaktmodus mit

UV-Licht (350 Watt), wobei die belichteten Stellen einer fotochemischen Reaktion ausgesetzt wurden. Diese hatte zur Folge, dass der Fotolack sich an den belichteten Stellen beim anschließenden 5-minütigen Entwickeln in verdünnter Kalilauge löste.

Aus diesem Prozess resultierte eine Gussform (Master), bei der die Linien des triangulären bzw. ringförmigen Musters als Vertiefungen im Fotolack vorlagen (s. Abb. 2.3).



*Abb. 2.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Masters. Die Linien des triangulären Musters entsprechen den Vertiefungen im Fotolack.*

### 2.2.3.3 Gießen des Stempels

Als Material für die Herstellung der Stempel diente Polydimethylsiloxan (PDMS).

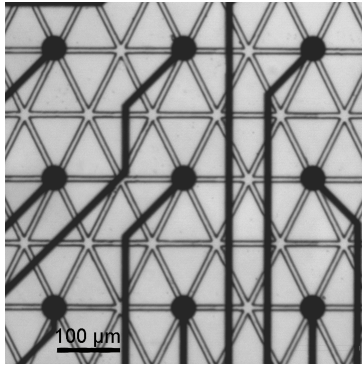
Dabei handelt es sich um das am meisten genutzte auf Silikon basierende organische Polymer. Es ist viskoelastisch, durchsichtig, im Allgemeinen inert und nicht toxisch, was es zum optimalen Material für die Mikrotempel macht.

Das PDMS (Sylgard<sup>®</sup> 184; Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland) wurde in einem Verhältnis von 10:1 mit dem Härter (Sylgard<sup>®</sup> 184; Dow Corning, curing agent, Wiesbaden, Germany) gemischt.

Vor dem Stempelguss wurde der Master einer 5-minütigen Behandlung mit dem Detergenz Natrium-Dodecyl-Sulfat (2%, Sigma) unterzogen, um später das Ablösen des Stempels aus der Gussform zu erleichtern. Das PDMS wurde in Glasringe mit einem Durchmesser von 5 mm, die auf den Master gestellt wurden, gegossen. Die Aushärtung des Polymers erfolgte bei 70 °C im Ofen über Nacht.

### 2.2.3.4 Mikrokontaktstempeln

Um die Hydrophilie der PDMS-Stempel zu erhöhen, wurden sie 24 Stunden in MilliQ-Wasser aufbewahrt. Die Dekontamination erfolgte durch Eintauchen in 70% Ethanol für etwa 30 Sekunden. Die Stempel wurden im Stickstoffstrom getrocknet und anschließend über Nacht in



**Abb. 2.4:** PDMS-Stempel mit triangulärem Muster justiert auf die Elektrodengeometrie eines MEAs

eine sterile PDL-Lösung der Konzentration 0,1 mg/ml in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS, pH 8.0) inkubiert. Nach einer erneuten Trocknung wurden die Stempel optisch so auf den MEA justiert, dass die Elektroden stets mit Knotenpunkten des Musters zusammenfielen (s. Abb. 2.4). Dies erfolgte mit Hilfe eines Positioniersystems bestehend aus dem Tragarm eines Fineplacers (Fineplacer-145 PICO, Finetech Electronics, Deutschland) und einem Stereomikroskop (Leica MS5, Leica Microsystems, Deutschland).

Die Stempel wurden dann mit einer Kraft von  $100 \text{ g/cm}^2$  für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf die Oberfläche gedrückt.

Mit einem planaren PDMS-Ring wurde zusätzlich um den Rand des aufgestempelten Musters ein etwa 5 mm breiter ganzflächiger PDL-Ring aufgestempelt, um dort ein geometrisch unbeeinflusstes Zellwachstum zu ermöglichen. Dieser umgebende Zelllayer sollte durch die Überlappung mit dem Rand des strukturierten Netzwerkes für eine stabilere Verankerung desselben Sorge tragen.

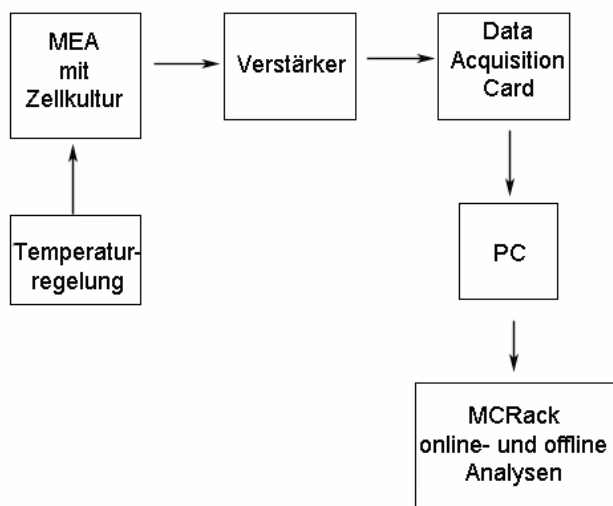
## 2.3 Versuchsaufbau

### 2.3.1 Extrazelluläre Ableitung

Bei dieser nicht-invasiven extrazellulären Ableitung werden durch Metallelektroden, die in direktem Kontakt mit den Zellen stehen, elektrische Feldpotentiale gemessen. Durch den Einsatz mehrerer Elektroden kann die elektrische Aktivität parallel an mehreren Stellen des Netzwerkes abgegriffen werden.

### 2.3.2 Messaufbau

Der Messaufbau bestand aus einem Multielektrodenarray (MEA), einem 60-Kanal-Vorverstärker und einer Messkarte (Multi Channel Systems, MCS GmbH, Reutlingen) (s. Abb. 2.5). Die Signale wurden vom Vorverstärker von den Kontakten des MEAs abgegriffen, um den Faktor 1200 verstärkt und über ein 68poliges SCSI-Kabel in die Messkarte (Data Acquisition Card) des PC eingespeist. Die Messkarte diente als Echtzeit-AD-Wandler und gestattete eine Abtastrate von 5 bis 50 kHz. Für die Messungen wurde eine Abtastrate von 10 kHz gewählt. Ein Aktionspotenzial stellt mit einer Dauer von 1-2 ms das kürzeste Signal dar.



**Abb. 2.5:** Übersicht zum Messaufbau des MEA-Systems von Multi Channel Systems

Drahtbrücke zu Elektrode 15 geerdet wurde. Diese Elektrode stellt somit die Referenzelektrode mit einem Potential von 0 Volt dar, so dass die gemessenen Spannungswerte aus der Differenz des Elektrodenpotenzials zum Potenzial der Referenz resultierten.

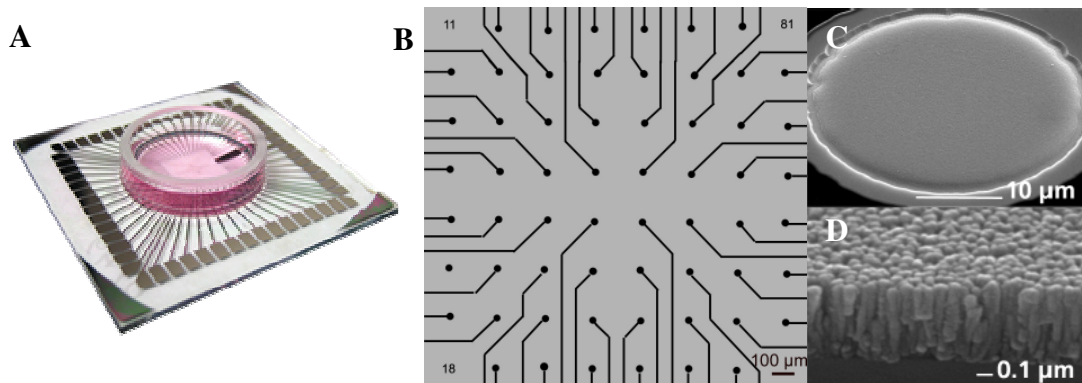
Eine im Versuchsaufbau unter dem MEA befindliche regelbare Heizplatte gestattete eine zuverlässige konstante Temperierung des Kulturmediums. Die hier beschriebenen Experimente wurden bei einer Mediumtemperatur von 37 °C durchgeführt.

### 2.3.3 Multielektrodenarray

Die verwendeten MEAs (s. Abb. 2.6 A) bestanden aus 60 Titannitrid-Elektroden, angeordnet in einer 8 x 8 Matrix mit freibleibenden Eckpositionen (s. Abb. 2.6 B). Der Durchmesser der Elektroden betrug 30 µm, der Abstand von Mittelpunkt zu Mittelpunkt benachbarter Elektroden 200 µm.

Die fraktale Struktur des Titannitrid (s. Abb. 2.6 D) garantierte aufgrund der großen Oberfläche eine geringe Impedanz und damit sehr hohe Ladungsübertragungskapazitäten sowie ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Die maximale Amplitude des Rauschens betrug bei dieser Elektrodengröße von Peak zu Peak 10 µV. Die Elektroden waren in eine langzeitstabile, transparente Isolatorschicht aus Siliziumnitrid eingebettet.

Der auf den MEA aufgesetzte Glasring diente als Reservoir für das Medium, so dass eine problemlose on-chip-Kultivierung der Zellen möglich war.



**Abb. 2.6:** Multielektrodenarray

[A] Multielektrodenarray mit Medium

[B] Anordnung der Elektroden in einer 8×8 Geometrie

[C] Aufnahme von einer Elektrode, vgl. [www.nmi.de](http://www.nmi.de)

[D] rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Elektrodenoberfläche, vgl. [www.nmi.de](http://www.nmi.de)

### 2.3.4 Software

Die Systemsoftware MCRack (Multi Channel Systems) erlaubt die Datenerfassung bei der Messung extrazellulärer Aktivität in Echtzeit, einfache online- und offline-Analysen der Daten (z.B. Spike-Detektion über ein Schwellenwertkriterium, Bestimmung der Rate, Erstellung eines Rasterplots, Spike-Sorting anhand der Waveform) und den Datenexport.

## 2.4 Elektrophysiologische Messungen

### 2.4.1 Eingesetzte Substanzen

Für die pharmakologischen Experimente wurden ausschließlich Substanzen gewählt, welche am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor binden. Dabei handelte es sich um GABA (gamma aminobutyric acid), Muscimol, Bicucullin, Picrotoxinin, Temazepam sowie dessen Glucuronide.

Der GABA<sub>A</sub>-Agonist Muscimol ist ein aus dem Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) stammendes Alkaloid und die psychoaktive Wirkkomponente des Pilzes. Verwendet wurde das wasserlösliche Muscimol-Hydrobromid.

Bicucullin ist ein kompetitiver GABA<sub>A</sub>-Antagonist. Das Alkaloid stammt aus der Pflanze *Dicentra cucullaria*, welche ein mehrjähriges Kraut aus der Familie der Erdrauchgewächse (*Fumariaceae*) ist. Bei den Versuchen wurde das wasserlösliche Bicucullin-Methiodid angewendet.

Bei Picrotoxinin handelt es sich um einen allosterischen GABA<sub>A</sub>-Kanal-Blocker. Die Substanz ist die aktive Komponente von Picrotoxin, ein molekularer Komplex, der sich 1:1 aus Picrotin und Picrotoxinin zusammensetzt. Picrotoxinin ist ein Sesquiterpen aus den Früchten der Scheinmyrte (*Anamirta cocculus*), eine Schlingpflanze (Sri Lanka, Vorderindien) aus der Familie der Monsterales (*Menispermaceae*) und wird als Arzneimittel bei Schwindel und Übelkeit eingesetzt.

Das eingesetzte Temazepam gehört zu den Benzodiazepinen, welche in der Natur vorkommen oder synthetisch hergestellt werden. Temazepam wird aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit von 8 bis 10 Stunden zur Behandlung von Einschlafstörungen eingesetzt. Es führt zu einer raschen Schlafinduktion, und durch die kurze Wirkdauer kommt es nicht zum Hang-Over-Effekt. Zum Einsatz bei den Versuchen kam ein Racemat der beiden Stereoisomere des Temazepam.

Bei der Metabolisierung des Temazepam entstehen die entsprechenden wasserlöslichen Glucuronide. Sowohl das R- als auch das S-Enantiomer dieses Abbauproduktes wurde auf die pharmakologische Wirksamkeit hin untersucht.

Alle verwendeten Substanzen mit Ausnahme von Temazepam und den entsprechenden Glucuroniden wurden von Sigma bezogen. Temazepam wurde vom Institut für Rechtsmedizin des Klinikums der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt. Die Glucuronide des Temazepam wurden von Tanja Pallman (Köln) im Rahmen ihrer Dissertation synthetisiert.

Substanz	Eingesetzte Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ]
GABA	0.5 / 1 / 1.5 / 2 / 5 / 10
Muscimol	0.05 / 0.1 / 0.2 / 0.5 / 1
Bicucullin	0.1 / 0.25 / 0.5 / 1 / 2.5 / 5 / 10
Bicucullin + GABA	Bicucullin: 1 GABA: 0 / 1 / 2 / 5 / 10 / 20
Picrotoxinin	0.1 / 0.25 / 0.5 / 1 / 2.5 / 5 / 10
Picrotoxinin + GABA	Picrotoxinin: 1 GABA: 0 / 1 / 2 / 5 / 10 / 20
Temazepam	0.01 / 0.02 / 0.05 / 0.1
Temazepam + GABA	GABA: 0.5 Temazepam: 0.01 / 0.02 / 0.05 / 0.1
Temazepamglucuronide	1 / 5
Temazepamglucuronide + GABA	GABA: 0.5 Temazepamglucuronide: 1 / 5

**Tab. 2.1:** Übersicht über die im Rahmen der pharmakologischen Versuche durchgeführten Messreihen

## 2.4.2 Durchführung der Messungen

Die kortikalen Kulturen wurden nach einer Kultivierung von 21 Tagen *in vitro* zu elektro-physiologischen Messungen herangezogen. Zunächst erfolgte eine Aufzeichnung der nativen Aktivität als Kontrolle. Dazu wurde das Medium gänzlich erneuert und die extrazelluläre Aktivität zum selben Zeitpunkt aufgezeichnet, zu dem später die Messung nach Zugabe der Substanz erfolgen sollte.

Die getesteten Substanzen wurden zunächst in PBS gelöst, anschließend in Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt (s. Tab. 2.1) und die Lösung auf 37 °C temperiert. Das Kulturmedium auf dem MEA wurde vollständig abpipettiert und durch 1 ml der Testlösung ersetzt. Nach einer Wartezeit von 5 min (bei Zugabe von GABA, Muscimol, Bicuculline, Picrotoxinin) bzw. 10 min (bei Zugabe von Temazepam und seinen Glucuroniden) hatte sich der modifizierte Aktivitätszustand stabilisiert und die Messung erfolgte für 60 bzw. 120 Sekunden. Anschließend wurde die Lösung abgenommen, frisches Medium zugegeben und in zeitlichen Abständen von 5 bis 30 min mehrmals ausgetauscht. In der Wartezeit wurden die Kulturen im Brutschrank inkubiert. Bevor die Messreihe fortgesetzt wurde, stellte eine erneute Kontrollmessung sicher, dass der Grundzustand wieder hergestellt war.

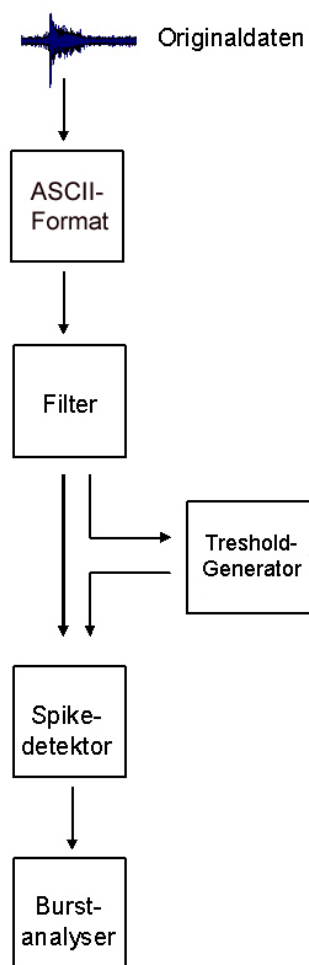
Vor Applikation der beiden höchsten Konzentrationen, wurden die Kulturen über Nacht im Brutschrank inkubiert, um ein vollständiges Auswaschen der Substanz sicherzustellen.

Alle Messungen wurden unter strenger Beachtung steriler Bedingungen durchgeführt. Kontaminationen mussten unbedingt vermieden werden, da sich die Messreihen insbesondere bei den die Netzwerkaktivität steigernden Substanzen über einen Zeitraum von mehreren Tagen erstreckten.

## 2.4.3 Datenanalyse

Als Kriterium zur Analyse der Netzwerkantwort auf die applizierten Substanzen wurden neben der Spikerate Parameter herangezogen, welche Burstcharakteristika darstellen. Dabei handelte es sich um:

- Burstrate
- Burstdauer
- Anzahl von Spikes innerhalb eines Bursts
- Interspikeintervall (ISI) innerhalb eines Bursts
- Interburstintervall (IBI)



**Abb. 2.7:** Übersicht über die Vorgehensweise bei der Vorverarbeitung der Daten

Um die Analyse durchführen zu können, bedurfte es mehrerer Schritte (s. Abb. 2.7). Zunächst mussten die mit MCRack erfassten Messdaten mit Hilfe des MC\_DataTools (Multi Channel Systems) in ein ASCII-Format konvertiert werden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Spikeanzahl und die Burstdetektion mittels der für diesen Zweck in Java<sup>®</sup> implementierten Software MEA-SPAT (signal processing and analysis tool) (Kujawski, 2005).

Die Detektion aller Spikes erfolgte durch eine optimierte Schwellenspannung (Threshold) in ausreichendem Abstand zum Signalrauschen. Jeder einzelne detektierte Spike wird durch den Zeitpunkt seines Auftretens repräsentiert (sog. Timestamp), die Amplitude des Signals wurde hierbei vernachlässigt. Alle Timestamps einer Elektrode ergeben den sogenannten Timestamptrain (Spikefolge).

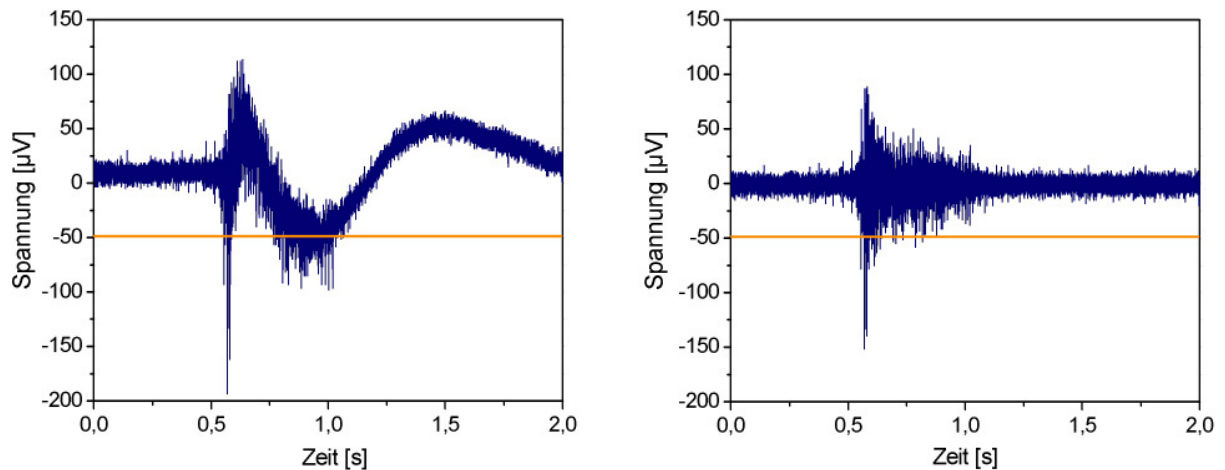
Nach dem Auftreten eines Burstereignisses ist ein niederfrequentes Nachschwingen zu verzeichnen, wodurch die Spikedetektion verfälscht wird (s. Abb. 2.8 A). Aus dieser Gegebenheit resultierte die Notwendigkeit einer Filterung der Messwerte. Eingesetzt wurde ein Hochpassfilter mit einer Cutoff-Frequenz von 100 kHz, wodurch das Nachschwingen eliminiert wurde (s. Abb. 2.8 B) und auf diesem beruhende fälschliche Spikedetektionen ausgeschlossen werden konnten.

Die Bestimmung der Schwellenwerte wurde automatisiert.

Dazu berechnete das Programm zunächst parallel die Spikefolge eines jeden Kanals für 15 verschiedene festgesetzte Thresholds. Der optimale dieser 15 Schwellenwerte wurde im Zuge der Burstanalyse für jeden einzelnen Kanal ermittelt. Eine individuelle Thresholdermittlung für jeden einzelnen Kanal war von Nöten, da die Signalamplituden stark variieren.

Ein wichtiger Parameter für die Ermittlung der Timestamps ist neben den Thresholds die Refraktärzeit, womit der Zeitraum von 2 ms nach Auftreten eines Spikes bezeichnet wird, in dem kein anderer Spike auftreten kann. Durch das Festsetzen einer Totzeit von 2 ms nach der Detektion eines Spikes wurde die irrtümliche Spikedetektion aufgrund zufälliger Fluktuationen ausgeschlossen.

Auf der Grundlage der optimalen Spikefolgen für jede einzelne Elektrode konnte auch die Anzahl der detektierten Spikes in einer bestimmte Zeiteinheit bestimmt und die Spikerate ermittelt werden.

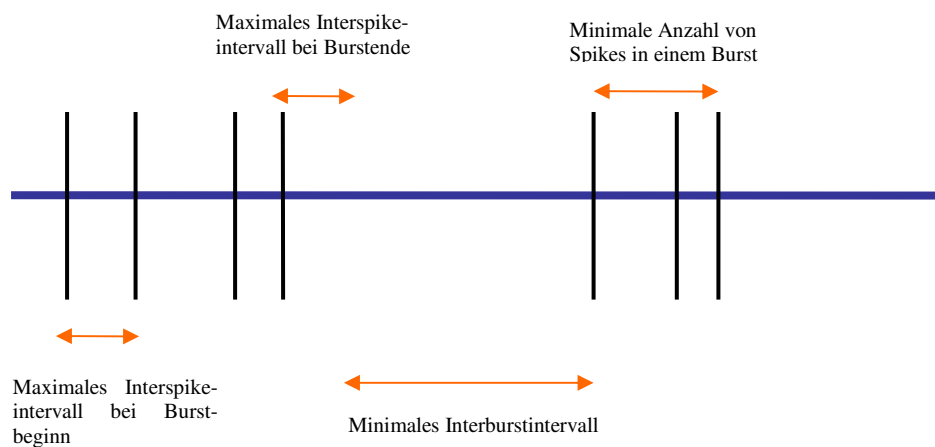


**Abb. 2.8:** Potenzialverlauf bei extrazellulärer Signalableitung  
 [A] Potenzialverlauf ohne Filterung  
 [B] Potenzialverlauf nach Hochpassfilterung

Nach der Ermittlung der Spikefolgen erfolgte die Burstanalyse, die auf der Methode der maximalen Intervalle beruhte (Tam, 2002).

Für die Definition eines Bursts wurden bei der Analyse aller Messungen die folgenden Parameter herangezogen (s. Abb. 2.9):

- Minimale Anzahl von Spikes in einem Burst: 3
- Maximales Interspikeintervall bei Burstbeginn: 10 ms
- Maximales Interspikeintervall bei Burstende: 20 ms
- Minimales Interburstintervall: 500 ms



**Abb. 2.9:** Veranschaulichung der zur Burstdetektion herangezogenen Parameter.

Um einen Burst zu detektieren, mussten somit zunächst drei Spikes detektiert werden, deren maximaler Abstand einen Zeitraum von 10 ms nicht überschritt. Das maximale Interspikeintervall von 20 ms bei Burstende und das minimale Interburstintervall von 500 ms bestimmten dabei die Burstlänge und die Anzahl der Spikes innerhalb eines Bursts.

Im ersten Teil der Burstanalyse wurden für jeden der 15 Spikefolgen der 60 Kanäle die Anzahl der Bursts, Burstlänge, Anzahl von Spikes und Interspikeintervalle (ISIs) innerhalb eines Bursts, sowie die Interburstintervalle (IBIs) ermittelt. Des Weiteren berechnete das Programm die Standardabweichung für die Burstdauer, Spikeanzahl, ISIs und IBIs.

Im zweiten Teil wurde aufgrund der Ergebnisse dieser Burstanalyse die optimale Spikefolge für jeden Kanal ermittelt. Dabei wurde zunächst das Verhältnis zwischen den Standardabweichungen und den entsprechenden Durchschnittswerten für die erwähnten Burstcharakteristika bestimmt.

Für die weiteren Untersuchungen wurden lediglich die Spikefolgen verwendet, die in allen vier Parametern einen Wert aufwiesen, der im Vergleich zum Durchschnittswert einen kleineren Wert in der Standardabweichung zeigte. Erfüllte keine der Spikefolgen diese Anforderungen wurden die von dieser Elektrode verzeichneten Messwerte verworfen.

Für diejenigen Spikefolgen, die die Kriterien erfüllten, wurde die mittlere Burstanzahl ermittelt. Im nächsten Schritt wurden sämtliche Spikefolgen eliminiert, deren Burstanzahl mehr als 10 % vom berechneten Mittelwert abwich.

Anschließend wurde die Spikefolge ausgewählt, die die Verhältnisse von Standardabweichung zu Durchschnittswert minimierte.

Wurden bei den bisher beschriebenen Schritten die Spikefolgen für jede Elektrode separat betrachtet, so wurden nun die Abweichungen der ausgewählten Spikefolgen der verschiedenen Elektroden untereinander verglichen.

Dazu wurde der Mittelwert der Burstdauer aller verbliebenen Spikefolgen berechnet. Eliminiert wurden jedoch nur solche, die hohe Abweichungen von 25 % unterhalb des Durchschnitts der Burstdauer und von 50 % oberhalb des Durchschnitts aufwiesen.

Die Werte für die Burstcharakteristika und ihre Standardabweichungen wurden in einer eigenen Ergebnisdatei gespeichert.

#### 2.4.4 Statistik

Jede Messreihe wurde mindestens dreimal mit unterschiedlichen Kulturen aus unterschiedlichen Präparationen durchgeführt. Zur Bestimmung des Messwertes für eine Substanzkonzentration wurden pro Kultur 20 bis 40 Elektroden ausgewertet und der

Mittelwert aus allen Messergebnissen gebildet. Alle Messwerte wurden auf den für den nativen Zustand ermittelten Wert normalisiert.

Für die Spikeanalyse wurde zunächst die Anzahl der Spikes für die gesamte Messreihe aller den Ansprüchen genügenden Kanäle ermittelt und auf den Wert des nativen Zustands normalisiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes aus den Messwerten aller Kanäle für eine Bedingung.

Alle Datenpunkte der elektrophysiologischen Messungen werden als der Mittelwert aller Messwerte  $\pm$  Standardabweichung vom Mittelwert angegeben.

Die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven erfolgte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse unter Verwendung folgender Gleichung:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^{n_H}} + A_2 \quad (\text{Gl. 1})$$

Dabei ist  $A_1$  der Anfangswert und  $A_2$  der Endwert.  $X_0$  gibt die Dosis an, bei der 50 % der maximalen Wirkung beobachtet wird. In dieser Arbeit wird dieser Wert als  $EC_{50}$  bzw.  $IC_{50}$ -Wert bezeichnet. Die Steigung der Dosis-Wirkungs-Beziehung und damit der Hill-Koeffizient wird durch  $n_H$  angegeben. Für die statistischen Vergleiche der Halbwirksamkeitsdosis verschiedener Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurde das Programm GraphPad Prism 4 der Firma GraphPad Software (San Diego, USA) herangezogen. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  zu Grunde gelegt.

Für die statistische Untersuchung des Mittelwertes verschiedener Datenpunkte wurde nach Überprüfung der Normalverteilung der Datensätze durch den Komolgorov-Smirnov-Test der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben herangezogen. Lag keine Normalverteilung vor, wurde als parameterfreier Test der Mann-Whitney U Test angewendet. Der Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit betrug in allen statistischen Berechnungen  $p < 0,05$ .

## 2.5 Immunzytochemische Färbungen

### 2.5.1 Präparate

Die Zellen wurden auf runde Deckgläser (Durchmesser: 12 mm), die ganzflächig mit PDL beschichtet oder im triangulären Muster bestempelt wurden, ausgesät und nach 7, 14 oder 21 Tagen *in vitro* für 20 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 30-

minütige Inkubation bei Raumtemperatur in 5 % Ziegen Serum (Dianova, Hamburg, Deutschland) in PBS abgesättigt und anschließend nach nochmaligem Waschen mit 0.6 % TritonX-100 (Sigma) in PBS für 20 Minuten bei 4 °C permeabilisiert.

Die Inkubation mit dem in PBS mit 1 % Ziegen Serum und 0,15 % Tween20 (Sigma) verdünnten Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration (s. Tab. 2.2) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurde der entsprechende fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper nach dreimaligem Waschen mit PBS in einer Verdünnung von 1:100 für 3 bis 12 Stunden zu den Zellen gegeben (s. Tab. 2.3). Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Sekundärantikörper wurden von nun an alle Arbeitsschritte im Dunkeln durchgeführt. Bei Doppelfärbungen zweier verschiedener Zelltypen oder Strukturen wurden die Antikörper nacheinander zugegeben.

Um ausschließen zu können, dass eine beobachtete Färbung nicht von einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers herrührte, wurden die Färbungen zur Kontrolle auch ohne die Primärantikörper durchgeführt.

Zur Färbung des Zellkerns wurde DAPI (4',6-diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid) (Roche, Deutschland) in einer Verdünnung von 0,25 µg/ml für 5 min bei Raumtemperatur zu den Proben gegeben. Anschließend wurde drei Mal mit PBS gewaschen.

Auf die Deckgläser wurde ein Tropfen Fluorescence Mounting Medium (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) gegeben, bevor sie kopfüber auf einen Objektträger gelegt und der Rand mit Nagellack abgedichtet wurde.

**Tab. 2.2:** Primäre Antikörper

Antigen	Antiserum	Hersteller	Verdünnung
glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Mouse anti-GFAP, clone GA5	Chemicon Europe, Hofheim, Deutschland	1:400
microtubule-associated protein 2 (MAP2)	polyclonal Rabbit anti-MAP2	Chemicon	1:200
MAP2a/2b	Mouse anti-MAP2a/2b, epitope 997-1332, clone AP20	Abcam Ltd, Cambridge, UK	1.5 µg/ml
myelin basic protein (MBP)	Mouse anti-MBP, epitope 129-138, clone 1	Chemicon	1:10
Neurofilament 160 kD	Mouse anti-neurofilament 160, clone NF-09	Abcam	1:200
Synapsin I	polyclonal Rabbit anti-synapsin I	Abcam	1:500
GABA <sub>A</sub> receptor (α1 subunit)	polyclonal Rabbit anti-GABA <sub>A</sub> receptor (α1 subunit)	Sigma	1:300

**Tab. 2.3:** Sekundäre Antikörper

Antigen	Antiserum	Quelle	Verdünnung
Rabbit IgG	Donkey, Rhodamin markiert	Chemicon	1:100
Rabbit IgG	Donkey, Fluorescein markiert	Chemicon	1:100
Mouse IgG	Donkey, Rhodamin markiert	Chemicon	1:100
Mouse IgG	Donkey, Fluorescein markiert	Chemicon	1:100

## 2.5.2 Quantitative Analyse

### 2.5.2.1 Besiedelte Elektroden

Die Ermittlung der Anzahl der mit Neuronen besetzten Elektroden erfolgte unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus IX 70, Olympus Deutschland GmbH). Die Zellkörper und Dendriten wurden mit einem Antikörper gegen MAP2 markiert, der sekundäre Antikörper war mit Rhodamin markiert.

Von einer genügend großen Probenanzahl wurde die Anzahl der Elektroden ausgezählt, die mit Neuronen besetzt waren.

### 2.5.2.2 Zelltypen und Zellmorphologie

Die Analyse der Proben erfolgte unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops des Typs Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss AG, Deutschland). Zur Anregung der Rhodamin-markierten Strukturen (MAP2) wurde ein Helium/Neon-Laser ( $\lambda = 543 \text{ nm}$ ) herangezogen, zur Anregung der Fluorescein-markierten Strukturen (Synapsin I, Neurofilament, GFAP) ein Argon-Laser ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ). Die Aufnahmen wurden mit einem 40 fach Objektiv gemacht, wobei im Falle einer Synapsin I und Neurofilament-Detektion ein einfacher Zoom und im Falle einer GFAP-Detektion ein Zoom von 0,7 verwendet wurde. Es handelte sich jeweils um Bilder mit  $1024 \times 1024$  Pixeln.

Die farbigen digitalen Aufnahmen wurden mit Adobe Photoshop zunächst monochromatisiert. Anschließend wurde eine quantitative Analyse mit Hilfe der Software MetaMorph<sup>®</sup> (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA) durchgeführt, wobei die fluoreszenzmarkierten Strukturen durch einen definierten Intensitätsschwellenwert vom Hintergrund hervorgehoben wurden, um anschließend die Anzahl der Pixel zu bestimmen. Die Pixelgröße betrug im Falle eines Einfachzooms  $0,23 \mu\text{m} \times 0,23 \mu\text{m}$ , bei einem 0,7 fachen Zoom waren es  $0,32 \mu\text{m} \times 0,32$

µm. Von jeder Probe wurden sechs Bilder aufgenommen, wobei die Auswahl der Bildausschnitte zufällig erfolgte. Für jede Probe wurde anhand dieser 6 Aufnahmen die durchschnittliche Anzahl der Pixel für die entsprechende Struktur ermittelt.

Die Färbung der Neuronen mit einem Antikörper gegen MAP2 ermöglichte aufgrund der Somatamarkierung die Bestimmung der Neuronenzahl für den Bildausschnitt, so dass für den Fall der Synapsin- und Neurofilament-Färbungen die durchschnittliche Anzahl der Pixel pro Neuron ermittelt werden konnte.

### 2.5.3 Statistik

Alle Datenpunkte wurden als Mittelwert aller Messwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung vom Mittelwert angegeben. Zur statistischen Analyse wurden die Datensätze zunächst mit Hilfe des Komolgorov-Smirnov-Tests auf eine Normalverteilung geprüft. Genügten die Werte diesen Ansprüchen, so wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben herangezogen. Waren die Voraussetzungen nicht erfüllt, wurde als parameterfreier Test der Mann-Whitney U Test angewendet. Als Signifikanzniveau wurde bei den Berechnungen  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  oder  $p < 0,001$  zu Grunde gelegt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird entsprechend angegeben.

## 2.6 Rasterelektronenmikroskopie

Die auf MEAs oder Deckgläsern kultivierten Neuronen wurden zunächst für eine Stunde in 2,5 % Glutaraldehyd (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) in MilliQ-Wasser fixiert. Nach dem dreimaligen Waschen von jeweils 20 Minuten in PBS erfolgte die Nachfixierung mit 1% Osmiumtetroxid (Fluka) in MilliQ-Wasser, ebenfalls für eine Stunde.

Die Zellen wurden nach erneutem Waschen mit steigenden Acetonkonzentrationen (30 % und 50 % Aceton jeweils 20 min; 70 % Aceton über Nacht; 80, 90 und 100 % Aceton jeweils 20 min) schrittweise entwässert. Dabei war darauf zu achten, dass die Präparate ab einem Acetonanteil von 70 % nicht mehr mit der Luft in Berührung kamen. Anschließend erfolgte die Kritische Punkt-Trocknung, bei der das flüssige Aceton durch flüssiges CO<sub>2</sub> ersetzt wird, welches am Kritischen Punkt in den gasförmigen Zustand übergeht ohne zu Strukturzerstörungen aufgrund von Oberflächenspannungen zu führen.

Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurden mit einem LEO EM 1530 Gemini (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK) aufgenommen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung der kortikalen neuronalen Kulturen

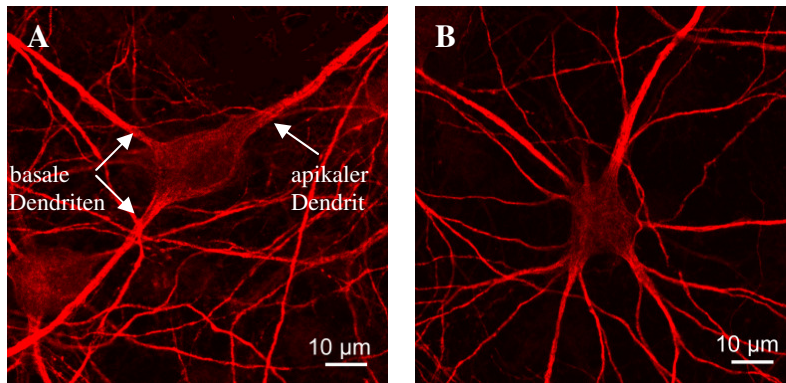
Zunächst wurde die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes in der artifiziiellen Umgebung hinsichtlich des Wachstums und der elektrischen Aktivität untersucht. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse dienten als Anhaltspunkt für das optimale Entwicklungsstadium der Kulturen für die pharmakologischen Messungen.

Die Betrachtung struktureller und morphologischer Eigenschaften der neuronalen Netzwerke erfolgt in diesem Kapitel zunächst weitgehend qualitativ. In Kapitel 3.4 werden weitere quantitative Untersuchungen angestellt.

#### 3.1.1 Morphologie und Wachstum der Neurone

Das neuronale Wachstum ließ sich anhand einer MAP2- (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) und Neurofilament-Markierung gut verfolgen. Mikrotubuli-assoziierte Proteine werden in vielen verschiedenen Zelltypen gefunden. Man unterscheidet mehrere der mit den Mikrotubuli des Zytoskeletts interagierenden Proteine. MAP2 jedoch kann ausschließlich in Neuronen gefunden werden, wo es für die Stabilisierung der Mikrotubuli eine wichtige Rolle spielt. Während MAP2 im Zellkörper und in den Dendriten der Neurone zu finden ist, ist das 160 Kilodalton (kD) schwere Neurofilament ein Protein des Zytoskeletts, das vor allem in den Axonen lokalisiert ist. Gegen MAP2 und Neurofilament gerichtete Antikörper konnten somit verwendet werden, um neuronale Somata und Dendriten beziehungsweise Axone zu markieren. Eine Betrachtung der Morphologie der Neurone zeigte, dass in der Kultur verschiedene neuronale Zelltypen präsent waren. Es ließen sich Neurone einer pyramidalen

Morphologie, die einen prominenten apikalen Dendriten und zwei basalen Dendriten aufwiesen, von Neuronen mit einer radialen Anordnung der Dendriten unterscheiden (s. Abb. 3.1). Die Durchmesser der neuronalen Somata wiesen unterschiedliche Werte auf und betrugen zwischen 10 und 20  $\mu\text{m}$ .

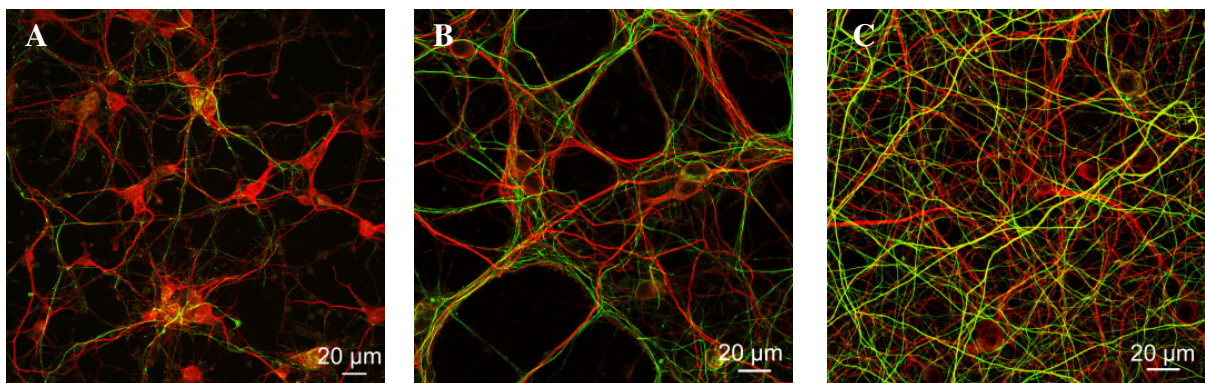


**Abb. 3.1:** Morphologie der Neurone nach 21 Tagen *in vitro*.

[A] Neuron mit pyramidaler Morphologie. Der apikale Dendrit lässt sich von den zwei basalen Dendriten unterscheiden.

