

Charakterisierung des Mikroelektroden - Arrays als Sensor für Tierversuchersatzsysteme

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Matthias Nissen, geb. am 18.01.1980 in Wuppertal

aus Velbert-Neviges

Eingereicht: 05.03.2016

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Jan Gimsa, Universität Rostock, Institut für Biologie
2. Gutachter/in: Prof. Dr. Rüdiger Kühling, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Physiologie

Datum der Verteidigung: 26.01.2024

Daß der Mensch das edelste Geschöpf sei, läßt sich auch schon daraus ablesen, daß ihm noch kein anderes Geschöpf widersprochen hat.

Georg Christoph Lichtenberg

Inhaltsverzeichnis

1	Verwendete Abkürzungen und Einheiten.....	3
1.1	Abkürzungsverzeichnis.....	3
1.2	Verzeichnis verwendeter Einheiten und Größen.....	6
2	Akademischer Lebenslauf.....	8
2.1	Stationen.....	8
2.2	Liste der eigenen Publikationen.....	9
3	Eigenständigkeitserklärung.....	10
4	Kurzzusammenfassungen.....	11
4.1	Kurzzusammenfassung, deutsch.....	11
4.2	Kurzzusammenfassung, englisch (Abstract).....	12
5	Einleitung.....	13
6	Material und Methoden: Allgemeiner Teil.....	15
6.1	Zellkultur.....	15
6.2	MEA Messungen.....	16
7	Charakterisierung von Sensoren auf Glaschips.....	17
7.1	Einleitung der Chipcharakterisierung.....	17
7.2	Material und Methoden Chipcharakterisierung.....	18
7.3	Ergebnisse der Chipcharakterisierung.....	20
7.4	Diskussion der Chipcharakterisierung.....	22
8	Pharmakologie der Valproinsäure.....	25
8.1	Einleitung Pharmakologie der Valproinsäure.....	25
8.2	Material und Methoden Pharmakologie der Valproinsäure.....	25
8.3	Ergebnisse Pharmakologie der Valproinsäure.....	26
8.4	Diskussion Pharmakologie der Valproinsäure.....	27
9	Quantitativer Nachweis des „Multi Drug Resistance“ Komplexes über ELISA.....	29
9.1	Einleitung ELISA.....	29
9.2	Material und Methoden ELISA.....	29
9.3	Ergebnisse ELISA.....	30
9.4	Diskussion ELISA.....	31
10	Simulation Biphasischer Kinetiken.....	32
10.1	Einleitung biphasische Kinetik.....	32
10.2	Material und Methoden Kinetik.....	32
10.3	Ergebnisse Kinetik.....	33
10.4	Diskussion Kinetik.....	35
11	Netzwerkstruktur.....	37
11.1	Einleitung Netzwerkstruktur.....	37
11.2	Material und Methoden der Netzwerkstruktur.....	37
11.3	Ergebnisse der Netzwerkstruktur.....	38
11.4	Diskussion der Netzwerkstruktur.....	41

12	Laserstimulation.....	43
12.1	Einleitung der Laserstimulation.....	43
12.2	Material und Methoden der Laserstimulation.....	44
12.2.1	Zellkultur und Aufzeichnung der neuronalen Aktivität.....	44
12.2.2	Versuchsaufbau Laserstimulation, Stimulationsparameter.....	45
12.2.3	Kalibrierung des Lasersensors und Durchführung der Stimulationsexperimente	47
12.2.4	Auswertung Laserstimulation.....	47
12.3	Ergebnisse der Laserstimulation.....	49
12.3.1	Visuell eindeutige Reaktionen auf den Laser.....	49
12.3.2	Quantifizierung der Laserstimulationen.....	53
12.4	Diskussion der Laserstimulation.....	56
13	Auswirkungen von hyperbarem Luftdruck auf neuronale Aktivität.....	58
13.1	Einleitung Luftdruck.....	58
13.2	Material und Methoden Luftdruck.....	58
13.3	Ergebnisse Luftdruck.....	59
13.4	Diskussion Luftdruck.....	59
14	Zusammenfassende Diskussion.....	61
15	Ausblick.....	64
16	Literaturverzeichnis.....	65
17	Danksagung.....	76
18	Anhang.....	77
A1.1	Programm für den Datenimport: „plexon_read“.....	77
A1.2	Programm zur Auswertung: „plexon_table_file“.....	79
A1.3	Programm zur Automatisierung: „opendata“.....	91
A2	Protokoll Proteinextraktion.....	93
A3	Protokoll „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA).....	95

1 Verwendete Abkürzungen und Einheiten

1.1 Abkürzungsverzeichnis

ADA-SCID	Adenosin Desaminase – Severe Combined Immunodeficiency (engl. Adenosin Desaminase – Schwere Kombinierte Immunschwäche)
ANOVA	Analysis of Variance (engl. Varianzanalyse)
ANOVA on Ranks	Analysis of Variance on Ranks (engl. Varianzanalyse auf Basis der Ränge)
AP	Aktionspotential
APF	Aktionspotentialfrequenz
ATP	Adenosin – Triphosphat
BPY	Biophysik
ChR2	Channelrhodopsin – 2 (engl. Kanal Rhodopsin – 2)
CNNS	Center for Network Neuroscience (Eigenname des Labors von Prof. Dr. Günther Gross an der Universität von Nord Texas, Texas USA)
DFG	Deutsche Forschungsgesellschaft
DISGH	Puck's DI salt solution with Glucose and Hepes (engl. D 1 Salzlösung mit Glukuse und Hepes nach Puck)
DMEM	Dulbeco's Minimal Essential Medium (engl. Minimalmedium nach Dulbeco)
DNASE	DNA Lysierendes Enzym
dsp	Digitaler Signalprozessor: Interner Baustein der verwendeten Verstärker, der die Aktivität an einer verbundenen MEA-Elektrode aufzeichnet.
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay (engl. Antikörper basiertes Nachweisverfahren mit enzymatischem Farbumschlag)
EZL	Extrazellulärlösung
FBN	Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (vomrals Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere)
GABA	Gamma Amino Buttersäure

GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GNC	Glasneurochip
GRK	Graduiertenkolleg
HD MEA	High Density Micro Electrode Array (engl. Mikroelektroden Array mit hoher Elektrodendichte)
hiPSC	human Induced Pluripotent Stem Cell (engl. humane induziert pluripotente Stammzellen)
HeNe	Helium – Neon Laser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hrp	horseradish peroxidase (engl. Meerrettich Peroxidase)
HSP ₇₀	Heat Shock Protein 70 kD (engl. Hitzeschock Protein 70 kD)
ITO	Indium Tin Oxide (engl. Indiumzinnoxid)
LALLF	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei in Mecklenburg-Vorpommern
LS	Lehrstuhl
MDR1	Multi Drug Resistance Protein 1 (engl. Für Multi Drogen- bzw. Wirkstoffresistenz Protein 1)
MEA	Mikroelektroden Array (auf Englisch: Micro Electrode Array)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMRI	Naval Medical Research Institute (engl. Eigenname)
PBS	Phosphate Buffered Saline (engl. mit Phosphorsäure gepufferte Saline)
PCA	Principle component analysis (engl. Hauptkomponentenanalyse)
PDL	Poly D – Lysin
Pt	Platin
dsp	Digital Signal Processor (engl. Digitaler Signalprozessor): Interne Bezeichnung für die bis zu 64 Kanäle der Plexon Verstärker
dsp _{xxxxy}	Schema für die Separation von AP-Signalformen in der Plexon Verstärker: Bis zu vier AP-Signalformen (a bis d) konnten an jedem dsp separiert werden. Abgespeichert wurden diese Separierungen als dsp001a bis dsp064d. Nicht separierte Signalformen konnten optional (i) gesammelt erfasst werden.
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical Substances (engl. Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe)

RPE65	Retinal Pigment Epithel-Spezifisches 65 kDa Protein
RT – PCR	Realtime Polymerase Chain Reaction (engl. Echtzeit Polymerase Kettenreaktion)
Stabw	Standardabweichung
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
UV	Ultraviolett
VPA	Valproic Acid (engl. Valproinsäure)
welisa	Analyse und Simulation elektrischer Wechselwirkungen zwischen Implantaten und Biosystemen: DFG Graduiertenkolleg 1505/1 und 1505/2

1.2 Verzeichnis verwendeter Einheiten und Größen

A	Area (engl. Fläche), gemessen in m^2 (Quadratmeter)
α	Temperaturkoeffizient, gemessen in $1/K$ (1/Kelvin)
bin	Zeitintervall, über das eine mittlere Frequenz berechnet wird (s)
c	Konzentrationen bzw. Dosis gelöster Stoffe, gemessen in mol/l, kurz M. ($1 \text{ mol} = 6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen).
ctrl	Control (englisch für Kontrolle, Einheit entspricht der jeweils zugehörigen Abszisse)
D	Atomaren Masse, gemessen in D (Dalton). $1 \text{ D} = 1,6601 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
e	Eulersche Zahl (ca. 2,72)
EC ₅₀	Halbmaximale, charakteristische Exzitatorische Dosis, gemessen in M
Epsilon:	Obergrenze für die Abweichungen zwischen einem Erwarteten und registriertem Signal, gemessen in ms
f	Frequenz, gemessen in Hz (Hertz)
fc	charakteristische Frequenz, gemessen in Hz
fe	Extremwert der APF, gemessen in Hz
fg	Grundlevel der APF, gemessen in Hz
hm	Hormese (Einheit entspricht der jeweils zugehörigen Abszisse)
hmb	Hormetischer Bereich, gemessen in M
hmg	grafisch abgelesener Hormesewert (Einheit entspricht der jeweils zugehörigen Abszisse)
hs	Hillslope (engl. Hangneigung) eines Abfall (einheitenloser Exponent)
hs'	Hillslope (engl. Hangneigung) eines Anstieg (einheitenloser Exponent)
IC ₅₀	charakteristische inhibitorische Konzentration, gemessen in M
k	Anzahl der Kontaktierungen eines Neurons zu Elektroden des MEAs
Leermessung	Messung ohne Probe bzw. Stimulation zur Kalibrierung eines Sensors (hier zum Beispiel ein MEA mit einem aktivem neuronalen Netzwerk, Einheit entspricht der jeweils zugehörigen Abszisse).
Max Delay	maximaler erwarteter Wert für die Signalübertragung zwischen zwei Elektroden, gemessen in ms

min	Minimum (Einheit entspricht der jeweils zugehörigen Ordinate)
MW	Mittelwert (Einheit entspricht der jeweils zugehörigen Ordinate)
N_{ges}	Gesamtzahl Neurone
N_K	erwartete Anzahl mehrfach kontaktierter Zellen
N_{MEA}	Neurone im Bereich des MEAs
P	Luftdruck, gemessen in bar
Osm	Konzentration der osmotisch aktiven Teilchen in Lösung: Osmolarität, gemessen in mOsm (Milliosmol pro Liter)
R	Widerstand, gemessen in Ω (Ohm)
σ	Spezifische Leitfähigkeit Sigma, gemessen in S/m (Siemens pro Meter)
S	Anzahl der verschiedenen AP-Signalformen, die über die PCA separiert wurden.
Standard Nu:	Anzahl der Übereinstimmungen im gegebenen Zeitfenster, die für einen Treffer notwendig sind
s	Strecken und Längen, gemessen in m (Meter)
T	Temperatur, gemessen in $^{\circ}\text{C}$ (Grad Celsius) oder K (Kelvin)
U	Spannung, gemessen in V (Volt)
W	Wahrscheinlichkeit für Kontaktierung zwischen einer Zelle und einer Elektrode
w	Wahrscheinlichkeit für Kontaktierung zwischen einer Zelle und einer Elektrode
w_k	Wahrscheinlichkeit für Kontaktierung zwischen einer Zelle und mehreren (k) Elektroden
Z	Impedanz, gemessen in Ω (Ohm)
Z_{ges}	Ausgesäte Zellen