[B] Neuron mit radialer Anordnung der Dendriten

Nach 7 Tagen *in vitro* waren nur verhältnismäßig kurze Dendriten und wenig Neurofilament auszumachen (s. Abb. 3.2 A). Doch nach der zweiten Woche in Kultur waren deutlich ausgewachsene Dendriten und Axone zu erkennen (s. Abb. 3.2 B), welche nach einer weiteren Woche ein dichtes Neuritengeflecht bildeten (s. Abb. 3.2 C). Die Neurite erreichten zu diesem Zeitpunkt eine Länge von mehreren 100  $\mu\text{m}$ .



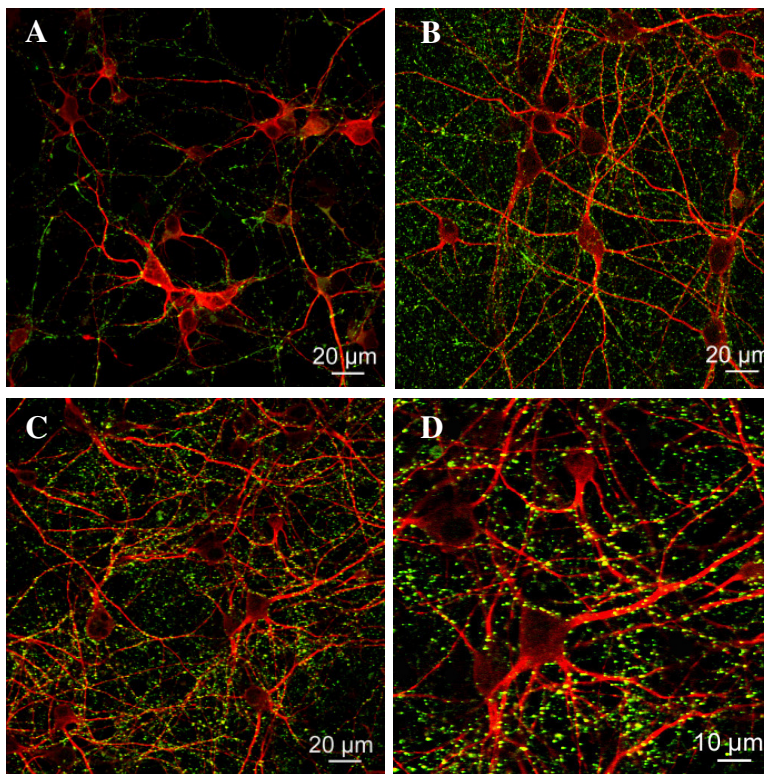
**Abb. 3.2.:** Neuronales Zellwachstum nach 7 [A], 14 [B] und 21 [C] Tagen *in vitro*.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die durch MAP2 markierten Zellkörper und Dendriten (rot) der Neuronen, sowie die mit einem Antikörper gegen Neurofilament 160 kD markierten Axone (grün).

### 3.1.2 Nachweis von Synapsen

Ein morphologischer Nachweis der Synapsen erfolgte durch eine Markierung mit einem Antikörper, der gegen das in der präsynaptischen Endigung befindliche Protein Synapsin gerichtet war. Bei Synapsin handelt es sich um ein synaptisches Vesikelprotein, welches die Neurotransmitter-Ausschüttung durch Interaktionen mit synaptischen Vesikeln der präsynaptischen Membran und Elementen des Zytoskeletts reguliert (Pieribone *et al.*, 1995).

Die Färbungen zeigten, dass nach 7 Tagen *in vitro* schon Synapsen vorlagen, jedoch in recht geringer Anzahl (s. Abb. 3.3 A). In der zweiten und dritten Woche kam es jedoch zu einem starken Anstieg der Synapsendichte (s. Abb. 3.3 B und C). Eine detailliertere Betrachtung der Synapsinfärbung zeigt die Detektion einzelner an den Dendriten und Somata lokalisierter punktförmiger Markierungen (s. Abb. 3.3 D).



**Abb. 3.3:** Synapsendichte neuronaler Netzwerke nach 7 [A], 14 [B, D] und 21 [C] Tagen *in vitro*.

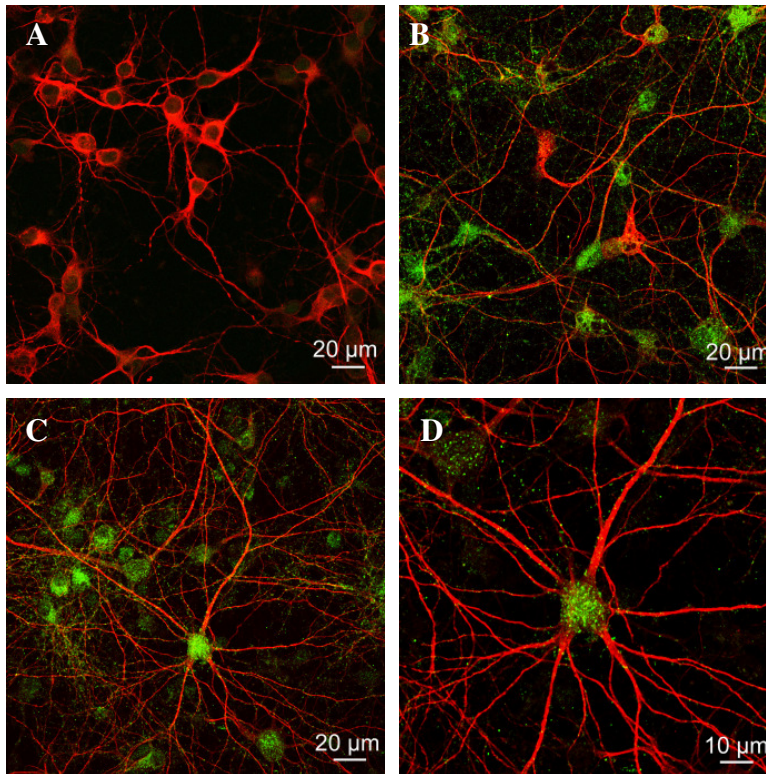
Die konfokalen Aufnahmen zeigen die Synapsen (grün), welche mit einem Antikörper gegen Synapsin markiert wurden, sowie die durch MAP2 markierten Zellkörper und Dendriten (rot) der Neuronen.

[D] zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Färbung nach 21 Tagen *in vitro*.

### 3.1.3 Auftreten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors

Der zeitliche Verlauf der GABA<sub>A</sub>-Rezeptorexpression wurde durch eine Markierung der  $\alpha 1$ -Untereinheit veranschaulicht. Nach 7 Tagen *in vitro* zeigten die Neurone noch keine Expression des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors (s. Abb. 3.4 A). Nach 14 und 21 Tagen *in vitro* hingegen erfolgte eine deutliche Detektion des Rezeptors (s. Abb. 3.4 B und C). Dabei wurden nach zwei und drei Kulturwochen bei nahezu allen Zellen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren

detektiert. Die Expression war vornehmlich im Bereich der Zellkörper lokalisiert, wobei durch den Antikörper distinkte Punkte markiert wurden (s. Abb. 3.4 D).

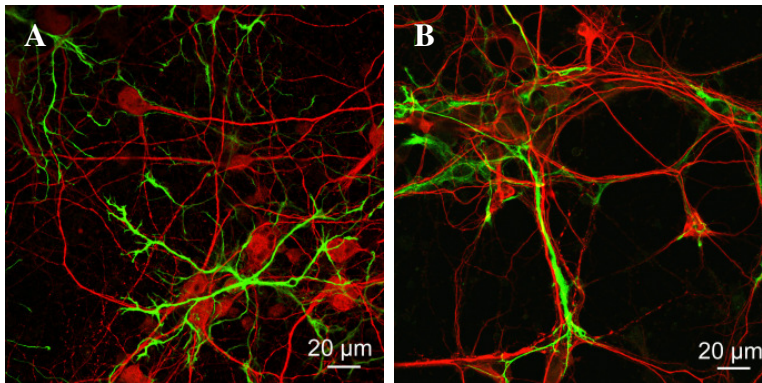


**Abb. 3.4:** Expression des  $GABA_A$ -Rezeptors bei neuronalen Netzwerken nach 7 [A], 14 [B] und 21 [C, D] Tagen *in vitro*.

Die  $GABA_A$ -Rezeptoren (grün) wurden mit einem Antikörper gegen die  $\alpha_1$ -Untereinheit des Rezeptors markiert, die Zellkörper und Dendriten (rot) der Neuronen mit einem Antikörper gegen MAP2. Ein vergrößerter Ausschnitt der konfokalen Aufnahme nach 21 Tagen *in vitro* [D] zeigt, dass eine punktuelle Markierung vorliegt.

### 3.1.4 Astrozyten

Bei den verwendeten Kulturen handelte es sich um Mischkulturen, die den Zellbestand des präfrontalen Kortex, aus dem sie gewonnen wurden, repräsentierten. Für die Kultivierung wurde serumfreies Neurobasalmedium verwendet, welches die Proliferation der neben den Neuronen in Kultur vorhandenen Gliazellen einschränkt. Im zentralen Nervensystem sind Astrozyten der zahlreichste Gliazelltyp. Um einen Eindruck vom Vorkommen und der Proliferationsfähigkeit dieser Zellen zu gewinnen, wurden die Astrozyten mit einem gegen GFAP (glial fibrillary acidic protein, „saures Gliafaserprotein“) gerichteten Antikörper markiert. Bei GFAP handelt es sich um das wesentliche Intermediärfilament im Zytoplasma reifer Astrozyten. Die auf diese Weise markierten sternförmigen Zellen wiesen ein Perikaryon mit flächiger Morphologie und einem Durchmesser von circa 10 bis 30  $\mu\text{m}$ , sowie zahlreiche verzweigte Ausläufer auf. Der Ausdehnungsradius dieser Ausläufer erstreckte sich von etwa 80  $\mu\text{m}$  bis hin zu 200  $\mu\text{m}$ . Nach 7 Tagen *in vitro* waren nur vereinzelte Zellen zu finden. In der zweiten Woche nahm ihre Anzahl deutlich zu (s. Abb. 3.5 A), wobei das Verhältnis zur Neuronenanzahl etwa 1:4 betrug. Die Aufnahmen ließen nach 21 Tagen *in vitro* keinen weiteren Anstieg in der Astrozytendichte erkennen (s. Abb. 3.5 B).



**Abb. 3.5:** Astrozytenwachstum in kortikalen Kulturen nach 14 [A] und 21 [B] Tagen *in vitro*. Die Astrozyten (grün) wurden mit einem Antikörper gegen GFAP markiert, die Zellkörper und Dendriten (rot) mit einem Antikörper gegen MAP2.

### 3.1.5 Oligodendrozyten

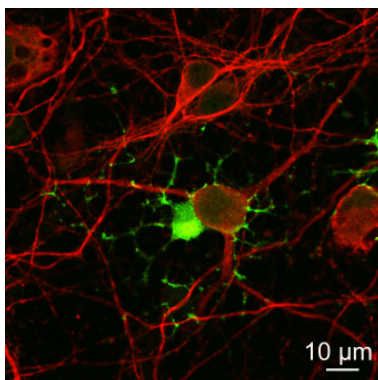
Neben den Astrozyten wurde die Zellkultur auf das Vorhandensein von Oligodendrozyten untersucht. Diese Gliazellen bilden im zentralen Nervensystem Zellfortsätze, die die Axone umwickeln und die Myelinscheide bilden. Diese elektrische Isolierung der Nervenfasern ermöglicht eine schnelle Erregungsweiterleitung.

Die Markierung der Oligodendrozyten erfolgte mit einem Marker gegen das an die Membran angelagerte Myelin-basische-Protein (MBP).

Die den Astrozyten in der Kultur zahlenmäßig weit unterlegenen Oligodendrozyten wiesen radial um den runden Zellkörper angeordnete Zellfortsätze auf, die weniger weitläufig waren als die Fortsätze der Astrozyten (s. Abb. 3.6) und sich auf einen Ausdehnungsradius von 50 bis 60 µm beschränkten. Der Durchmesser der Somata dieser Gliazellen betrug ungefähr 10 µm und war damit vergleichbar zu dem der neuronalen Zellkörper.

Die Oligodendrozyten befanden sich in der Zellkultur zwar meist in enger Nähe zu den Neuronen, die Ausbildung einer Myelinscheide konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Sie waren über den gesamten Zeitraum im Vergleich zu den Neuronen in einer etwa 100-fach geringeren Anzahl zu finden.



**Abb. 3.6:** Konfokale Aufnahme eines Oligodendrozyten in einer kortikalen Kultur nach 14 Tagen *in vitro*.

Die Detektion der Oligodendrozyten (grün) erfolgte durch einen gegen MBP gerichteten Antikörper. Zellkörper und Dendriten (rot) der Neuronen wurden mit einem Antikörper gegen MAP2 markiert.

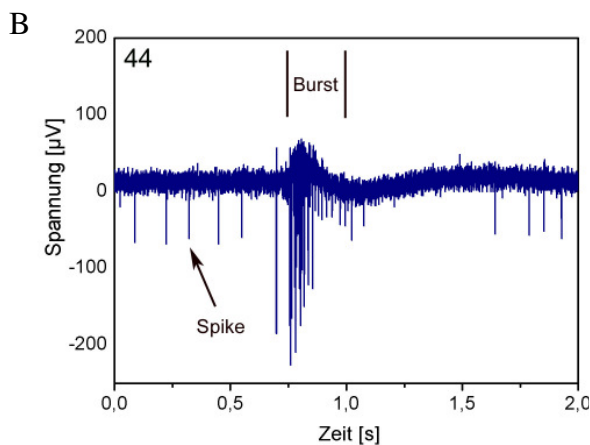
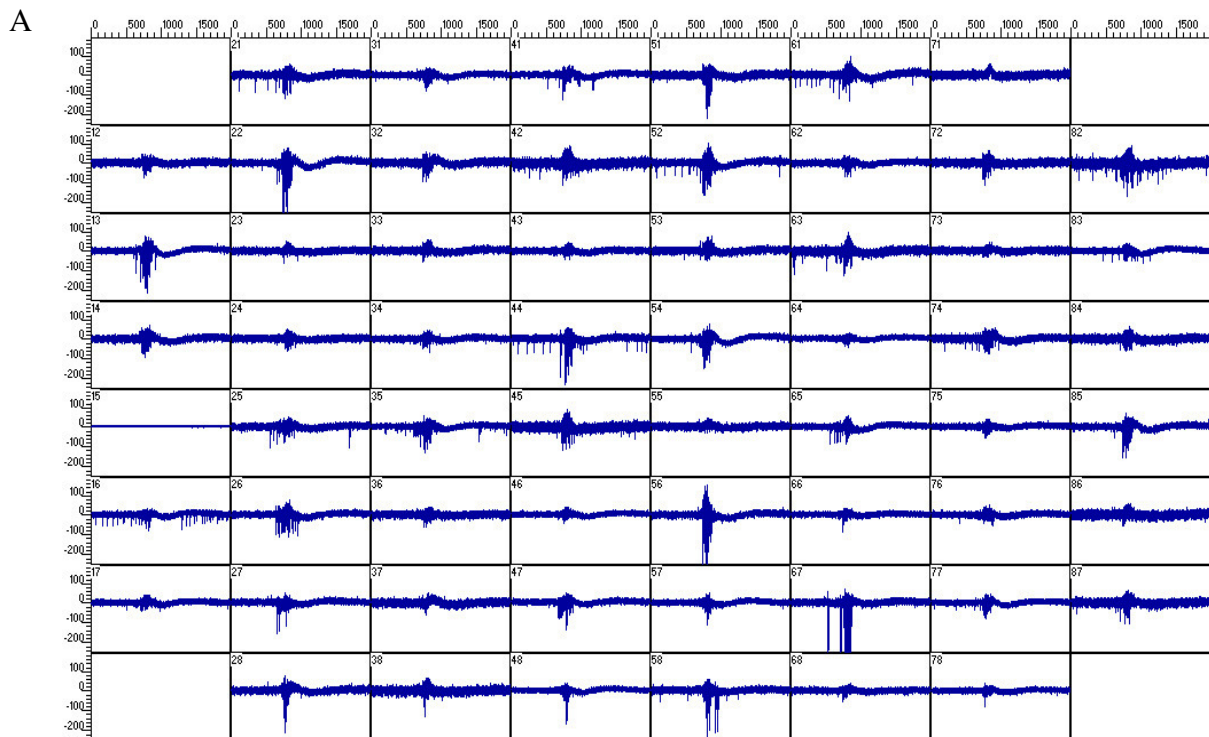
### 3.1.6 Elektrische Aktivität

Nach etwa 10 Tagen in Kultur konnte zum ersten Mal elektrische Aktivität abgeleitet werden. Diese bestand aus spontan auftretenden Einzelsignalen, so genannten Spikes. Mit zunehmender Kulturdauer stieg die Anzahl der Elektroden, von denen Signale abgeleitet werden konnten, an. Diese Spikefolgen verschiedener Ableitungsorte zeigten untereinander keine erkennbare zeitliche Korrelation.

Die ersten hoch-frequenten Spikefolgen, so genannte Bursts, wurden nach 14 Tagen beobachtet. Die Burst-Ereignisse traten zu diesem Zeitpunkt noch in unregelmäßigen Abständen auf. Nach etwa 3 Wochen *in vitro* wurden neben unkorrelierten Spikes synchronisierte Burst-Ereignisse, die in regelmäßigen Intervallen von 10 bis 20 Sekunden auftraten, detektiert. Die Bursts wiesen dabei eine Dauer von 100 bis 200 ms und eine Spikefrequenz von etwa 150 bis 200 Hz auf.

In einem Zeitraum von mehreren hundert Millisekunden nach einem Burst, zeigten die Neurone typischerweise keine Spikeaktivität, wie die vergrößerte Darstellung der Ableitung in Abb. 3.7 B verdeutlicht.

Zu einem Zeitpunkt von 21 Tagen *in vitro* lag eine stabile, reproduzierbare Netzwerkaktivität vor. Abb. 3.7 A zeigt die von den 60 Elektroden eines MEAs verzeichnete native Aktivität für eine Zeitdauer von 2 Sekunden nach 24 Tagen *in vitro*. Jedes einzelne Fenster stellt die von einer Elektrode gemessene Aktivität dar. Dabei wird deutlich, dass nahezu alle Elektroden Signale erfassen, die jedoch in den Amplituden differieren. Einfluss auf die Signalamplitude hat die Distanz zwischen Zelle und Elektrode, die Zellgeometrie, die Isolation der Elektrode durch das Neuron, sowie die Qualität der Elektrode. Die Amplituden der einzelnen Spikes betragen in der Regel zwischen 50 und 300  $\mu\text{V}$ . In dem dargestellten zeitlichen Ausschnitt kam es zu einem Burstereignis, das auf allen Elektroden gleichzeitig auftrat. Neben den Bursts wurden auch einzelne Spikes erfasst.



**Abb. 3.7:** Spontane native Aktivität eines Netzwerkes nach 24 Tagen *in vitro*.

[A] Darstellung der von den 60 Elektroden des MEA gemessenen Aktivität.

Jedes Fenster zeigt die von einer Elektrode (Nr. der Elektrode links oben) verzeichneten Signale für einen Zeitausschnitt von 2 Sekunden. Die  $8 \times 8$  Geometrie der Elektroden wird auch in der Darstellung der Aktivität beibehalten.

[B] Aktivität der Elektrode Nr. 44. Kennzeichnend gemacht sind einzelne Spikes und ein Burst. Auf den Burst folgt eine kurze Phase ohne Spontanaktivität.

## 3.2 Pharmakologische Untersuchungen an neuronalen Netzwerken auf Multielektrodenarrays

Um zu überprüfen, ob neuronale Netzwerke auf Multielektrodenarrays als sensitives und zuverlässiges Biosensorsystem fungieren können, wurde die Modifikation der Netzwerkaktivität durch Substanzen, die an den ionotropen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor binden, untersucht.

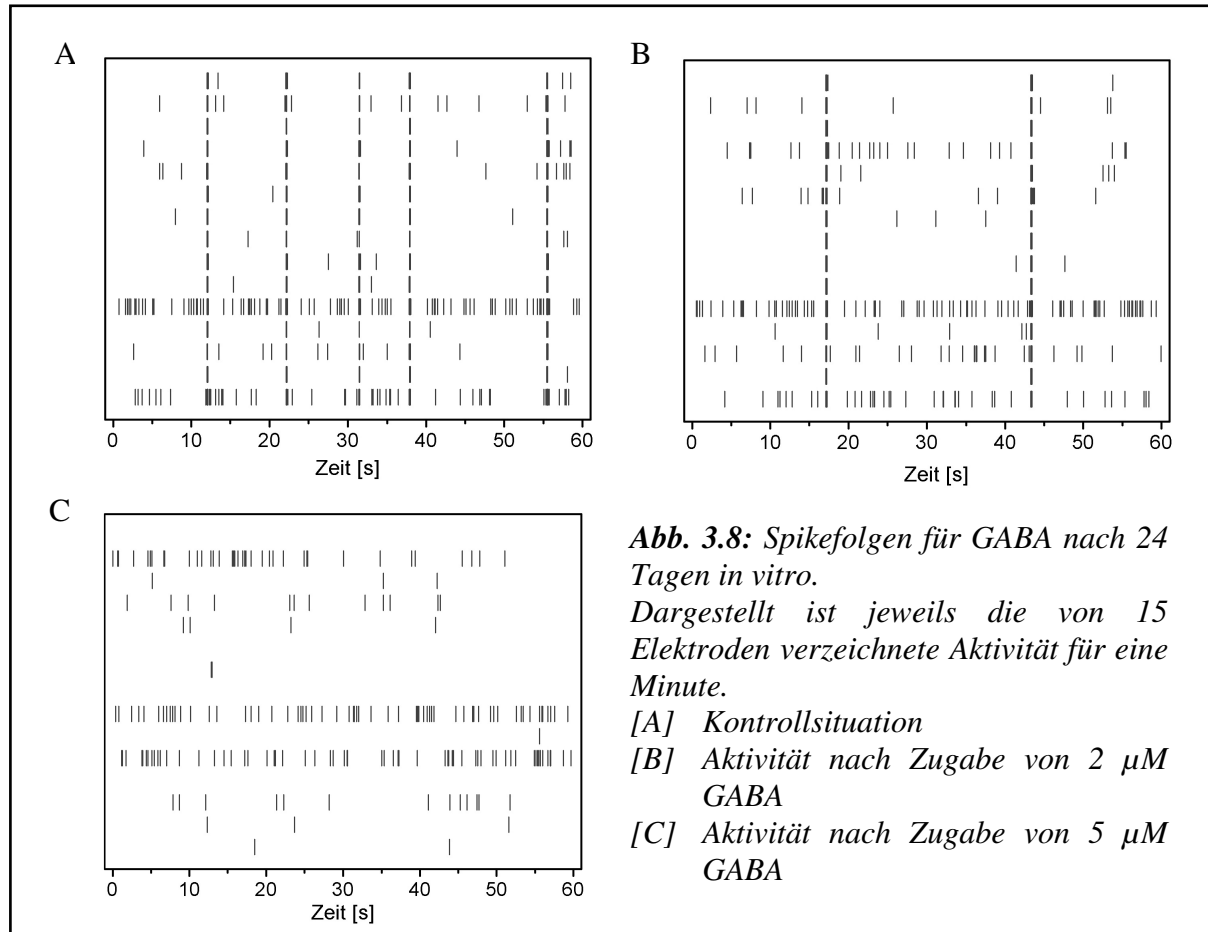
Zur Analyse der Netzwerkantwort wurden neben einer Bestimmung der Spikerate Parameter herangezogen, welche auf Bursts basieren, da diese das hervorstechende Merkmal der Aktivität kortikaler neuronaler Netzwerke sind. Untersucht wurde der Einfluss der verwendeten Substanzen auf die Burstrate, die Burstdauer und die Anzahl der Spikes innerhalb eines Bursts in Abhängigkeit von der Konzentration der zugegebenen Substanz. Um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu prüfen, wurde jede Messreihe mehrmals mit unterschiedlichen Kulturen aus unterschiedlichen Präparationen durchgeführt. Pro Kultur wurden für eine Substanzkonzentration dabei 20 bis 40 Elektroden ausgewertet und aus den einzelnen Messwerten der Mittelwert ermittelt. Neben dem natürlichen Transmitter GABA (Gamma-Aminobuttersäure) wurden der GABA<sub>A</sub>-Agonist Muscimol, der kompetitive GABA<sub>A</sub>-Antagonist Bicucullin, der allosterische GABA<sub>A</sub>-Kanal-Blocker Picrotoxinin, sowie das Benzodiazepin Temazepam und seine Glucuronide eingesetzt.

### 3.2.1 Modifikation der Netzwerkaktivität durch GABA

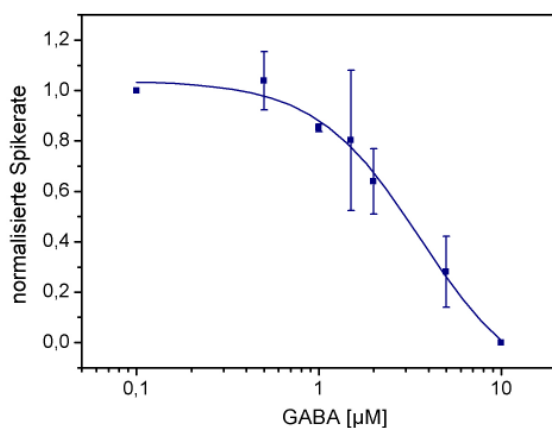
Zunächst wurde die Sensitivität der Zellkulturen auf extern zugefügtes GABA überprüft. Um die Veränderungen der Netzwerkaktivität zu visualisieren, wurden die von mehreren Elektroden gemessenen Spikefolgen für die Kontrollsituation und nach Applikation verschiedener GABA-Konzentrationen erstellt (s. Abb. 3.8 A, B und C). Dabei wurden Ereignisse, deren Amplitude einen definierten Schwellenwert überschritt, als Spike detektiert und zum Zeitpunkt ihres Auftretens dargestellt. Die Spikeform sowie die Amplitude wurden vernachlässigt. Bei einer solchen Darstellung der detektierten Spikes spricht man auch von Rasterplot. Jeder einzelne Strich im Rasterplot repräsentiert einen Spike. Dickere Balken stellen mehrere Spike-Ereignisse mit einer hohen Frequenz und somit Bursts dar. Die Darstellung der Spikefolgen mehrerer Elektroden im Rasterplot zeigt, dass Bursts stets von einem Großteil der Elektroden synchron detektiert wurden (s. Abb. 3.8 A, B und C).

Mit steigender GABA-Konzentration nahm die Anzahl der Burst-Ereignisse ab. Während in der Kontrollsituation bei der dargestellten Messung in einer Minute 5 Bursts auftraten, sank

die Rate nach Applikation von  $2 \mu\text{M}$  GABA auf 2 Bursts pro Minute ab. Bei einer  $5 \mu\text{M}$  Dosis konnte bei dieser Messung kein Burst mehr detektiert werden. Allerdings registrierten weiterhin viele Elektroden einzelne Spikes.

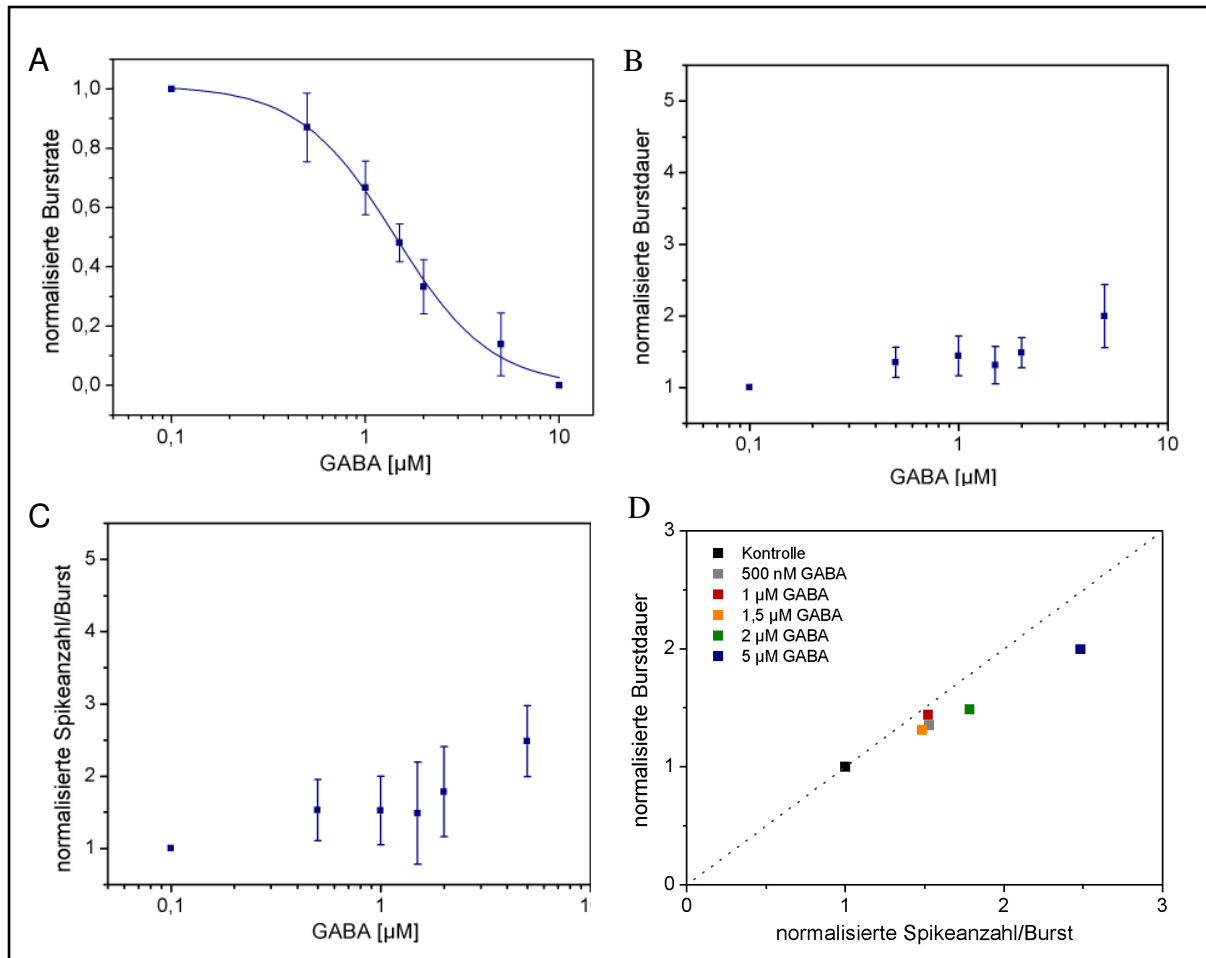


Die Reduktion der Netzwerkaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des extern applizierten GABA drückte sich in einem Absinken der Spikerate aus (s. Abb. 3.9). Die Halbwirksamkeitsdosis dieser Dosis-Wirkungs-Beziehung lag bei  $3,60 \pm 1,05 \mu\text{M}$ . Der Betrag des Hill-Koeffizienten betrug dabei  $1,51 \pm 0,40$ .



**Abb. 3.9:** Einfluss von GABA auf die Spikerate ( $n=4$ )  
 Die Spikerate wurde durch GABA mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $3,60 \pm 1,05 \mu\text{M}$  reduziert. Der Betrag des Hill-Koeffizienten betrug  $1,51 \pm 0,40$ .

Eine Analyse der Burstrate machte deutlich, dass das Netzwerk auf zugefügtes GABA in einem Konzentrationsbereich von 500 nM bis 5  $\mu$ M mit einer Reduktion der generierten Bursts reagierte (s. Abb. 3.10 A). Der Betrag des Hill-Koeffizient war auch hier mit einem Wert von  $1,70 \pm 0,26$  signifikant höher als 1. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei  $1,43 \pm 0,11 \mu$ M, und ist somit signifikant niedriger als die Halbwirksamkeitsdosis, der sich aus einer Analyse der Spikerate ergab ( $p < 0,05$ ). Folglich war die Sensitivität der Burstrate gegenüber GABA deutlich höher als die der Spikerate.



**Abb. 3.10:** Einfluss von GABA auf die Burstaktivität

GABA reduzierte die Burstrate [A] mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $1,43 \pm 0,11 \mu$ M. Der Betrag des Hill-Koeffizienten betrug  $1,70 \pm 0,26$ . Die Burstdauer [B] und Spikeanzahl/Burst [C] erfuhren keine signifikanten Veränderungen ( $p < 0,05$ ). Die normalisierten Werte für die Burstdauer in Abhängigkeit von der Spikeanzahl/Burst liegen nahe einer Linie der Steigung 1 (gepunktete Linie) [D]. Zwischen der Burstdauer und Spikeanzahl/Burst besteht damit eine lineare Beziehung, was zeigt, dass auch die interspikeintervalle in den Bursts keine Veränderung erfuhren.

Es gilt jeweils:  $n=4$

Bezüglich der Burstdauer und Spikeanzahl pro Burst war mit steigender GABA-Konzentration eine Zunahme der Werte zu erkennen (s. Abb. 3.10 B, C und D). Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  GABA wurden pro Minute noch ein bis zwei Bursts generiert, die im Vergleich zu den im Kontrollzustand auftretenden Bursts durchschnittlich die zweifache Burstdauer und etwa die 2,5-fache Anzahl an Spikes erkennen ließen. Diese Differenzen waren jedoch statistisch nicht signifikant. Zwischen den Werten für die Burstdauer und Spikeanzahl/Burst besteht eine lineare Beziehung (s. Abb. 3.10 D), was zeigt, dass die Interspikeintervalle zwischen den Spikes der Bursts keine Veränderung erfuhren.

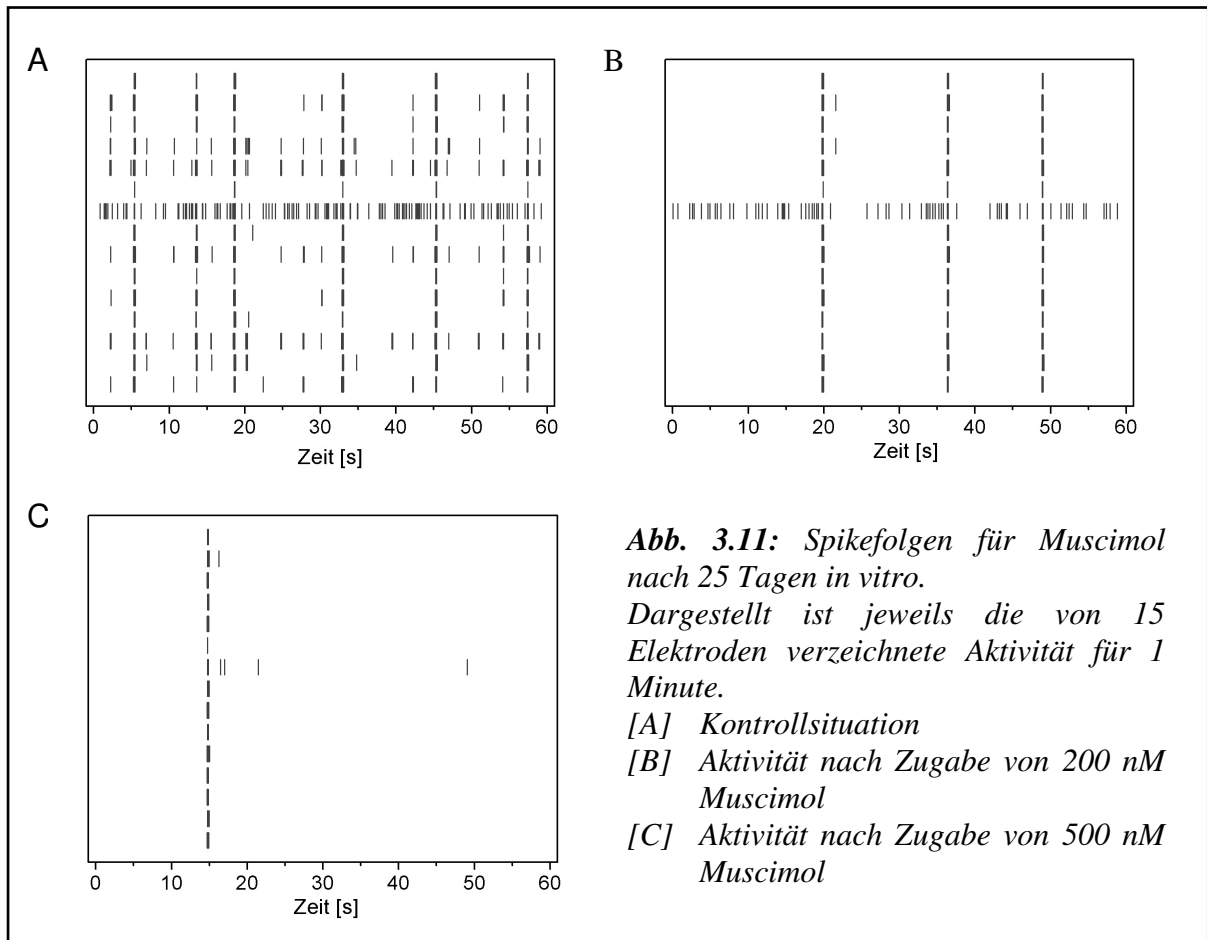
Die hemmende Wirkung von GABA ist darauf zurückzuführen, dass dessen Bindung an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor zu einer Öffnung des für Chlorid-Ionen passierbaren Rezeptorkanals führte. Aufgrund des zelleinwärts gerichteten Konzentrationsgradienten für Chlorid, kam es daher zu einem Anionen-Einstrom in die Zelle. Die daraus resultierende Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran drückte sich in einer Verminderung der Aktionspotenzialrate in den GABA-sensitiven Neuronen aus.

Die Analyse der Veränderungen in der Netzwerkaktivität durch Zugabe ansteigender GABA-Konzentrationen zeigte, dass die Burstrate und Spikerate in diesem Fall sensitiv modifiziert werden konnte, wobei die Burstrate den sensitiveren Parameter zur Analyse der dosisabhängigen Modifikation der Netzwerkantwort darstellte.

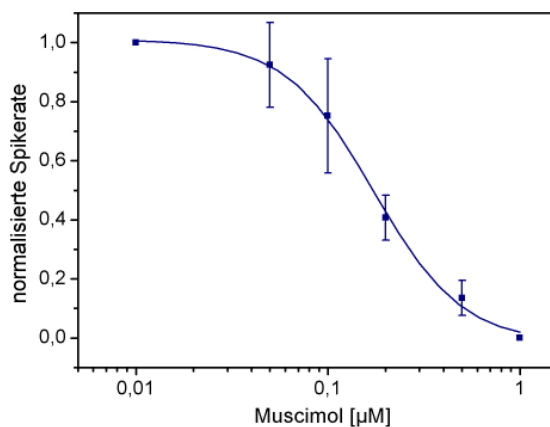
### 3.2.2 Modifikation der Netzwerkaktivität durch Muscimol

Die Applikation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisten Muscimol führte ebenfalls zu einer dosisabhängigen Verminderung der elektrischen Aktivität. Die Darstellung der Spike-Folgen mehrerer Elektroden macht deutlich, dass Muscimol schon in einer Konzentration von 200 nM eine deutliche Abnahme der Aktivität bewirkte. Sowohl die Burstrate als auch die Anzahl der zeitlich unsynchronen Spike-Ereignisse wurde deutlich reduziert (s. Abb. 3.11). In der dargestellten Messung war nach Zugabe einer 500 nM Muscimol-Dosis kaum mehr Aktivität zu verzeichnen. Es konnte pro Minute lediglich ein Burst und kaum noch vereinzelte Spikes detektiert werden. Schon die Betrachtung der Spikefolgen zeigte somit, dass Muscimol verglichen mit GABA die Aktivität der neuronalen Netzwerke in einem deutlich niedrigeren Konzentrationsbereich herabsetzte.

Bei Muscimol handelt es sich um ein Struktur analogon zu GABA, das direkt an die GABA-Bindungsstelle des GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkomplexes bindet und eine Öffnung des Rezeptorkanals bewirkt. Durch den Einstrom der Chlorid-Ionen wird die postsynaptische Membran hyperpolarisiert, was in den dargestellten Messungen zu einer deutlich messbaren Reduktion der elektrischen Aktivität führte.



Die Analyse machte deutlich, dass eine Dosis zwischen etwa 20 nM und 1  $\mu\text{M}$  zu einer stetigen Reduktion der Spikeanzahl führte (s. Abb. 3.12). Die Halbwirksamkeitsdosis lag hier bei  $0,173 \pm 0,014 \mu\text{M}$ , der Betrag des Hill-Koeffizienten betrug  $1,88 \pm 0,27$ .

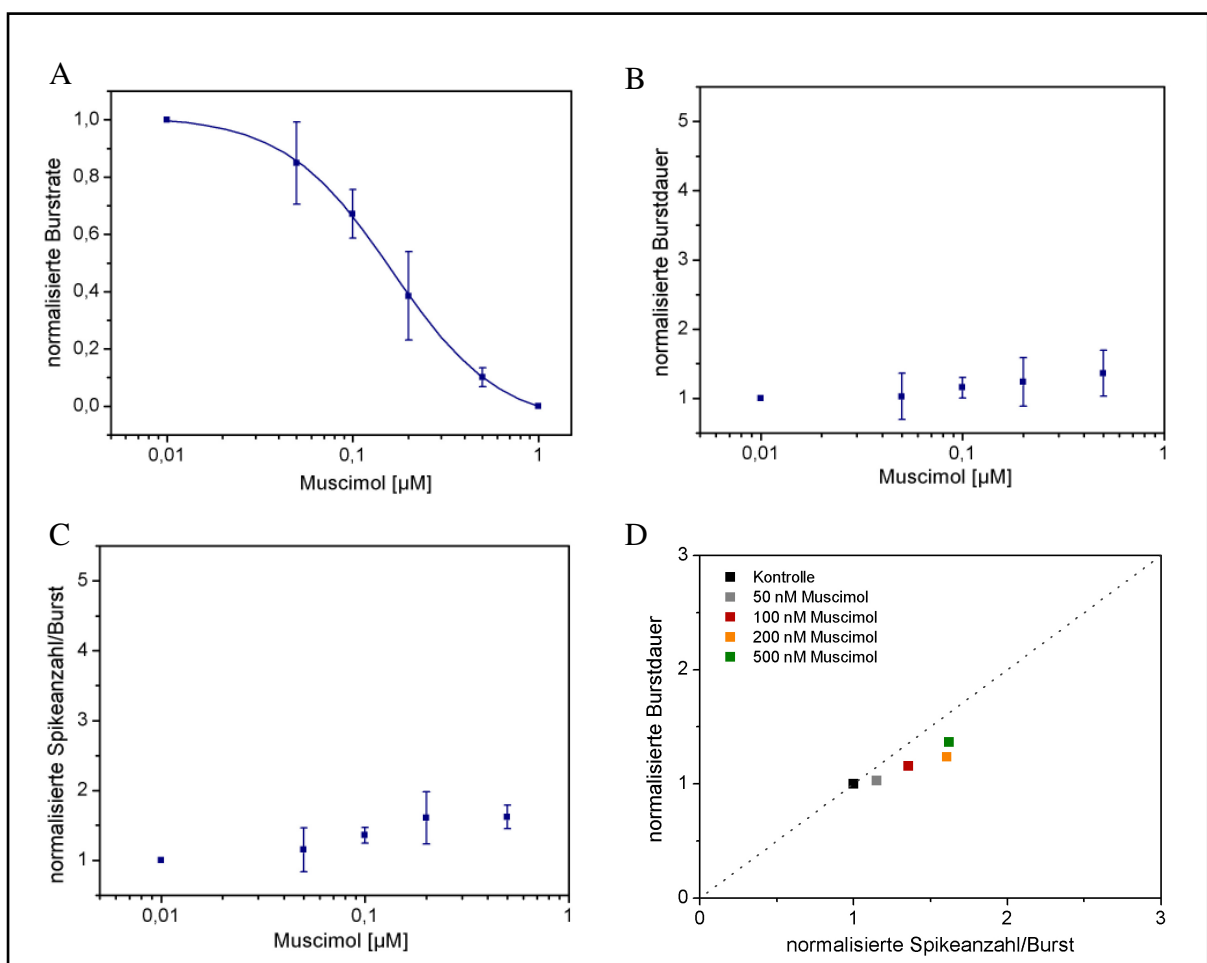


**Abb. 3.12:** Einfluss von Muscimol auf die Spikerate, ( $n = 4$ )

Die Spikerate wurde durch Muscimol mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $0,173 \pm 0,014 \mu\text{M}$  reduziert. Der Betrag des Hill-Koeffizienten betrug  $1,88 \pm 0,27$ .

Für die Burstrate ergab sich eine zur Spikerate ähnliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Steigende Dosierungen reduzierten die Rate der generierten Bursts ebenfalls in einem Konzentrationsbereich von etwa 20 nM bis 1  $\mu$ M (s. Abb. 3.13 A). Der  $IC_{50}$ -Wert betrug  $0,162 \pm 0,005 \mu$ M und unterschied sich damit nicht signifikant von der Halbwirksamkeitsdosis bezüglich der Spikerate. Für den Betrag des Hill-Koeffizienten ergab sich ein Wert von  $1,51 \pm 0,07$ . Verglichen mit GABA zeigte das neuronale Netzwerk eine zehnfach höhere Sensitivität für Muscimol.

Für die Burstdauer und die Spikeanzahl/Burst ergab sich bei höheren Muscimol-Dosierungen nur eine geringfügige, nicht signifikante Zunahme der Werte (s. Abb. 3.13 B, C und D).



**Abb. 3.13:** Einfluss von Muscimol auf die Burstaktivität

Muscimol setzte die Burstrate [A] mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $0,162 \pm 0,005 \mu$ M herab. Der Betrag des Hill-Koeffizienten betrug  $1,51 \pm 0,07$ . Die Burstdauer [B] und Spikeanzahl/Burst [C] erfuhren keine signifikanten Veränderungen ( $p < 0,05$ ).

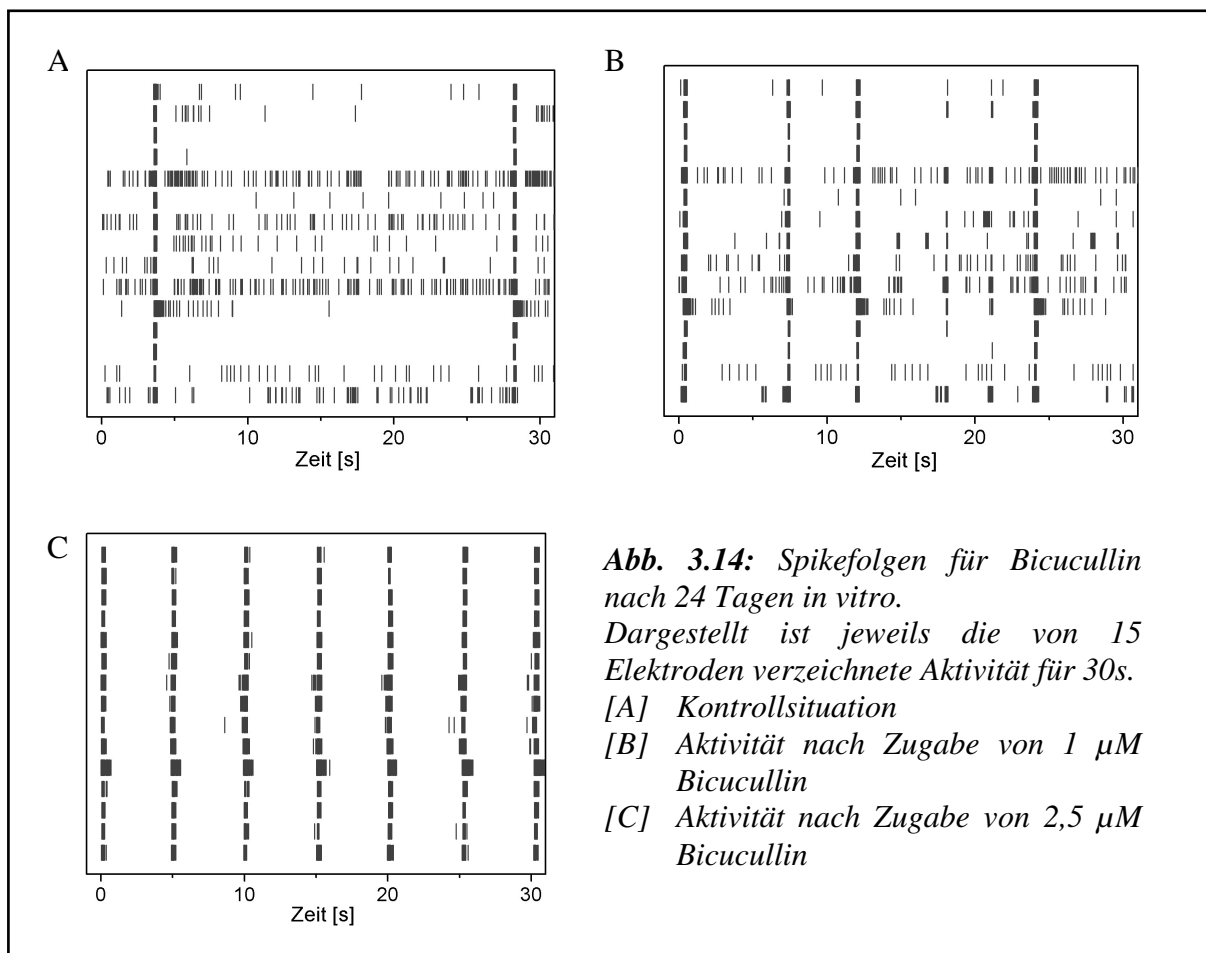
Die normalisierten Werte für die Burstdauer in Abhängigkeit von der Spikeanzahl/Burst stiegen nur geringfügig an und liegen nahe einer Linie der Steigung 1 (gepunktete Linie) [D].

Es gilt jeweils:  $n=4$

### 3.2.3 Modifikation der Netzwerkaktivität durch Bicucullin

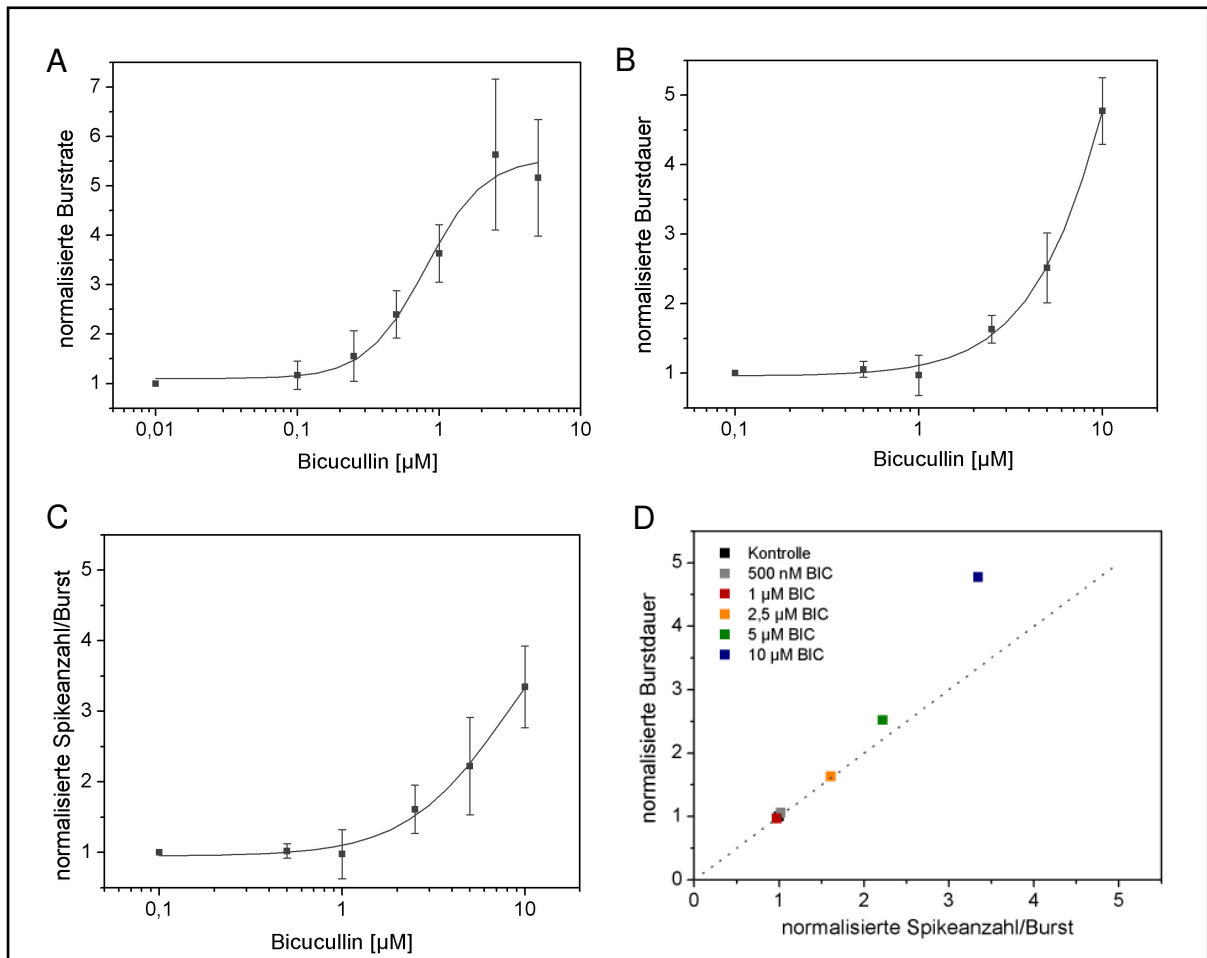
Bicucullin ist ein kompetitiver GABA<sub>A</sub>-Antagonist. Das heißt, es konkurriert direkt mit GABA um eine Bindung an der Bindungsstelle des Rezeptors. Betrachtet man die Spike-Folgen mehrerer Elektroden für die Kontrollbedingung und für die Aktivität nach Zugabe von 1 bzw. 2,5  $\mu\text{M}$  Bicucullin, so wird deutlich, dass die antagonistische Wirkung von Bicucullin mit zunehmender Konzentration in einem Anstieg synchron auftretender Burst-Ereignisse resultierte. Die Anzahl zeitlich unsynchronisierter einzelner Spikes nahm dabei deutlich ab (s. Abb. 3.14 A, B und C).

Kommt es zur Bindung von Bicucullin an die Bindungsstelle des GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkanals, so werden Öffnungswahrscheinlichkeit und durchschnittliche Öffnungszeit des Rezeptors herabgesetzt, wodurch die Leitfähigkeit der Membran für Chlorid-Ionen vermindert wird. Die hemmende Wirkung des Neurotransmitters GABA wird somit durch zugefügtes Bicucullin unterbunden, was sich in einer zunehmenden Enthemmung der Netzwerkaktivität ausdrückte.



**Abb. 3.14:** Spikefolgen für Bicucullin nach 24 Tagen *in vitro*. Dargestellt ist jeweils die von 15 Elektroden verzeichnete Aktivität für 30s.  
 [A] Kontrollsituation  
 [B] Aktivität nach Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Bicucullin  
 [C] Aktivität nach Zugabe von 2,5  $\mu\text{M}$  Bicucullin

Der schon bei der Betrachtung der Spike-Folgen augenscheinliche Anstieg der Netzwerkaktivität fand auch in der Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der Burstrate Ausdruck (s. Abb. 3.15 A). Es ergab sich ein dosisabhängiger Anstieg der Burstrate, wobei die Schwellenkonzentration bei etwa  $100 \mu\text{M}$  lag und die Sättigung bei einer Konzentration von  $2.5 \mu\text{M}$  erreicht wurde. Die Halbwirksamkeitsdosis wurde für eine Konzentration von  $0,80 \pm 0,14 \mu\text{M}$  ermittelt. Der Hill-Koeffizient betrug  $2,09 \pm 0,71$ .

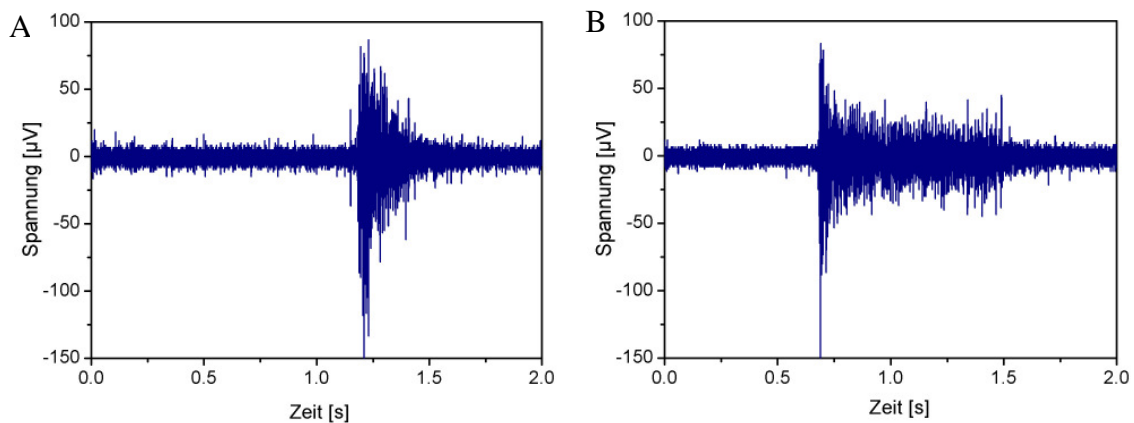


**Abb. 3.15:** Einfluss von Bicucullin auf die Burstaktivität

Bicucullin erhöhte die Burstrate [A]. Die Halbwirksamkeitsdosis lag bei  $0,80 \pm 0,14 \mu\text{M}$ , der Hill-Koeffizient betrug  $2,09 \pm 0,71$ . Die Burstdauer [B], sowie Spikeanzahl/Burst [C] nahmen ebenfalls zu. Die normalisierten Werte für die Burstdauer in Abhängigkeit von der Spikeanzahl/Burst liegen bis zu einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  nahe einer Linie der Steigung 1 (gepunktete Linie) [D]. Diese lineare Beziehung zwischen der Burstdauer und der Spikeanzahl/Burst zeigt, dass die interspikeintervalle in den Bursts mit steigenden Bicucullin-Konzentrationen keine Veränderung erfuhren. Lediglich bei einer Dosis von  $10 \mu\text{M}$  stiegen die interspikeintervalle geringfügig an.

Es gilt jeweils:  $n=5$

Die Zugabe von Bicucullin wirkte sich ebenfalls deutlich auf die Burstdauer aus. Originalableitungen einer Elektrode zeigen eine deutliche zeitliche Ausdehnung der Bursts (s. Abb. 3.16). Bezüglich dieses Parameters wies das System mit einer Schwellenkonzentration von  $2.5 \mu\text{M}$  jedoch eine wesentlich geringere Sensitivität auf. Allerdings stieg die Burstdauer bis zu einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  weiter an (s. Abb. 3.15 B). Somit wurde eine zeitliche Ausdehnung der Bursts erst durch Dosierungen hervorgerufen, die hinsichtlich der Burstrate schon den maximalen Effekt erzielt hatten. Ferner bewirkten weiter ansteigende Konzentrationen keine weitere Zunahme der Burstrate, wohl aber der Burstdauer.



**Abb. 3.16:** *Modifikation der Burstlänge durch Bicucullin*  
 Dargestellt ist die extrazelluläre Ableitung von einer Elektrode für einen Zeitausschnitt von 2 Sekunden im Kontrollzustand [A] und nach Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  Bicucullin [B].

Zusätzlich war im Konzentrationsbereich von  $2,5$  bis  $10 \mu\text{M}$  auch ein dosisabhängiger Anstieg der Spikeanzahl/Burst zu verzeichnen (s. Abb. 3.15 C).

Betrachtet man den Anstieg der Burstdauer in Abhängigkeit von der Spikeanzahl per Burst, so wird deutlich, dass die normalisierten Werte bis zu einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  in einer linearen Beziehung zueinander stehen (s. Abb. 3.15 D). Dies beweist, dass die interspikeintervalle zwischen den Spikes eines Bursts für diese Konzentrationen keine Veränderung erfuhren.

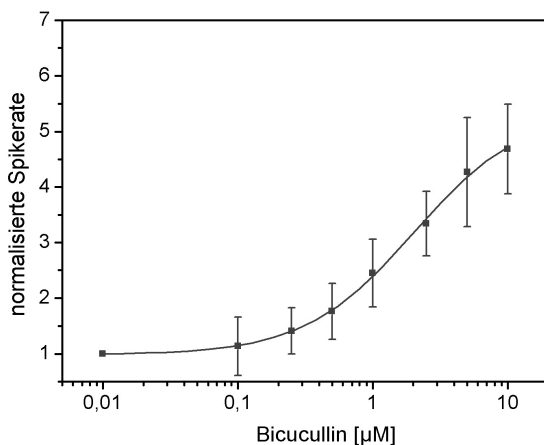
Dagegen kam es unter dem Einfluss von  $10 \mu\text{M}$  Bicucullin zu einem Anstieg der interspikeintervalle (ISIs). Hier stieg die Burstdauer im Vergleich zu der nativen Situation um etwa das Fünffache an, während sich die Anzahl der Spikes pro Burst nur um das Vierfache erhöhte. Somit ergab sich für die ISIs bei einer  $10 \mu\text{M}$  Bicucullinkonzentration ein durchschnittlicher Anstieg um etwa das 1,3-fache.

Für Dosis-Wirkungs-Beziehung der Burstdauer und Spikeanzahl/Burst ergab sich keine Sättigung, da eine stärkere Dosierung als  $10 \mu\text{M}$  zu einem rapiden Abfall der Werte bezüglich

dieser beiden Parameter führte (in Abb. 3.15 B und C nicht dargestellt). Die Applikation von Bicucullin in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  hatte zur Folge, dass die Werte für die Burstdauer und Spikeanzahl/Burst auf die der Kontrollbedingung absanken.

Der dosisabhängige Anstieg der Burstrate und Spikeanzahl/Burst machte sich auch in einem Anstieg der Spikerate bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bemerkbar, wobei die Anzahl der Spikes auf den 5-fachen Wert der Kontrollsituation angehoben wurde (s. Abb. 3.17). Die Halbwirksamkeitsdosis wurde bei einer Konzentration von  $2,01 \pm 0,36 \mu\text{M}$  erreicht. Der Hill-Koeffizient betrug in diesem Fall  $1,08 \pm 0,36 \mu\text{M}$ .

Im Fall des GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Bicucullin wurde somit auch die Spikerate in Abhängigkeit von der zugefügten Konzentration modifiziert. Allerdings war die Halbwirksamkeitsdosis von  $2,01 \pm 0,36 \mu\text{M}$  signifikant höher als der EC<sub>50</sub>-Wert im Fall einer Analyse der Burstrate (EC<sub>50</sub> =  $0,80 \pm 0,14 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0,05$ ). Das System zeigte somit bezüglich der konzentrationsabhängigen Modifikation der Burstrate eine deutlich höhere Sensitivität.



**Abb. 3.17:** Einfluss von Bicucullin auf die Spikerate, ( $n = 5$ )

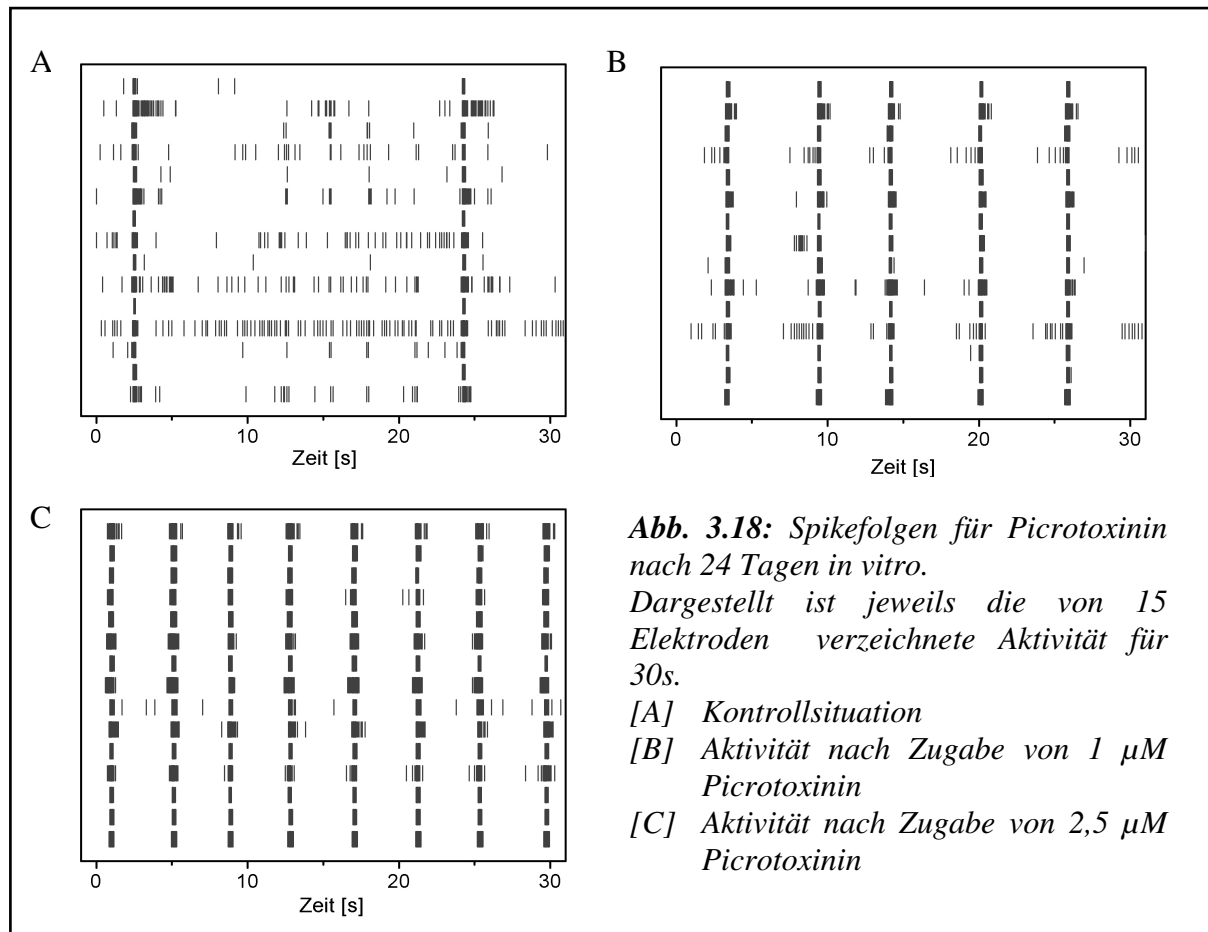
Die Spikerate wurde durch Bicucullin mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $2,01 \pm 0,36 \mu\text{M}$  erhöht. Der Hill-Koeffizient betrug  $1,08 \pm 0,10$ .

### 3.2.4 Modifikation der Netzwerkaktivität durch Picrotoxinin

Neben Bicucullin wurde als GABA<sub>A</sub>-Antagonist Picrotoxinin eingesetzt, wobei es sich um einen nicht-kompetitiven GABA<sub>A</sub>-Kanal-Blocker handelt, der in der Kanalpore bindet.

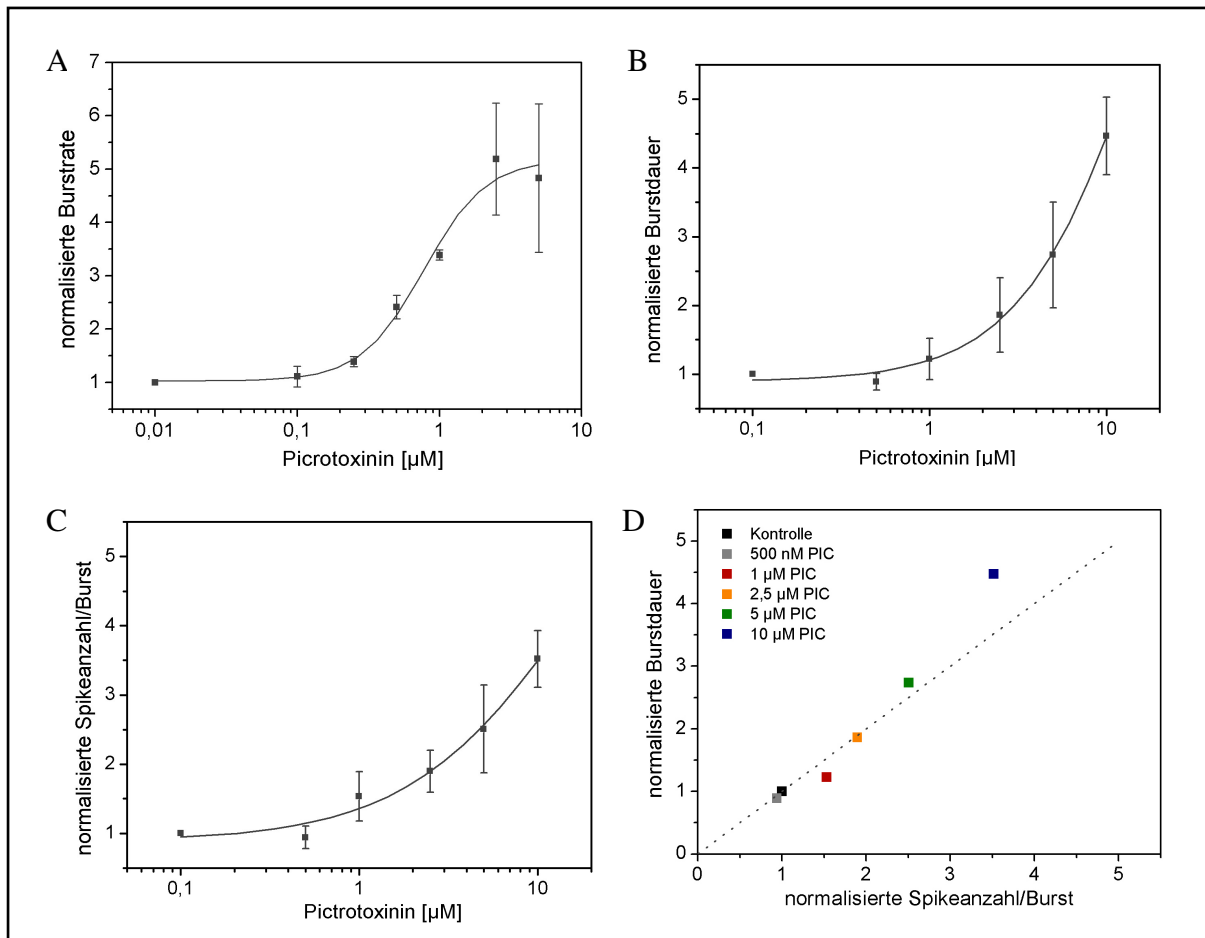
Die Spikefolgen einer Messung für die Kontrollsituation und für die Aktivität nach Applikation einer 1 bzw. 2,5  $\mu\text{M}$  Picrotoxininkonzentration zeigen, dass es auch bei dieser Substanz mit steigender Konzentration zu einer Zunahme synchron und regelmäßig auftretender Burst-Ereignisse kam. Gleichzeitig nahm die Anzahl zeitlich unkorrelierter Spikes ab (s. Abb. 3.18 A, B und C). Damit bewirkte Picrotoxinin ebenso wie Bicucullin eine Steigerung der Netzwerkaktivität, was sich auch hier in einem deutlichen Anstieg der Burstrate bemerkbar machte. Dies ist darin begründet, dass der GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkanal durch die Bindung von Picrotoxinin blockiert wird, wodurch die Leitfähigkeit der Membran für

Chlorid-Ionen herabgesetzt wird. Picrotoxinin bindet jedoch in der Kanalpore des Rezeptorkanals und konkurriert damit im Gegensatz zu Bicucullin nicht direkt mit GABA um dieselbe Bindungsstelle. Aufgrund dieser verschiedenen Wirkungsweisen wäre es denkbar, dass sich Abweichungen in den Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Bicucullin und Picrotoxinin feststellen lassen, die eine Unterscheidung der Substanzen anhand ihrer Wirkungen erlauben könnten.



Die Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der Burstrate (s. Abb 3.19 A) macht deutlich, dass Picrotoxinin, wie schon bei Bicucullin beobachtet, im Konzentrationsbereich von 100 nM bis 2,5  $\mu\text{M}$  zu einem Anstieg der Burstrate führte. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert wurde für eine Konzentration von  $0,77 \pm 0,13 \mu\text{M}$  ermittelt, und unterschied sich somit nicht signifikant von dem für Bicucullin ( $\text{EC}_{50 \text{ Bicucullin}} = 0,80 \pm 0,14 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0,05$ ). Der Hill-Koeffizient betrug  $1,98 \pm 0,64$ . Ansteigende Picrotoxininkonzentrationen erhöhten neben der Burstrate auch die Burstdauer und die Anzahl der Spikes innerhalb der Bursts (s. Abb. 3.19 B und C). Wie schon bei Bicucullin beobachtet, kam es bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einem Anstieg dieser Werte. Allerdings lag der durchschnittliche Maximalwert für die Burstdauer bei Picrotoxinin

etwas niedriger als bei Bicucullin. Die Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.19:** Einfluss von Picrotoxinin auf die Burstaktivität

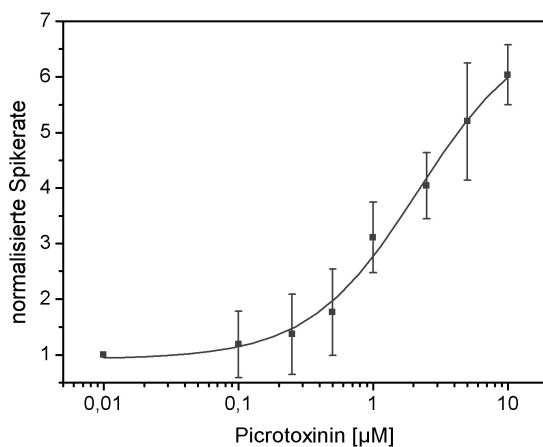
Picrotoxinin erhöhte die Burstrate [A]. Die Halbwirksamkeitsdosis lag bei  $0,77 \pm 0,13 \mu\text{M}$ , der Hill-Koeffizient betrug  $1,98 \pm 0,641$ . Die Burstdauer [B], sowie Spikeanzahl/Burst [C] stiegen ebenfalls an. Die normalisierten Werte für die Burstdauer in Abhängigkeit von der Spikeanzahl/Burst liegen bis zu einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  nahe einer Linie der Steigung 1 (gepunktete Linie) [D]. Die interspikeintervalle in den Bursts erfuhren somit bei steigenden Picrotoxinin-Konzentrationen keine Veränderung. Lediglich bei einer Dosis von  $10 \mu\text{M}$  stiegen die interspikeintervalle geringfügig an.

Es gilt jeweils:  $n=5$

Die Werte für die Burstdauer in Abhängigkeit von der Spikeanzahl/Burst lagen auch für Picrotoxinin nahe einer Geraden der Steigung 1 (s. Abb. 3.19 D), was darauf schließen lässt, dass die interspikeintervalle innerhalb der Bursts konstant blieben. Lediglich eine Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  bewirkte, wie es schon bei Bicucullin zu beobachten war, eine im Vergleich zur Spikeanzahl/Burst stärkeren Anstieg in der Burstdauer und somit eine durchschnittliche Erhöhung der interspikeintervalle um das etwa 1,3-fache.

Ferner ist auch hier zu beobachten, dass sich für Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei Analyse der Burstdauer und Spikeanzahl/Burst keine Sättigung ergab. Eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  führte auch im Fall von Picrotoxinin zu einem Abfall der Werte auf die des nativen Zustandes (in Abb. 3.19 B und C nicht dargestellt).

Die zunehmende Netzwerkaktivität drückte sich auch in einem dosisabhängigen Anstieg der Spikerate bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  aus (s. Abb. 3.20). Die Halbwirksamkeitsdosis wurde für eine Konzentration von  $2,17 \pm 0,66 \mu\text{M}$  ermittelt und war damit signifikant höher als die mittlere exzitatorische Konzentration im Fall der Burstrate. ( $\text{EC}_{50} = 0,77 \pm 0,13 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0,05$ ). Der Hill-Koeffizient betrug  $1,07 \pm 0,23$ .



**Abb. 3.20:** Einfluss von Picrotoxinin auf die Spikerate, ( $n = 3$ )  
Die Spikerate wurde durch Picrotoxinin mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $2,17 \pm 0,66 \mu\text{M}$  erhöht. Der Hill-Koeffizient betrug  $1,07 \pm 0,23$ .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich für die Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Bicucullin und Picrotoxinin bezüglich der verschiedenen auf Bursts basierenden Parameter und der Spikerate nur geringfügige, nicht signifikante Unterschiede ergaben.

Die Netzwerkantwort erlaubte in den dargestellten Experimenten folglich keine Unterscheidung der beiden Antagonisten.

### 3.2.5 Modifikation der Netzwerkaktivität durch Ko-Applikation eines $\text{GABA}_A$ -Rezeptor-Antagonisten und GABA

Bei alleiniger Zugabe der Antagonisten Bicucullin und Picrotoxinin konnte kein deutlich unterschiedliches Antwortverhalten der neuronalen Netzwerke beobachtet werden. Daher sollte überprüft werden, ob eine Unterscheidung der beiden Substanzen durch eine Ko-Applikation mit GABA ermöglicht werden konnte.

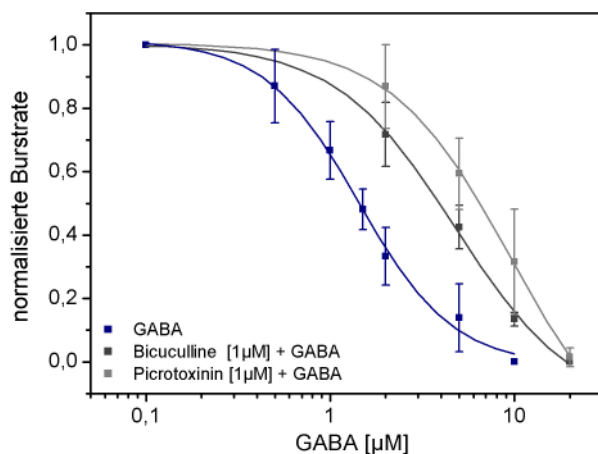
Die eingesetzte Bicucullin- bzw. Picrotoxininkonzentration betrug 1  $\mu\text{M}$  und entsprach damit etwa dem  $\text{EC}_{50}$ -Wert hinsichtlich der Burstrate. Ansteigende GABA-Konzentrationen sollten

den enthemmenden Effekt des entsprechenden Antagonisten kompensieren und zu einer Minderung der Burstrate führen. Bicucullin konkurriert dabei mit GABA direkt um dieselbe Bindungsstelle am Rezeptorkomplex. Picrotoxinin hingegen ist ein nicht-kompetitiver GABA<sub>A</sub>-Kanal-Blocker und bindet in der Kanalpore.

Bei Durchführung der Messreihen wurde zunächst sichergestellt, dass die Burstrate durch die Zugabe einer 1 µM Bicucullin- bzw. Picrotoxininkonzentration in vergleichbarem Maß modifiziert wurde. Alle weiteren Messwerte wurden auf diesen Aktivitätszustand normalisiert.

Wie zu erwarten, bedurfte es bei gleichzeitiger Applikation eines Antagonisten und GABA deutlich höherer GABA-Konzentrationen zur Verminderung der Burstrate als bei alleiniger Zugabe von GABA (s. Abb. 3.21). Die Halbwirksamkeitsdosis für GABA ( $IC_{50\text{ GABA}} = 1,43 \pm 0,11 \mu\text{M}$ ) war signifikant niedriger als die der Wirkstoffkombinationen (Bicucullin + GABA:  $IC_{50} = 4,77 \pm 0,84 \mu\text{M}$ ; Picrotoxinin + GABA:  $IC_{50} = 9,43 \pm 1,56 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0,05$ ). Weiterhin zeigen die  $IC_{50}$ -Werte der Wirkstoffkombinationen, dass im Falle eines durch Picrotoxinin erhöhten Aktivitätszustandes eine höhere GABA-Konzentration zur Reduktion der Burstrate benötigt wurde als bei Kulturen, deren Aktivität durch Bicucullin angehoben wurde.

Die deutlich unterschiedlichen  $IC_{50}$ -Werte für die kombinierte Zugabe von Bicucullin+GABA beziehungsweise Picrotoxinin+GABA bestätigen, dass die Netzwerkantwort eine Unterscheidung der beiden Antagonisten bei einer jeweiligen Ko-Applikation mit GABA ermöglicht.



**Abb. 3.21:** Dosis-Wirkungs-Beziehung für GABA, Bicucullin [1µM] + GABA und Picrotoxinin [1µM] + GABA

Die Burstrate wurde durch GABA mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $1,43 \pm 0,11 \mu\text{M}$  erhöht. In Kombination mit einer 1µM Bicucullin-Dosis stieg der  $IC_{50}$ -Wert auf  $4,77 \pm 0,84 \mu\text{M}$  an. Wurde GABA mit einer 1µM Picrotoxin-Dosis ko-appliziert, so ergab sich eine Halbwirksamkeitsdosis von  $9,43 \pm 1,56 \mu\text{M}$ .