2 Akademischer Lebenslauf

2.1 Stationen

07/1990 – 06/1999 Gymnasium Bayreuther Straße, Wuppertal,
Abschlussnote 1,9

10/2000 – 08/2010 Studium der „Technischen Biologie“ (Diplom) an der
Universität Stuttgart, Abschlussnote 1,7

11/2009 – 05/2011 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Zoologie des
Biologischen Instituts der Universität Stuttgart.

10/2011 – 04/2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Biophysik
der Universität Rostock, davon ca. 6 Monate Auslandsaufenthalt am Center for
Network Neuroscience (CNNS) in den USA (Denton, TX). Die ersten 3 Jahre davon
als Stipendiat des DFG GRK 1505 welisa, danach als wissenschaftliche Hilfskraft.

2.2 Liste der eigenen Publikationen

Nissen, M.; Buehler, S. M.; Bonk, S. M.; Stubbe, M.; Baumann, W.; Gimsa, J. (2012): „Sensors for Glass Cell-Culture Chips (GC3)“. Stett, Alfred; Zeck, Günther (Hrsg.) *Conference Proceedings of the 8th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays July 10 - July 13, 2012, Reutlingen, Germany*. Reutlingen: NMI Natural and Medical Sciences Institute at the University of Tuebingen, S. 290. — ISBN: 13 978-3-938345-08-5 (Posterpräsentation)

Nissen, M.; Buehler, S. M.; Stubbe, M.; Baumann, W.; Gimsa, J. (2014): „Biphasic Response of Neuronal Networks to Sodium Valproic Acid (NaVPA)“. Stett, Alfred; Zeck, Günther (Hrsg.) *Conference Proceedings of the 9th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays July 01 - July 04, 2014, Reutlingen, Germany*. Reutlingen: NMI Natural and Medical Sciences Institute at the University of Tuebingen, S. 126. — ISBN: 2199-1596 (Posterpräsentation)

Nissen, M.; Shcherbakov, D.; Heyer, A.; Brümmer, F.; Schill, R. O. (2015): „Behaviour of the plathelminth *Syngaster roscoffensis* under different light conditions and the consequences for the symbiotic algae *Tetraselmis convolutae*“. *Journal of Experimental Biology*. 218 (11), S. 1693–1698, DOI: 10.1242/jeb.110429.

Stubbe, M.; Nissen, M.; Schroeder, J.; Gimsa, J. (2015): „The effect of hyperbaric air on the electric activity of neuronal in vitro networks“. *Biosensors and Bioelectronics*. 73 (1), S. 153–159, DOI: 10.1016/j.bios.2015.05.052.

Nissen, M.; Buehler, S. M.; Stubbe, M.; Gimsa, J. (2016): „Neuronal in vitro activity is more sensitive to valproate than intracellular ATP: Considerations on conversion problems of IC50 in vitro data for animal replacement“. *Biosystems*. 144 , S. 35–45, DOI: 10.1016/j.biosystems.2016.04.009.

Buehler, S.; Stubbe, M.; Bonk, S.; Nissen, M.; Titipornpun, K.; Klinkenberg, E.-D.; Baumann, W.; Gimsa, J. (2016): „Cell Monitoring and Manipulation Systems (CMMs) based on Glass Cell-Culture Chips (GC3s)“. *Micromachines*. 7 (7), S. 106, DOI: 10.3390/mi7070106.

3 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig durchgeführt und abgefasst habe. Quellen, Literatur und Hilfsmittel, die von mir genutzt wurden, sowie Beiträge von Kooperationspartnern sind als solche gekennzeichnet.

4 Kurzzusammenfassungen

4.1 Kurzzusammenfassung, deutsch

Das Mikroelektroden Array (MEA) ist ein etablierter Sensor im Bereich der Neurologie, der im Bereich der Tierversuchersatzsysteme von zunehmender Bedeutung ist. In dieser Arbeit wurden Netzwerke aus dissoziierten, primären, embryonalen Kortexzellen der Maus auf Glaschips mit MEA angezogen. Die spontane elektrische Aktivität dieser Netzwerke wurde über kommerziell erhältliche Verstärker der Firma Plexon visualisiert und aufgezeichnet. Diese Daten wurden zur Charakterisierung des Sensors an sich, der Strukturanalyse der Netzwerke, verschiedener pharmakologischer Untersuchungen und für Stimulationsexperimente mit einem UV – Kurzpuls laser verwendet.

In einer vergleichenden Messung verschiedener MEA – Geometrien mit Elektrodendurchmessern von 15 bis 35 μm und Gitterabständen von 100 und 170 μm zeigte sich, dass die größte Signalamplitude mit 167 \pm 39 μV bei einem Durchmesser von 25 μm erreicht wurde, der Padabstand jedoch sowohl bei der gemessenen Spannung, als auch bei der Anzahl der registrierten Signale keinen signifikanten Einfluss hatte. Mit einer Vergleichenden Analyse von der gemessenen spontanen elektrische Aktivität mit einer Kreuzkorrelation und den „Nachbarschaftsalgorithmus“ konnte gezeigt werden, dass die Vernetzung der Neurone eine so starke Korrelation der Aktivitäten der verschiedenen Neurone bewirkt, das nicht immer klar unterschieden werden kann, ob Signale von einem oder mehren Neuronen abgeleitet wurden.