Die vorgestellten pharmakologischen Untersuchungen zeigten, dass die Netzwerkaktivität bei allen eingesetzten Substanzen eine reproduzierbare und dosisabhängige Modifikation erfuhr. Dabei stellte die Burstrate den gemeinhin sensitivsten Parameter dar. Die Effekte aller Substanzen waren meist vollständig reversibel. Lediglich beim Einsatz von Bicucullin und Picrotoxinin in einer Dosis höher als 10 µM konnte der Grundzustand nicht wieder hergestellt werden und es lag nach dem Auswaschen eine erniedrigte Kontrollaktivität vor.

### 3.2.6 Modifikation der Netzwerkaktivität durch Temazepam und seine Glucuronide

Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist pharmakologisch besonders interessant, da an diesem die als Schlaf- und Beruhigungsmittel eingesetzten Benzodiazepine binden und ihre Wirksamkeit entfalten. Körper eigene Abbauprodukte der Benzodiazepine sind die Glucuronide, von denen allgemein angenommen wird, dass sie keine pharmakologische Wirksamkeit mehr besitzen. Eine experimentelle Bestätigung dieser Annahme erfolgte bisher jedoch nicht. Die neuronalen Netzwerke auf Mikroelektrodenarrays stellen, wie die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, ein zuverlässiges zellbasiertes Biosensorsystem für neuroaktive Substanzen dar und wurden eingesetzt, um diese Annahme zu überprüfen.

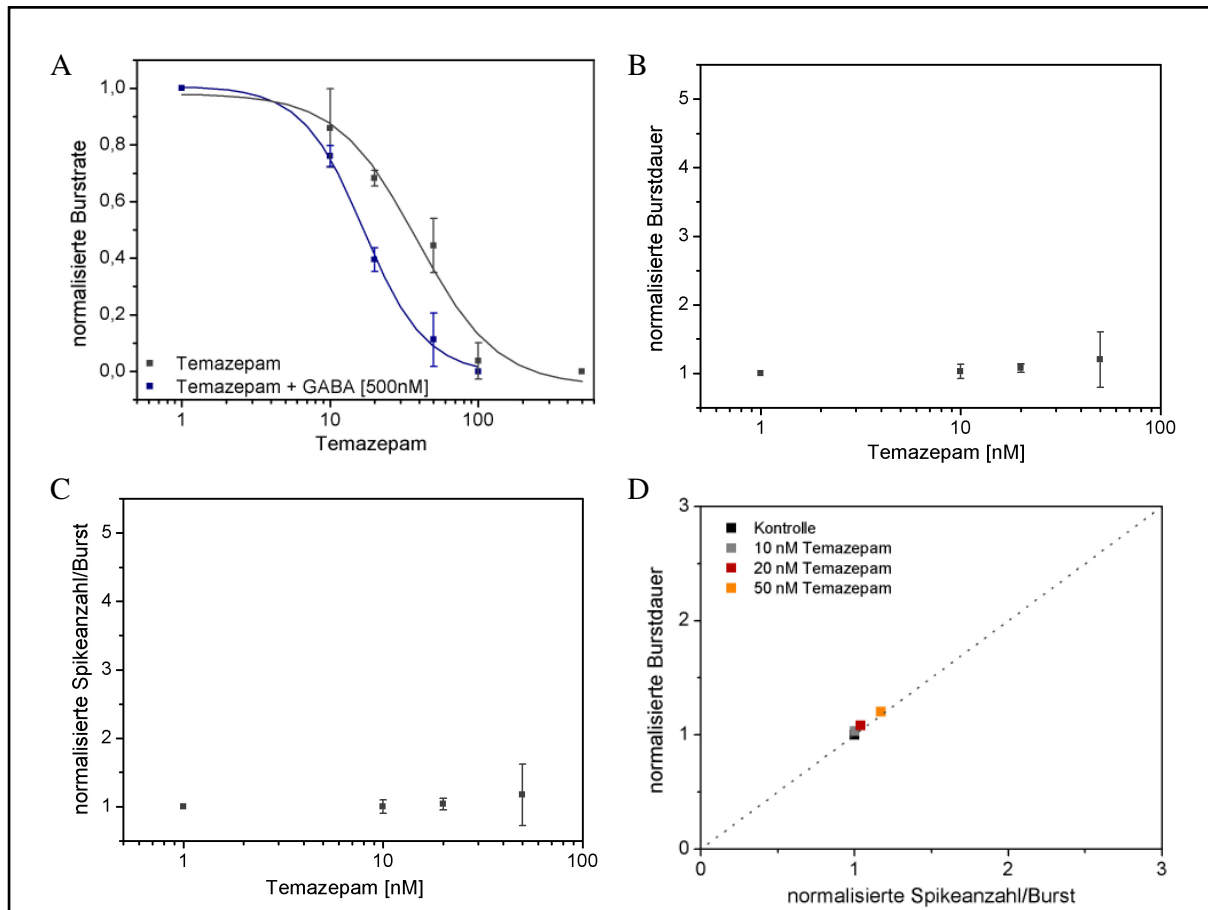
Zum Einsatz kamen die Glucuronide des Temazepam, welches als Medikament bei der Behandlung von Einschlafstörungen Anwendung findet und auch bei der Metabolisierung des häufig angewendeten Diazepam (Handelsname: Valium<sup>®</sup>) im Körper gebildet wird. Bevor jedoch die pharmakologische Wirksamkeit der Metabolite untersucht wurde, wurde der Einfluss des Benzodiazepins Temazepam auf die Netzwerkaktivität getestet.

Benzodiazepine stimulieren den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor nicht direkt, jedoch verstärken sie die Hemmwirkung von GABA an der postsynaptischen Membran, indem sie durch Bindung an eine allosterische Bindungsstelle zu einer Konformationsänderung des Rezeptorkanals führen. Daraus resultiert ein vermehrter Einstrom von Chlorid-Ionen in das postsynaptische Neuron und somit eine intensivere Hyperpolarisation desselben. Die durch GABA erreichte Maximalwirkung kann dabei nicht verstärkt werden, jedoch vermögen Benzodiazepine die GABA-Dosis herabzusetzen, die zu einer Maximalwirkung führt.

Das Messsystem zeigte eine hohe Sensitivität gegenüber Temazepam. Eine Konzentration von 10 nM setzte die Burstrate um etwa 10 % herab, während eine vollständige Hemmung der Burstaktivität bereits durch eine Konzentration von 500 nM hervorgerufen wurde (s. Abb. 3.22 A). Die Halbwirksamkeitsdosis betrug  $38,50 \pm 10,72$  nM, der Betrag des Hill-Koeffizienten  $1,62 \pm 0,59$ . Das Benzodiazepin führte damit schon in sehr geringen Konzentrationsbereichen zu einer Verstärkung der Hemmwirkung des in der Kultur vorhandenen endogenen GABA. Dagegen erwies sich die Burstdauer und die Spikeanzahl/Burst als nicht sensitiv gegenüber Temazepam (s. Abb. 3.22 B, C und D).

Für die Reduktion der Netzwerkaktivität durch Benzodiazepine ist eine ausreichende endogene GABA-Verfügbarkeit an allen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren entscheidend. Um die ausreichende Präsenz von GABA sicherzustellen, wurde der Botenstoff in einer weiteren Versuchsreihe in einer Dosis von 500 nM mit dem Benzodiazepin ko-appliziert. Wie aus Abb. 3.10 A hervorgeht, lag diese GABA-Dosis nahe der Schwellenkonzentration und setzte die Burstrate durchschnittlich um lediglich 10 % herab.

Verglichen mit dem alleinigen Einsatz von Temazepam zeigte das Netzwerk bei Ko-Applikation des Benzodiazepins mit GABA (500nM) eine deutlich höhere Sensitivität (s. Abb. 3.22 A). Die Halbwirksamkeitsdosis lag hier bei  $16,85 \pm 1,41$  nM. Gleiche Temazepam-Konzentrationen führten somit in Kombination mit GABA signifikant stärkeren Reduktion der Burstrate als die alleinige Gabe des Benzodiazepins ( $p < 0,05$ ), so dass es zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Beziehung kam.



**Abb. 3.22:** Einfluss von Temazepam auf die Burstaktivität

Temazepam setzte die Burstrate [A] mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $38,50 \pm 10,72$  nM herab. Der Betrag des Hill-Koeffizient betrug  $1,62 \pm 0,59$ . Die Burstdauer [B] und Spikeanzahl/Burst [C], sowie die Burstdauer in Abhängigkeit von der Spikeanzahl/Burst erfuhren keine signifikanten Veränderungen ( $p < 0,05$ ).

Bei Ko-Applikation von Temazepam mit GABA in einer Konzentration von 500 nM sank die Halbwirksamkeitsdosis auf  $16,85 \pm 1,41$  nM.

Es gilt jeweils:  $n=3$ , für Temazepam + GABA gilt:  $n=4$

[D] Burstdauer in Abhängigkeit von der Spikeanzahl/Burst, ( $n=3$ )

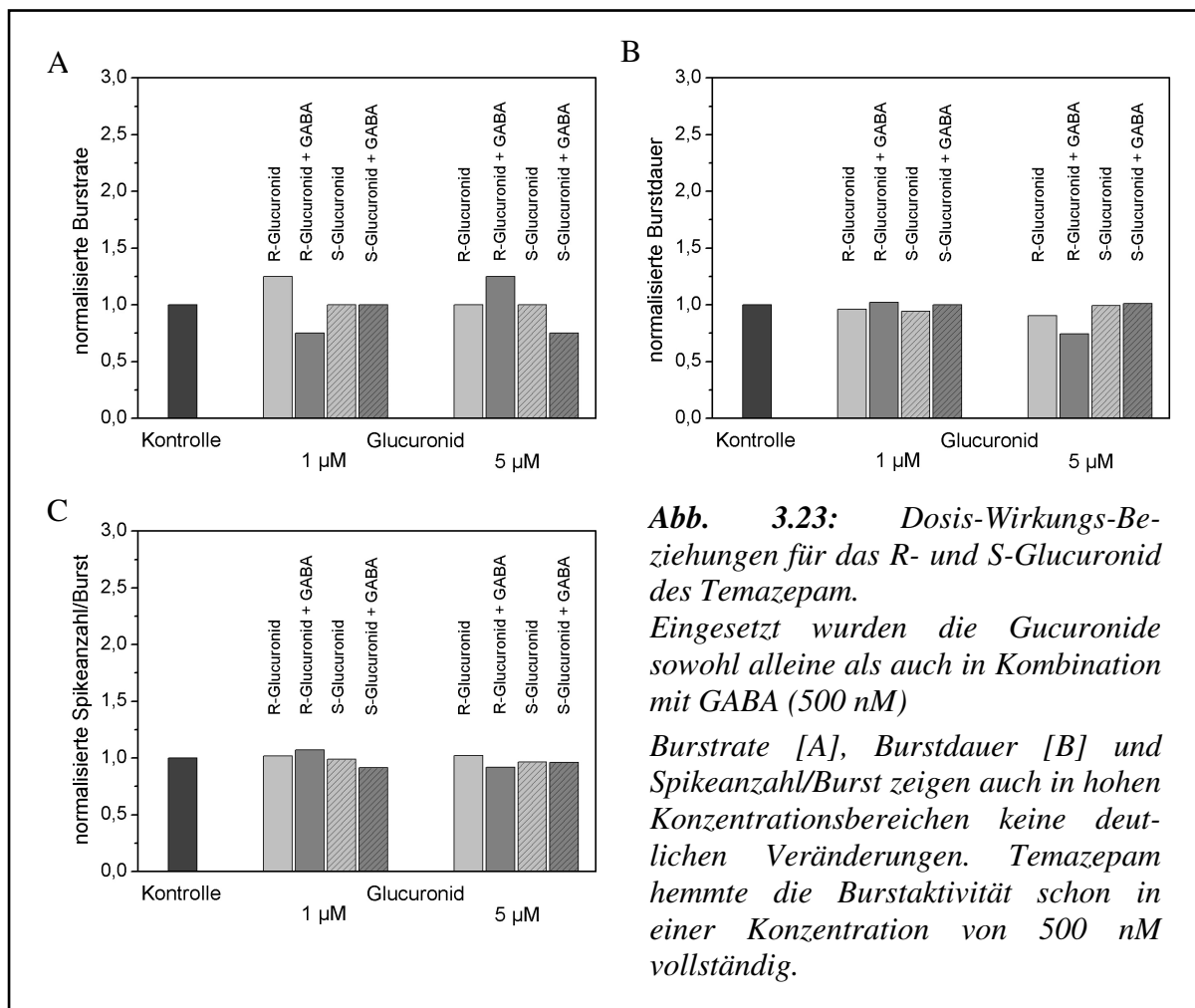
Sowohl das R- als auch das S-Glucuronid des Temazepam wurde auf die pharmakologische Wirksamkeit hin überprüft.

Getestet wurden Konzentrationen bis zu 5  $\mu\text{M}$ . Dabei wurden die Substanzen alleine und auch in Kombination mit GABA (500 nM) eingesetzt, wodurch eine ausreichende GABA-Verfügbarkeit im System sichergestellt wurde. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass die Substanzen aufgrund mangelnder endogener GABA-Verfügbarkeit irrtümlich als unwirksam identifiziert wurden.

Abb. 3.23 zeigt, dass beide Stereoisomere die Burstrate sowohl bei alleiniger Zugabe als auch in Kombination mit GABA nicht herabsetzten. Die Ausgangssubstanz Temazepam hemmte die Burstaktivität vollständig in einer Konzentration von 500 nM. Die maximal eingesetzte Glucuronidkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  überstieg diese Konzentration um das Zehnfache.

Die Substanzen hatten weiterhin keinen Effekt auf die Burstdauer und die Anzahl der Spikes/Burst.

Da die Glucuronide des Temazepam die neuronale Netzwerkaktivität nicht beeinflussen, ist anzunehmen, dass diese Substanzen keine pharmakologische Wirksamkeit besitzen.



**Abb. 3.23:** Dosis-Wirkungs-Beziehungen für das R- und S-Glucuronid des Temazepam.

Eingesetzt wurden die Glucuronide sowohl alleine als auch in Kombination mit GABA (500 nM)

Burstrate [A], Burstdauer [B] und Spikeanzahl/Burst zeigen auch in hohen Konzentrationsbereichen keine deutlichen Veränderungen. Temazepam hemmte die Burstaktivität schon in einer Konzentration von 500 nM vollständig.

### 3.3 Zellwachstum auf strukturierten Oberflächen

Für die in Kapitel 3.2 beschriebenen pharmakologischen Untersuchungen an neuronalen Netzwerken auf Multielektrodenarrays wurden stets Netzwerke einer hohen Zelldichte (1000 Zellen/mm<sup>2</sup>) herangezogen.

Neben diesem Ansatz sollte eine Methode entwickelt werden, die extrazelluläre Ableitungen von Netzwerken einer möglichst geringen Zelldichte auf Multielektrodenarrays ermöglichte.

Reduziert man die Zelldichte, so ergibt sich daraus bei einer homogenen Substratbeschichtung das Problem, dass bedingt durch den willkürlich stattfindenden Adhäsions- und Wachstumsprozess nur wenige Neurone auf den Elektroden adhären.

Um ausreichend elektrische Zellaktivität ableiten zu können, ist es jedoch von Nöten, dass sich ein möglichst hoher Anteil der Neurone auf den Elektroden befindet. Um dieser Notwendigkeit Rechnung zu tragen, sollte die Zelladhäsion und das Auswachsen der Zellen zu Netzwerken mit geringer Zelldichte durch eine eingeschränkte Substratbeschichtung in Form eines vorgegebenen Poly-D-Lysin (PDL)-Musters dirigiert werden.

In der Vergangenheit verwendeten einige Gruppen die Polyaminosäurenals Adhäsionspromotor, um das Zellwachstum von Neuronen auf Oberflächen zu kontrollieren (Wheeler et al., 1999; Branch et al., 2000; Vogt et al., 2003; Heller et al., 2004; Nam et al., 2004). Bei Polylysin handelt es sich um ein polykationisches Polymer. Es vermittelt die Zelladhäsion nicht über spezifische Rezeptor-Liganden-Bindungen, wie beispielsweise das extrazelluläre Matrixprotein Laminin, sondern über elektrostatische Wechselwirkungen.

Ziel dieser Dissertation war es, einen möglichst einfachen Weg zur Oberflächenstrukturierung der MEAs zu finden. Aufwendige chemische Oberflächenbehandlungen sollten, wenn möglich, vermieden werden. Der Adhäsionspromotor PDL wurde durch Mikrokontaktstempeln auf Glassubstrate und MEA-Oberflächen aufgebracht. Die Anbindung der Moleküle erfolgte aufgrund der elektrostatischen Anziehung zwischen der negativ geladenen Siliziumoxid- bzw. Siliziumnitrid-Oberfläche und dem positiven Polylysingerüst.

Abb. 3.24 zeigt das Zellwachstum auf einer bestempelten Glasoberfläche nach 14 Tagen *in vitro*. Die Neurone wurden in einer Dichte von 200 Zellen/mm<sup>2</sup> auf die Substrate aufgebracht. Im Fall des kreisförmigen Musters wurde die vorgegebene Struktur durch das Zellwachstum nicht zufriedenstellend befolgt. In dem Muster aus ineinander geschlungenen Kreisen mit einem Durchmesser von 100 µm lagen die einzelnen Kreisbögen zu nahe beisammen, so dass es zu einem Überwachsen der vorgegebenen Struktur kam (s. Abb. 3.24 A). Ein klar strukturiertes Netzwerk konnte mit dieser Struktur nicht realisiert werden.

Wurde die Oberfläche mit dem triangulären PDL-Muster bestempelt, so folgte die Zelladhäsion und das Zellwachstum der Struktur in den gewählten Dimensionen zuverlässig. Die Höhe der gleichschenkligen Dreiecke betrug 100 µm, die Basis besaß eine Länge von

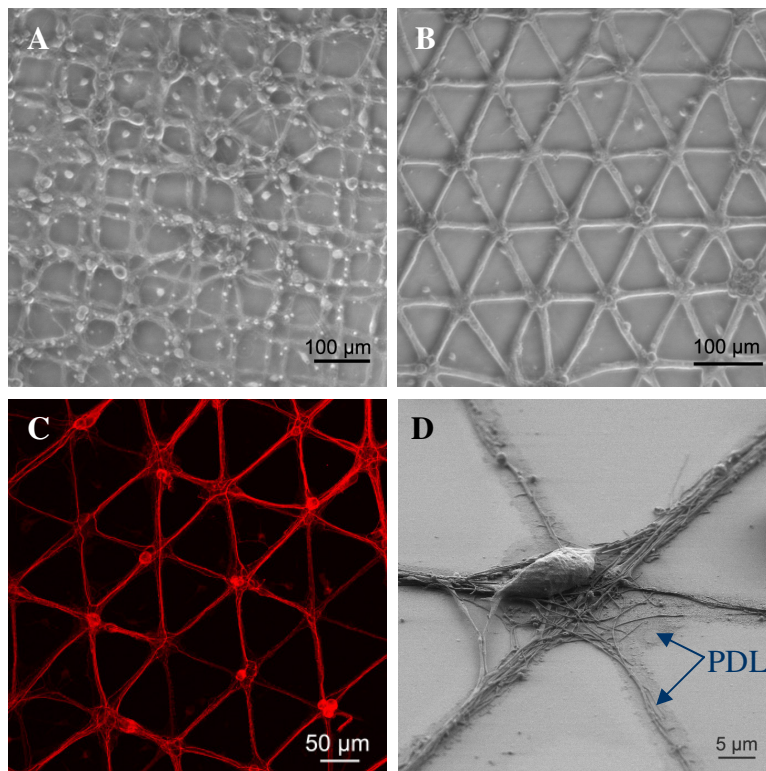
100  $\mu\text{m}$ . Die Fläche der nicht bestempelten Zwischenräume war ausreichend groß und konnte von den auswachsenden Neuriten nicht überbrückt werden, so dass das Zellwachstum deutlich der triangulären Struktur folgte. Zellen, die sich in den nicht beschichteten Zwischenräumen befanden, konnten nicht auswachsen (s. Abb. 3.24 B), was beweist, dass sie lediglich auf der bestempelten Fläche die adäquate Adhäsions- und Wachstumsbedingungen vorfanden. Die Somata adhärten vornehmlich an den Knotenpunkten bzw. orientierten sich sekundär dorthin, während die auswachsenden Neurite den Linien folgten (s. Abb. 3.24 C und D).

Die Lokalisierung der Zellkörper auf den Knotenpunkten ist bei einer Kultivierung auf den MEAs wünschenswert, da sich an diesen auch die Elektroden befinden. Weiterhin müssen die Elektroden durch Zellen isoliert sein, um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten.

Da das Soma eines Neurons mit einem Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  eine Elektrode nicht zu isolieren vermag, müssen sich immer mehrere Neurone bzw. Gliazellen neben den Neuronen auf den Elektroden befinden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Zellwachstum im triangulären Muster sehr gut der vorgegebenen PDL-Struktur folgte und die Zellkörper vornehmlich an den Knotenpunkten adhärten. Bei dem kreisförmig gestempelten Muster war die Fläche der nicht bestempelten Zwischenräume kleiner und konnte von den auswachsenden Neuriten überbrückt werden.

Dies führte dazu, dass das Zellwachstum sich nicht deutlich an den vorgegebenen Strukturen orientierte. Weiterhin zeigte die Lokalisierung der Zellkörper keine Präferenz für die Knotenpunkte. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden für die weiterführenden Versuche nur trianguläre Netzwerke herangezogen.



**Abb. 3.24:** Zellwachstum auf strukturierten Oberflächen.

[A] Zellwachstum nach 21 Tagen *in vitro* auf einer im kreisförmigen Muster bestempelten Oberfläche.

[B, C] neuronales Netzwerk auf einem triangulären PDL-Muster nach 21 Tagen *in vitro*. Bei C wurden Zellkörper und Dendriten der Neurone mit einem Antikörper gegen MAP2 markiert.

[D] Rasterelektroenenmikroskopische Aufnahme eines Knotenpunktes im triangulären Muster nach 7 Tagen *in vitro*.

Das gestempelte PDL hebt sich dunkel vom Hintergrund ab. Auf dem Knotenpunkt haftet ein Zellkörper. Neurite wachsen entlang der Linien.

### 3.4 Vergleich der Eigenschaften strukturierter und unstrukturierter neuronaler Netzwerke

Die strukturierten neuronalen Netzwerke mussten hinsichtlich wesentlicher Merkmale mit den unstrukturierten verglichen werden, um Aussagen über eine eventuelle Beeinflussung des geometrisch kontrollierten Wachstums auf strukturelle und morphologische Eigenschaften machen zu können. Dazu wurden die Neurone in einer Dichte von 200 Zellen/mm<sup>2</sup> auf Substrate, welche im triangulären Muster mit Poly-D-Lysin (PDL) bestempelt waren, und auf ganzflächig mit PDL beschichtete Oberflächen aufgebracht.

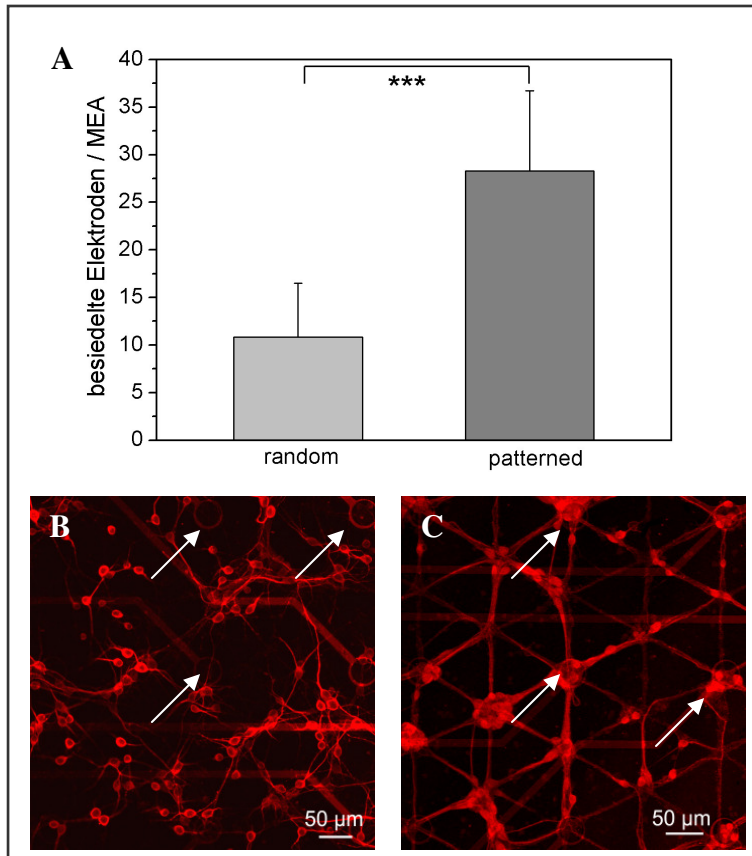
Der Vergleich der beiden Netzwerktypen wurde anhand von Kriterien vorgenommen, die eine Aussage über das Wachstum der Neurone und die Entwicklung der Kulturen zulassen und durch immunzytochemische Färbungen kenntlich gemacht werden konnten, wodurch eine quantitative Analyse ermöglicht wurde.

Zunächst erfolgte eine quantitative Betrachtung der Elektrodenbesetzung durch Neurone, da die vermehrte Adhäsion der Neurone auf den Elektroden ein entscheidendes Argument für ein strukturiertes Zellwachstum war. Ein kritischer Punkt war das Wachstum der Astrozyten. Da diesen Zellen wichtige Aufgaben zukommen, mussten sie auch in strukturierten Netzwerken zugegen sein. Weiterhin musste die Synaptogenese beschrieben und ein Vergleich zu unstrukturierten Netzwerken angestellt werden. Das Wachstum der Neurite wurde durch eine Markierung der Axone verfolgt.

#### 3.4.1 Besiedelung der Elektroden

Um die Anzahl der mit Neuronen besetzten Elektroden bei unstrukturierten und strukturierten Netzwerken auf MEAs miteinander vergleichen zu können, wurden Zellen in einer Zelldichte von 200 Neurone/mm<sup>2</sup> auf Chips aufgebracht, die homogen mit Poly-D-Lysin beschichtet oder im triangulären Muster der Linienbreite 6 µm mit dem Adhäsionspromotor bestempelt waren. Nach 7 Tagen *in vitro* wurden die Elektroden ausgezählt, auf denen sich neuronale Zellkörper befanden.

Die Anzahl der besiedelten Elektroden war bei den strukturierten Netzwerken durchschnittlich fast 3-fach höher als bei den unstrukturierten (s. Abb. 3.25). Während bei der gegebenen Zelldichte auf einer homogen beschichteten MEA-Oberfläche im Durchschnitt nur jede sechste Elektrode ( $10,8 \pm 5,7$  Elektroden von 60) mit Neuronen besiedelt war, konnte bei Netzwerken, die auf dem triangulären Muster ausgewachsen waren, eine Elektrodenbelegung von etwa 50 % registriert werden ( $28,3 \pm 8,5$  Elektroden von 60).



**Abb. 3.25:** Vergleich der Elektrodenbesiedelung durch Neurone bei unstrukturierten (random) und strukturierten (patterned) Netzwerken auf Multielektrodenarrays.

[A] Anzahl der von Neuronen bedeckten Elektroden bei zufällig wachsenden und strukturierten Netzwerken der Linienbreite  $6\ \mu\text{m}$  nach 7 Tagen *in vitro* ( $n = 12$ ).

\*\*\*  $p < 0,001$

[B, C] fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Netzwerken bei homogener und strukturierter PDL-Beschichtung ( $6\ \mu\text{m}$  breite Linien) auf MEAs nach 7 Tagen *in vitro*. Zellkörper und Dendriten der Neurone wurden mit einem Antikörper gegen MAP2 markiert. Einige der Elektroden sind durch Pfeile gekennzeichnet.

### 3.4.2 Astrozyten

Astrozyten mit ihren sternförmig angeordneten Ausläufern sind die häufigsten Gliazellen des zentralen Nervensystems. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Synaptogenese, Informationsverarbeitung und regulieren die molekulare Zusammensetzung des Extrazellulär-raumes durch Aufnahme, Speicherung und Abgabe von Transmittern. Ferner kontrollieren sie den Kaliumhaushalt, indem sie die bei der Erregungsleitung in den Extrazellulär-raum gelangenden überschüssigen Kaliumionen aufnehmen. Aufgrund dieser Gegebenheiten musste sichergestellt werden, dass Astrozyten auch auf den gestempelten Strukturen in ausreichendem Maß vorhanden waren. Gleichzeitig musste jedoch eine flächige Ausbreitung der proliferierenden Astrozyten auf den Elektroden vermieden werden, da dies die Detektion neuronaler Signale erschwert hätte.

Um eine Aussage über die Auswirkungen der Linienbreite eines strukturierten Musters auf das Astrozytenwachstum treffen zu können, wurden Strukturen der Linienbreite  $4$  und  $6\ \mu\text{m}$  verwendet. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, waren bei einem unstrukturierten Zellwachstum nach 7 Tagen *in vitro* nur vereinzelte Astrozyten zu finden, während es in der zweiten Woche zu einer starken Zunahme ihrer Anzahl kam. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen

zeigten nach diesem Zeitpunkt keinen weiteren Anstieg in der Astrozytenzahl, so dass die quantitativen Untersuchungen nach 14 Tagen *in vitro* angestellt wurden.

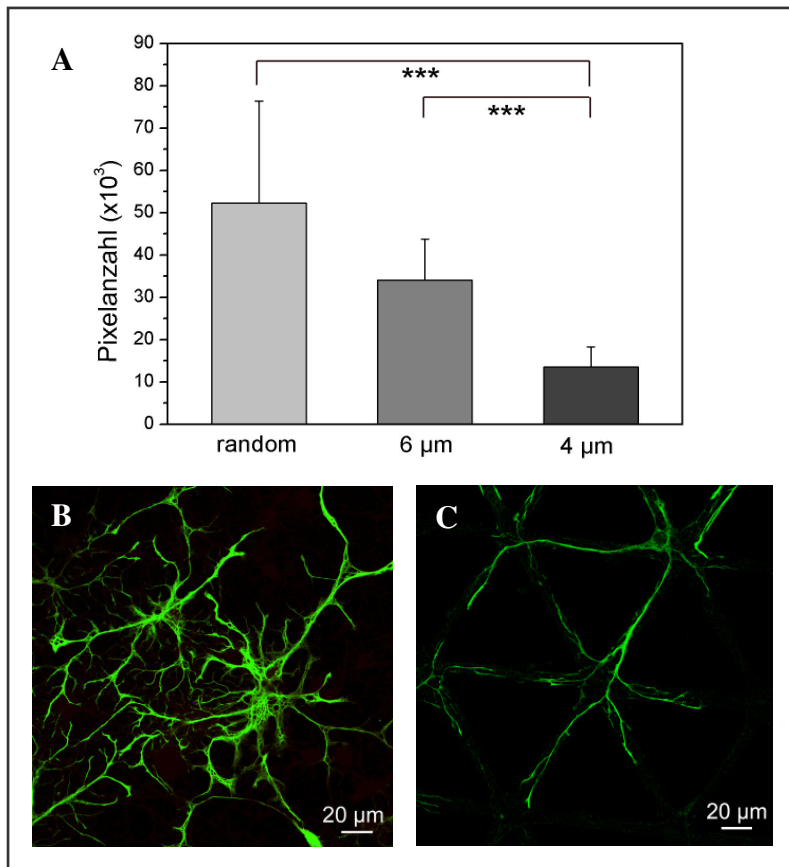
Wie Abb. 3.26 B und C verdeutlicht, zeigten die sternförmigen Astrozyten auf einer ganzflächigen PDL-Beschichtung ein Perikaryon mit flächiger Morphologie. Diese Ausbreitung war auf den gestempelten Substraten nicht zu beobachten, was auf die Einschränkung der zur Verfügung stehenden PDL-Fläche zurückzuführen ist. Eine vollständige Isolierung der Elektroden durch die Astrozyten musste somit angesichts der schlanken Zellmorphologie nicht befürchtet werden. Um die Anzahl der Astrozyten bei den verschiedenen Substratbeschichtungen miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen GFAP (glial fibrillary acidic protein, "Säures Gliafaserprotein"), welches als Intermediärfilament im Zytoplasma der Astrozyten vorkommt, markiert.

Nach einer Visualisierung dieser Markierungen mit einem fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper wurde in den konfokalen Aufnahmen die Anzahl der Pixel ermittelt.

Eine direkte Auszählung der Astrozyten war insbesondere auf den strukturierten Substraten nicht möglich, da die mit DAPI markierten Zellkerne aufgrund der schlanken Astrozytenmorphologie einzelnen Zellen nicht zugeordnet werden konnten und darüber hinaus verschiedene Zellen nicht voneinander abgegrenzt werden konnten.

Abb. 3.26 A zeigt, dass die Pixelanzahl der GFAP-Markierungen bei einem unstrukturierten Zellwachstum (Pixelanzahl =  $52,3 \times 10^3 \pm 24,1 \times 10^3$ ) durchschnittlich etwas höher war als bei Bestempelung der Oberfläche mit einem 6  $\mu\text{m}$  breiten Muster (Pixelanzahl =  $34 \times 10^3 \pm 9,7 \times 10^3$ ). Die Differenzen waren statistisch jedoch nicht signifikant. Die geringere Anzahl der Pixel bei strukturierten Netzwerken ist zum einen auf eine etwas geringere Astrozytendichte zurückzuführen, zum anderen jedoch auch auf die weniger flächige Morphologie der Zellen auf den gestempelten Substraten. Des Weiteren war die Pixelanzahl der GFAP-Markierungen bei einer Substratbestempelung mit einem triangulären Muster der Linienbreite 6  $\mu\text{m}$  signifikant höher als bei einem Muster der Linienbreite 4  $\mu\text{m}$  (Pixelanzahl =  $13,6 \times 10^3 \pm 4,7 \times 10^3$ ). Bei Netzwerken mit 4  $\mu\text{m}$  breiten Linien waren damit durchschnittlich etwa 75 % weniger GFAP-markierte Strukturen zu finden als bei einem unkontrollierten Zellwachstum.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Anzahl der Astrozyten bei einem gestempelten PDL-Muster der Linienbreite 4  $\mu\text{m}$  sehr gering ist. Die quantitative Untersuchung der Synapsendichte und des Neurofilamentanteils sowie die pharmakologischen Untersuchungen (s. Kap. 3.6) an strukturierten Netzwerken wurden aufgrund dieser Ergebnisse nur bei triangulären Mustern einer Linienbreite von 6  $\mu\text{m}$  vorgenommen.



**Abb. 3.26:** Vergleich des Gliazellenmaßes bei unstrukturierten und strukturierten Netzwerken.

[A] Pixelfläche der mit einem Antikörper gegen GFAP markierten Strukturen nach 14 Tagen *in vitro* (*div*) ( $n = 60$ ).

\*\*\* $p < 0,001$

[B, C] Astrozytenwachstum bei homogener und strukturierter PDL-Beschichtung nach 14 Tagen *in vitro*. Die Astrozyten (grün) wurden mit einem Antikörper gegen GFAP markiert.

### 3.4.3 Synapsen

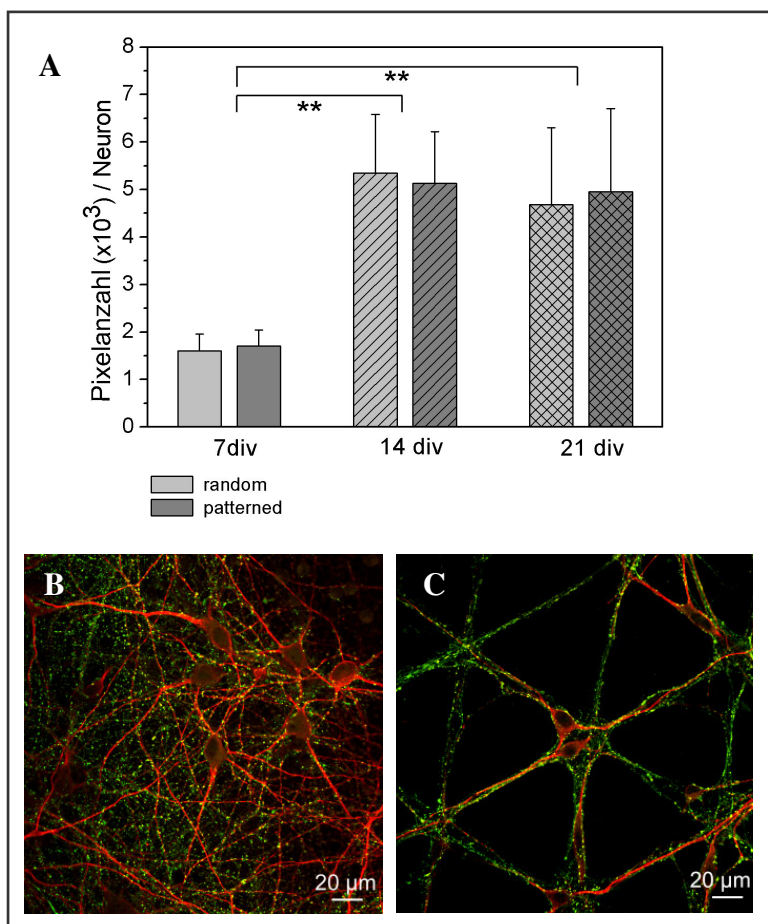
Um die Synapsendichte der strukturierten und unstrukturierten Netzwerke quantifizieren zu können, wurden die Synapsen mit einem Antikörper gegen das in der Präsynapse lokalisierte Protein Synapsin I markiert (s. Abb. 3.27 B und C) und die Pixelanzahl der Markierung pro Neuron bestimmt. Von Interesse war hierbei nicht nur der Vergleich zwischen den beiden Netzwerktypen, sondern auch die Entwicklung der Synapsendichte bis hin zum Zeitpunkt der Messungen nach 3 Wochen. Eine genaue Angabe über die Anzahl der Synapsen pro Neuron anhand der immunzytochemischen Färbungen gestaltete sich schwierig, da insbesondere im Stadium einer hohen Synapsendichte, distinkte Synapsin-Punkte kaum auszumachen waren.

Die quantitative Bestimmung der Synapsendichte über einen dreiwöchigen Zeitraum von Netzwerken auf einer homogenen PDL-Beschichtung zeigte, dass sich die Pixelanzahl der Synapsin-markierten Strukturen pro Neuron zwischen der ersten und zweiten Woche in Kultur ungefähr verdreifachte (Pixelanzahl<sub>7div</sub> =  $1,6 \times 10^3 \pm 0,4 \times 10^3$ ; Pixelanzahl<sub>14div</sub> =  $5,4 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$ ) (s. Abb. 3.26 A). In der dritten Woche hingegen kam es zu keiner weiteren signifikanten Veränderung der Synapsendichte (Pixelanzahl<sub>21div</sub> =  $4,7 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$ ).

Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass nach einem Zeitpunkt von 14 Tagen in Kultur lediglich eine Umbildung der bereits vorhandenen Synapsen erfolgte. Auch die strukturierten Netzwerke zeigten die für Netzwerke auf homogenen Oberflächen beschriebene Entwicklung bezüglich der Synapsendichte. Während es in der zweiten Woche zu einem etwa dreifachen Anstieg der Synapsendichte kam (Pixelanzahl  $_{7\text{div}} = 1,7 \times 10^3 \pm 0,3$ ; Pixelanzahl  $_{14\text{div}} = 5,1 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^3$ ), war in der dritten Woche keine weitere Zunahme festzustellen (Pixelanzahl  $_{21\text{div}} = 5 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^3$ ).

Es wurden für alle Zeitpunkte keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der pro Neuron ermittelten Pixelanzahl zwischen strukturierten und unstrukturierten Netzwerken festgestellt (s. Abb. 3.27 A).

Diese Feststellung lässt die Aussage zu, dass nach 7, 14 und 21 Tagen *in vitro* die Anzahl der Synapsen pro Neuron bei den beiden verschiedenen Netzwerktypen vergleichbar war und die geometrische Kontrolle von Adhäsion und Zellwachstum die Synaptogenese offenbar nicht nachteilig beeinflusste.



**Abb. 3.27:** Vergleich der Synapsendichte bei strukturierten und unstrukturierten Netzwerken.

[A] Pixelfläche der mit einem Antikörper gegen Synapsin markierten Strukturen pro Neuron nach 7, 14 und 21 Tagen *in vitro* (div) ( $n = 30$ ).

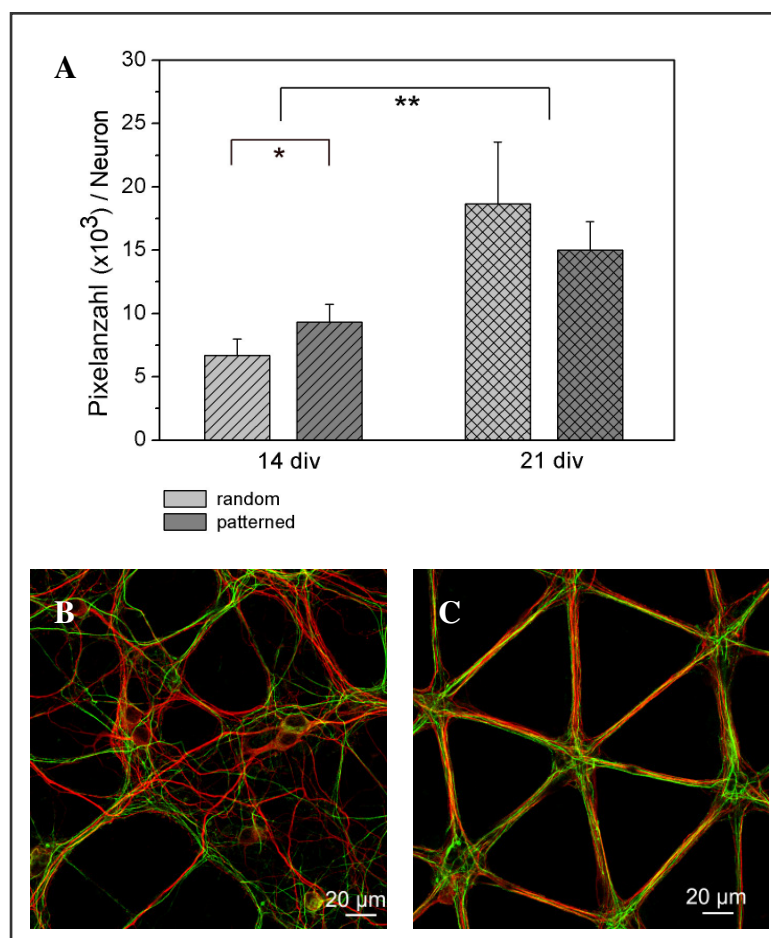
\*\* $p < 0,01$

[B, C] zeigen Netzwerke bei homogener und strukturierter Substratbeschichtung nach 14 Tagen *in vitro*. Die Zellkörper und Dendriten der Neurone (rot) wurden mit einem Antikörper gegen MAP2 markiert, die Synapsen (grün) mit einem Antikörper gegen Synapsin.

## 3.4.4 Neurofilament

Um eine Aussage über das Wachstum der Neurite bei strukturierten und unstrukturierten Netzwerken treffen zu können, wurde der Anteil des 160 kD schweren, in Axonen lokalisierten Neurofilaments quantifiziert. Es wäre ebenfalls möglich gewesen, das Wachstum der Dendriten durch eine Markierung mit MAP2 quantitativ zu vergleichen. Allerdings hätte die zusätzliche Färbung der Zellkörper durch MAP2 die Auswertung erschwert, so dass ein Vergleich des Neuronenwachstums durch eine Neurofilamentfärbung präferiert wurde.

Abb. 3.28 A macht deutlich, dass sich bei einem Zellwachstum auf homogen beschichteten Oberflächen die Pixelanzahl der Neurofilament-markierten Strukturen von der zweiten zur dritten Woche fast verdreifachte (Pixelanzahl<sub>14div</sub> =  $6,7 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^3$ ; Pixelanzahl<sub>21div</sub> =  $18,7 \times 10^3 \pm 4,9 \times 10^3$ ). Dies zeigt, dass in diesem Zeitraum ein deutliches Wachstum der Neurone erfolgte. Auch die in Struktur wachsenden Neurone zeigten einen signifikanten Anstieg der Pixelanzahl Neurofilament-markierter Strukturen in der dritten Woche (Pixelanzahl<sub>14div</sub> =  $9,3 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^3$ ; Pixelanzahl<sub>21div</sub> =  $15 \times 10^3 \pm 2,2 \times 10^3$ ).



**Abb. 3.28:** Vergleich des Neurofilamentanteils pro Neuron bei strukturierten und unstrukturierten Netzwerken.

[A] Pixelfläche der mit einem Antikörper gegen Neurofilament 160 kD markierten Strukturen pro Neuron nach 14 und 21 Tagen in vitro (div) ( $n = 30$ ).

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

[B, C] zeigen Netzwerke bei homogener und strukturierter PDL-Beschichtung nach 14 Tagen in vitro (div). Die Zellkörper und Dendriten der Neurone (rot) wurden mit einem Antikörper gegen MAP2 markiert, die Axone (grün) mit einem Antikörper gegen Neurofilament 160 kD.

Die Untersuchungen zeigen, dass das Wachstum der Axone auf den bestempelten Substratoberflächen nicht eingeschränkt war. Für den Zeitpunkt nach 14 *Tagen in vitro* wurde sogar ein höherer Anteil neurofilamentmarkierter Strukturen bei strukturierten Netzwerken festgestellt. Die Differenz war statistisch geringfügig signifikant. Dies deutet darauf hin, dass das Zellwachstum durch die vorgegebenen PDL-Pfade offenbar erleichtert wurde.

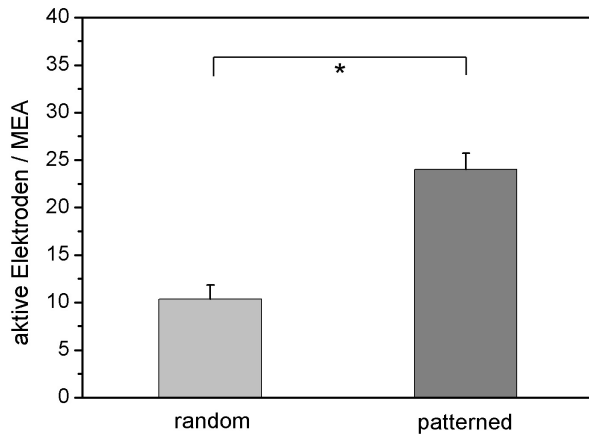
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Neurone von im triangulären Muster wachsenden neuronalen Netzwerke hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften zu denen aus unstrukturierten Netzwerken vergleichbar sind. Eine Oberflächenstrukturierung des Substrats hatte offenbar keinen negativen Effekt auf das Zellwachstum und die Synaptogenese. Gleichzeitig erlaubte sie jedoch eine kontrollierte Zelladhäsion und ein dirigiertes Zellwachstum, so dass die Anzahl der auf den Elektroden lokalisierten Zellkörper um etwa das Dreifache höher war als bei einem unstrukturierten Zellwachstum.

### 3.5 Elektrische Aktivität unstrukturierter und strukturierter Netzwerke geringer Zelldichte

Eine Motivation für die Realisierung eines strukturierten Zellwachstums auf MEAs war es, der nur geringen Elektrodenbesiedelung bei Kulturen einer geringen Zelldichte abzuweichen. Wie in Kapitel 3.4.1 erläutert, war bei einem Zellwachstum auf einer homogen mit PDL beschichteten Oberfläche nur ein Sechstel der Elektroden mit Neuronen besiedelt, während bei einem Zellwachstum auf einer triangulär bestempelten Oberfläche auf etwa der Hälfte der Elektroden neuronale Zellkörper adhärirten.

Entscheidend ist jedoch letzten Endes der Anteil der Elektroden, die elektrische Aktivität registrieren. Um ein strukturiertes neuronales Zellwachstum auf dem Hintergrund der angeführten Motivation zu rechtfertigen, musste bei den strukturierten Netzwerken auch von einer deutlich höheren Anzahl an Elektroden elektrische Aktivität verzeichnet werden als bei den auf homogener Substratbeschichtung wachsenden Netzwerken einer geringen Zelldichte. Abbildung 3.29 zeigt, dass bei einer ganzflächigen Substratbeschichtung nach 24 *Tagen in vitro* durchschnittlich nur von 10 Elektroden Aktivität verzeichnet werden konnte. Wurde die Substratoberfläche im triangulären Muster einer Linienbreite von 6  $\mu\text{m}$  mit PDL bestempelt, so konnte von durchschnittlich 25 Elektroden elektrische Aktivität registriert werden. Damit zeigte sich eine deutliche Korrelation in der Anzahl der Elektroden, welche elektrische Aktivität verzeichnen, zur Anzahl der mit neuronalen Zellkörpern besiedelten Elektroden (s. Abb. 3.25 A). Wurde jedoch ein trianguläres Muster der Linienbreite 4  $\mu\text{m}$  auf die MEA-Oberfläche aufgebracht, so konnte kaum elektrische Aktivität gemessen werden.

Die Versuche zeigten, dass erst durch die kontrollierte Zelladhäsion und das gesteuerte Zellwachstum im Zuge einer geeigneten strukturierten Substratbeschichtung eine Reduktion der Zelldichte möglich war und dennoch von einer ausreichend großen Anzahl an Elektroden Signale erfasst werden konnten.



**Abb. 3.29:** Vergleich der Anzahl der aktiven Elektroden bei unstrukturierten (random) und strukturierten (patterned) Netzwerken auf Multielektrodenarrays nach 24 Tagen *in vitro* ( $n = 3$ ).  
\* $p < 0,05$

### 3.6 Physiologische Eigenschaften strukturierter neuronaler Netzwerke auf Multielektrodenarrays

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben sind die strukturierten Netzwerke morphologisch und strukturell betrachtet mit unstrukturierten vergleichbar. Weiterhin bestand jedoch die Notwendigkeit, die Physiologie der in Struktur wachsenden Neurone zu untersuchen.

Somit musste zum einen die zeitliche Entwicklung der Netzwerkaktivität dokumentiert werden. Zum anderen musste überprüft werden, inwieweit das Aktivitätsmuster die charakteristischen Merkmale kortikaler Netzwerkaktivität aufwies. Weiterhin war zu überprüfen, inwieweit die Netzwerkaktivität reproduzierbar und dosisabhängig durch die Applikation neuroaktiver Substanzen modifiziert werden konnte.

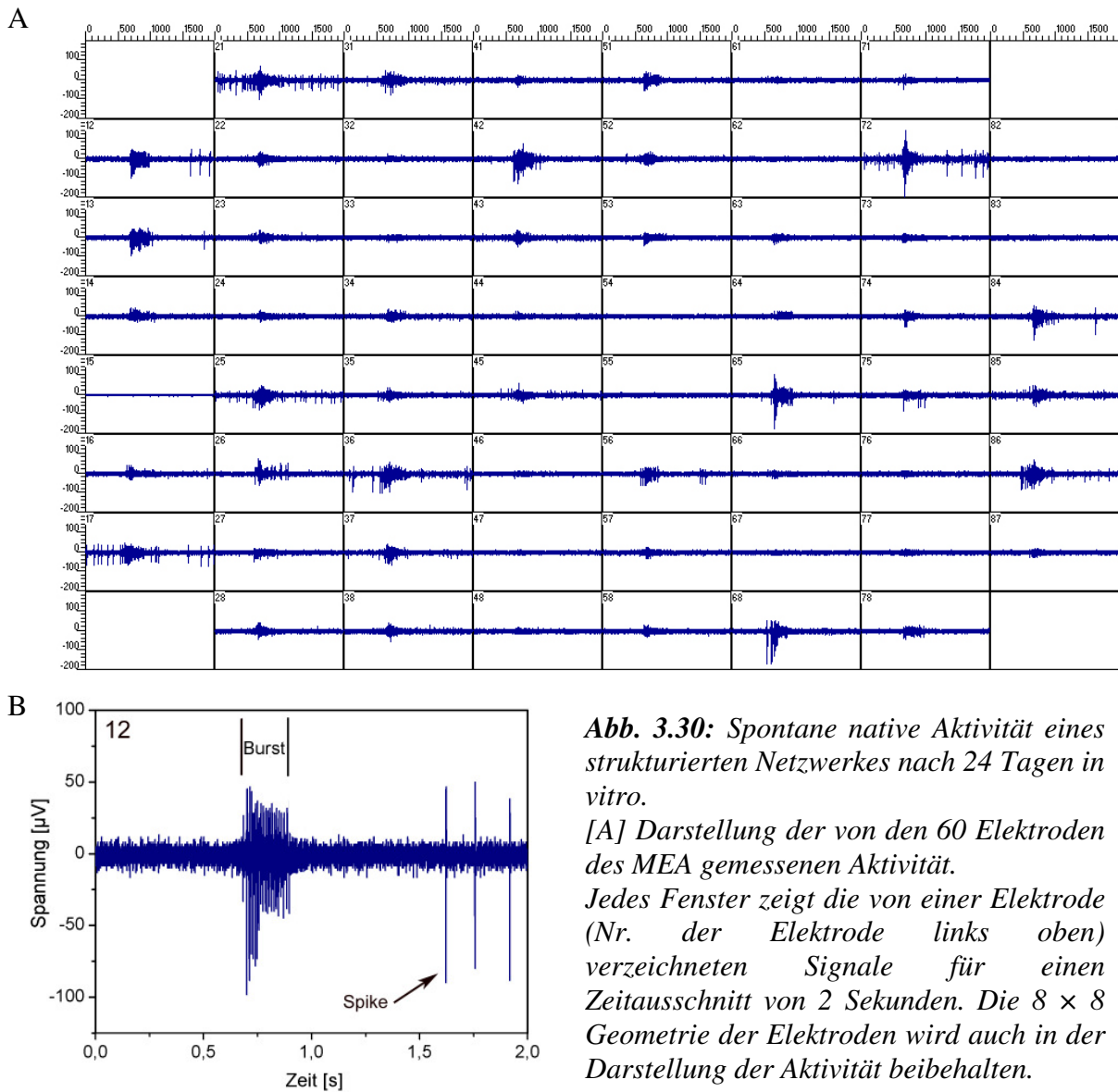
#### 3.6.1 Entwicklung und Charakteristika der elektrischen Aktivität

Bei strukturierten Netzwerken der Linienbreite  $6 \mu\text{m}$  wurden die ersten spontan auftretenden zeitlich unkorrelierten Spike-Ereignisse nach etwa 10 Tagen *in vitro* abgeleitet, während die ersten unregelmäßigen Burst-Ereignisse nach 14 Tagen beobachtet wurden. Eine stabile Aktivität bestand nach 3 Wochen und wies neben einzelnen Spike-Ereignissen auch die für die Aktivität kortikaler Netzwerke charakteristischen Bursts auf.

Bei unstrukturiert wachsenden Netzwerken mit einer geringen Zelldichte, sowie auch bei Netzwerken der Linienbreite 4  $\mu\text{m}$  konnten keine Bursts detektiert werden. Hier wurden lediglich von einer geringen Elektrodenanzahl zeitlich unkorrelierte Spike-Ereignisse abgeleitet.

In Abb. 3.30 A ist die Ableitung von einem strukturierten neuronalen Netz der Linienbreite 6  $\mu\text{m}$  nach 24 Tagen *in vitro* gezeigt. Dargestellt ist ein zeitlicher Ausschnitt von 2 Sekunden, in dem es zu einem Burstereignis kam, das gleichzeitig von etwa der Hälfte der Kanäle verzeichnet wurde. Das synchrone Auftreten der Bursts war auch für die strukturierten Netzwerke ein charakteristisches Merkmal, sofern die Substrate in einem Muster der Linienbreite 6  $\mu\text{m}$  bestempelt wurden. Die Aktivität dieser strukturierten Netzwerke entwickelte sich über den beobachteten Zeitraum von drei Wochen vergleichbar zu der unstrukturierter Netzwerke einer hohen Zelldichte (s. Kap. 3.1.2). Diese Gegebenheit lässt den Rückschluss zu, dass auch die im triangulären Muster auswachsenden Neurone *ein* Netzwerk bilden, in dem hochfrequente exzitatorische Inputs sicher weitergeleitet werden konnten.

Die Bursts traten in Abständen von etwa 20 s auf, besaßen eine Dauer von 100 bis 150 ms und mit 15 bis 20 Spikes pro Burst eine Spikefrequenz von etwa 150 Hz. Die Spikeamplituden betragen bei einem strukturierten Zellwachstum in der Regel zwischen 50 und 200  $\mu\text{V}$ .



**Abb. 3.30:** Spontane native Aktivität eines strukturierten Netzwerkes nach 24 Tagen *in vitro*.

[A] Darstellung der von den 60 Elektroden des MEA gemessenen Aktivität.

Jedes Fenster zeigt die von einer Elektrode (Nr. der Elektrode links oben) verzeichneten Signale für einen Zeitausschnitt von 2 Sekunden. Die  $8 \times 8$  Geometrie der Elektroden wird auch in der Darstellung der Aktivität beibehalten.

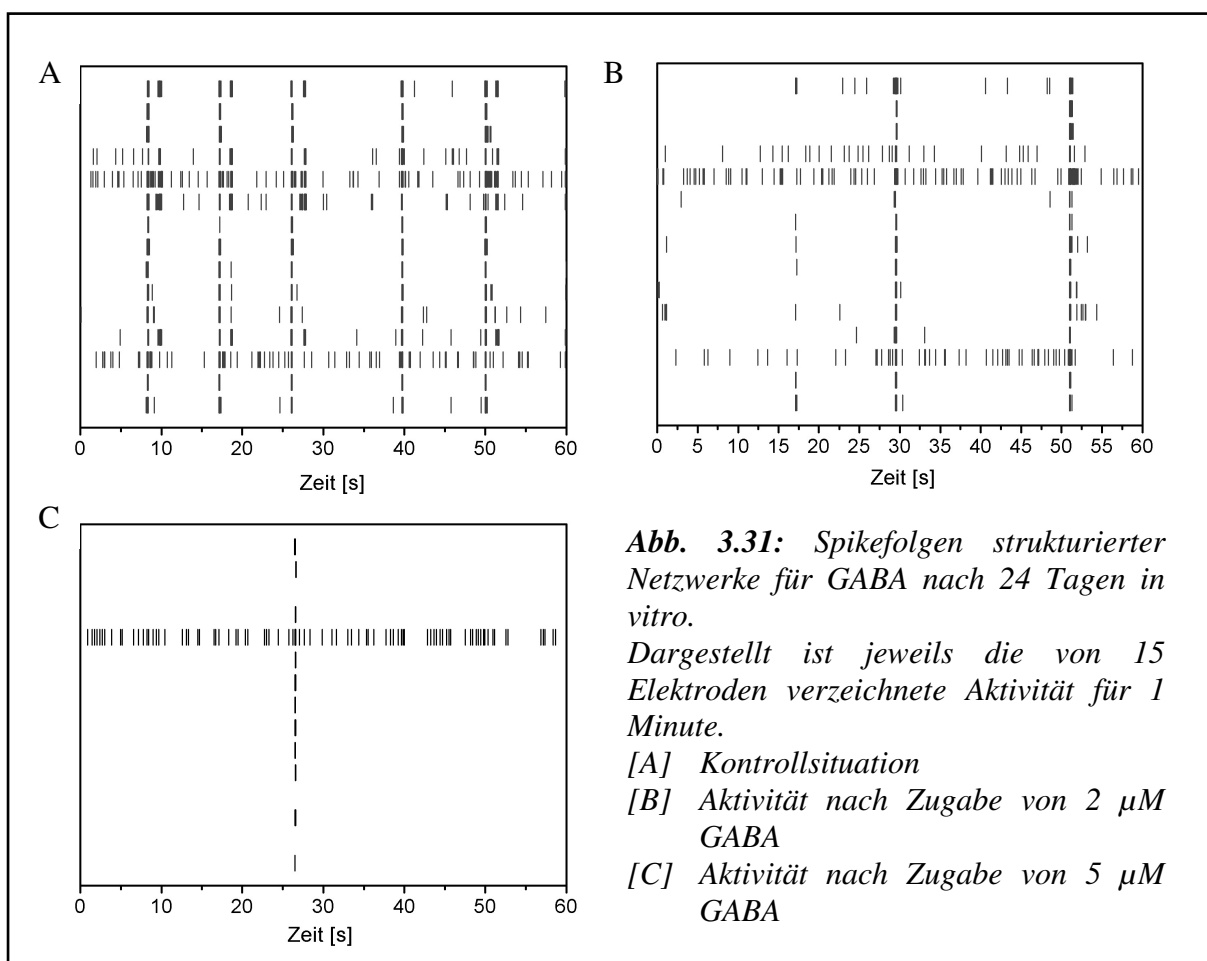
[B] Aktivität der Elektrode Nr. 12. Kennlich gemacht sind Spikes und ein Burst. Auf den Burst folgt eine Phase ohne Spontanaktivität.

### 3.6.2 Modifikation der Netzwerkaktivität durch GABA

In Kapitel 3.2 wurde die Modifikation der neuronalen Aktivität bei unstrukturierten Netzwerken einer hohen Zelldichte durch am  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor bindende Substanzen dokumentiert. Daher sollte auch das Antwortverhalten der strukturierten Netzwerke auf neuroaktive Stoffe anhand von Substanzen überprüft werden, die an diesen Rezeptor binden. Hierbei wurde nicht der Anspruch erhoben, das gesamte Spektrum der in Kapitel 3.2 vorgestellten Substanzen auf seine Wirksamkeit hin zu überprüfen. Vielmehr sollte lediglich

untersucht werden, ob auch bei strukturierten Netzwerken eine dosisabhängige, reproduzierbare Modifikation der Netzwerkaktivität durch GABAerge Substanzen möglich ist, um eine Aussage über die Funktionalität und Sensitivität des Netzwerkes treffen zu können.

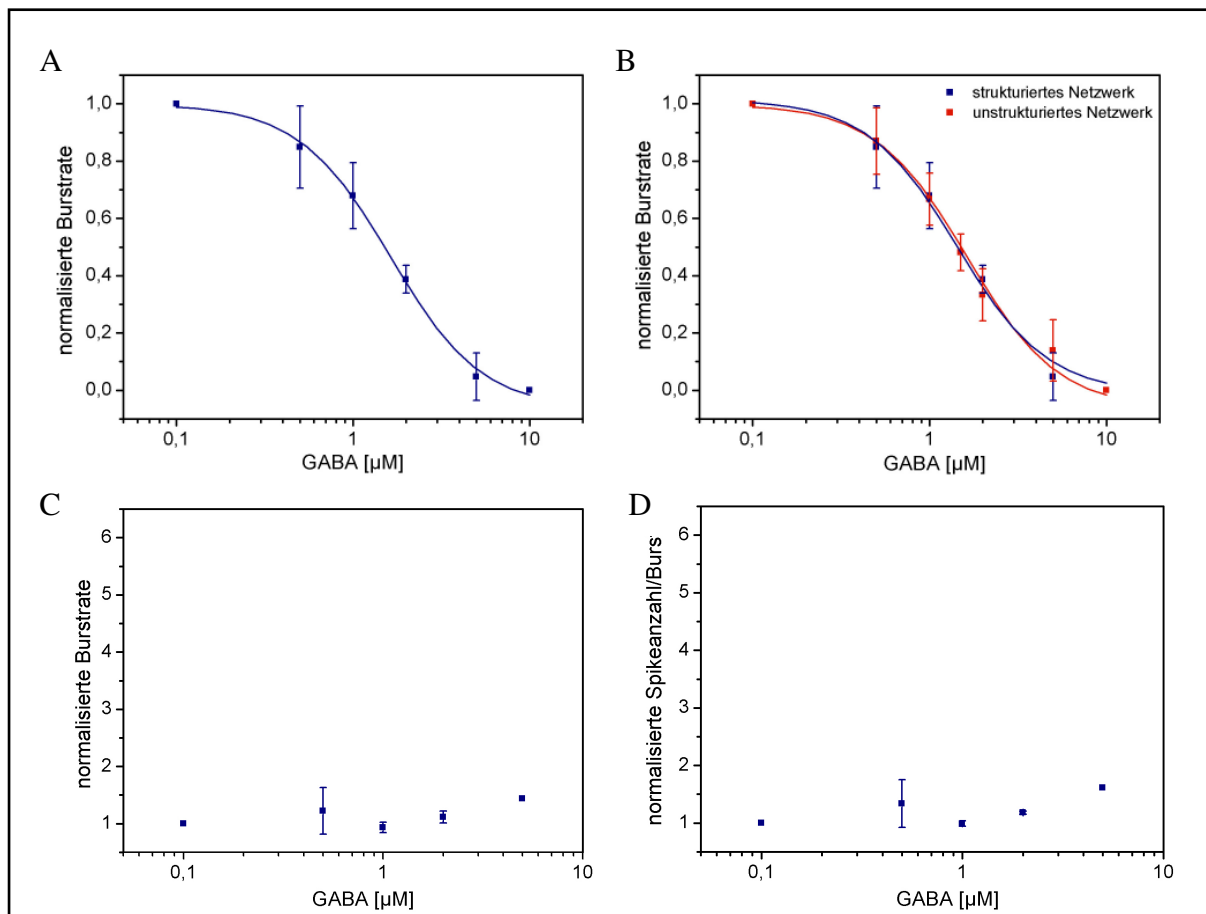
Da sowohl die morphologischen Untersuchungen als auch die Entwicklung der Netzwerkaktivität für ein ausgereiftes Netzwerk zu einem Zeitpunkt nach 3 Wochen in Kultur sprachen, wurden auch bei strukturierten Netzwerken alle pharmakologischen Messungen ab diesem Zeitpunkt durchgeführt. Zunächst wurde der natürliche Neurotransmitter GABA als eine die Netzwerkaktivität mindernde Substanz eingesetzt.



Die externe Applikation von GABA führte auch bei strukturierten Netzwerken zu einer Reduktion der Burstrate. Die Rasterplots zeigen, dass die Burstrate in der dargestellten Messung durch eine 2  $\mu\text{M}$  Dosis von fünf Bursts pro Minute in der Kontrollsituation auf zwei Bursts pro Minute reduziert wurde (s. Abb. 3.31 A und B). Der Einsatz einer Konzentration

von 5  $\mu\text{M}$  führte neben einer weiteren Reduktion der Burstrate auch zu einer drastischen Minderung der vereinzelt Spikeaktivität (s. Abb. 3.31 C).

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung macht deutlich, dass die Burstaktivität durch GABA dosisabhängig modifiziert wurde (s. Abb. 3.32 A). Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Dosis-Wirkungs-Beziehung betrug  $1,63 \pm 0,14 \mu\text{M}$  und unterschied sich damit nur geringfügig von dem für unstrukturierte Netzwerke ( $\text{IC}_{50} = 1,43 \pm 0,11 \mu\text{M}$ ). Für den Betrag des Hill-Koeffizienten wurde ein Wert von  $1,67 \pm 0,24$  ermittelt. Damit ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Dosis-Wirkungs-Beziehungen für GABA bei den beiden verschiedenen Netzwerktypen.



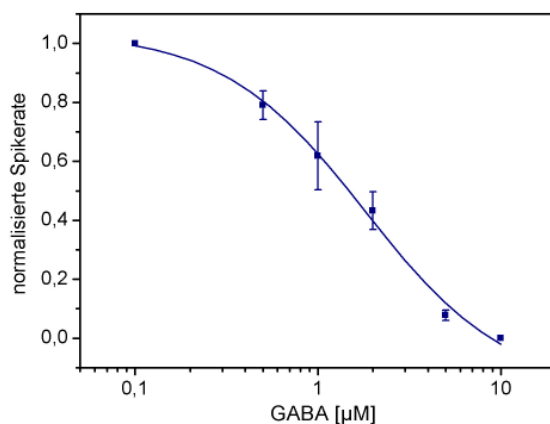
**Abb. 3.32:** Einfluss von GABA auf die Burstaktivität strukturierter Netzwerke

GABA reduzierte die Burstrate [A] mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $1,63 \pm 0,14 \mu\text{M}$ . Der Betrag des Hill-Koeffizienten betrug  $1,67 \pm 0,24$ . Damit ergab sich kein signifikanter Unterschied zur Halbwirksamkeitsdosis bei unstrukturierten Netzwerken einer hohen Zelldichte, die  $1,43 \pm 0,11 \mu\text{M}$  betrug. Die Burstdauer [B] und Spikeanzahl/Burst [C] erfuhren durch GABA bei strukturierten Netzwerken keine signifikanten Veränderungen ( $p < 0,05$ ).

Es gilt jeweils:  $n=3$

Die strukturierten Netzwerke mit ihrer geringen Zelldichte zeigten abhängig von der applizierten GABA-Dosis die gleiche Sensitivität und dosisabhängige Veränderung der Burstrate wie die unstrukturierten Netzwerke einer hohen Zelldichte. Allerdings zeigte die Spikerate mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $1,81 \pm 0,45 \mu\text{M}$  eine signifikant höhere Sensitivität im Fall der strukturierten Netzwerke verglichen mit den unstrukturierten neuronalen Netzwerken ( $IC_{50} = 3,60 \pm 1,05 \mu\text{M}$ ) (s. Abb. 3.33).

Im Bezug auf die Burstdauer und Anzahl der Spikes/Burst ergaben sich mit steigenden GABA-Konzentrationen nur geringfügige, nicht signifikante Veränderungen (s. Abb. 3.32 B und C) ( $p < 0,05$ ).

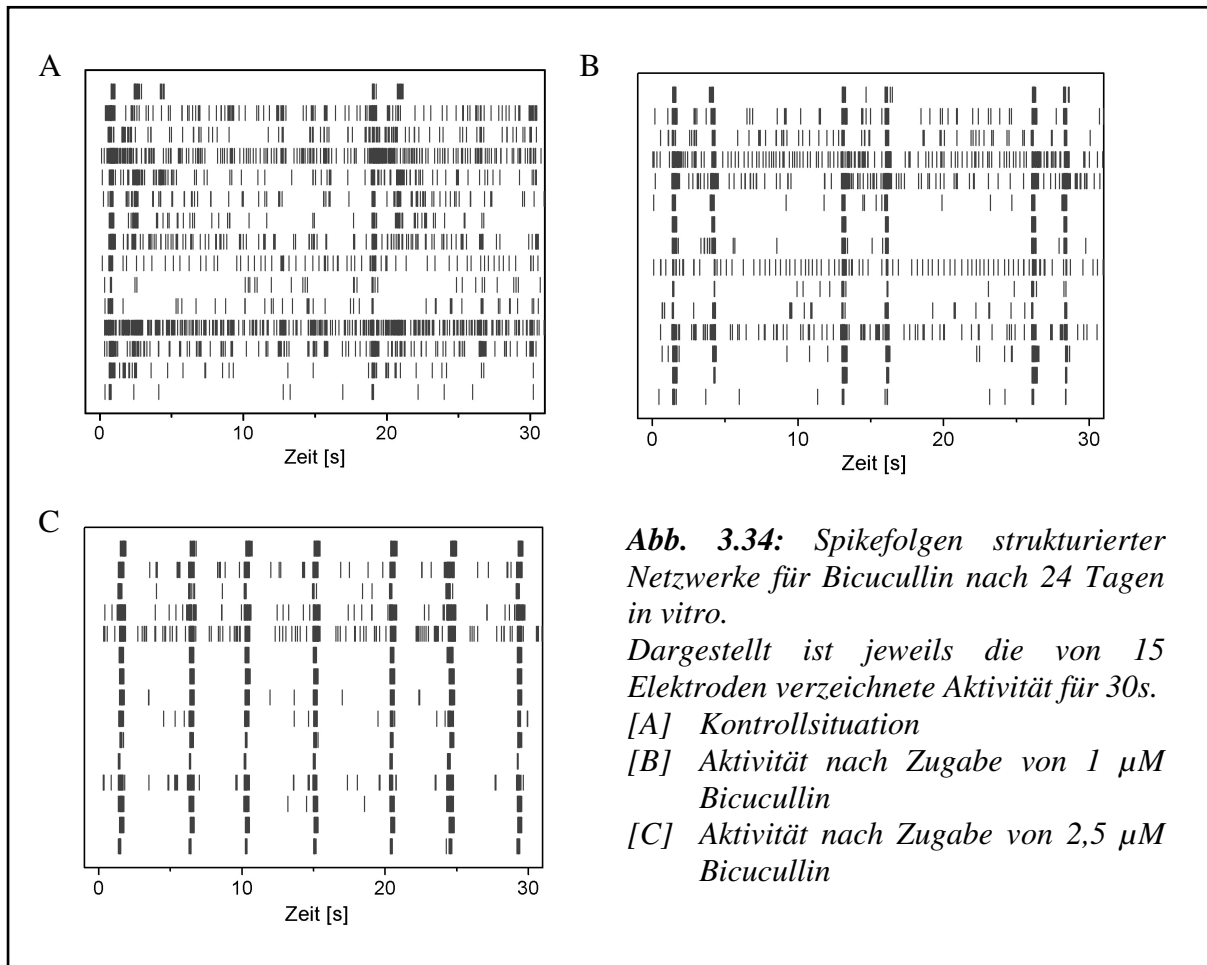


**Abb. 3.33:** Einfluss von GABA auf die Spikerate strukturierter Netzwerke, ( $n = 3$ )

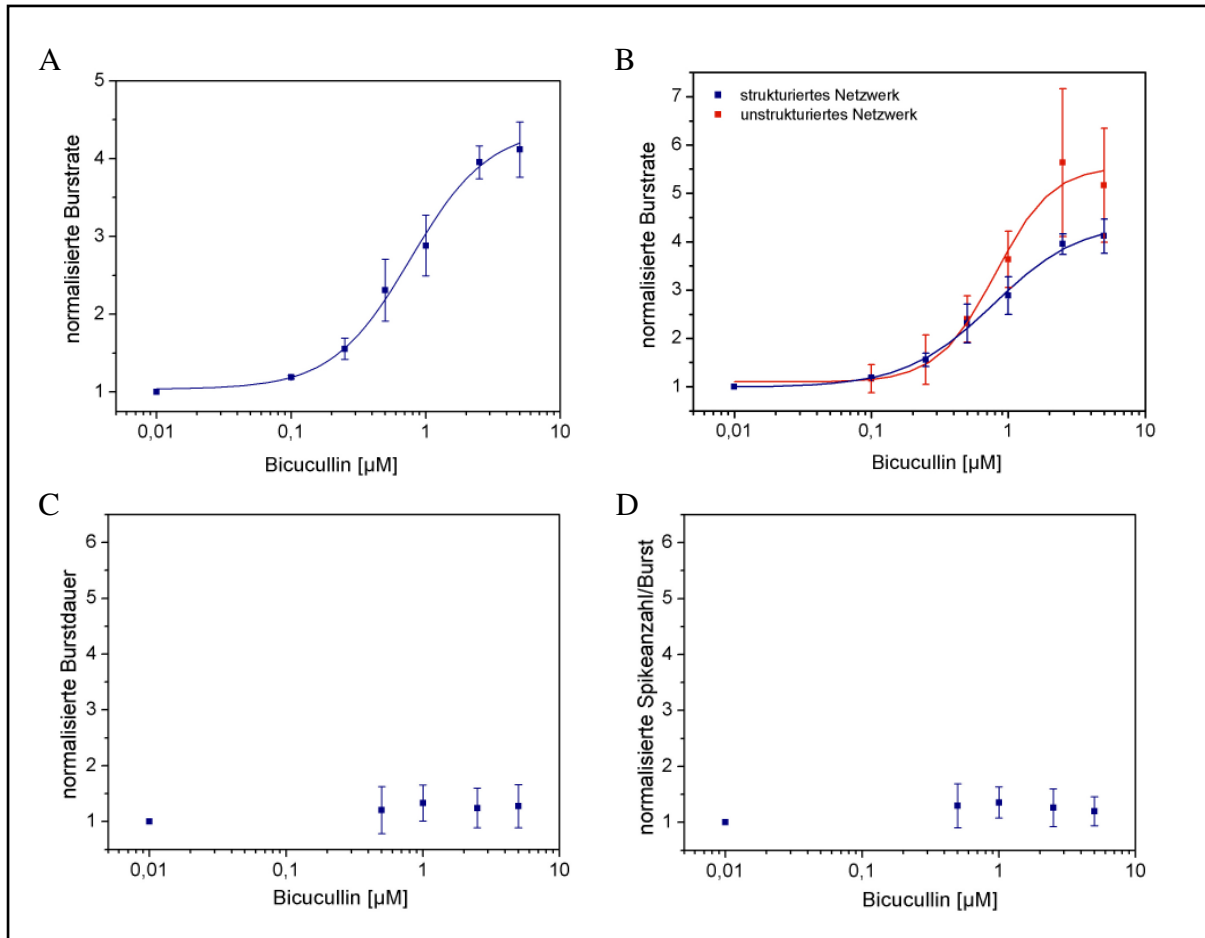
Die Spikerate wurde durch GABA mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $1,81 \pm 0,45 \mu\text{M}$  reduziert. Der Betrag des Hill-Koeffizienten betrug  $1,12 \pm 0,31$ .

### 3.6.3 Modifikation der Netzwerkaktivität durch Bicucullin

Die Applikation des  $GABA_A$ -Antagonisten Bicucullin führte mit einer Erhöhung der Dosierung zu einer deutlichen Zunahme der Burstrate. Die Spikefolgen mehrerer Elektroden für die Kontrollsituation (s. Abb. 3.34 A) und für die Aktivität nach Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  (s. Abb. 3.34 B) bzw.  $2,5 \mu\text{M}$  Bicucullin (s. Abb. 3.34 C) machen deutlich, dass ansteigende Bicucullinkonzentrationen zu einer zunehmenden Disinhibition der Netzwerkaktivität durch ein vermehrtes Auftreten von Bursts führten. Die Bursts wurden dabei synchron von den verschiedenen Elektroden abgeleitet, was zeigt, dass sich die Aktivität über das gesamte Netzwerk ausbreitete. Mit steigenden Konzentrationen des GABA-Blockers traten einzelne Spikes zunehmend seltener auf.



Die Burstrate stieg durch die Zugabe von Bicucullin in einem Konzentrationsbereich von 100 nM bis 5 µM dosisabhängig an (s. Abb. 3.35 A). Der  $EC_{50}$ -Wert der Dosis-Wirkungs-Beziehung betrug  $0,77 \pm 0,11 \mu\text{M}$  und unterschied sich damit nicht signifikant zu dem für unstrukturierte Netzwerke einer hohen Zelldichte ( $EC_{50} = 0,80 \pm 0,14 \mu\text{M}$ ). Bei Dosierungen bis zu 500 nM ergaben sich für beide Netzwerktypen vergleichbare Werte (s. Abb. 3.35 B). Die Applikation einer 1 und 2,5 µM Konzentration führte jedoch bei strukturierten Netzwerken zu einem geringeren Anstieg der Burstrate, so dass sich ein etwas niedrigerer Wert für den Hill-Koeffizienten ergab ( $n_{\text{H strukturiert}} = 1,37 \pm 0,23 \mu\text{M}$ ;  $n_{\text{H unstrukturiert}} = 2,09 \pm 0,17 \mu\text{M}$ ).

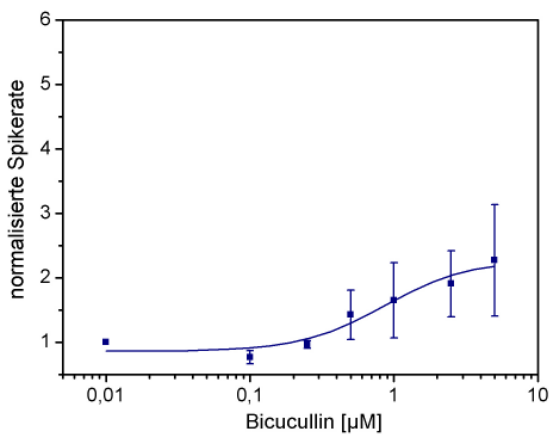


**Abb. 3.35:** Einfluss von Bicucullin auf die Burstaktivität strukturierter Netzwerke

Bicucullin reduzierte die Burstrate [A] mit einer Halbwirksamkeitsdosis von  $0,77 \pm 0,11 \mu\text{M}$ . Der Hill-Koeffizient betrug  $1,37 \pm 0,23$ . Die Halbwirksamkeitsdosis für Bicucullin unterschied sich damit nicht signifikant von dem für unstrukturierte Netzwerke einer hohen Zelldichte ermittelten  $EC_{50}$ -Wert von  $0,80 \pm 0,14 \mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). Die Burstdauer [B] und Spikeanzahl/Burst [C] erfuhren durch Bicucullin bei strukturierten Netzwerken keine signifikanten Veränderungen ( $p < 0,05$ ).

Es gilt jeweils:  $n=4$

Ein weiterer Unterschied zeigte sich in der Sensitivität der Netzwerke bezüglich einer Veränderung der Burstdauer und Spikeanzahl/Burst mit steigenden Bicucullinkonzentrationen. Während bei unstrukturierten Netzwerken sowohl die Burstdauer als auch die Spikeanzahl/Burst für eine Dosis von 2,5 bis 10  $\mu\text{M}$  substantiell anstieg (s. Kap. 3.2.1.3), erfuhren diese Parameter bei strukturierten Netzwerken keine signifikanten Veränderungen (s. Abb. 3.35 C und D). Jedoch ergab sich für die Spikerate mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $0,86 \pm 0,41 \mu\text{M}$  für strukturierte Netzwerke eine deutlich höhere Sensitivität im Vergleich zu unstrukturierten neuronalen Netzwerken ( $EC_{50} = 2,01 \pm 0,36 \mu\text{M}$ ) (s. Abb. 3.36).