Das Natriumsalz der Valproinsäure, das als Antiepileptikum medizinische Anwendung findet, diente als Testsubstanz, mit der die Reproduzierbarkeit der mit dem MEA – Sensor erzielten Daten gezeigt wurde. Valproinsäure zeigt einen biphasischen Effekt auf die gemessene neuronale Aktivität, der auf eine Überkompensation der Zellen zurückzuführen ist, wie durch Modellierungen gezeigt werden konnte. Über immunologische Messungen konnte die erhöhte Präsenz eines zellulären Entgiftungssystems (MDR1) als eine Gegenreaktion identifiziert werden. Mit Vergleichsmessungen konnte zudem der dominante Wirkmechanismus der Valproinsäure gezeigt werden, der über Hemmung von Enzymen wirkt, die den seinerseits hemmenden Neurotransmitter GABA abbauen. Durch die Integration des MEA in eine Druckkammer konnte ein Tierversuchersatzsystem für die Untersuchung der Taucherkrankheit entwickelt werden, wo bereits erste Ergebnisse auf eine große Bedeutung der Gliazellen hinweisen. Zellkulturen mit reduzierter Anzahl von Gliazellen erwiesen sich als vergleichsweise weniger sensitiv als Zellkulturen mit höherer Gliazellzahl.

In Kooperation mit dem „Centre for Network Neuroscience“ (CNNS) in Denton, Texas USA konnte gezeigt werden, dass sich ein richtig dosierter Kurzpuls UV – Laser eignet um einzelne Zellen eines Netzwerkes gezielt zu stimulieren, was wiederum eine signifikante Antwort des Netzwerkes hervorrufen kann.

4.2 Kurzzusammenfassung, englisch (Abstract)

The Micro Electrode Array (MEA) is an established sensor in neurology, which has a growing importance in the field of animal replacing experiments. Primary embryonic cells of mice cortices were cultured on the MEA. These cells formed spontaneously, electrically active networks. A commercially available amplifier (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) was used for visualization and recording of the neuronal activity. The recorded activity was used for the characterization of the sensor itself and as a biosensor for various experiments, such as the analysis of the network's structure, different pharmacological experiments, and stimulation experiments using UV short pulse laser.

Different MEA structures with electrode pad diameters from 15 to 35 μm and lattice spacing of 100 and 170 μm were tested. The highest signal voltage of 167 \pm 39 μV was recorded at 25 μm pad diameter. The lattice spacing did not have a significant influence on the recorded signal voltage. The number of registered signals per network was not significantly influenced by neither by the pad diameters, nor the lattice spacing. The network topology was investigated using cross correlation, statistical investigations, and a "neighbourhoods finding" algorithm. A comparison of the three methods showed, that it is not always possible to determine whether recorded signals at different electrodes are from different neurons, or neurons that have multiple connections to several MEA electrodes.

The sodium salt of valproic acid is a common treatment for epilepsy. Here, we did use it as a test substance to check the reproducibility of the MEA data. Valproic acid did have a biphasic effect on the recorded neuronal activity. Mathematical modelling suggests that this biphasic behavior may be caused by an overcompensation of the valproic acid's inhibitory effect.

The increase of a cellular detoxification system (MDR1) could be identified as a counter reaction to exposure to valproic acid using an enzyme linked immuno assay (Elisa). Valproic acid is known to interact with the metabolism of the inhibitory neurotransmitter GABA in several ways. Here it is suggested that the degrading pathway of GABA is inhibited, leading to a higher GABA concentration and therefore ultimately reduces the neuronal activity. By integrating the MEA into a pressure chamber, an animal replacing experiment for investigating the diver's paralysis could be established. First results showed that neuronal networks cultured with a reduced number of glia cells were more sensitive to pressure changes. This result may be of importance for understanding the underlying mechanism of diver's paralysis in future.

In cooperation with the "Center for Network Neuroscience" in Denton, Texas USA, the reaction of neuronal networks on stimulations using a short pulse UV-Laser was quantified. The laser allows for changing the network activity significantly.

5 Einleitung

Auf europäischer Ebene gibt es zur Zeit zwei sich widersprechende Tendenzen: Zum einen soll die Sicherheit für in den Umlauf gebrachte Substanzen erhöht werden, wie dies z. B. in der Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe, (englisch: REACH) festgelegt wurde (Das europäische Parlament, Rat der europäischen Union, 2012). Andererseits gibt es Bestrebungen, die Anzahl der durchgeführten Tierversuche zu reduzieren. (Der Rat der Europäischen Gemeinschaften, 1986). Diese sich widersprechenden Bestrebungen können durch den forcierten Einsatz von Tierversuchersatzsystemen zusammengebracht werden, wie es beispielsweise bei Sicherheitsüberprüfungen im Bereich der Impfstoffherstellung routinemäßig durchgeführt wird (Kulpa-Eddy u. a., 2011).