**Abb. 3.36:** Einfluss von Bicucullin auf die Spikerate strukturierter Netzwerke, ( $n = 4$ )

Die Spikerate wurde durch GABA mit einer Halbwirksamkeitsdosis  $0,86 \pm 0,41 \mu\text{M}$  reduziert. Der Hill-Koeffizient betrug  $1,48 \pm 0,9$ .

Die vorgestellten Experimente zeigen, dass auch strukturierte Netzwerke eine hohe Sensitivität für Substanzen aufweisen, die am  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor wirken. Dabei zeigte die Burstrate eine zu unstrukturierten Netzwerken mit hoher Zelldichte vergleichbare Sensitivität. Die strukturierten Netzwerke reagierten darüber hinaus mit einer sensitiveren Modifikation der Spikerate.

Bezüglich beider Substanzen zeigt sich eine reproduzierbare, dosisabhängige Modifikation der Netzwerkantwort. Dabei ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung für GABA vergleichbar zu der für Zellkulturen einer hohen Zelldichte. Bicucullin bewirkte im Vergleich zu diesen Netzwerken bei hohen Substanzkonzentrationen eine geringere Steigerung der Burstrate und hatte keinen Effekt auf die Burstdauer sowie auf die Spikeanzahl/Burst.

## 4. Diskussion

### 4.1 Eigenschaften neokortikaler Kulturen

Als zelluläres System wurden in dieser Arbeit dissoziierte Neurone des pränatalen Neokortex verwendet. Die Reorganisation des Netzwerkes in der artifiziellen Umgebung wurde über einen Zeitraum von drei Wochen durch Betrachtung morphologischer und struktureller Parameter, sowie durch die Entwicklung der Netzwerkaktivität untersucht.

Frühere Studien zeigten, dass kortikale Neurone in der künstlichen Zellkulturumgebung unter Serum-freien Bedingungen in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren und dieselben morphologischen Eigenschaften aufweisen wie *in vivo* (Kriegstein *et al.*, 1983; de Lima *et al.*, 1997a).

Sowohl für hippocampale als auch für kortikale Neurone konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit Poly-D-Lysin beschichteten Substraten nach etwa 7 Tagen *in vitro* ein einzelnes Axon und viele Dendriten ausbilden (Dotti *et al.*, 1988; de Lima *et al.*, 1997a). In Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen konnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund immunzytochemischer Färbungen nach einer Woche *in vitro* die Differenzierung der Neurite in Dendriten und Axone festgestellt werden. Während zu diesem Zeitpunkt nur recht kurze Dendriten ausgebildet waren und noch relativ wenig Neurofilament detektiert werden konnte, entwickelte sich bis zur dritten Woche *in vitro* ein dichtes Neuritengeflecht, in dem stärker verzweigte Dendriten deutlich von langen, wenig verzweigten Axonen unterschieden werden konnten. Des Weiteren ließ die unterschiedliche Morphologie der Neurone darauf schließen, dass die Kultur eine heterogene Zellpopulation aufwies. Neurone einer pyramidalen Morphologie mit einem apikalen und zwei basalen Dendriten konnten deutlich von Neuronen mit einer radialen Anordnung der Dendriten unterschieden werden.

Die Detektion des in der präsynaptischen Endigung lokalisierten Proteins Synapsin wies darauf hin, dass nach 7 Tagen *in vitro* bereits Synapsen vorhanden waren, jedoch nur in einer geringen Anzahl. Die Färbungen zeigten aber, dass es besonders in der 2. Woche zu einem deutlichen Anstieg der Synapsendichte kam.

Die Entwicklung der morphologischen Eigenschaften kortikaler Neurone wurde in anderen Studien eingehend beschrieben (de Lima *et al.*, 1997a). Dabei wurde gezeigt, dass die Synapsendichte in der zweiten und dritten Woche *in vitro* signifikant ansteigt. Elektrophysiologische Studien bewiesen, dass dabei sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Synapsen ausgebildet werden (Dichter *et al.*, 1978).

Aus anderen Arbeiten zur Untersuchung der Verteilung der verschiedenen Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors im adulten Rattengehirn ist bekannt, dass die  $\alpha_1$ -Untereinheit in allen kortikalen Schichten exprimiert wird (Pirker *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte durch immunzytochemische Färbungen gezeigt werden, dass die  $\alpha_1$ -Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors nach 14 Tagen *in vitro* von nahezu allen Neuronen der Zellkultur exprimiert wurde. Die Detektion erfolgte dabei vornehmlich am Soma. Es gilt jedoch zu bedenken, dass lediglich die  $\alpha_1$ -Untereinheit detektiert und damit eventuell vorhandene GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ohne Beteiligung dieser Untereinheit nicht erfasst wurden.

Wie auch in anderen Untersuchungen demonstriert werden konnte, sind in den dissoziierten neuronalen Zellkulturen neben den Neuronen auch Gliazellen zu finden (Dichter, 1978). Die immunzytochemischen Färbungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass neben Astrozyten zudem Oligodendrozyten präsent sind. Auf Mikroglia wurden die Kulturen nicht getestet.

Die Proliferation der Gliazellen konnte durch das Serum-freie Neurobasalmedium so weit eingeschränkt werden, dass es nicht zu einem Überwachsen der Neurone kam. Eine Behandlung der Zellkultur mit dem Antimitotikum Ara-C (Arabinosid-Cytosin) war somit nicht nötig. Weiterhin legten andere Studien dar, dass die definierte Zusammensetzung des Neurobasalmediums die Variabilität der Zellzusammensetzung neuronaler Kulturen im Vergleich zu serum-haltigen Medien vermindert (Evans *et al.*, 1998).

Um den optimalen Entwicklungszeitpunkt für die elektrophysiologischen Messungen zu bestimmen, wurde die Entwicklung der elektrischen Netzwerkeigenschaften täglich verfolgt. Die Kulturen zeigten nach etwa 10 Tagen *in vitro* spontane Spikeaktivität und nach etwa 14 Tagen synchronisierte Burstaktivität, die jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht periodisch auftrat. Der Zeitpunkt der Burstentstehung war korreliert mit dem Anstieg der Synapsendichte und Astrozytendichte in der zweiten Kulturwoche. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die ansteigende Synapsenzahl die Weiterleitung der Inputs garantierte, so dass hochfrequente Spikefolgen generiert werden konnten. Weiterhin muss die Bedeutung der Astrozyten in diesem Zusammenhang bedacht werden. Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass Astrozyten eine bedeutende Rolle in der Synchronisation neuronaler Aktivität spielen. An

Schnitten des Hippocampus wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Kalzium-Konzentration in Astrozyten durch elektrische Stimuli anstieg. Dadurch kam es zur Freisetzung von Glutamat aus den Astrozyten, wodurch über eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren langsame Einwärtsströme in mehreren pyramidalen Neuronen induziert wurden, die eine hohe Synchronizität aufwiesen (Angulo *et al.*, 2004; Fellin *et al.*, 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Kulturen entwickelten bis zu einem Zeitpunkt von 3 Wochen *in vitro* ein stabiles Aktivitätsprofil, bei dem die synchronisierten Burst-Ereignisse in regelmäßigen Abständen auftraten und eine Dauer von 100 bis 200 ms aufwiesen.

Während die Beobachtungen zur Burstdauer mit anderen Untersuchungen der Aktivität kortikaler Netzwerke auf MEAs übereinstimmen (Maeda, *et al.*, 1995), wird von anderen Gruppen das frühere Auftreten der spontanen Aktivität berichtet (Kamioka *et al.*, 1996; Tateno *et al.*, 2002; Wagenaar *et al.*, 2005). Spontane Spikeaktivität konnte in diesen Fällen bei Kulturen kortikaler Neurone auf Multielektrodenarrays schon ab einem Zeitpunkt von 3 Tagen *in vitro* beobachtet werden. Bereits in der zweiten Woche *in vitro* trat eine periodische, synchronisierte Burstaktivität auf. Diese Unterschiede können durch die andersartigen Kulturbedingungen oder höhere Zelldichten in diesen Studien bedingt sein.

Die Dauer der extrazellulär abgeleiteten Bursts in der vorliegenden Arbeit unterschied sich deutlich von denen durch intrazelluläre Messungen registrierten intrinsischen Bursts. Von intrinsischen Bursts ist bekannt, dass sie aus 2 bis 5 Aktionspotenzialen bestehen, wobei diese eine Frequenz von 150 bis 200 Hz aufweisen (Guatteo *et al.*, 1994; Franceschetti *et al.*, 1995). Die extrazellulär abgeleiteten Bursts hingegen bestanden aus etwa 20 bis 40 Spikes und besaßen eine Gesamtdauer von 100 bis 200 ms. Allerdings entspricht die verzeichnete Spikefrequenz von etwa 150 bis 200 Hz der intrinsischer Bursts. Diese gegenüber der intrazellulären Situation deutlich erhöhte Burstdauer und Spikeanzahl per Burst ist darauf zurückzuführen, dass sich bei den vorliegenden Netzwerken mit einer hohen Zelldichte von etwa 1000 Zellen/mm<sup>2</sup> immer mehrere Neurone auf einer Elektrode befinden. Die von einer Elektrode abgeleiteten Spikes spiegeln somit in den meisten Fällen die Aktivität mehrerer Zellen wider. Weiterhin gilt es zu bedenken, dass intrazelluläre Ableitungen meist aus dem intakten Gewebe oder Schnittpräparaten stammen, wobei die intakten ursprünglichen Schaltkreise eine übermäßige Burstaktivität unterdrücken.

## 4.2 Modifikation der Netzwerkaktivität kortikaler Netzwerke auf Multielektrodenarrays durch am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor bindende Substanzen

Im Rahmen der pharmakologischen Untersuchungen an kortikalen Netzwerken auf Multielektrodenarrays wurden Substanzen eingesetzt, welche auf denselben Rezeptor einwirken. Somit konnte überprüft werden, ob das System auch für Substanzen, welche auf den gleichen Mechanismus abzielen, eine unterschiedliche Sensitivität zeigte und die Netzwerkaktivität eine unterscheidbare Veränderung erfuhr.

Der Großteil der schnellen inhibitorischen synaptischen Übertragung im Säugetiergehirn wird durch ionotrope GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren übermittelt, die von den meisten neuronalen Zellen exprimiert werden (Korpi *et al.*, 2002). Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkomplex besitzt mehrere verschiedene Bindungsstellen und ist der Wirkort für viele Substanzen. Beispielsweise wirken hier Substanzen, die bei der Behandlung von Angstzuständen, Schlaflosigkeit, Epilepsie und Alkoholentzug eingesetzt werden (Korpi *et al.*, 2002; Johnston, 2005).

Bislang wurden neuronale Netzwerke auf Multielektrodenarrays (MEAs) auch in früheren Studien als Modellsystem für pharmakologische Untersuchungen beschrieben (Morefield *et al.*, 2000; Keefer *et al.*, 2001; Chiappalone *et al.*, 2003; Gopal & Gross, 2004; Martinoia *et al.*, 2005a; 2005b). Allerdings findet sich hierbei zum GABA<sub>A</sub>-Rezeptor als Wirkort keine umfassende Untersuchung. Will man jedoch eine Aussage über die Relevanz eines hybriden Systems aus neuronalen Zellen und MEAs für das Screening neuroaktiver Substanzen treffen, so bietet sich aufgrund der hohen pharmakologischen Relevanz die Verwendung von Substanzen an, welche auf diesen Rezeptor wirken.

Eine der größten Fragestellungen in diesem Zusammenhang ist die Auswahl verlässlicher und sensitiver Parameter zur Quantifizierung inhibitorischer und exzitatorischer Effekte der zu testenden Substanzen. Die hohe Informationsdichte, die man bei der simultanen Ableitung der Aktivität von 60 Orten eines neuronalen Netzwerkes erhält, muss auf geeignete, aussagekräftige Messparameter reduziert werden. Aus diesem Grund wurde sowohl die Spikerate als auch verschiedene auf Bursts beruhende Parameter analysiert, um den aussagekräftigsten Messparameter für die verschiedenen Substanzen zu ermitteln.

Klassische Verfahren zur Analyse der Netzwerkaktivität beruhen auf den Zeitpunkten des Auftretens von Spikes und dem zeitlichen Zusammenhang von Spikes (Tam, 2002). Letzteres wurde vor allen Dingen durch die Methode der Auto- und Kreuz-Korrelation untersucht (Aertsen *et al.*, 1994). Während einzelne Spikes meist zeitlich unkorreliert an verschiedenen Orten im Netzwerk auftreten, zeigen Bursts in reifen Netzwerken ein hohes Maß an

Synchronizität und stellen das auffälligste Merkmal der spontanen Aktivität kortikaler neuronaler Netzwerke dar.

Aufgrund dieser Eigenschaften bietet sich eine Netzwerkanalyse auf der Grundlage synchronisierter Burstaktivität an. In der Vergangenheit wurden viele Methoden zur Analyse der Burstaktivität entwickelt, die ihre Anfänge schon in den sechziger Jahren nahmen (Rodiek *et al.*, 1962; Cocatre-Zilgien & Delcomyn, 1990; Tam, 2002; Corner *et al.*, 2002; Turnbull *et al.*, 2004; Chiappalone *et al.*, 2005). Der in dieser Arbeit verwendete Algorithmus zur Burstdetektion beruhte auf der Methode der maximalen Intervalle (Tam, 2002). Weiterhin wurde das Analyseverfahren hinsichtlich der Detektion synchronisierter Burst-Ereignisse optimiert. Somit sollte die Variabilität zwischen den verschiedenen Elektroden vermindert und die Verlässlichkeit des Systems gesteigert werden.

Die Signalform, sowie die Signalamplitude wurden nicht in die Analyse einbezogen, da diesen Parametern aufgrund der Abhängigkeit von diversen variablen Größen, wie z.B. der Abstand der Zellmembran zur Elektrode, nur begrenzt verlässliche Information entnommen werden kann. Allerdings können diese Parameter dazu genutzt werden, die von einer Elektrode detektierten Spikes verschiedenen Neuronen zuzuordnen (so genanntes Spike-Sorting). Da diese Arbeit jedoch nicht auf eine umfassende Netzwerkanalyse abzielt, sondern die Veränderungen der Netzwerkaktivität durch verschiedene Substanzen im Zusammenhang der gesamten Aktivität betrachtet, wurde von dieser Methode kein Gebrauch gemacht.

Vielmehr wurde die Modifikation der Netzwerkaktivität als Antwort auf Substanzen, die agonistisch, antagonistisch, als Blocker oder Modulator auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor einwirken, untersucht.

#### 4.2.1 GABA

Durch extern verabreichtes GABA konnte sowohl die Spike- als auch die Burstrate konzentrationsabhängig herabgesetzt werden. Diese hemmende Wirkung ist darin begründet, dass die Bindung von GABA die Öffnungszeit und Öffnungsfrequenz des GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkanals erhöht, so dass die Membranleitfähigkeit für Chlorid-Ionen steigt. Um den Ionenkanal zu aktivieren, muss es zur Bindung von zwei GABA-Molekülen an den Rezeptor kommen. Dabei unterscheidet man eine Bindungsstelle, die eine hohe Affinität für GABA zeigt (high-affinity site) von einer zweiten mit einer geringeren Affinität (low-affinity site) (Sieghart, 1995; Baur & Sigel, 2003). Bei reifen Neuronen kommt es aufgrund der Aktivierung des Kanals durch GABA zu einem Einstrom von Chlorid-Ionen in die Zelle und damit zu einer Hyperpolarisation. Bei unreifen Neuronen hingegen ist das Membranpotenzial aufgrund der hohen intrazellulären Chlorid-Konzentration negativer ist als das

Umkehrpotenzial für Chlorid, so dass GABA exzitatorisch wirken kann (Gallo & Haydar, 2003; Stein & Roger, 2003; Mody & Pearce, 2004; Yamada *et al.*, 2004). Der inhibitorische Effekt des extern zugefügten GABA auf die Netzwerkaktivität kann als ein weiterer Hinweis auf das Vorliegen eines reifen Netzwerks zum Zeitpunkt der Messungen von etwa 3 Wochen *in vitro* angesehen werden.

Bezüglich der Burstrate ergab sich ein  $IC_{50}$ -Wert von  $1,43 \mu\text{M}$ , der deutlich geringer war als die Halbwirksamkeitsdosis bezüglich der Spikerate von  $3,60 \mu\text{M}$ . Die Burstrate konnte folglich in niedrigeren Konzentrationsbereichen herabgesetzt werden als die Spikerate und stellte somit den sensitiveren Parameter dar. Diese mittlere inhibitorische Konzentration bezüglich der Spikerate liegt in derselben Größenordnung wie der in einer anderen Studie durch extrazelluläre Ableitungen der Spikeaktivität kortikaler Kulturen ermittelte  $IC_{50}$ -Wert von  $2,8 \mu\text{M}$  (Keefer *et al.*, 2001).

Der Betrag des Hill-Koeffizienten betrug  $1,70$  für die Burstrate bzw.  $1,51$  für die Spikerate entsprechend der beiden Bindungsstellen am Rezeptor. Weiterhin spricht dieser Wert für die kooperative Bindung der Moleküle am Rezeptor. Auch in anderen Studien werden vergleichbare Hill-Koeffizienten angegeben, welche aus intrazellulären Untersuchungen resultieren (Bormann, 2000). Eine Betrachtung der Burstrate und Spikeanzahl/Burst zeigte, dass die Werte bei einer hohen GABA-Konzentration durchschnittlich auf etwa das doppelte angehoben wurden. Allerdings sind die Veränderungen zu geringfügig und die Sensitivität dieser Parameter bezüglich steigender GABA-Konzentrationen damit unzureichend.

Da keine Versuche mit dem selektiven  $GABA_B$ -Rezeptor Agonist Baclofen bzw. dem  $GABA_C$ -Rezeptor Agonist CACA unternommen wurden, können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob und in welchem Ausmaß in der Kultur  $GABA_B$ - und  $GABA_C$ -Rezeptoren präsent waren. Natürlich gilt es zu bedenken, dass GABA die Netzwerkaktivität nicht allein durch Bindung an  $GABA_A$ -Rezeptoren herabsetzt, sondern auch über  $GABA_B$ - und  $GABA_C$ -Rezeptoren einen hemmenden Effekt vermitteln kann. In anderen Studien wurde gezeigt, dass  $GABA_B$ -Rezeptoren im Kortex in hoher Dichte vertreten sind (Bowery, 2001),  $GABA_C$ -Rezeptoren hingegen hauptsächlich in der Retina von Vertebraten zu finden sind (Johnston, 1996; Bormann, 2000). Da für  $GABA_C$ -Rezeptoren jedoch Hill-Koeffizienten von 3 bis 5 gefunden wurden (Bormann, 2000), müsste in der vorliegenden Arbeit aus einer starken Beteiligung dieser Rezeptoren an dem durch GABA vermittelten hemmenden Effekt ein deutlich höherer Wert für den Hill-Koeffizient resultieren.

### 4.2.2 Muscimol

Als selektiver GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Agonist wurde Muscimol verwendet, das auch am GABA<sub>C</sub>-Rezeptor eingeschränkt agonistisch wirken kann, am GABA<sub>B</sub>-Rezeptor jedoch inaktiv ist (Johnston, 1996). Somit können über den GABA<sub>C</sub>-Rezeptor vermittelte Effekte von Muscimol nicht ausgeschlossen werden. Für diese Substanz ergaben sich mit einer Halbwirksamkeitsdosis von 0,162  $\mu\text{M}$  und 0,173  $\mu\text{M}$  ähnliche Werte und damit eine ähnliche Sensitivität für die Burst- und Spikerate. Die Burstdauer und Spikeanzahl/Burst erfuhren mit steigenden Muscimolkonzentrationen nur geringfügige Veränderungen.

Das Netzwerk zeigte folglich verglichen mit GABA eine etwa zehnfach höhere Sensitivität für den GABA-Agonisten. Untersuchungen mit radioaktiv markierten Liganden zeigten, dass Muscimol über eine high-affinity Bindungsstelle an den Rezeptor bindet und eine hohe agonistische Aktivität aufweist (Ebert *et al.*, 1997; Baur *et al.*, 2003). Die hier gefundene Sensitivität der Netzwerkaktivität unterscheidet sich jedoch deutlich von der in anderen Untersuchungen, bei denen für Muscimol ein IC<sub>50</sub>-Wert von 19,2  $\mu\text{M}$  bei kortikalen Kulturen ermittelt wurde (Gross *et al.*, 2006).

Der Betrag des Hill-Koeffizient der Dosis-Wirkungs-Beziehung betrug 1,51 für die Burstrate und 1,88 für die Spikerate, was auch bei Muscimol darauf hindeutet, dass eine Kooperativität der von mindestens zwei Molekülen aktivierten Bindungsstellen vorliegt.

### 4.2.3 Bicucullin und Picrotoxinin

Das durch Bicucullin und Picrotoxinin induzierte Aktivitätsmuster war mit steigenden Konzentrationen von einer zunehmenden synchronisierten, rhythmischen Burstaktivität geprägt.

Es handelt sich hierbei nicht um „exzitatorischen“ Substanzen im Sinne von Glutamat oder dem Glutamatagonist NMDA, die die Spikerate steigern, diese Substanzen führen vielmehr zu einer Disinhibition der Netzwerkaktivität. Der GABA<sub>A</sub>-Antagonist Bicucullin setzt die durchschnittliche Öffnungszeit und Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptorkanals und damit die Leitfähigkeit der Membran für Chlorid-Ionen herab. Dabei ist unklar, ob Bicucullin nur an eine oder beide GABA-Bindungsstellen anbindet (Macdonald & Olsen, 1994). Picrotoxinin hingegen ist ein nicht-kompetitiver GABA<sub>A</sub>-Kanal-Blocker, für den mehrere Wirkungsmechanismen diskutiert werden (Newland & Cull-Candy, 1992; Macdonald & Olsen, 1994). Frühere Studien zeigten, dass Picrotoxinin den Kanal nur in Anwesenheit von GABA oder eines GABA-Agonisten blockieren kann. Daher wird angenommen, dass die Bindung von Picrotoxinin eines geöffneten Kanals bedarf und sich die Bindungsstelle

demzufolge in der Kanalpore befindet (Sieghart, 1995). Während Bicuculline nur auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor antagonistisch einwirken kann, kann Picrotoxinin auch als nicht-kompetitiver Antagonist am GABA<sub>C</sub>-Rezeptor wirken (Johnston, 1996). Substanzen wie Bicucullin und Picrotoxinin, die die hemmende Wirkung des Neurotransmitters GABA unterbinden, werden auch als Krampfgifte bezeichnet (Meldrum & Whiting, 2001; Treiman, 2001). Sie induzieren einen Aktivitätszustand, der dem einer epileptischen Aktivität gleicht (Hwa *et al.*, 1990).

In den Experimenten dieser Arbeit nahm die Aktivität mit steigenden Substanzkonzentrationen deutlich zu, wobei die Burstrate mit EC<sub>50</sub>-Werten von 0,80 µM (Bicucullin) und 0,77 µM (Picrotoxinin) eine deutlich höhere Sensitivität zeigte als die Spikerate mit einer Halbwirksamkeitsdosis von 2,01 µM (Bicuculline) und 2,17 µM (Picrotoxinin). Diese Konzentrationen liegen im selben Bereich wie die in anderen Studien durch intrazelluläre Messungen gewonnenen Werte. Für Untersuchungen an akut dissoziierten Vertebratenneuronen wurde berichtet, dass der GABA-Strom durch Picrotoxinin in einem Konzentrationsbereich von 0,6 bis 37 µM zu 50 % herabgesetzt wird (Newland *et al.*, 1991). Für Bicucullin wurde im Rahmen anderer Studien an Horizontalzellen der Maus eine Halbwirksamkeitsdosis von 1,4 bis 1,7 µM angegeben (Feigenspan *et al.*, 2000; Feigenspan & Weiler, 2004).

Allerdings wurden für beide Substanzen widersprüchliche Werte bezüglich der Hill-Koeffizienten ermittelt. Während sich aufgrund der Spikerate jeweils ein Hill-Koeffizient von 1 ergab, lagen die Werte im Fall der Burstrate bei 2. Bei intrazellulären Ableitungen von Horizontalzellen im Rahmen einer anderen Studie wurde ein Hill-Koeffizient von 1 gefunden (Feigenspan & Weiler, 2004), so dass die Werte für die Spikerate diesbezüglich besser mit denen durch intrazelluläre Messungen gefundenen Werten korreliert.

Neben der auffälligen Steigerung der Burstrate durch Bicucullin und Picrotoxinin, kam es in einem Konzentrationsbereich von 2,5 bis 10 µM zu einer deutlichen Zunahme der Burstdauer. Allerdings stieg die Burstrate schon in einem etwa 10-fach geringeren Konzentrationsbereich an und erwies sich somit als der deutlich sensitivere Parameter. Die Steigerung der Burstdauer durch Bicucullin und andere Krampfgifte wie TMPP (Trimethylolpropanphosphat) wurde auch in anderen Studien zur extrazellulären Signalableitung von neuronalen Netzwerken beschrieben (Keefer *et al.*, 2001). Durch eine TMPP-Dosis von 20 µM konnte die Burstrate dort im Vergleich zur Kontrollsituation um etwa das 10-fache gesteigert werden, für Bicucullin finden sich keine näheren Angaben zum Ausmaß der Steigerung.

In anderen Untersuchungen an neuronalen Netzwerken auf Multielektrodenarrays lag die eingesetzte Bicucullinkonzentration mit 50 µM deutlich höher (Keefer *et al.*, 2001; Morefield *et al.*, 2000). Hierbei kamen jedoch vor allem Kulturen des Rückenmarks zum Einsatz. Das in dieser Arbeit eingesetzte System zeigte eine deutlich höhere Sensitivität. Eine Konzentration

von 20  $\mu\text{M}$  führte sogar zu einem deutlichen Absinken der Aktivität. Eine erniedrigte Aktivität im Grundzustand, sowie eine geringere Sensitivität der Kulturen nach Applikation einer 20  $\mu\text{M}$  Bicucullin- bzw. Picrotoxinin-Dosis deuteten sogar auf die Zytotoxizität dieser Substanzkonzentrationen hin.

Obwohl Bicucullin und Picrotoxinin an unterschiedlichen Stellen des Rezeptorkomplexes binden, und es sich im einen Fall um einen GABA-Antagonisten und im anderen Fall um einen GABA-Kanal-Blocker handelt, erlaubte die Änderung der Netzwerkantwort keine Unterscheidung der beiden Substanzen. Für die Dosis-Wirkungs-Beziehung ergaben sich sowohl für die Burstrate als auch für die Spikerate nahezu identische  $\text{EC}_{50}$ -Werte.

Erst aus der Ko-Applikation jeweils einer Substanz mit GABA resultierten signifikant unterschiedliche Werte für die Halbwirksamkeitsdosis. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für die Hemmung der Burstaktivität durch GABA erhöhte sich durch die Ko-Applikation mit Picrotoxinin auf 9,43  $\mu\text{M}$ . Bei einer Ko-Applikation mit Bicucullin betrug der  $\text{IC}_{50}$ -Wert 4,77  $\mu\text{M}$ . Die Messungen zeigten somit, dass eine deutlich höhere GABA-Konzentration benötigt wurde, um den durch Picrotoxinin erhöhten Aktivitätszustand herabzusetzen als bei Kulturen, deren Aktivität durch Bicucullin angehoben wurde. Durch den experimentellen Ansatz wurde eine Konkurrenzsituation geschaffen, bei der im Fall von Bicucullin und GABA beide Substanzen in direktem Wettbewerb um die Bindungsstellen am Rezeptor stehen. Kommt es zur Bindung von GABA, ist die Bindungsstelle für Bicucullin blockiert und der Antagonist kann nicht wirksam werden. Durch steigende GABA-Konzentrationen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Bindung von GABA, so dass immer weniger Bicucullin an den Rezeptor binden kann. Bei Ko-Applikation von Picrotoxinin und GABA konkurrieren die Substanzen nicht um dieselbe Bindungsstelle, da es sich bei Picrotoxinin um einen Kanal-Blocker handelt, der in der Kanal-Pore bindet und den Durchtritt von Chlorid-Ionen verhindert. Diese unterschiedlichen Wirkungsmechanismen führten zu einer Unterscheidung der Substanzen im Fall einer Ko-Applikation mit GABA.

#### 4.2.4 Temazepam und seine Glucuronide

Temazepam gehört zur Substanzklasse der Benzodiazepine, die eine große klinische Relevanz zur Behandlung von Schlaflosigkeit und Angstzuständen besitzen. Vor mehr als 30 Jahren erkannte man, dass Benzodiazepine ihren therapeutischen Effekt über den  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor vermitteln (Costa *et al.*, 1975; Haefely *et al.*, 1975). Zahlreiche Studien beschäftigten sich seither mit der Interaktion zwischen den Benzodiazepinen und dem  $\text{GABA}_A$ -Rezeptorkomplex. Es wurde gezeigt, dass es sich bei Benzodiazepinen um allosterische Modulatoren handelt, die die Hemmwirkung von GABA durch Steigerung der

Öffnungsfrequenz und Leitfähigkeit des Kanals erhöhen (Eghbali *et al.*, 1997). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Effekte von Benzodiazepinen auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor von der Zusammensetzung der Untereinheiten abhängt (Barnard *et al.*, 1998; Chebib & Johnston, 2000).

Das Benzodiazepin Temazepam konnte die Burstrate schon im nanomolaren Konzentrationsbereich herabsetzen. Dabei ergab sich ein IC<sub>50</sub>-Wert von 38,50 nM, was auf eine hohe Affinität von Temazepam zum GABA<sub>A</sub>-Rezeptor hinweist. Die Burstdauer und Spikeanzahl/Burst erwiesen sich nicht als sensitiv gegenüber dem Benzodiazepin. Die Ableitung von Ganzzellströmen durch Patch-Clamp-Messungen im Rahmen anderer Studien an Horizontalzellen der Maus zeigte, dass das Benzodiazepin Diazepam den GABA-Strom in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10 µM verstärkte, der IC<sub>50</sub>-Wert betrug 6,6 µM. Für Zolpidem, das eine andere chemische Struktur als die Benzodiazepine besitzt, jedoch ähnlich wirkt, wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 85 nM ermittelt (Feigenspan & Weiler, 2004).

Wurde Temazepam in der vorliegenden Arbeit zusammen mit einer GABA-Dosis von 500 nM, die die Burstaktivität alleine lediglich um etwa 10 % herabsetzte, appliziert, so konnte die hemmende Wirkung des Benzodiazepins auf die Burstrate deutlich verstärkt werden. Aus diesem experimentellen Ansatz resultierte ein IC<sub>50</sub>-Wert von 16,85 nM, womit die Halbwirksamkeitsdosis von Temazepam um das etwa 2,5-fache erniedrigt werden konnte.

Diese Beobachtung kann nicht allein auf den hemmenden Effekt des zugefügten GABA zurückgeführt werden. Hierin zeigt sich vielmehr, dass die endogene GABA-Verfügbarkeit im zellulären System zu gering war, um den Effekt von Temazepam gänzlich deutlich werden zu lassen. In anderen Studien wurde nachgewiesen, dass die extrazelluläre GABA-Konzentration im ZNS etwa 0,8-2,9 µM beträgt (Lerma *et al.*, 1986; Tossman *et al.*, 1986). Da eine 0,5 µM GABA-Dosis den Temazepameffekt um das 2,5-fache verstärken konnte, ist zu vermuten, dass die GABA-Konzentration im Zellkultursystem unter diesem Wert lag. Dies ist wahrscheinlich auch durch den vollständigen Austausch des Mediums vor den Messungen bedingt, wodurch extrazellulär vorliegendes GABA ausgewaschen wurde.

Der körpereigene Abbau der Benzodiazepine verläuft häufig in mehreren Schritten. Die meisten dieser Pharmaka werden zunächst im so genannten Phase-I-Metabolismus in ebenfalls pharmakologisch aktive Metabolite umgewandelt, bevor diese im Phase-II-Metabolismus durch eine Glucuronidierung in einen wasserlöslichen Zustand überführt und renal ausgeschieden werden (Lader, 1987). Es wird allgemein angenommen, dass diese Abbauprodukte der Benzodiazepine, die so genannten Glucuronide, nicht mehr neuroaktiv sind (Baldacci & Thormann, 2006). Eine experimentelle Bestätigung dieser Annahme steht jedoch aus. Wie in der Vergangenheit am Beispiel des Morphins gezeigt wurde, können Glucuronide durchaus eine hohe pharmakologische Wirksamkeit besitzen (Osborne *et al.*,

1990), so dass eine experimentelle Überprüfung der Neuroaktivität der Benzodiazepin-Glucuronide eine Notwendigkeit darstellt.

Da pharmakologischen Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass die Netzwerkaktivität kortikaler Kulturen auf Multielektrodenarrays durch am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor bindende Substanzen sensitiv modifiziert werden konnte, wurde das System zur Überprüfung der pharmakologischen Wirksamkeit der Glucuronide von Temazepam eingesetzt. Die Versuche ergaben, dass sowohl das R- als auch das S-Glucuronid keinen inhibitorischen Effekt auf die Netzwerkaktivität ausübten. Aufgrund dieses Ergebnisses kann angenommen werden, dass diese Substanzen pharmakologisch nicht wirksam sind, was für die medizinische Anwendung der Benzodiazepine von großer Bedeutung ist.

Durch den Einsatz mehrerer am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor bindender Substanzen zeigte sich, dass sich die auf zellulärer Ebene bekannten Wirkungen der Pharmaka auf den Rezeptorkomplex auch in einer entsprechenden Modifikation der Netzwerkantwort ausdrückten. In Übereinstimmung mit anderen Studien (Morefield *et al.*, 2000; Keefer *et al.*, 2001; Gopal & Gross, 2004) machen die Ergebnisse deutlich, dass neuronale Netzwerke sensitiv und reproduzierbar auf pharmakologisch aktive Substanzen in der Umgebung reagieren. Die Modifikation der Netzwerkantwort erlaubt dabei neben einer qualitativen Aussage bezüglich der Substanz auch eine Aussage über die vorliegende Konzentration.

Will man genauere Aussagen über die Anzahl der am Rezeptor bindenden Moleküle des Liganden bzw. über die Affinität von Ligand und Rezeptor treffen, so können extrazelluläre Messungen nur Hinweise geben. Für genauere Untersuchungen diesbezüglich ist jedoch die Messung direkter Ströme am Rezeptorkanal bzw. Experimente mit radioaktiv markierten Liganden erforderlich.

## 4.3 Strukturierte neuronale Netzwerke

### 4.3.1 Zellwachstum auf strukturierten Oberflächen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Zelldichte neuronaler Netzwerke so weit wie möglich zu reduzieren, um die elektrische Aktivität von einem möglichst überschaubaren Zellverband ableiten zu können. Da die Zelladhäsion und das Auswachsen der Neurite auf ganzflächig beschichteten Substraten zufällig erfolgt, ist die Wahrscheinlichkeit der Adhäsion auf den Elektroden bei einer geringen Zelldichte deutlich herabgesetzt.

Diesem Problem sollte mit einer strukturierten Substratbeschichtung, die eine geometrische Kontrolle über die Zelladhäsion und das Auswachsen der Neurone erlaubt, begegnet werden.

Durch das Schaffen von Substratregionen, welche die Zelladhäsion und das Zellwachstum begünstigen, kann man Einfluss auf die Lokalisation und das Wachstum der Zellen ausüben. Auf diese Weise können die Zellen unmittelbar zu den Elektroden der Multielektrodenarrays dirigiert und in möglichst nahen Kontakt zu den Ableitungsorten gebracht werden, wodurch die Qualität der abgeleiteten Signale deutlich verbessert werden kann. Weiterhin kann das Auswachsen der Neurite bei einer strukturierten Substratoberfläche durch vorgegebene Pfade kontrolliert werden und die Zellen gezielt miteinander in Kontakt gebracht werden. Zwar kann eine solche Strukturierung des Zellwachstums im zweidimensionalen Zellkultursystem nicht das geometrisch stark kontrollierte neuronale Wachstum *in vivo* nachahmen, jedoch bietet es die Möglichkeit, die beschriebenen Prozesse bis zu einem gewissen Grad zu kontrollieren.

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl verschiedener Methoden entwickelt, die ein Zellpatterning erlauben (Übersicht in: Jung *et al.*, 2001, Falconnet *et al.*, 2006). Für diese Arbeit wurde die Methode des Mikrokontaktstempelns benutzt, um den Adhäsionspromotor Poly-D-Lysin in den gewünschten Strukturen auf die Substratoberfläche aufzubringen. Diese Methode bietet eine einfach zu handhabende und kostengünstige Möglichkeit der Oberflächenstrukturierung von Substraten.

Um die aufgestempelten Adhäsionsproteine kovalent an Glasoberflächen zu binden, wurden die Substrate in früheren Arbeiten chemisch vorbehandelt (Wheeler *et al.*, 1999; Branch *et al.*, 2000; Scholl *et al.*, 2000; Branch *et al.*, 2001, Chang *et al.*, 2003; Nam *et al.*, 2004). Da Multielektrodenarrays jedoch heterogene Substrate sind, sieht man sich hier Problemen gegenübergestellt, und es existieren bislang nur wenig erfolgreiche Versuche ein strukturiertes Zellwachstum auf diesen Oberflächen zu realisieren. Beispielsweise wurde die Isolierung der Multielektrodenarrays mit Gold beschichtet, um daran ein Alkanthiol zu koppeln, welches die Bindung des aufgestempelten Poly-D-Lysins erlaubt (Nam *et al.*, 2004). Auf diese Weise kann jedoch ein Zellwachstum lediglich in Nähe der Elektroden erreicht werden, wodurch erfolgreiche Ableitungen nur eingeschränkt möglich sind. Ein anderer Ansatz bestand darin, das Adhäsionspeptid PA22-2 mittels Silanchemie an die Glasoberfläche eines Feldeffekttransistors zu binden (Scholl *et al.*, 2000). Bei dieser Studie wurden jedoch keine erfolgreichen Ableitungen gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein strukturiertes Zellwachstum ohne aufwendige Oberflächenbehandlung realisiert werden, indem der Adhäsionspromotor Poly-D-Lysin (PDL) mit Hilfe der Methode des Mikrokontaktstempelns im gewünschten Muster direkt auf die Substratoberfläche aufgebracht wurde. Auf diese Weise kann die Polyaminosäure zwar nicht kovalent gebunden werden, jedoch ist die Anbindung des positiven Polylysingerüsts über elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Glas- oder Siliziumnitridoberfläche ausreichend, um eine stabile Anbindung zu gewährleisten. Die Zelladhäsion

wird bei dem polykationischen PDL nicht über spezifische Rezeptor-Liganden-Bindungen vermittelt, sondern über elektrostatische Wechselwirkungen.

Die Stabilität der Anbindung des PDL an das Substrat, sowie der Zellen an das PDL zeigte sich darin, dass die Kulturen über einen Zeitraum von mehreren Wochen stabil an die Substrate banden, und es nicht zum Ablösen der zellulären Strukturen kam.

Auf eine oft beschriebene zusätzliche Behandlung des Hintergrundes mit Polyethylenglykol (Wheeler *et al.*, 1999; Branch *et al.*, 2000; Branch *et al.*, 2001) zur Steigerung der zellabweisenden Eigenschaften konnte verzichtet werden, da die unbehandelte Siliziumnitrid-Oberfläche der Multielektrodenarrays oder des Glassubstrates den Zellen keine adäquaten Adhäsionsbedingungen bot.

### 4.3.2 Optimierung der Struktur

Bisherige Versuche zum Patterning von Neuronen wurden nur mit gestreiften und rechteckigen Mustern durchgeführt (Ma *et al.*, 1998; Wheeler *et al.*, 1999; Branch *et al.*, 2000; James *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001; Lauer *et al.*, 2002; Vogt *et al.*, 2003; 2005; Heller *et al.*, 2005). Gestreifte Muster widersprechen der Idee eines neuronalen Netzwerkes, da man hier zwangsläufig einzelne untereinander nicht oder nur unzureichend verbundene Netzwerke erhält. In einer rechteckigen Geometrie auswachsende Neurone konnten von mehreren Gruppen realisiert werden. Bei einem solchen Muster können die wachsenden Neurite entweder geradeaus wachsen oder aber einem Winkel von 90 ° folgen. In einer anderen Studie wurde das durch einen Laserstrahl geleitete Wachstum von Axonen untersucht (Ehrlicher *et al.*, 2002). Dabei wurde gezeigt, dass Axone schwächere Biegungen bevorzugen, so dass starke Spannungen vermieden werden. Demzufolge, wurden in dieser Arbeit kreisförmige und trianguläre Muster eingesetzt, die stumpfe Winkel bzw. Bögen aufwiesen und den Neuronen erweiterte Wachstumsmöglichkeiten im Einklang mit dem Gedanken eines stark verknüpften Netzwerkes boten.

Eingesetzt wurden die Strukturen in einer Linienbreite von 4 oder 6 µm. Im Fall des Musters aus ineinander geschlungenen Kreisen lagen die Bögen der einzelnen Kreise zu dicht zusammen und es kam zum Überwachsen der nicht bestempelten Zwischenräume, so dass die Struktur für beide Linienbreiten nicht zufrieden stellend befolgt wurde.

Dahingegen konnten bei einem triangulären Muster die größeren PDL-freien Zwischenräume nicht von Neuriten überbrückt werden, und das Zellwachstum zeigte stets eine gute Übereinstimmung zur vorgegebenen Struktur. Die Zellen adhärten vornehmlich an den Knotenpunkten des Netzwerkes oder bewegten sich sekundär dorthin, und die auswachsenden Neurite folgten den vorgegebenen Linien zuverlässig. Hier wirkte sich das trianguläre Muster

zusätzlich positiv aus, da durch das Kreuzen dreier Linien an den Knotenpunkten eine größere PDL-Fläche und damit eine Präferenz der Zellkörper für die Knotenpunkte bestand.

In früheren Arbeiten mit rechteckigen Strukturen wurde die Fläche der Knotenpunkte erhöht, um den Zellen eine genügend große Fläche zur Adhäsion zur Verfügung zu stellen (Lauer *et al.*, 2002). Die besten Ergebnisse konnten dabei für ein rechteckiges Muster (Rechtecke:  $50 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ ) erzielt werden, das  $4 \mu\text{m}$  breite Linien und Knotenpunkte mit einem Durchmesser von  $10 \mu\text{m}$  aufwies. Erhöhte man die Fläche der Knotenpunkte weiter, so kam es zu einem Überwachsen der vorgegebenen Struktur. Bei der Verwendung eines Musters der Linienbreite  $6 \mu\text{m}$  konnte eine geringere Präferenz für eine Adhäsion an den Knotenpunkten gefunden werden.

Diese Beobachtung konnte bei der Verwendung des triangulären Musters in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Mehrheit der Somata befand sich auch unter Verwendung einer Struktur der Linienbreite  $6 \mu\text{m}$  an den Knotenpunkten des Netzwerkes, was eine notwendige Voraussetzung für erfolgreiche extrazelluläre Ableitungen mittels Multielektrodenarrays ist. Eine trianguläre Struktur mit einer geringeren Linienbreite von  $4 \mu\text{m}$  erfüllte, wie die immunzytochemischen Untersuchungen und extrazellulären Ableitungen zeigten, nicht die Anforderungen und führte nicht zu erfolgreichen Ableitungen (s. Kap. 4.3.3, 4.3.4).

### 4.3.3 Strukturelle und morphologische Eigenschaften strukturierter neuronaler Netzwerke

Eine genauere Betrachtung der strukturellen und morphologischen Eigenschaften strukturierter neuronaler Netzwerke erfolgte durch eine Antikörpermarkierung verschiedener zellulärer Proteine. Es musste sichergestellt werden, dass eine strukturierte Substratbeschichtung sich nicht nachteilig auf das Wachstum der Neurone, sowie die Synaptogenese auswirkte, und die Netzwerke hinsichtlich wichtiger morphologischer und struktureller Merkmale den unstrukturierten gleichzustellen sind.

Im Vergleich zu den auf homogenen Substratoberflächen auswachsenden Netzwerken einer geringen Zelldichte war die Anzahl der besiedelten Elektroden bei den strukturierten Netzwerken um circa das Dreifache höher. Dies entsprach auch der Anzahl an Elektroden, von denen elektrische Aktivität abgeleitet werden konnte (s. Abb. 3.25 A, 3.29).

Da Gliazellen eine bedeutende Rolle für die Ausbildung und Funktionalität von Synapsen spielen (Ullian *et al.*, 2001; Pfrieger, 2002; Freeman, 2006), ist die Anwesenheit dieser Zellen in Kultur eine notwendige Voraussetzung für die Ausbildung eines funktionalen Netzwerkes.

Während in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung eines Musters der Linienbreite  $4 \mu\text{m}$  nur wenige Astrozyten gefunden werden konnten, war der Anteil bei einer Linienbreite von  $6$

µm deutlich höher. Ein Grund für die weitgehend erfolglosen Ableitungen von Netzwerken der Linienbreite 4 µm dürfte unter anderem auf das geringe Astrozytenvorkommen in diesen Kulturen zurückzuführen sein. Diese Ergebnisse zeigen, dass neuronale Netzwerke der Linienbreite 4 µm die Anforderungen, die an den Biosensor gestellt werden müssen, nicht erfüllen. Pfrieder und Barres (1997) konnten zeigen, dass in Kulturen retinaler Ganglienzellen bei Abwesenheit von Gliazellen die Frequenz und Amplitude spontaner exzitatorischer postsynaptischer Potenziale (EPSP) stark absank. Weiterhin waren die in gliazellhaltigen Kulturen spontan auftretenden Burst-Ereignisse nicht mehr zu beobachten. In einer anderen Studie wurde demonstriert, dass in Kulturen retinaler Ganglienzellen die Anzahl reifer Synapsen bei Anwesenheit von Astrozyten um das Siebenfache erhöht war. Weiterhin belegten Patch-Clamp-Messungen, dass die spontane synaptische Aktivität durch eine Ko-Kultivierung der Ganglienzellen mit Astrozyten deutlich gesteigert werden konnte (Ullian *et al.*, 2001).

Obwohl eine notwendige Voraussetzung, birgt die Anwesenheit von Gliazellen in den Kulturen die Gefahr, dass diese Zellen sich flächig auf den Elektroden ausbreiten und die Detektion neuronaler Signale somit verhindern. Bei einer ganzflächigen Substratbeschichtung zeichnen sich Astrozyten durch eine flächige Morphologie des Perikaryons aus. Das Wachstum der Astrozyten auf den strukturierten Substraten hingegen war, aufgrund der nur eingeschränkt zur Verfügung stehenden PDL-Fläche, durch eine sehr schlanke Morphologie dieses Gliazellentyps charakterisiert. Die Elektroden wurden nicht von den Gliazellen abgedeckt.

Die Untersuchungen der Synapsendichte stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass ein strukturiertes Zellwachstum bei Verwendung des Adhäsionspromotors DETA (trimethoxysilylpropyl-diethylenetriamine) sich nicht nachteilig auf die Synaptogenese auswirkt (Ma *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000). Die Zelladhäsion und das Zellwachstum auf diesem Substrat ist vergleichbar zu PDL-beschichteten Oberflächen (Ma *et al.*, 1998).

Neben der Bestimmung der Synapsendichte durch immunzytochemische Detektion synaptischer Proteine, wurden die Netzwerke unter Verwendung der Patch-Clamp-Technik im Rahmen dieser Untersuchungen auch elektrophysiologisch charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die in Struktur wachsenden Neurone funktionale chemische Synapsen ausbilden und in ihren physiologischen Eigenschaften den auf homogen beschichteten Substraten kultivierten Zellen gleichzusetzen sind (Liu *et al.*, 2000; Vogt *et al.*, 2003). Es konnten sowohl GABAerge als auch glutamaterge Synapsen identifiziert werden (Liu *et al.*, 2000; Wyart *et al.*, 2001). Diese Untersuchungen betrachteten die Synapsendichte lediglich für den Zeitraum von bis zu höchstens 14 Tagen.

Da dieser Entwicklungszeitpunkt in der vorliegenden Arbeit jedoch einem noch nicht reifen Netzwerk entsprach, wurde die Synapsendichte über einen Zeitraum von drei Wochen untersucht. Es sollte gezeigt werden, zu welchem Zeitpunkt die Synapsenzahl pro Neuron stabil blieb, um daraus Rückschlüsse über den Zeitpunkt der Ausbildung eines reifen Netzwerkes ziehen zu können. Dabei konnte zum einen dargelegt werden, dass sich für 7, 14 und 21 Tage *in vitro* zu unstrukturierten Netzwerken vergleichbare Werte ergaben und das strukturierte Zellwachstum sich folglich nicht nachteilig auf die Synaptogenese auswirkte. Zum anderen zeigten die Untersuchungen, dass die Synapsendichte nach 7 Tagen *in vitro* relativ gering war und in der zweiten Kulturwoche um das etwa Dreifache anstieg, um dann stabil zu bleiben. Dies weist darauf hin, dass in der dritten Woche *in vitro* lediglich eine synaptische Konsolidierung erfolgte. In einer anderen Studie zur Untersuchung der morphogenetischen Eigenschaften kortikaler Neurone auf ganzflächig beschichteten Substraten zeigte sich hingegen, dass die Synapsendichte bis zum Ende der dritten Woche *in vitro* ansteigt (De Lima & Voigt, 1997a). Diese unterschiedlichen Befunde sind eventuell auf die höheren Zelldichten von bis zu 1500 Zellen/mm<sup>2</sup> in dieser Studie und auf die Verwendung eines anderen Mediums (Dulbecco's modified Eagle medium), sowie jüngerer Tiere (Entnahme der Embryonen am 16. Trächtigkeitstag) zurückzuführen.

Untersuchungen zum Zellwachstum machten deutlich, dass der Anteil des Neurofilaments bei strukturierten und unstrukturierten Netzwerken vergleichbar war. Nach 14 Tagen *in vitro* konnte sogar für die strukturierten Netzwerke ein etwas höherer Neurofilamentanteil ermittelt werden, was darauf hindeutet, dass das Zellwachstum durch die vorgegebene Geometrie auf bestempelten Substraten effizienter erfolgte.

Die Befunde bewiesen, dass das Wachstum der Neurone durch die strukturierte Substratbeschichtung nicht eingeschränkt wurde. Die quantitativen Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten darüber hinaus, dass es auch in der dritten Woche *in vitro* noch zu einem starken axonalen Wachstum kam.

Das Wachstum kortikaler Neurone in Kultur wurde von De Lima *et al.* auf ganzflächig beschichteten Substraten bis zu einem Zeitpunkt von 16 Tagen *in vitro* untersucht, um die Differenzierung der Neurite in Dendriten und Axone genauer zu betrachten (De Lima & Voigt, 1997a). Dabei konnte durch immunzytochemische Detektion eines phosphorylierten Epitops des Neurofilaments gezeigt werden, dass die axonale Dichte kortikaler Neurone besonders in den ersten 8 Tagen in Kultur drastisch anstieg. Dies ist neben den Untersuchungen zur Synapsendichte ein Hinweis darauf, dass die Reifung des Netzwerkes in dieser Studie aufgrund der beschriebenen höheren Zelldichten und abweichenden Kulturbedingungen schneller erfolgte als bei den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zellkulturen.

#### 4.3.4 Extrazelluläre Ableitungen der elektrischen Aktivität strukturierter neuronaler Netzwerke

Bisher wurden die elektrischen Eigenschaften strukturierter neuronaler Netzwerke hauptsächlich unter Verwendung der Patch-Clamp-Technik untersucht (Liu *et al.*, 2000; Lauer *et al.*, 2001; Vogt *et al.*, 2003; Heller *et al.*, 2005).

Ableitungen von strukturierten neuronalen Netzwerken auf Multielektrodenarrays konnten hingegen kaum verwirklicht werden. So wurde bisher nur ein Beispiel für eine extrazelluläre Ableitung von einem aus Linien bestehenden strukturierten Netzwerk (Nam *et al.*, 2004) beschrieben.

Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass bei Multielektrodenarrays heterogene Substratoberflächen vorliegen, wodurch das Patterning erschwert wird. Zum anderen müssen die Zellen präzise zu den Elektroden der MEAs dirigiert werden, um Potenziale möglichst erfolgreich ableiten zu können. Dies ist darin begründet, dass das Signal-Rausch-Verhältnis mit einem zunehmend engen Kontakt zwischen Elektrode und Zellmembran zunimmt. Die Qualität der abgeleiteten Signale wird dann optimal, wenn die Zelle direkt auf der Elektrode platziert ist und diese vollständig abdeckt (Jung *et al.*, 2001).

Die Geometrie der triangulären Struktur wurde so auf die Anordnung der Elektroden abgestimmt, dass die Elektroden immer mit den Knotenpunkten des Musters zusammentrafen. Da die Knotenpunkte aufgrund der größeren PDL-Fläche die bevorzugten Orte der Zelladhäsion darstellen, wurde gewährleistet, dass die Somata direkt auf den Ableitungsorten lokalisiert waren.

In dieser Arbeit wurde mit Multielektrodenarrays gearbeitet, bei denen der Durchmesser der Elektroden 30  $\mu\text{m}$  betrug. Da die neuronalen Somata einen Durchmesser von 10 bis 20  $\mu\text{m}$  aufweisen, wurden immer mehrere Zellen benötigt, um eine Elektrode weitestgehend abzudecken. Begegnet man diesem Problem durch die Verwendung kleinerer Elektroden, deren Durchmesser ungefähr dem eines neuronalen Somas entspricht, so wird die Impedanz erhöht, woraus ein ungünstigeres Signal-Rausch-Verhältnis resultiert, und die Signaldetektion erschwert bzw. unmöglich wird.

Durch die Adhäsion mehrerer Zellen auf einer Elektrode besteht bei den Messungen evtl. das Problem, dass die von verschiedenen Neuronen generierten Signale von einer Elektrode verzeichnet werden. Für eine über diese Arbeit hinausgehende detailliertere Analyse der Netzwerkaktivität kann die Methode des Spike-Sorting angewendet werden (Letelier & Weber, 2000; Takahashi & Sakurai, 2005). Dabei werden die von einer Elektrode detektierten Spikes aufgrund der Abhängigkeit der Spikeform von der Zellmorphologie und relativen Position des Neurons zur Elektrode verschiedenen Neuronen zugeordnet.

Aufgrund eines strukturierten Zellwachstums gelang es im Vergleich zu unstrukturierten Netzwerken einer geringen Zelldichte, die Anzahl der Elektroden, die Spikes detektierten, um etwa das Dreifache zu erhöhen. Durchschnittlich konnte unter Anwendung eines Zellpatternings bei einer Zelldichte von etwa 200 Zellen/mm<sup>2</sup> von etwa der Hälfte der Elektroden Signale erfasst werden.

Weiterhin konnten auch bei diesen Kulturen ab einem Zeitpunkt von etwa 14 Tagen *in vitro* von mehreren Elektroden gleichzeitig Bursts abgeleitet werden. Nach etwa 3 Wochen *in vitro* traten die Burstereignisse in regelmäßigen Abständen von etwa 20 s auf und wiesen eine Dauer von etwa 100 bis 150 ms, sowie eine Spikefrequenz von etwa 150 Hz auf. Damit ist die Dauer und Spikefrequenz der von strukturierten Netzwerken abgeleiteten Bursts etwas niedriger als die der unstrukturierten Netzwerke einer hohen Zelldichte. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich durch die geringere Zelldichte der strukturierten Netzwerke bedingt, aufgrund derer die Elektroden von einer geringeren Zellanzahl Signale detektieren. Die Burstrate im nativen Zustand war vergleichbar zu der unstrukturierter Netzwerke einer hohen Zelldichte.

Zellkulturen einer geringen Dichte, die auf einer homogenen Substratbeschichtung ausgewachsen waren, zeigten hingegen keine synchrone Burstaktivität. Weiterhin konnten bei strukturierten Netzwerken einer geringeren Linienbreite von 4 µm nur vereinzelte Spikes und keine Bursts detektiert werden. Dies spricht auf der einen Seite dafür, dass durch ein Zellpatterning ein stärker verknüpftes Netzwerk realisiert werden konnte, bei dem hochfrequente synaptische Inputs sicher weitergeleitet werden und sich über das gesamte Netzwerk ausbreiten können. Auf der anderen Seite deutet das Fehlen von Bursts bei Netzwerken mit 4 µm breiten Linien darauf hin, dass die Funktionalität des Netzwerkes eingeschränkt ist. Zum einen ist vermutlich eine gewisse Mindestzelldichte notwendig, um zuverlässige Signaldetektionen zu gewährleisten. Es ist zu vermuten, dass aufgrund der geringeren PDL-Fläche nicht genügend Zellen adhären und auswachsen konnten, so dass die Mindestzelldichte unterschritten wurde. Weiterhin besteht ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der fehlenden Burstaktivität und der geringen Astrozytendichte bei Netzwerken einer Linienbreite von 4 µm. Wie bereits erwähnt, spielen Astrozyten eine wichtige Rolle für die Synaptogenese (Ullian *et al.*, 2001; Pfrieger, 2002) und können weiterhin durch die Freisetzung von ATP und Glutamat neuronale Aktivität stimulieren, sowie synchronisieren (Angulo *et al.*, 2004; Fellin *et al.*, 2004). Ein wichtiger Grund für die deutlich eingeschränkte Funktionalität dieser Netzwerke ist sicher in der geringen Astrozytendichte der Kulturen zu sehen.

#### 4.3.5 Sensitivität strukturierter neuronaler Netzwerke gegenüber neuroaktiven Substanzen

Intrazelluläre Ableitungen offenbarten, dass funktionale chemische Synapsen auch in strukturierten Netzwerken ausgebildet werden, und darüber hinaus auch die physiologischen Eigenschaften der Neurone keine offensichtlichen Einschränkungen erfahren (Ma *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Vogt *et al.*, 2003).

Allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob die Netzwerke ebenfalls sensitiv auf neuroaktive Substanzen reagieren, und sich dies in einer pharmakologisch nachvollziehbaren Modifikation der Netzwerkaktivität äußert. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit die Veränderungen der Spike- und Burstrate durch GABA als GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonist und Bicucullin als Antagonist betrachtet.

In Übereinstimmung mit den Versuchen an unstrukturierten Netzwerken einer hohen Zelldichte zeigten auch die strukturierten Netzwerken eine dosisabhängige Reduktion der Burst- und Spikerate mit steigenden GABA-Konzentrationen. Während die IC<sub>50</sub>-Werte bezüglich der Burstrate für beide Netzwerktypen nahezu identisch waren (strukturierte Netzwerke: IC<sub>50</sub> = 1,63 µM; unstrukturierte Netzwerke: IC<sub>50</sub> = 1,43 µM), zeigte die Spikerate im Fall der strukturierten Netzwerke eine höhere Sensitivität (strukturierte Netzwerke: IC<sub>50</sub> = 1,81 µM; unstrukturierte Netzwerke: IC<sub>50</sub> = 3,60 µM). Diese höhere Sensitivität der Spikerate könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Elektroden bedingt durch die geringere Zellzahl von weniger Zellen elektrische Aktivität registrierten als im Fall der unstrukturierten Netzwerke einer hohen Zelldichte. Ein weiterer Hinweis hierauf findet sich in der nicht ansteigenden Burstlänge und Spikeanzahl/Burst im Fall der strukturierten Netzwerke.

Die Applikation des GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Bicucullin führte auch bei den unstrukturierten Netzwerken zu einer Disinhibition der Netzwerkaktivität, was sich in einem dosisabhängigen Anstieg synchronisierter Burst-Ereignisse äußerte. Dabei stimmte die Halbwirksamkeitsdosis bezüglich der Burstrate als Messparameter gut mit der unstrukturierten Netzwerke überein (strukturierte Netzwerke: EC<sub>50</sub> = 0,77 µM; unstrukturierte Netzwerke: EC<sub>50</sub> = 0,80 µM). Jedoch war der Hill-Koeffizient der Dosis-Wirkungs-Kurve etwas geringer (strukturierte Netzwerke: n<sub>H</sub> = 1,37; unstrukturierte Netzwerke: n<sub>H</sub> = 2,09). Weiterhin ergab sich im Gegensatz zu den unstrukturierten Netzwerken keine Veränderung der Burstdauer und Spikeanzahl/Burst mit steigenden Bicucullinkonzentrationen.

Neben dieser Beobachtung wurde für die Spikerate auch im Fall von Bicucullin eine höhere Sensitivität bei strukturierten Netzwerken gefunden (strukturierte Netzwerke: EC<sub>50</sub> = 0,86 µM; unstrukturierte Netzwerke: EC<sub>50</sub> = 2,01 µM). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass aufgrund der geringeren Zellanzahl strukturierter Netzwerke die Sensitivität des Systems bezüglich neuroaktiver Substanzen gesteigert werden konnte.

All diese Ergebnisse zeigen, dass die Netzwerkaktivität strukturierter Netzwerke durch neuroaktive Substanzen eine sinnvolle Modifikation erfuhr und in ihren physiologischen Eigenschaften mit unstrukturierten Netzwerken gleichzusetzen sind. Die geringere Zellzahl kombiniert mit einer kontrollierten Geometrie des neuronalen Netzwerkes wirkte sich positiv auf die Sensitivität der Messparameter, insbesondere der Spikerate aus.

#### 4.4 Die Tauglichkeit kortikaler Netzwerke auf Multielektrodenarrays als zellbasierter Biosensor

Eine dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung ist die Tauglichkeit der neuronalen Netzwerke auf Multielektrodenarrays als ein zellbasiertes Biosensorsystem. Kommerzielle Anforderungen an ein Biosensorsystem sind in erster Linie eine einfache Handhabung, ein geringer Kostenaufwand, ein schneller Zugriff auf die Ergebnisse, sowie eine hohe Zuverlässigkeit und Sensitivität in Bezug auf ein breites Substanzspektrum.

Von Seiten der pharmazeutischen Industrie besteht der Bedarf des Substanzscreenings, sei es um die Nebenwirkungen von Substanzen auf das zentrale Nervensystem zu untersuchen oder die Effekte neuer Medikamente zur Behandlung neuronaler Krankheiten zu analysieren. Beispielsweise werden elektrophysiologische Methoden benötigt, die die Modulation von Ionenströmen durch pharmakologisch aktive Substanzen erfassen können (Stett *et al.*, 2003), da viele Krankheiten auf der Dysfunktion von Ionenkanälen beruhen (Lehmann-Horn & Jurkat-Rott, 1999).

Weiterhin besteht der Wunsch, zellbasierte Biosensoren in einem portablen System einzusetzen, um in die Umwelt gelangte Neurotoxine zu detektieren (Rogers, 1995; Pancrazio *et al.*, 2003; O'Shaughnessy *et al.*, 2004; Renhak, 2005). Dabei können sie nicht nur einen Hinweis auf die generelle physiologische Wirksamkeit einer eventuell unbekanntes Substanz liefern, sondern auch deren Funktionalität näher spezifizieren.

Die in einem zweidimensionalen System kultivierten kortikalen Netzwerke stellen ein im Vergleich zu den Strukturen *in vivo* leichter zugängliches, vereinfachtes System dar, das jedoch den Zellbestand und die Rezeptorausstattung des ursprünglichen Gewebes weiter repräsentiert. Dabei erlaubt die Modifikation des spontan generierten Aktivitätsmusters Rückschlüsse auf die Effekte und den wirksamen Konzentrationsbereich eines breiten Substanzspektrums unter definierten experimentellen Bedingungen.

Um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten, ist jedoch eine möglichst standardisierte Zellpräparation und Zellkultivierung der primären Zellen eine notwendige Voraussetzung. Weiterhin ist anzumerken, dass aufgrund der Verwendung dissoziierter Kulturen als zelluläres System zunächst die Reorganisation des Netzwerkes

erfolgen muss und den Kulturen ein Zeitraum von etwa 3 Wochen nach der Präparation zu gewähren ist, bevor sie für Experimente eingesetzt werden können. Diesem zeitlichen Vorlauf kann man jedoch durch eine entsprechende Planung und fortlaufende Präparation begegnen, um Wartezeiten zu vermeiden. Da bei dem beschriebenen System primäre Zellen zum Einsatz kommen, muss das Zellmaterial embryonalen Ratten entnommen werden. Durch die Verwendung eines Gehirns können jedoch ungefähr 50 Multielektrodenarrays belegt werden, wodurch eine Vielzahl von Experimenten ermöglicht und der Bedarf und Kosten an Tieren im Vergleich zu Untersuchungen *in vivo* deutlich eingeschränkt wird.

Denkbar ist die Verwendung neuronaler Zelllinien anstelle der primären Zellen. Zelllinien sind aber aufgrund der eingeschränkten Synapsenbildung und Ionenkanalausstattung meist nicht für einen Einsatz als zelluläre Komponente eines Biosensorsystems geeignet, welches auf ein breites Substanzspektrum ausgerichtet ist (Pancrazio *et al.*, 1999; Stenger *et al.*, 2001; Görtz *et al.*, 2004). Eine Alternative zur Verwendung primärer Zellen stellen jedoch kryokonservierte Neurone dar, die positiv auf ihre strukturellen und elektrophysiologischen Eigenschaften untersucht wurden (Otto *et al.*, 2003).

Will man nicht den generellen Effekt einer Substanz auf ein neuronales Netzwerk erfassen, sondern gezielt die Modulation von Ionenströmen durch einen bestimmten Ionenkanal messen, so eröffnen Methoden wie automatisierte Patch-Clamp-Messungen neue Perspektiven hinsichtlich des Substanzscreenings (Stett *et al.*, 2003; Brueggemann *et al.*, 2004). Dabei müssen jedoch Zelllinien zum Einsatz kommen, welche den entsprechenden Ionenkanal überexprimieren, was einen gewissen experimentellen Aufwand in der Vorbereitung des Zellmaterials erfordert.

Weiterhin können künstliche Membranen geschaffen werden, die eine Matrix für die Einlagerung funktionaler Membranproteine, wie z.B. Ionenkanäle, darstellen. Der Ionenstrom durch die Kanäle wird dabei über ein elektrochemisches Signal detektiert (Minami *et al.*, 1991; Sackmann, 1996; Terrettaz *et al.*, 2003; Vockenroth *et al.*, 2005). Allerdings ist dies bisher nur für wenige Ionenkanäle gelungen.

Die Verwendung primärer neuronaler Zellen auf Multielektrodenarrays erlaubt zwar nicht die unmittelbare Messung von Strömen durch die Zellmembran, jedoch resultiert die Modifikation der Netzwerkaktivität aus der Summation der Substanzeinwirkung an einer Vielzahl von Rezeptoren und ist somit unter Umständen sogar sensitiver als die Untersuchung der Substanzeffekte an einzelnen Zellen durch intrazelluläre Messungen. Besonders bei Betrachtung der synchronisierten Bursts kortikaler Netzwerke wird durch die Vernetzung der einzelnen Zellen eine Verstärkung bewirkt. Somit konnte insbesondere die Burstaktivität auf Netzwerkebene sehr sensitiv durch neuroaktive Substanzen modifiziert werden und schon in niedrigen Konzentrationsbereichen auf einen Effekt der Testsubstanz hindeuten, lange bevor die Zellen irreversibel geschädigt wird. Die kortikalen Kulturen erwiesen sich in diesem

Zusammenhang als ein äußerst robustes Zellsystem, da die Substanzeffekte vollständig reversibel waren, und die Kulturen auch für mehrere Messreihen eingesetzt werden konnten. Lediglich beim Einsatz von Bicucullin und Picrotoxinin in einer Dosis höher als 10  $\mu\text{M}$  erfuhr die Kulturen Schädigungen und konnten nicht mehr weiter verwendet werden.

Ein weiterer großer Vorteil des Systems ist die einfache Handhabung im Vergleich zu Methoden der intrazellulären Signalableitung, so dass eine Anwendung auch durch weniger erfahrene Personen möglich ist. Des Weiteren können aufgrund der nicht-invasiven Messungen Kulturen über einen Zeitraum von Wochen oder gar Monaten für Experimente herangezogen werden. Somit erlaubt das System nicht nur eine Betrachtung der akuten Substanzeffekte, sondern auch die Untersuchungen chronischer Auswirkungen auf Veränderungen der Netzwerkaktivität.

Auch in anderen Studien konnten neuronale Netzwerke auf Multielektrodenarrays erfolgreich zur Detektion neuroaktiver Substanzen eingesetzt werden (Gross & Rhoades, 1995; Morefield *et al.*, 2000; Keefer *et al.*, 2001; Chiappalone *et al.*, 2003; O'Shaughnessy *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2003; Gopal & Gross, 2004; Martinoia *et al.*, 2005a; 2005b). In der vorliegenden Arbeit jedoch wurde erstmals der Einfluss auf die Netzwerkaktivität durch ein breites Spektrum am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor bindender Substanzen getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass das System dosisabhängig und durch die optimierten Kulturbedingungen sowie Analyseverfahren im Vergleich zu den anderen extrazellulären Studien sensitiver und verlässlicher auf neuroaktive Substanzen reagierte. Bei allen eingesetzten Pharmaka wurde die Netzwerkaktivität entsprechend der bekannten Wirkungen auf zellulärer Ebene im mikromolaren oder sogar nanomolaren Konzentrationsbereich moduliert. Dabei konnte das System nicht nur eine qualitative Aussage über die applizierte Substanz liefern, sondern auch eine quantitative, wobei die Burstrate für die Ableitungen auf Netzwerkebene als der sensitivste Messparameter bei der Verwendung der kortikalen Kulturen herausgestellt werden konnte. Von großer Bedeutung war in diesem Zusammenhang die Wahl einer geeigneten Analysesoftware, die auf das System und die zu extrahierenden Parameter optimiert war.

Beim Einsatz eines solchen Systems als Biosensor könnte die Verlässlichkeit bei der Identifizierung und Diskriminierung verschiedener Substanzen darüber hinaus durch die Verwendung von Merkmalskombinationen weiter gesteigert werden.

Für strukturierte Netzwerke ergab sich einerseits für die Burstrate eine zu unstrukturierten Netzwerken einer hohen Zelldichte vergleichbare Sensitivität. Andererseits konnte die Sensitivität der Spikerate durch ein strukturiertes Zellwachstum deutlich gesteigert werden, was vermutlich durch die geringere Zellanzahl bedingt ist. Bei einer Verwendung des Systems als zellbasierter Biosensor für kommerzielle Zwecke ist jedoch ein unstrukturiertes Netzwerk aufgrund des geringeren Arbeitsaufwandes bei der Substratvorbehandlung vorzuziehen.

Die in dieser Arbeit angestellten Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass kortikale neuronale Netzwerke auf MEAs ein einfach zu handhabendes, sensibles System zum Pre-Screening für ein breites Substanzspektrum darstellen, das wertvolle und schnell verfügbare Hinweise auf die Wirksamkeit der zu testenden Substanzen in einem funktionalen, robusten neuronalen Netzwerk liefern kann. Das Messsystem erlaubt dabei nicht nur eine Aussage über die generelle Neuroaktivität einer Testsubstanz, sondern lässt gegebenenfalls auch Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus und die physiologischen Effekte zu. Ein solches System kann zwar die pharmakologischen und analytischen Studien auf molekularer Ebene als auch Untersuchungen *in vivo* nicht vollständig ersetzen, diese jedoch deutlich einschränken.

## 5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das in dieser Arbeit eingesetzte biohybride System aus kortikalen Neuronen und Multielektrodenarrays ein sensitives und verlässliches System zum Screening physiologisch aktiver Substanzen darstellt, mit dessen Hilfe einerseits Hinweise über die Neuroaktivität einer Substanz erhalten werden können und andererseits deren genaue Wirkweise näher spezifiziert werden kann. Die Untersuchungen bezogen sich auf am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor bindende Substanzen. Um den Einsatz des Systems auch auf andere Signalwege auszudehnen, müssten zunächst entsprechende Substanzen getestet, Charakterisierungen vorgenommen und geeignete Messparameter definiert werden.

Für den Einsatz neuronaler Netzwerke auf Multielektrodenarrays als Biosensor, ist weiterhin der Aufbau einer Datenbank für eine möglichst große Anzahl von Referenzsubstanzen sinnvoll. Übereinstimmungen in der Modifikation definierter Parameter oder Merkmalskombinationen zu bekannten Substanzen könnten so schnell erkannt werden und die Identifizierung neuroaktiver Substanzen, sowie deren Zuordnung zu bestimmten Substanzklassen deutlich erleichtert werden.

In dieser Arbeit wurden lediglich die akuten Effekte der Substanzen untersucht. Die Möglichkeit elektrophysiologische Parameter über einen längeren Zeitraum zu beschreiben, kann jedoch auch wertvolle Hinweise auf chronische Substanzeffekte liefern. Durch eine fortwährende Applikation neuroaktiver Substanzen könnte weiterhin auch deren Einfluss auf die Entwicklung des Netzwerkes untersucht und ein größeres Augenmerk auf die zeitabhängige Entwicklung der physiologischen Eigenschaften gelegt werden.

Der Einsatz des Systems zum Substanzscreening in der pharmazeutischen Industrie verlangt weitere Optimierungen, insbesondere im Bezug auf die technischen Aspekte. Die Handhabung des Systems muss weiter vereinfacht und automatisiert werden. Beispielsweise sind kleinere Chips mit weniger Elektroden und einem geringeren Bedarf an zellulärem Material ausreichend. Weiterhin ist es denkbar, die Chips zu kompartimentieren, was die parallele Untersuchung verschiedener Substanzen bzw. mehrerer Substanzkonzentrationen ermöglichen würde. In diesem Zusammenhang kann auch die Darstellungs- und Analysesoftware weiter optimiert werden, so dass die Daten für den Anwender möglichst einfach zu erheben sind und unmittelbar vorliegen.

Die Integration eines automatisierten Fluidiksystems würde die Handhabung auf der einen Seite weiter vereinfachen und andererseits würde das Auswaschen der Substanzen durch einen kontinuierlichen Durchfluss schonender erfolgen (Pottek *et al.*, 2006). Die Kombination mit einem fluidischen System würde es darüber hinaus auch ermöglichen, lediglich eine

Hälfte des Netzwerkes der Testsubstanz auszusetzen während die andere Hälfte weiterhin als Kontrolle dient.

Um Substanzen außerhalb des Labors auf ihre pharmakologische Wirksamkeit zu untersuchen, ist es weiterhin notwendig, die neuronalen Netzwerke auf Multielektrodenarrays in ein portables System zu integrieren. Zur Entwicklung eines geeigneten elektronischen Systems mit der entsprechenden Softwareplattform existieren bereits einige Ansätze (Gilchrist *et al.*, 2001; Pancrazio *et al.*, 2003; O'Shaughnessy *et al.*, 2004; Renhak, 2005). Das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte portable, zellbasierte Biosensorsystem (Renhak, 2005; Steininger, 2005) wurde im vergangenen Jahr erfolgreich für den zweitägigen Einsatz außerhalb des Labors zur Demonstration neuronaler Netzwerkaktivität und deren Modifikation durch neuroaktive Substanzen eingesetzt (Mainzer Wissenschaftssommer, 2005). Zusätzlich zur Entwicklung eines portablen Systems ist für das Vor-Ort-Monitoring umweltgefährdender Stoffe auch ein geeignetes Verfahren zur Vorverarbeitung der Proben von Nöten, um die zu testenden Stoffe für den Biosensor verfügbar zu machen.

Schnittstellen zwischen zellulären und mikroelektronischen Systemen können langfristig auch genutzt werden, um Körperfunktionen nach Lähmungen wieder herzustellen. Dabei müssen einzelne Neurone gezielt mit Elektroden verbunden werden. Adhäsions- und Wachstumsprozesse können hier nicht dem Zufall überlassen bleiben, sondern müssen einer genauen Kontrolle unterworfen werden. Der vorgestellte Ansatz zu einem strukturierten Zellwachstum zeigte, dass diese Prozesse bei kortikalen Neuronen bis zu einem gewissen Grad kontrolliert werden können, ohne dass die physiologischen Eigenschaften der Zellen bezüglich der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Parameter eingeschränkt sind. Eine weiterführende Kontrolle der zellulären Prozesse könnte auf die Induktion der neuronalen Polarität (Stenger *et al.*, 1998) und die kontrollierte Ausbildung von Synapsen abzielen. Für die Entwicklung mikroelektronischer Neuroprothesen ist jedoch darüber hinaus die Entwicklung dreidimensionaler neuronaler Kulturen notwendig. Das Wachstum der Neurone in einer dreidimensionalen Matrix kommt den Bedingungen *in vivo* deutlich näher als die Kultivierung in einem zweidimensionalen System. Kollagen-Strukturen oder Hydrogele können hier als geeignete Substrate dienen (O'Connor *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2004). Jedoch stehen diese Entwicklungen erst am Anfang und es werden viele Bemühungen notwendig sein, ein stabiles, funktionales, neuronales Netzwerk in einer dreidimensionalen Matrix zu etablieren.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden neokortikale neuronale Netzwerke auf Multielektrodenarrays auf ihre Tauglichkeit als zellbasiertes Biosensorsystem untersucht.

Die Untersuchung der Entwicklung des neuronalen Netzwerkes hinsichtlich der morphologischen und elektrischen Eigenschaften wies darauf hin, dass nach einer dreiwöchigen Kulturdauer von einem ausgereiften Netzwerk ausgegangen werden kann. Das extrazellulär über das Elektrodenarray abgeleitete Aktivitätsmuster war zu diesem Zeitpunkt von einzelnen Spike-Ereignissen und regelmäßigen, synchronen Bursts geprägt.

Der Schwerpunkt der pharmakologischen Untersuchungen an den ausgereiften kortikalen Netzwerken lag auf dem Einsatz von Substanzen, welche auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor einwirken. Es zeigte sich, dass die auf zellulärer Ebene bekannten Wirkungen der Substanzen auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor in einer entsprechenden Modifikation der Netzwerkantwort Ausdruck fanden. Das System zeigte dabei eine hohe Sensitivität und eine gute Reproduzierbarkeit bezüglich der jeweiligen Effekte. Die Modifikation des spontan generierten Aktivitätsmusters ließ Rückschlüsse auf die Wirksamkeit und den Wirkungsmechanismus der Testsubstanzen zu. Das System erlaubte ferner in den meisten Fällen eine Diskriminierung der auf den gleichen Rezeptor einwirkenden Substanzen. Die Analyse der Spikerate und verschiedener auf Bursts beruhender Messparameter machte deutlich, dass die Burstrate bei den extrazellulären Ableitungen auf Netzwerkebene den sensitivsten und verlässlichsten Parameter zum Nachweis der Substanzeffekte darstellte. Durch die Verwendung kortikaler Netzwerke unter optimierten Kulturbedingungen und einer auf das System abgestimmten Analysesoftware konnte die Reproduzierbarkeit und Sensitivität im Vergleich zu anderen Studien deutlich verbessert werden.

Das optimierte System wurde eingesetzt, um die pharmakologische Wirksamkeit der Benzodiazepin-Metabolite zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die Glucuronide von Temazepam die Netzwerkaktivität hinsichtlich der untersuchten Parameter nicht modifizierten. Damit kann angenommen werden, dass diese Abbauprodukte von Medikamenten keine Neuroaktivität aufweisen.

Um die extrazelluläre Signableitung von einer möglichst geringen Zellanzahl und damit einem überschaubaren zellulären Netzwerk auf Multielektrodenarrays zu ermöglichen, wurden die Oberflächeneigenschaften der Substrate so modifiziert, dass die Lokalisation der Zellsomata und das Auswachsen der Neurite einer geometrischen Kontrolle unterlag. Die kontrollierte Substratbeschichtung des Adhäsionspromotors Poly-D-Lysin konnte dabei durch die Methode des Mikrokontaktstempelns realisiert werden. Es zeigte sich, dass eine trianguläre Struktur, bei der die Höhe der gleichschenkligen Dreiecke 100 µm und die Länge

der Basis 100  $\mu\text{m}$  betrug, den Anforderungen sehr gut entsprach. Die Linienbreite der optimalen Struktur betrug 6  $\mu\text{m}$ . Bei diesem Muster zeigten die Zellkörper eine deutliche Präferenz für die Knotenpunkte und konnten damit gezielt zu den Elektroden dirigiert werden, während die Linien den Neuriten definierte Wachstumspfade vorgaben.

Die Untersuchung struktureller und morphogenetischer Eigenschaften der strukturierten Netzwerke bewies, dass die kontrollierte Substratbeschichtung sich nicht negativ auf das Wachstum und die Synaptogenese auswirkte. Durch das kontrollierte Zellwachstum konnte die extrazelluläre Ableitung von Netzwerken einer geringen Zelldichte über einen Zeitraum von mehreren Wochen ermöglicht werden. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die Funktionalität des Netzwerkes durch das strukturierte Wachstum nicht eingeschränkt war und die spontan generierte Aktivität im selben Maß oder im Fall der Spikerate sogar sensitiver durch neuroaktive Substanzen modifiziert werden konnte als die Aktivität unstrukturierter Netzwerke einer hohen Zelldichte.

Diese Arbeit diente der Optimierung einer Schnittstelle zwischen einem mikroelektronischen System und Neuronen. Sowohl die Entwicklung geeigneter Biosensoren für kommerzielle Zwecke als auch die medizinische Anwendung im Bereich neuroelektronischer Prothesen birgt ein großes Potenzial und wird auch in der Zukunft Grundlage weiterer Forschungsvorhaben sein.