Für die weitergehende Automatisierung wurden miniaturisierte „Lab on Chip“ Systeme entwickelt, die über entsprechende Sensorik wie pH, Sauerstoff und Zelladhäsion auf elektronischer Basis verfügen (Baumann u. a., 1999, 2002; Brischwein u. a., 2003; Buehler u. a., 2011; Ehret u. a., 1997; Fuhr u. a., 1997; Ilchmann u. a., 2006; Walther u. a., 2014; Wolf u. a., 1998, 2006). Etablierte Systeme werden hierbei meist auf Basis von Siliziumchips hergestellt, neuere Entwicklungen ermöglichen aber auch die Messung der extrazellulären Ansäuerung, sowie die Ermittlung der von Zellproliferation durch Impedanz auf Glaschips (Bonk u. a., 2015b; Ilchmann u. a., 2006; Nissen u. a., 2012). Ein solches System für den Bereich der Neurologie ist das Micro Electrode Array (MEA), das seit ca. 40 Jahren extrazelluläre Ableitungen von einzelnen Neuronen oder neuronalen Netzwerken ermöglicht (Gross u. a., 1977, 1985, 1992, 1995; Johnstone u. a., 2010; Parenti u. a., 2013; Thomas Jr. u. a., 1972). Dies bewirkte eine drastische Reduktion der benötigten Tiere, da die hier verwendeten primären embryonalen Neurone in großer Zahl gewonnen werden können: Zirka $20 \cdot 10^6$ Zellen können aus der Präparation einer trächtigen Maus gewonnen werden, für die Aussaat eines Neurochips reichten $10 \cdot 10^3$ bis $30 \cdot 10^3$ Zellen, womit theoretisch bis zu 200 MEA – Chips für Experimente zur Verfügung stehen. Eine weitere Reduktion der benötigten Tiere könnte durch die Verwendung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (englisch: hiPSC) erreicht werden (Heikkilä u. a., 2009; Toivonen u. a., 2013), wobei hier die notwendige Reproduzierbarkeit der Ausdifferenzierung nicht immer gegeben ist (Dick u. a., 2010; Knollmann, 2013).

Für die weitere Entwicklung des MEA geht der derzeitige Trend hin zu immer kleineren und damit dichteren Elektrodenanordnungen mit über 50000 Elektroden pro Quadratmillimeter (Bakkum u. a., 2013; Santoro u. a., 2014; Wrobel u. a., 2007), die jedoch technisch aufwändigere aktive Verstärkerelektronik direkt auf den MEA – Chips erforderlich macht. Die am Lehrstuhl für Biophysik (LS BPY) in Rostock und am „Center for Network Neuroscience“ (CNNS) in Denton, Texas, USA verwendeten Systeme hingegen besitzen eine klassische Elektrodenstruktur mit Elektrodendurchmessern von 15 bis 35 μm , Gitterabständen von bis zu 170 μm und

52 bis 64 Elektroden auf einer Fläche von ca. einem Quadratmillimeter. Sie kommen ohne aktive Verstärkung unmittelbar auf dem Chip aus und werden daher auch als „passiv“ bezeichnet. Neben dem Kostenfaktor sind sie im Durchlicht mikroskopierbar, da die Strukturen auf Glas aufgebracht werden. Die MEA – Chips vom LS BPY besitzen Elektrodenstrukturen aus Platin und eine Isolierung aus Siliziumnitrid (Koester u. a., 2010). Für eine weiterhin verbesserte Mikroskopierbarkeit verwendet das CNNS MEA – Chips mit Leiterbahnen aus transparentem Indiumzinnoxid (englisch „indium tin oxide“, ITO), kombiniert mit vergoldeten Elektroden für eine geringe Impedanz der Elektroden (Gross u. a., 1985). Für die Isolierung der Leiterbahnen wird vom CNNS ein Polymer aus Methyl Tri Methoxy Silan ($\text{CH}_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten primären neuronalen Zellen bilden nach ca. 3 Wochen in Kultur spontan aktive Netzwerke, deren Aktivität über diese Elektroden gemessen wird (Gross u. a., 1977; Thomas Jr. u. a., 1972). Verschiedene Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Arbeit behandelt:

Im ersten Schritt wurden bereits vorhandene Messdaten des Lehrstuhls verwendet, um die optimale Elektrodenstruktur für die verwendeten passiven MEA zu ermitteln. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der bekannten Referenzsubstanz Valproinsäure (VPA) auf die kultivierten Neurone untersucht und mit Literaturdaten (Johannessen, 2000) verglichen, um die Reproduzierbarkeit der mit dem MEA gemessenen Daten zu zeigen. Ergänzend zu den Messungen mit dem MEA wurde die intrazelluläre ATP Konzentration gemessen und als Konsequenz aus diesen Ergebnissen die Reaktion der Zellen gegen VPA mit dem „Multi Drug Resistance Proteine 1“ - System (MDR1) untersucht. Des Weiteren wurde über Simulationen die potentiell biphasische Reaktion der Zellen und des Organismus auf VPA (Biggs u. a., 1992) untersucht. Beim Thema Netzwerkstruktur wurde mit verschiedenen mathematischen Algorithmen die Vernetzung der Zellen verschiedener Neuronaler Netzwerke untersucht (Kooperation mit Sebastian Hanisch innerhalb des Graduiertenkollegs welisa 1505/2).

Als Anwendungen des MEAs im Bereich der Tierversuchersatzsysteme in Hinblick auf die tiefe Hirnstimulation (Benabid u. a., 1993, 1998; Gimsa u. a., 2005) wurde die Auswirkung der Stimulation einzelner Neurone auf ihr jeweiliges Netzwerk mit einem UV - Laser untersucht (Kooperation mit dem CNNS, Denton, TX, USA). Erstmals konnten in Kooperation mit Dr. Marco Stubbe, LS BPY der Uni Rostock, das MEA mit einer miniaturisierten Druckkammer kombiniert werden. Mit diesem System wurde der Einfluss von hohen Luftdrücken auf die Aktivität der neuronalen Netzwerke untersucht, um ein Tierversuchersatzmodell für Krankheiten beim Tauchen zu erhalten (Stubbe u. a., 2015).

6 Material und Methoden: Allgemeiner Teil

6.1 Zellkultur

Die verwendeten Gasneurochips (GNC) mit einem 52 Elektroden MEA wurden für die Registrierung der neuronalen Aktivität verwendet (Koester u. a., 2010). Neue und gebrauchte Chips wurden mit einer 1%igen Tergazym® Lösung (Alcoconox, White Plains, NY, USA) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Oberflächen wurden anschließend mit einem Wattestäbchen gereinigt und mit demineralisiertem Wasser über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Chips in unvergälltem Alkohol gereinigt und danach autoklaviert.

Für die Detektion der intrazellulären ATP Konzentration wurden Zellen in 24 Well Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) verwendet. Um gleiche Bedingungen zu erreichen, wurden Deckgläser mit einem Durchmesser von 10 mm verwendet, die ebenfalls mit nicht vergälltem Alkohol gereinigt wurden und anschließend autoklaviert wurden, bevor je ein Deckglas in je ein Well einer 24 Well Platte überführt wurde.

40 µl Poly D Lysin (PDL, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Selze, Deutschland, gebrauchsfertige Verdünnung) wurden ohne Trogberührung auf das Elektrodenfeld bzw. in die Mitte des Deckgläschens gelegt und eine Stunde unter der Sterilbank inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen dreimal mit sterilem, entionisiertem Wasser gereinigt und über Nacht in der Sterilbank belassen.

50 µl Laminin (Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Selze, Deutschland) wurden in 1,5 ml „Dulbecco's minimal essential medium“ (DMEM Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gegeben und 40 µl des Laminin – Medium – Gemischs auf das Elektrodenfeld ohne Trogberührung des Tropfens geben. Die Inkubationszeit lag bei mindestens 30 min bei 37 ° C, anschließend wurde der Tropfen mit der Pipette wieder abgesaugt.

Eine tragende „NMRI“ - Maus (Naval Medical Research Institute, bezogen über das Tierhaus der Universität Rostock) wurde am Tag 14 der Trächtigkeit über zervikale Dislokation getötet. Die Embryonen wurden in einen Präparationspuffer überführt und über Dekapitation getötet. Dieses Vorgehen wurde von der Tierversuchbeauftragten der Universität Rostock und dem Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) Mecklenburg-Vorpommern als meldepflichtige Tiertötung zur anschließenden Organentnahme genehmigt (Aktenzeichen 7221.3- und vorherige). Das LALLF wurde über die eingesetzten Tiere vorschriftsmäßig vom Lehrstuhl für Biophysik informiert. Der oben genannte Puffer, in der Literatur als „DISGH“ oder „D1SGH“ zu finden, besitzt eine Osmolarität von 320 mOsm, einen pH von 7.3 und besteht aus 10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), 135 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 0.2 mM KH₂PO₄, 22.6 mM Saccharose und 16.5 mM Glucose (Ransom u. a., 1977).

Anschließend wurde die zu untersuchende Gehirnregion des Cortexes präpariert und das Gewebe enzymatisch verdaut. Hierfür wurden 10 units/ml Papain und 1,3 units/ml Desoxyribonuklease 1 (DNase) (beide von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in DISGH gegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. 3 ml der Lösung reichten für 10 Cortices.

Die Cortices wurden anschließend mit einer 1 ml Pipette trituriert (mehrfach pipettiert) und zu gleichen Teilen in zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die enzymatische Verdauung wurde mit je 3 ml Präparationsmedium unterbrochen (DMEM mit je 10 % Pferde- und Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100 g/ml Streptomycin und 100 mM L- Glutamin, erworben von Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und die Zellsuspension anschließend für 4 Minuten bei 124 g bzw. 800 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je 3 ml Präparationsmedium resuspendiert. Nach fünf Minuten Wartezeit um größere Fragmente absetzen zu lassen wurden die Zellsuspensionen in ein 50 ml Gefäß zusammengeführt und eine Zellzahl von etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen / ml eingestellt und die gewünschte Zellzahl (ca. 150000 bis 200000 Zellen für einen GNC bzw. 80000 auf ein Deckgläschen) ausgesät. Nach 2 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 10 % CO₂ wurden die Tröge des Glasneurochips aufgefüllt (Gesamtvolumen ca. 270 µl) und die Wells auf 400 µl Mediumvolumen aufgefüllt.

Alle 2 Tage wurde jeweils die Hälfte des Mediums gegen Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % Pferdeserum, 100 U/ml Penicillin, 100 g/ml Streptomycin und 100 mM L- Glutamin, erworben von Biochrom AG, Berlin, Deutschland) getauscht. Das Weglassen des Kälberserums diente hierbei der Reduktion von Zellteilungen, vor allen Dingen von in der Kultur enthaltenen Gliazellen.

In drei Wochen bildeten sich elektrisch aktive neuronale Netzwerke, deren Aktivität mindestens sechs Wochen stabil blieb.

6.2 MEA Messungen

Für die Messungen wurde eine Extrazellulärlösung (EZL, pH 7.3, Osmolarität 340 mOsm: 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, 0.01 mM Glyzin, 10 mM Glukose und 5 mM HEPES, Quelle: Dr. Oliver Klink, LS BPY, persönliche Kommunikation) verwendet. Die elektrische Aktivität der Neurone wurde über das 52 Elektroden MEA mit einem Vorverstärker (Koester u. a., 2010) und einem 64-Kanal Verstärker (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) digitalisiert und mit der zugehörigen Software „MEA-Sort-Client“ aufgezeichnet. Jede Elektrode wurde an jeweils einen Kanal des Verstärkers angeschlossen, die Plexon-Intern als Digital Signal Processor (dsp) bezeichnet wurden. Die an einem dsp registrierten Aktionspotentiale (AP) konnten anhand ihrer Signalformen (S) über eine „Principle component analysis“ (PCA) oder manuell mit „Triggerboxen“ separiert werden. Die unterschiedlichen AP-Signalformen stammten vermutlich von verschiedenen Zellen (Thomas Jr. u. a., 1972). (Absatz bearbeitet)