## 7. Literaturverzeichnis

Aertsen, A., Erb, M., Palm, G., 1994. Dynamics of functional coupling in the cerebral cortex - an attempt at a model-based interpretation. *Physica D* 75, 103-128.

Alger, B.E., Le Beau, F.E.N., 2001. Physiology of the GABA and Glycine Systems. In: *Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission* (H. Möhler, ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Alteheld, N., Roessler, G., Vobig, M., Walter, R., 2004. The retina implant new approach to a visual prosthesis. *Biomedizinische Technik* 49, 99-103.

Angulo, M.C., Kozlov, A.S., Charpak, S., Audinat, E., 2004. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 24, 6920-6927.

Baldacci, A., Thormann, W., 2006. Analysis of lorazepam and its 3O-glucuronide in human urine by capillary electrophoresis: evidence for the formation of two distinct diastereoisomeric glucuronides. *Journal of Separation Science* 29, 153-163.

Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N., Langer, S.Z., 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors: Classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological Reviews* 50, 291-313.

Baur, R., Sigel, E., 2003. On high- and low-affinity agonist sites in GABA<sub>A</sub> receptors. *Journal of Neurochemistry* 87, 325-332.

Becciu, A., 2004. Analysis of neuronal data recorded with micro-electrode arrays. Diploma Thesis, Università di Cagliari, Cagliari.

Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Represa, A., Gozlan, H., 2004. Interneurons set the tune of developing networks. *Trends in Neuroscience* 27, 422-427.

Bormann, J., 2000. The ABC of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 21, 16-19.

Bormann, J., Feigenspan, A., 1995. GABA<sub>C</sub> receptors. *Trends in Neuroscience* 18, 515-519.

Bormann, J., Feigenspan, A., 2001. GABA<sub>C</sub> Receptors: Structure, Function and Pharmacology. In: *Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission* (H. Möhler, ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Bousse, L., 1996. Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators B* 34, 270-275.

Bowery, N.G., 2001. Pharmacology of GABA<sub>B</sub> Receptors. In: *Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission* (H. Möhler, ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Branch, D.W., Corey, J.M., Weyhenmeyer, J.A., Brewer, G.J., Wheeler, B.C., 1998. Microstamp patterns of biomolecules for high-resolution neuronal networks. *Medical & Biological Engineering & Computing* 36, 135–141.

Branch, D.W., Wheeler, B.C., Brewer, G.J., Leckband, D.E., 2000. Long-term maintenance of patterns of hippocampal pyramidal cells on substrates of polyethylene glycol and microstamped polylysine. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 47, 290-300.

Branch, D.W., Wheeler, B.C., Brewer, G.J., Leckband D.E., 2001. Long-term stability of grafted polyethylene glycol surfaces for use with microstamped substrates in neuronal cell culture. *Biomaterials* 22, 1035-1047.

Brewer, G.J., 1995. Serum-free B27/Neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *Journal of Neuroscience Research* 42, 674–683.

Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., Price, P.J., 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal™, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research* 35, 567–576.

Brueggemann, A., George, M., Klau, M., Beckler, M., Steindl, J., Behrends, J.C., Fertig, N., 2004. Ion Channel Drug Discovery and Research: The Automated Nano-Patch-Clamp Technology. *Current Drug Discovery Technologies* 1, 91-96.

Buzsaki, G., Draguhn, A., 2004. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926-1929.

Carter, S.B., 1965. Principles of cell motility: The direction of cell movement and cancer invasion. *Nature* 208, 1183-1187.

Chang, J.C., Brewer, G.J., Wheeler, B.C., 2001. Modulation of neural network activity by patterning. *Biosensors & Bioelectronics* 16, 527-533.

Chang, J.C., Brewer, G.J., Wheeler, B.C., 2003. A modified microstamping technique enhances polylysine transfer and neuronal cell patterning. *Biomaterials* 24, 2863-2870.

Chebib, M., Johnston, G.A.R., 2000. GABA-activated ligand gated ion channels: Medicinal chemistry and molecular biology. *Journal of Medicinal Chemistry* 43, 1427-1447.

Chiappalone, M., Novellino, A., Vajda I., Vato, A., Martinoia S., van Pelt J., 2005. Burst detection algorithms for the analysis of spatio-temporal patterns in cortical networks of neurons. *Neurocomputing* 65-66, 653-662.

Chiappalone, M., Vato, A., Tedesco, M.B., Marcoli, M., Davide, F., Martinoia, S., 2003. Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications. *Biosensors & Bioelectronics* 18, 627-634.

Cocatre-Zilgien, J.H., Delcomyn, F., 1992. Identification of bursts in spike trains. *Journal of Neuroscience Methods*. 41, 19-30.

Corey, J.M., Wheeler, B.C., Brewer, G.J., 1996. Micrometer resolution silane-based patterning of hippocampal neurons: critical variables in photoresist and laser ablation processes for substrate fabrication. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 43, 944-955.

Corner, M.A., Van Pelt, J., Wolters, P.S., Baker, R.E., Nuytinck, R.H., 2002. Physiological effects of sustained blockade of excitatory synaptic transmission on spontaneously active developing neuronal networks: An inquiry into the reciprocal linkage between intrinsic biorhythms and neuroplasticity in early ontogeny. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 26, 127-185.

Cornish, T., Branch, D.W., Wheeler, B.C., Campanelli, J.T., 2002. Microcontact Printing: A versatile technique for the study of synaptogenic molecules. *Molecular and Cellular Neuroscience* 20, 140-153.

Costa, E., Guidotti, A., Mao, C.C., 1975. Evidence for the involvement of GABA in the action of benzodiazepines. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 14, 113-130.

Curtis, A., 2002. Breaking the neural code. *Nature* 416, 274-275.

Curtis, A., Wilkinson, C., 1997. Topographical control of cells. *Biomaterials* 18, 1573-1583.

De Lima, A.D., Merten, M.D.P., Voigt, T., 1997a. Neuritic differentiation and synaptogenesis in serum-free neuronal cultures of the rat cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 382. 230-246.

De Lima, A.D., Voigt, T., 1997b. Identification of two distinct populations of  $\gamma$ -Aminobutyric acidergic neurons in cultures of rat cerebral cortex. *Journal of comparative neurology* 388, 526-540.

Dichter, M. A., 1978. Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Research* 149, 279-293.

- Dotti, C.G., Sullivan, C.A., Banker, G.A., 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience* 8, 1454-1468.
- Drew, C.A., Johnston, G.A., Weatherby, R.P., 1984. Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neuroscience Letters* 52, 317-21.
- Ebert, B., Thompson, S. A., Saounatsou, K., McKernan, R., Krogsgaard-Larsen, P., 1997. Differences in agonist/antagonist binding affinity and receptor transduction using recombinant human  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors. *Molecular Pharmacology* 52, 1150-1156.
- Eghbali, M., Curmi, J.P., Birnir, B., Cage, P.W., 1997. Hippocampal GABA<sub>A</sub> channel conductance increased by diazepam. *Nature* 388, 71-75.
- Egert, U., Knott, T.H., Schwarz, C., Nawrot, M., Brandt, A., Rotter, S., Diesmann, M., 2002. MEA-tools: an open source toolbox for the analysis of multielectrode-data with MATLAB. *Journal of Neuroscience Methods* 177, 33-42.
- Ehrlicher, A., Betz, T., Stuhmann, B., Koch, D., Milner, V., Raizen, M.G., Käs., J., 2002. Guiding neuronal growth with light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16024-16028.
- Evans, M.S., Collings, M.S., Brewer, G.J., 1998. Electrophysiology of embryonic, adult and aged rat hippocampal neurons in serum-free culture. *Journal of Neuroscience Methods* 79, 37-46.
- Falconnet, D., Csucs, G., Grandin, H.M., Textor, M., 2006. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials* 27, 3044-3063.
- Feigenspan, A., Gustincich, S., Raviola, E., 2000. Pharmacology of GABA<sub>A</sub> receptors of retinal dopaminergic neurons. *Journal of Neurophysiology* 84, 1697-1707.
- Feigenspan, A., Weiler, R., 2004. Electrophysiological properties of mouse horizontal cell GABA<sub>A</sub> receptors. *Journal of Neurophysiology* 92, 2789-2801.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P., Carmignoto, G., 2004. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729-743.
- Franceschetti, S., Guatteo, E., Panzica, F., Sancini, G., Wanke, E., Avanzino, G., 1995. Ionic mechanisms underlying burst firing in pyramidal neurons: intracellular study in rat sensorimotor cortex. *Brain Research* 696, 127-139.

- Freeman, M.R., 2006. Sculpting the nervous system: glial control of neuronal development. *Current Opinion in Neurobiology* 16, 119-125.
- Fromherz, P., 2002: Electrical Interfacing of Nerve Cells and Semiconductor Chips. *ChemPhysChem* 3, 276-284.
- Fromherz, P., Offenhäusser, A., Vetter T., Weis J., 1991. A neuron-silicon junction: A retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science* 252, 1290-1293.
- Fromherz, P., Stett, A., 1995. Silicon-neuron Junction: Capacitive stimulation of an individual neuron on a silicon chip. *Physical Review Letters* 75,1670-1673.
- Galarreta, M., Hestrin, S., 2001. Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nature reviews* 2, 425-433.
- Galarreta, M., Hestrin, S., 1999. A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402, 72-75.
- Gallo, V., Haydar, T., 2003. GABA: exciting again in its own right. *Journal of Physiology* 550, 665.
- Gibson, J.R., Beierlein, M., Connors, B.W., 1999. Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402, 75-79.
- Gilchrist, K.H., Barker, V.N., Fletcher, L.E., DeBusschere, B.D., Ghanouni, P., Giovangrandi, L., Kovacs, G.T.A., 2001. General purpose, field-portable cell-based biosensor platform. *Biosensors & Bioelectronics* 16, 557-564.
- Görtz, P., Fleischer, W., Rosenbaum, C., Otto, F., Siebler, M., 2004. Neuronal network properties of human teratocarcinoma cell line-derived neurons. *Brain Research* 1018, 18-25.
- Gopal, K.V., Gross, G.W., 2004. Unique responses of auditory cortex networks in vitro to low concentrations of quinine. *Hearing Research*. 192, 10-22.
- Gross, G.W., Rhoades, B.K., 1995. The use of neuronal networks on multielectrode arrays as a biosensor. *Biosensors & Bioelectronics* 10, 553-567.
- Gross, G.W., Rhoades, B.K., Reust, D.L., Schwalm, F.U., 1993. Stimulation of monolayer networks in culture through thin-film indium-tin oxide recording electrodes. *Journal of Neuroscience Methods* 50, 131-143.
- Gross, G.W., Rieske, E., Kreuzberg, G.W., Meyer A., 1977. A new fixed-layer multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. *Neuroscience Letters* 6, 101-105.

- Gross, G.W., Rijal-Oli, S., Parviz, M., Jones, V., Hollmuller, D., Karg, M., 2006. High-throughput microelectrode array platforms for quantitative pharmacology and toxicology. 5<sup>th</sup> International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes, 132-135.
- Guatteo, E., Bacci, A., Franceschetti, S., Avanzino, G., Wanke, E., 1994. Neurons dissociated from neocortex fire with 'burst' and 'regular' trains of spikes. *Neuroscience Letters* 175, 117-120.
- Haefely, W., Kucsar, A., Mohler, H., Lieri, L., Polc, P., Schaffner, R., 1975. Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 14, 131-151.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* 391, 85-100.
- Heller, D.A., Garga, V., Kelleher, K.J., Lee, T., Mahbubani, S., Sigworth, L.A., Lee, R., Rea, M.A., 2005. Patterned networks of mouse hippocampal neurons on peptide-coated gold surfaces. *Biomaterials* 26, 883-889.
- Helmchen, F., Nimmerjahn, A., 2005. Neue Einblicke ins Gehirn – Beobachtung von Gliazellen in der intakten Hirnrinde. *Tätigkeitsbericht 2005*, Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, 391-396
- Hill, D.R., Bowery, N.G., 1981. <sup>3</sup>H-baclofen and <sup>3</sup>H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA<sub>B</sub> sites in the rat brain. *Nature* 290, 149-152.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952a. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology* 117, 500-544.
- Hodgkin A.L., Huxley, A.F., Katz, B., 1952b. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *Journal of Physiology* 116. 424-448.
- Hungar, K., Gortz, M., Slavcheva, E., Spanier, G., Weidig, C., Mokwa, W., 2005. Production processes for a flexible retina implant. *Sensors & Actuators A. Physical*. 123-24,172-178.
- Hwa, G.G.C., Avoli, M., Oliver, A., Villemure, J.G., 1990. Bicuculline-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro. *Experimental Brain Research* 83, 329-339.
- James, C.D., Davis, R., Meyer, M., Turner, A., Withers, G., Kam, L., Banker, G., Craighead, H., Isaacson, M., Turner, J., Shain, W., 2000. Aligned microcontact printing of micrometer-scale poly-l-lysine structures for controlled growth of cultured neurons on planar microelectrode arrays. *IEEE Transactions on biomedical engineering* 47, 17-21.

- Johnston, G.A.R., Curtis, D.R., Beart, P.M., Game, C.J.A., McCulloch, R.M., Twitchin, B., 1975. *cis*- and *trans*-4-Aminocrotonic acid as GABA agonist of restricted conformation. *Journal of Neurochemistry* 24, 157-160.
- Johnston, G.A.R., 1996. GABA<sub>C</sub> receptors – relatively simple transmitter-gated ion channels. *Trends in Pharmacological Sciences*. 17, 319-323.
- Johnston, G.A.G., 2005. GABA<sub>A</sub> receptor channel pharmacology. *Current Pharmaceutical Design* 11, 1867-1885.
- Jügelt, K., 2001. Parameter zur Beschreibung der komplexen Aktivitätsmuster von neuronalen Netzwerken in Kultur auf Mikroelektroden-Arrays, Diplomarbeit, Universität Rostock, Rostock.
- Jung, D.R., Kapur, R., Adams, T., Giuliano, K.A., Mrksich M., Craighead, H.G., Taylor, D.L., 2001. Topographical and physicochemical modification of material surface to enable patterning of living cells. *Critical Reviews in Biotechnology* 21, 111-154.
- Jungblut, M., Schwind, C., Knoll, W., Graf, K., Thielemann, C., 2003. Micropatterned neuronal networks on solid surfaces. 5<sup>th</sup> International Meeting on Functional Polymeric Surfaces in Biotechnology, 57.
- Jungblut, M., Pottek, M., Schwind, C., Knoll, W., Thielemann, C., 2004. Micropatterned neuronal networks on microelectrode arrays. 4<sup>th</sup> International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, 65.
- Kamioka, H., Maeda, E., Jimbo, Y., Robinson, H.P.C., Kawana, A., 1996. Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neuroscience Letters* 206, 109-112.
- Kandel, E., Schwartz, J.H., Jessel, T.M., 2000. *Principles of neural science*. 4ed, McGraw Hill.
- Kash, T.L., Trudell, J.R., Harrison, N.L., 2004. Structural elements involved in activation of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABA<sub>A</sub>) receptor. *Biochemical Society Transaction* 32, 540-546.
- Kawaguchi, Y., Kubota, Y., 1997. GABAergic Cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex* 7, 476-486.
- Kawaguchi, Y., 1995. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in Layer II/III of rat frontal cortex. *The Journal of Neuroscience* 5, 2638-2655.

- Keefer, E.W., Gramowski, A., Stenger, D.A., Pancrazio, J.J., Gross, G.W., 2001. Characterization of acute neurotoxic effects of trimethylolpropane phosphate via neuronal network biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 16, 513-525.
- Kleinfeld, D., Kahler, K.H., Hockberger, P.E., 1988. Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates. *Journal of Neuroscience* 8, 4098-4120.
- Korpi, E.R., Gründer, G., Lüddens, H., 2002. Drug interactions at GABA<sub>A</sub> receptors. *Progress in Neurobiology* 67, 113-159.
- Kriegstein, A.R., Dichter M. A., 1983. Morphological classification of rat cortical neurons in cell culture. *Journal of Neuroscience* 3, 1634-1747.
- Kriegstein, A.R, Dichter, M.A., 1984. Neuron generation in dissociated cell cultures from fetal rat cerebral cortex. *Brain Research* 295, 184-189.
- Kujawski, P., 2005. Klassifikation neuronaler Netzwerkaktivität kortikaler Kulturen auf Mikroelektrodenarrays mithilfe von Hidden-Markov-Modellen. Master Thesis, Fachhochschule Darmstadt, Darmstadt.
- Kumar, A., Whitesides, G.M., 1993. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with elastomeric stamp and an alkanethiol "ink" followed by chemical etching. *Applied Physics Letters*, 63, 2002-2004.
- Lader, M., 1987. Clinical pharmacology of benzodiazepines. *Annual Review of Medicine* 38, 19-28.
- Lauer, A., Klein, C., Offenhäusser, A., 2001. Spot compliant neuronal networks by structure optimized micro-contact printing. *Biomaterials* 22, 1925–1932.
- Lauer, L., Vogt, A., Yeung, C.K., Knoll, W., Offenhäusser, A., 2002. Electrophysiological recordings of patterned rat brain stem slice neurons. *Biomaterials* 23, 3123-3130.
- Lehmann-Horn, F., Jurkat-Rott, K., 1999. Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiological Reviews* 79, 1317-1372.
- Lerma, J., Herranz, A.S., Herreras, O., Abaira, V, Martin del rio, R., 1986. In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Research* 384, 145-155.
- Letelier, J.C., Weber, P.P., 2000. Spike sorting based on discrete wavelet transform coefficients. *Journal of Neuroscience Methods*. 101, 93-106.

- Lisman, J.E., 1997. Bursts as a unit of neural information – making unreliable synapses reliable. *Trends in Neurosciences*. 20, 38-43.
- Liu, Q.-Y., Coulombe, M., Dumm, J., Shaffer, K.M., Schaffner, A.E., Barker, J.L., Pancrazio, J.J., Stenger, D.A., Ma W., 2000. Synaptic connectivity in hippocampal neuronal networks cultured on micropatterned surfaces. *Developmental Brain Research* 120, 223-231.
- Luhmann, H.J., Hanganu, I., Kilb, W., 2002. Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex. *Brain Res. Bull.* 60, 345-353.
- Ma, W., Fitzgerald, W., Liu, Q.-Y., O'Saughnessy, T.J., Maric, D., Lin, H.J., Alkon, D.L., Barker, J.L., 2004. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuits in three-dimensional collagen gels. *Experimental Neurology* 190, 276-288.
- Ma, W., Liu, Q., Jung, D., Manos, P., Pancrazio, J.J., Schaffner A.E., Barker J.L. Stenger, D.A., 1998. Central neuronal synapse formation on micropatterned surfaces. *Developmental Brain Research* 111, 231-243.
- Maeda, E., Robinson, H.P.C., Kawana, A., 1995. The mechanisms of generation and propagation of synchronized bursting in developing networks of cortical neurons. *The Journal of Neuroscience* 15, 6834-6845.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., Wu, C., 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews* 5, 793-807.
- Martinoia, S., Bonzano, L., Chiappalone, M., Tedesco, M., 2005a. Electrophysiological activity modulation by chemical stimulation in networks of cortical neurons coupled to microelectrode arrays: A biosensor for neuropharmacological applications. *Sensors & Actuators B-Chemical*. 108, 589-596.
- Martinoia, S., Bonzano, L., Chiappalone, M., Tedesco, M., Marcoli, M., Maura, G., 2005b. In vitro cortical neuronal networks as a new high-sensitive system for biosensor applications. *Biosensors & Bioelectronics* 20, 2071-2078.
- Macdonald, R.L., Olsen, R.W. 1994. GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annual Review of Neuroscience* 17, 569-602.
- Meldrum, B.S., Whiting, P., 2001. Anticonvulsants acting on the GABA System. In: *Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission* (H. Möhler, ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Merz, M., Fromherz, P., 2002. Polyester microstructures for topographical control of outgrowth and synapse formation of snail neurons. *Advanced Materials*. 14, 141-144.

- Minami, H., Sugawara, M., Odashima, K., Umezawa, Y., 1991. Ion channel sensors for glutamic acid. *Analytical Chemistry* 63, 2787-2795.
- Mody, I., Pearce, R.A., 2004. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA<sub>A</sub> receptors. *Trends in Neuroscience* 27, 569-575.
- Montoro, R.J., Yuste, R., 2004. Gap junction in developing neocortex: a review. *Brain Research Reviews* 47, 216-226.
- Morefield, S.I., Keefer E.W., Chapman K.D., Gross G.W., 2000. Drug evaluations using neuronal networks cultured on microelectrode arrays. *Biosensors & Bioelectronics* 15, 383-396.
- Munson, B., Nelson, P.B., 2005. Phonetic identification in quiet and in noise by listeners with cochlear implants. *Journal of the Acoustical Society of America* 118, 2607-2617.
- Nam, Y., Chang, J.C., Wheeler, B.C., Brewer, G.J., 2004. Gold-coated microelectrode array with thiol linked self-assembled monolayers for engineering neuronal cultures. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 51, 158-165.
- Neher, E., Sakmann, B., 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Newland, C.F., Cull-Candy, S.G., 1992. On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat. *Journal of Physiology* 447, 191-213.
- Nicholls, J.G., Martin, A.R., Wallace, B.G., 2002. Vom Neuron zum Gehirn. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, New York.
- O'Connor, S.M., Andreadis, J.D., Shaffer, K.M., Ma, W., Pancrazio, J.J., Stenger, D.A., 2000. Immobilization of neural cells in three-dimensional matrices for biosensor applications. *Biosensors & Bioelectronics* 14, 871-881.
- Osborne, R., Joel, S., Trew, D., 1990. Morphine and metabolite behaviour after different routes of morphine administration demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 47, 12-19.
- O'Shaughnessy, T.J., Gray, S.A., Pancrazio, J.J., 2004. Cultured neuronal networks as environmental biosensors. *Journal of Applied Toxicology* 24, 379-385.
- O'Shaughnessy, T.J., Zim, B., Ma, W., Shaffer, K.M., Stenger, D. A., Zamani, K., Gross, G.W., Pancrazio, J.J., 2003. Acute neuropharmacologic action of chloroquine on cortical neurons in vitro. *Brain Research* 959, 280-286.

- Otto, F., Görtz, P., Fleischer, W., Siebler, M., 2003. Cryopreserved rat cortical cells develop functional neuronal networks on microelectrode arrays. *Journal of Neuroscience Methods* 128, 173-181.
- Owens, D.F., Kriegstein, A.R., 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature Reviews Neuroscience* 3, 715-727.
- Owicki, J.C., Parce J.W., 1992. Biosensors based on the energy metabolism of living cells: The physical chemistry and cell biology of extracellular acidification. *Biosensors & Bioelectronics* 7, 255-272.
- Pancrazio, J.J., Gray, S.A., Shubin, Y.S., Kulagina, N., Cuttino, D.S., Shaffer K.M., Eisemann, K., Curran, A., Zim, B., Gross, G.W., O'Shaughnessy, T.J., 2003. A portable microelectrode array recording system incorporating cultured neuronal networks for neurotoxin detection. *Biosensors and Bioelectronics* 18, 1339-1347.
- Pancrazio, J.J., Whelan, J.P., Borkholder, D.A., Ma, W., Stenger, D.A., 1999. Development and application of cell-based biosensors. *Annals of Biomedical Engineering* 27, 697-711.
- Pfrieger, F.W., 2002. Role of glia in synapse development. *Current Opinion in Neurobiology* 12, 486-490.
- Pfrieger, F.W., Barres, B.A., 1997. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277, 1684-1687.
- Pieribone, V.A., Shupliakov, O., Brodin, L., Hilfiker-Rothenfluh, W., Czernik, A., Greengard, P., 1995. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature* 375, 493-497.
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., Sperk, G., 2000. GABA<sub>A</sub> receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101, 815-850.
- Pike, F.G., Meredith, R.M., Olding, A.W.A., Paulsen, O., 1999. Postsynaptic bursting is essential for 'Hebbian' induction of associative long-term potentiation at excitatory synapses in rat hippocampus. *Journal of Physiology (London)* 518, 571-576.
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A.M., Sieghart, W., Sperk, G., 2000. GABA<sub>A</sub> receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101, 815-850.
- Pottek, M., Sörensen, P., Knoll, W., Howitz, S., Thielemann, C., 2006. A cell-based microfluidic system for drug screening applications. *MSTnews* 1/06, 38-39.

- Potter, S.M. & DeMarse, T.B., 2001. A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of Neuroscience Methods* 110, 17–24.
- Ramirez, J.-M., Tryba, A.K., Pena, F., 2004. Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Current Opinion in Neurobiology* 14, 665-674.
- Renhak, F., 2005. Entwicklung eines portablen, zellbasierten Messsystems zur Ermittlung von Umwelteinträgen. Diplomarbeit, Fachhochschule Jena, Jena.
- Rodiek, R.W., Kiang, N.Y.S., Gerstein, G.L., 1962. Some quantitative methods for the study of spontaneous activity in single neurons. *Biophysical Journal* 2, 351-368.
- Rogers, K.R., 1995. Biosensors for environmental applications. *Biosensors and Bioelectronics* 10. 533-541.
- Rosenberg, M.D., 1963. Cell guidance by alterations in monomolecular films. *Science* 139, 411-412.
- Rothman, J.E., 1994. Mechanism of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- Sackmann, E., 1996. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science, New Series* 271, 43-48
- Scholl, M., Sprössler, C., Denyer, M., Krause, M., Nakajima, K., Maelicke, A., Knoll, W., Offenhäusser, A., 2000. Ordered networks of rat hippocampal neurons attached to silicon oxide surfaces. *Journal of Neuroscience Methods* 104, 65-75.
- Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., Uhler, M.D., 1999. *Basic Neurochemistry*. 6ed, Lippincott Williams & Wilkins.
- Sieghart, W., 1995. Structure and pharmacology of  $\gamma$ -Aminobutyric AcidA receptor subtypes. *Pharmacological Reviews* 47, 181-234.
- Sigworth, F.J., Klemic K.G., 2005. Microchip technology in Ion-Channel Research. *Transactions on Nanobioscience* 4, 121-127.
- Singer, W., 1999. Neuronal Synchrony: A Versatile Code for the Definition of Relations? *Neuron* 24, 49-65.
- Söllner T., 1995. SNAREs and targeted membrane fusion. *FEBS Letters* 469, 80- 83.
- Stein, V., Roger, A.N., 2003. GABA Generates Excitement. *Neuron* 37, 375-378.

- Steininger, J., 2005. Signalverarbeitung für zellbasierte Biosensoren. Diplomarbeit, Fachhochschule Aschaffenburg, Aschaffenburg..
- Stenger, D.A. Hickman, J.J., Bateman, K.E., Ravenscroft, M.S., Ma, W., Pancrazio, J.J., Shaffer, K., Schaffner, A.E., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., 1998. Microlithographic determination of axonal/dendritic polarity in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Methods* 82, 167-173.
- Stenger, D.A., Gross, G.W., Keefer, E.W., Shaffer, K.M., Andreadis, J.D., Ma, W., Pancrazio, J.J., 2001. Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors. *Trends in Biotechnology* 19, 304-309.
- Stett, A., Burkhardt, C., Weber, U., van Stiphout, P., Knott, T., 2003. Cytocentering: A novel technique enabling automated cell-by-cell patch clamping with the CYTOPATCH™ Chip. *Receptors and Channels* 9, 59-66.
- Stett, A., Egert, U., Guenther, E., Hofmann, F., Meyer, T., Nisch, W., Haemmerle, H., 2003. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 3, 486-495.
- Stieglitz, T., Schuettler, M., Koch, K.P., 2004. Neural prostheses in clinical applications - Trends from precision mechanics towards biomedical microsystems in neurological rehabilitation. *Biomedizinische Technik* 49, 72-77.
- Sturm, A.K. König, P., 2001. Mechanisms to synchronize neuronal activity. *Biological Cybernetics* 84, 153-172.
- Takahashi, S., Sakurai, Y., 2005. Real-time and automatic sorting of multi-neuronal activity for sub-millisecond interactions in vivo. *Neuroscience* 134, 301-315.
- Tam, D.C., 2002. An alternate burst analysis for detecting intra-burst firings based on inter-burst periods. *Neurocomputing* 44-46, 1155-1159.
- Tamás, G., Buhl, E.H., Lörincz, A., Somogyi, P., 2000. Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nature Neuroscience* 4, 366-371.
- Tateno, T., Kawana, A., Jimbo, Y., 2002. Analytical characterization of spontaneous firing in networks of developing rat cultured cortical neurons. *Physical Review E* 65, 051924-1 – 051924-16
- Terrettaz, S., Mayer, M., Vogel, H., 2003. Highly electrically insulating tethered lipid bilayers for probing the function of ion channel proteins. *Langmuir* 19, 5567-5569.

- Tossman, U., Jonsson, G., Understedt, U., 1986. Regional distribution and extracellular levels of amino acids in rat central nervous system. *Acta Physiologica Scandinavica* 127, 533-545.
- Treiman, D.M., 2001. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42, 8-12.
- Turnbull, L.; Dian, E.; Gross, G.W., 2005. The string method of burst identification in neuronal spike trains. *Journal of Neuroscience Methods* 145, 23-35.
- Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., Barres, B.A., 2001. Control of synapse number by glia. *Science* 291, 657-661.
- Varju, P., Katarova, Z., Madarás, E., 2001. GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Research* 305, 239-246.
- Vockenroth, I.K., Atanasova, P.P., Jenkins, A.T.A., Knoll, W., Köper, I., 2005. Functional tethered bilayer membranes as a biosensor platform. *IEEE sensors – The 4th IEEE Conference on Sensors*. Irvine, CA.
- Vogt, A.K., Lauer, L., Knoll, W., Offenhäusser, A., 2003. Micropatterned substrates for the growth of functional neuronal networks of defined geometry. *Biotechnological Progress* 19, 1562-1568.
- Vogt, A.K., Brewer, G.J., Offenhäusser, A., 2005. Connectivity patterns in neuronal networks of experimentally defined geometry. *Tissue Engineering* 11, 1757-1767.
- Wagenaar, D.A., Madhavan, R., Pine, J., Potter, S.M., 2005. Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *The Journal of Neuroscience* 19, 680-688.
- Wheeler, B.C., Corey, J.M., Brewer, G.J., Branch, D.W., 1999. Microcontact printing for precise control of nerve cell growth in culture. *Journal of Biomedical Engineering* 121, 73-78.
- Wyart C., Ybert, C., Bourdieu, L., Herr, C., Prinz, C., Chatenay, D., 2001. Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces. *Journal of Neuroscience Methods* 117, 123-131.
- Xia, Y., Gross, G.W., 2003. Histiotypic electrophysiological responses of cultured neuronal networks to ethanol. *Alcohol* 30, 167-174.
- Xu, T.-L., 1999.  $\gamma$ -Aminobutyric acid-induced responses in acutely dissociated neurons from the rat sacral dorsal commissural nucleus. *Journal of the Autonomic Nervous System* 75, 156-163.

Yaari, Y., Beck, H., 2002. "Epileptic neurons" in temporal lobe epilepsy. *Brain Pathology* 12, 234-239.

Yamada, J., Okabe, A., Toyoda, H., Kilb, W., Luhmann, H.J, Fukuda, A., 2004. Cl<sup>-</sup> uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *Journal of Physiology (London)* 557, 829-841.

Yehezkel, B., Khalilov, I., Represa, A., Gozlan, H., 2004. Interneurons set the tune of developing networks. *Trends in Neuroscience* 27, 422-427.

Zrenner, E., 2002. Will retinal implants restore vision? *Science* 295, 1022-1025.

## Abbildungsverzeichnis

1.1:	Schematische Darstellung eines GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Komplexes.....	7
1.2:	Transformation eines elektrischen Stimulus in eine bestimmte Anzahl von Aktionspotenzialen, die eine definierte Frequenz aufweisen.....	11
1.3:	Signalverlauf eines Aktionspotenzials und eines Spikes.....	14
2.1:	Schematische Darstellung der strukturierten Substratbeschichtung.....	22
2.2:	Vergrößerter Ausschnitt aus dem Maskendesign.....	23
2.3:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Masters.....	24
2.4:	PDMS-Stempel mit triangulärem Muster justiert auf die Elektrodengeometrie eines MEAs.....	25
2.5:	Übersicht zum Messaufbau des MEA-Systems von Multi Channel Systems.....	26
2.6:	Multielektrodenarray.....	27
2.7:	Übersicht über die Vorgehensweise bei der Vorverarbeitung der Daten.....	31
2.8:	Potenzialverlauf bei extrazellulärer Signalableitung.....	32
2.9:	Veranschaulichung der zur Burstdetektion herangezogenen Parameter.....	32
3.1:	Morphologie der Neurone nach 21 Tagen in vitro.....	39
3.2.:	Neuronales Zellwachstum nach 7, 14 und 21 Tagen in vitro.....	39
3.3:	Synapsendichte neuronaler Netzwerke nach 7, 14 und 21 Tagen in vitro.....	40
3.4:	Expression des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors bei neuronalen Netzwerken nach 7, 14 und 21 Tagen in vitro.....	41
3.5:	Astrozytenwachstum in kortikalen Kulturen nach 14 und 21 Tagen in vitro.....	42
3.6:	Konfokale Aufnahme eines Oligodendrozyten in einer kortikalen Kultur nach 14 Tagen in vitro.....	42
3.7:	Spontane native Aktivität eines Netzwerkes nach 24 Tagen in vitro .....	44
3.8:	Spikefolgen für GABA nach 24 Tagen in vitro.....	46
3.9:	Einfluss von GABA auf die Spikerate.....	46
3.10:	Einfluss von GABA auf die Burstaktivität.....	47
3.11:	Spikefolgen für Muscimol nach 25 Tagen in vitro.....	49
3.12:	Einfluss von Muscimol auf die Spikerate.....	49
3.13:	Einfluss von Muscimol auf die Burstaktivität.....	50
3.14:	Spikefolgen für Bicucullin nach 24 Tagen in vitro.....	51
3.15:	Einfluss von Bicucullin auf die Burstaktivität.....	52
3.16:	Modifikation der Burstlänge durch Bicucullin.....	53
3.17:	Einfluss von Bicucullin auf die Spikerate.....	54
3.18:	Spikefolgen für Picrotoxinin nach 24 Tagen in vitro.....	55

3.19:	Einfluss von Picrotoxinin auf die Burstaktivität.....	56
3.20:	Einfluss von Picrotoxinin auf die Spikerate.....	57
3.21:	Dosis-Wirkungs-Beziehung für GABA und Bicuculline [1µM] + GABA, Picrotoxinin [1µM] + GABA.....	58
3.22:	Einfluss von Temazepam auf die Burstaktivität.....	60
3.23:	Dosis-Wirkungs-Beziehungen für das R- und S-Glucuronid des Temazepam.....	61
3.24:	Zellwachstum auf strukturierten Oberflächen.....	63
3.25:	Vergleich der Elektrodenbesiedelung durch Neuronen bei unstrukturierten und strukturierten Netzwerken auf Multielektrodenarrays.....	65
3.26:	Vergleich des Gliazellenmaßes bei unstrukturierten und strukturierten Netz- werken.....	67
3.27:	Vergleich der Synapsendichte bei strukturierten und unstrukturierten Netz- werken.....	68
3.28:	Vergleich des Neurofilamentanteils pro Neuron bei strukturierten und unstrukturierten Netzwerken.....	69
3.29:	Vergleich der Anzahl der aktiven Kanäle bei unstrukturierten und strukturierten Netzwerken auf Multielektrodenarrays nach 24 Tagen in vitro.....	71
3.30:	Spontane native Aktivität eines strukturierten Netzwerkes nach 24 Tagen in vitro	73
3.31:	Spikefolgen strukturierter Netzwerke für GABA nach 24 Tagen in vitro.....	74
3.32:	Einfluss von GABA auf die Burstaktivität strukturierter Netzwerke.....	75
3.33:	Einfluss von GABA auf die Spikerate strukturierter Netzwerke.....	76
3.34:	Spikefolgen strukturierter Netzwerke für Bicucullin nach 24 Tagen in vitro.....	77
3.35:	Einfluss von Bicucullin auf die Burstaktivität strukturierter Netzwerke.....	78
3.36:	Einfluss von Bicucullin auf die Spikerate strukturierter Netzwerke.....	79

## Tabellenverzeichnis

2.1:	Übersicht über die im Rahmen der pharmakologischen Versuche durchgeführten Messreihen.....	29
2.2:	Primäre Antikörper.....	35
2.3:	Sekundäre Antikörper.....	36

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

AMPA:	engl.: (RS)- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Ara-C:	Arabinosid-Cytosin
ATP:	Adenosintriphosphat
BIC:	Bicucullin
CACA:	engl.: cis-4-aminocrotonic acid
CAD:	engl: computer aided design
CAMs:	engl.: cell adhesion molecules
DAPI:	4',6-diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
DETA:	engl.: trimethoxysilylpropyl-diethylenetriamine
div:	engl.: days in vitro
DNase:	Desoxyribonuklease
EC <sub>50</sub> :	Dosis einer die Aktivität steigernden Substanz, bei ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird.
ECM:	engl.: extracellular matrix
EEG:	Elektroenzephalographie
EKG:	Elektrokardiographie
EMG:	Elektromyographie
EPSP:	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
et al.:	lat.: et alii, und andere
FEP:	engl.: fluorinated ethylene propylene
FET:	Feldeffekttransistor
GABA:	engl.: gamma-aminobutyric-acid
GFAP:	engl.: glial fibrillary acidic protein
G-Protein:	Guanyl-nucleotid-bindendes Protein
HBSS:	Hanks balanced salt solution
HEPES:	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IBI:	Interburstintervall
IC <sub>50</sub> :	Dosis einer die Aktivität mindernden Substanz, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird.
<i>in vitro</i> :	künstlich
<i>in vivo</i> :	im lebenden Organismus
IPSP:	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
ISI:	Interspikeintervall
kD:	Kilodalton
kHz:	Kilohertz

MBP:	Myelin-basisches-Protein
MAP:	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MEA:	Multielektrodenarray
$\mu$ CP	engl.: micro-contact-printing
SPAT:	engl.: signal processing and analysis tool
NMDA:	engl.: N-methyl-D-aspartatic acid
NSF:	engl.: N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
PDL:	Poly-D-Lysin
PDMS:	Polydimethylsiloxan
PIC:	Picrotoxinin
PBS:	engl.: phosphate buffered saline
PEG:	Polyethylenglykol
rpm:	engl.: revolutions per minute
SCSI:	engl.: small computer system interface
SD:	engl.: standard deviation
SNARE:	engl.: soluble NSF attachment receptor
TMPP:	Trimethylolpropanphosphat
TritonX-100:	Octyl-phenol-ethoxylat
Tween20:	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U:	engl.: unit (Enzymeinheit)
ZNS:	zentrales Nervensystem
$\alpha$ :	Alpha
$\beta$ :	Beta
$\gamma$ :	Gamma
$\delta$ :	Delta
$\epsilon$ :	Epsilon
$\rho$ :	Rho
$\theta$ :	Theta
$\pi$ :	Pi
g	Gramm
Hz	Hertz
s	Sekunde(n)
min	Minute(n)
h	Stunde(n)
l	Liter
m	milli-

$\mu$	mikro-
M	Molar
°C	Grad Celsius
$n_H$	Hill-Koeffizient

Abb.:	Abbildung
bzw.:	beziehungsweise
engl.:	englisch
evtl.:	eventuell
Kap.:	Kapitel
Tab.:	Tabelle

## Anglizismen

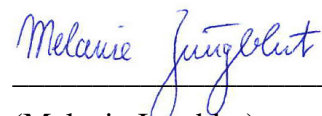
Begriffe, die dem Angelsächsischen entstammen, werden in der vorliegenden Arbeit auch in dieser ursprünglichen Form verwendet und hier in Kürze beschrieben.

Burst:	hochfrequente Folgen von Aktionspotenzialen
Inhibition:	Hemmung
Master:	Gussform
micro-contact-printing:	Mikrokontaktstempeln
pattern:	Muster
Raster-Plot:	Darstellung detektierter Spikes mehrerer Elektroden zum Zeitpunkt ihres Auftretens unter Vernachlässigung der Spikeform und Amplitude
Spike-Sorting:	Zuordnung der von einer Elektrode detektierten Spikes zu verschiedenen Neuronen
Spike:	extrazelluläres Abbild eines Aktionspotenzials
Spin-Coating:	Rotationsbeschichtung
Spine:	dornenförmige Ausstülpung der postsynaptischen Membran
random:	zufällig
Threshold:	Schwellenspannung
Timestamp:	Zeitmarke
Transducer:	Signalumwandler

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Mainz, im August 2006



---

(Melanie Jungblut)

*So eine Reise wird eigentlich nie fertig,  
man muss sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das Möglichste getan hat.*

Johann Wolfgang von Goethe