7 Charakterisierung von Sensoren auf Glaschips

7.1 Einleitung der Chipcharakterisierung

Zur Vorbereitung der eigentlichen Arbeit mit dem GNC stand die Charakterisierung und damit verbunden die Weiterentwicklung des Systems im Vordergrund. Der GNC Stand 2010 (Abbildung 1) verfügt über 4 verschiedene Strukturen (Koester u. a., 2010): Zentraler Bestandteil ist das „Micro – Elektroden – Array (MEA, Abbildung 1 A) in 8 verschiedenen Dimensionierungen mit 4 verschiedenen Durchmessern (15, 20, 25 und 35 μm) und 2 verschiedenen Pad – Abständen (100 und 170 μm). Masseelektroden (Abbildung 1 B), eine interdigitierende Elektrodenstruktur (IDES, Abbildung 1 C) und ein Temperatursensor (Abbildung 1 D) komplettieren das System.

Insbesondere der Einfluss der Geometrie der hier verwendeten MEA – Elektroden auf die gemessene Signalstärke ist nach unserem Wissen noch nicht systematisch im Versuch untersucht worden, wobei jedoch auf theoretische Abhandlungen aufgebaut werden kann (Joye u. a., 2009; Nick u. a., 2015). Die Charakterisierung des IDES wurde bereits von Dr. Stubbe in seiner Dissertation durchgeführt (Stubbe, 2012).

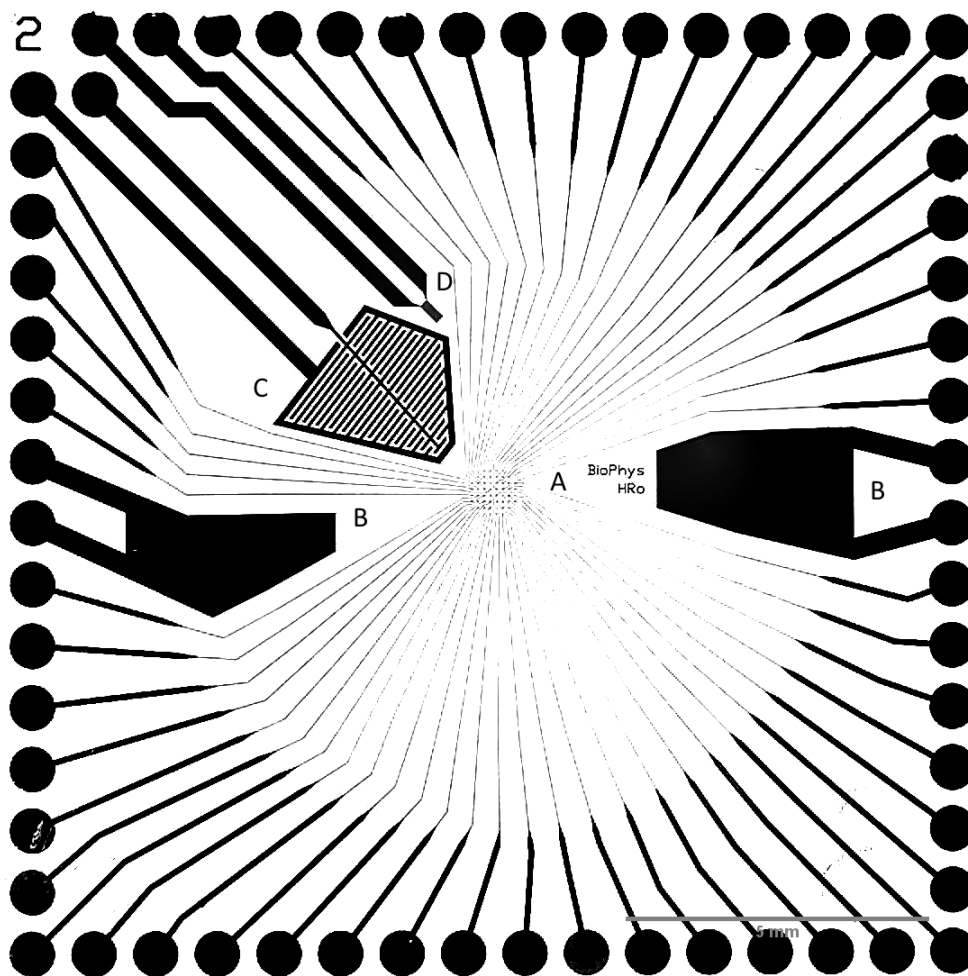


Abbildung 1: Vorhandenes System (Koester u.a., 2010, Reimer u. a., 2012). Mit MEA (A), Masseelektroden (B), IDES (C) und Temperatursensor (D)

7.2 Material und Methoden Chipcharakterisierung

Die Auswertung bereits vorhandener neuronaler Messdaten (Messungen vom LS BPY, u. a. von Dr. Tom Reimer) dienten zur Optimierung der derzeit verwendeten Glasneurochips (Koester u. a., 2010; Reimer u. a., 2012). Ziel war hierbei aus den vorhandenen acht Layouts die optimale Konfiguration auszuwählen.

Ausgewertet wurde zum einen die gemessene Amplitude von der Spitze des Minimums zur Spitze des Maximums der Signale (mV), zum anderen wurde die Anzahl der registrierten Kanäle ausgezählt. Zur Charakterisierung der physikalischen Elektrodeneigenschaften wurde die Impedanz der Elektrodenpads gemessen. Hierfür wurde das Impedanzspektrum mit einem HP 4149A Impedance Gain-Phase Analyzer (Hewlett-Packard Company, Wilmington, Delaware, USA) im Bereich von 100 Hz bis 40000 kHz, also dem vollen Spektrum des Messgerätes, zwischen einem Pad am Rand des MEAs und beiden Masseelektroden des Chips gemessen. Als Medium wurde der auch für die Zellmessungen verwendete EZL mit einer spezifischen Leitfähigkeit von 13,38 mS/cm (gemessen mit inoLab Cond Level 1 von WTW GmbH & Co. KG, Weilheim, Germany) genutzt. Nach Betrachtung der Ortskurven wurde für die Auswertung der Betrag der Impedanz bei 1 kHz gewählt (Gross u. a., 1985). Für die Impedanzmessungen wurden je 2 neue Chips für jede Kombination aus Durchmesser und Abstand verwendet. Die Chips wurden entsprechend dem Protokoll (Abschnitt 6.1) einmal gereinigt und autoklaviert. Gebrauchte Chips mit je ca. 20 Nutzungsdurchläufen wurden ebenfalls gereinigt und die Impedanz gemessen. Zur Kalibrierung wurden alle Kontakte des Chiphalters gegen Masse kurzgeschlossen.

Für die Auswertung der Impedanzmessungen an neuen Chips wurde die gemessene Impedanz gegen den Durchmesser der Elektrodenpads aufgetragen (Abbildung 4 E). An die Daten wurden eine inversen quadratische Gleichung angepasst, wobei die Impedanz (Z) sich aus einem Grundlevel (Z_0), dem Radius (r) und zwei abhängigen Faktoren a und b zusammensetzt:

$$Z = Z_0 + a/r + b/r^2 \quad (1)$$

Vom Modell her entspricht dies 3 parallel geschalteten Kapazitäten: Z_0 entspricht einem unveränderlichen Teil des Versuchsaufbaus wie Zuleitungen, Platinen und Leiterbahnen auf dem Chip, a/r einer invers linearen Abhängigkeit, also der Verkürzung der Leiterbahnen durch ein größeres Elektrodenbad und b/r^2 der invers quadratischen Abhängigkeit, ist also proportional zu dem Flächeninhalt des Pads, siehe auch Ersatzschaltbild in Abbildung 2.

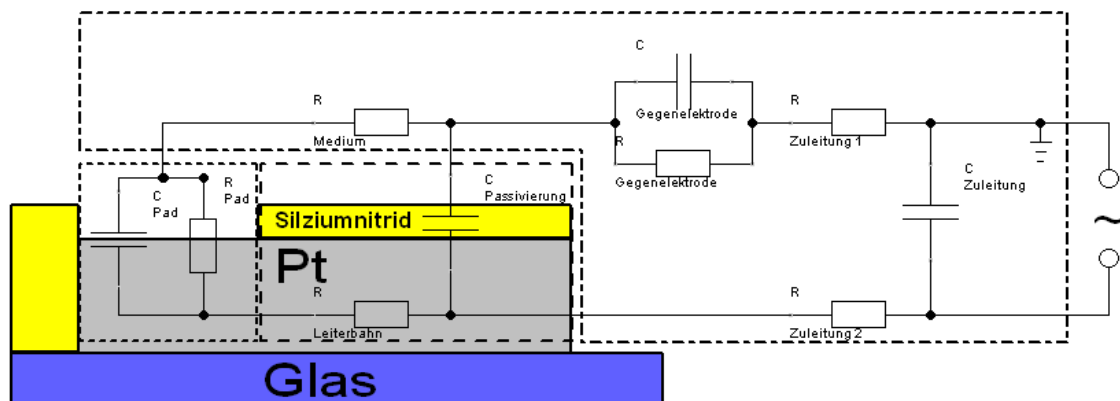


Abbildung 2: Ersatzschaltbild für eine Elektrode des MEAs während der Impedanzmessung. Auf dem Glasträger (blau hinterlegt) bilden die Platinstrukturen (Pt, grau hinterlegt) und Siliziumnitrid (gelb hinterlegt) die Sensorstrukturen. Die Leiterbahn wird vom Siliziumnitrid passiviert (lang gestrichelte Linie), wobei die Elektrode selber jedoch nicht passiviert ist (kurz gestrichelte Linie). Die Elektrode wird durch einen Widerstand und einen Kondensator (RC – Paar mit der Kennung „Pad“) im Ersatzschaltbild dargestellt. Die Impedanz des Pads ist umgekehrt proportional zum Radius, entsprechend wird sie in Gleichung 1 durch b/r^2 repräsentiert. Die Länge der Leiterbahn ist bei einem größeren Paddurchmesser etwas kürzer, entsprechend verringern sich der Widerstand der Leiterbahn ($R_{\text{Leiterbahn}}$) und die Kapazität der Passivierung ($C_{\text{Passivierung}}$). In Gleichung 1 wird diese Änderung durch den Term a/r repräsentiert. Der Widerstand des Mediums (R_{Medium}), Kapazität und Widerstand der Gegenelektrode ($C_{\text{Gegenelektrode}}$ und $R_{\text{Gegenelektrode}}$), die Widerstände der beiden Zuleitungen ($R_{\text{Zuleitung 1}}$ und $R_{\text{Zuleitung 2}}$), die Kapazität der Zuleitungen ($C_{\text{Zuleitung}}$), alles markiert mit einer abwechselnd kurz / lang gestrichelte Linie, sowie der in der Messreihe konstante Teil der Leiterbahnen werden in der Messreihe als von r unabhängig angesehen und in Gleichung 1 durch Z_0 repräsentiert. Grafik angelehnt an Nick u. a., 2015, verändert.

Der auf dem Chip vorhandene Temperatursensor wurde mit einem Omega PT-104A (Omega Engineering, Stamford, Connecticut, USA) und einem PT 1000 als Referenzsensor getestet. Etwa 250 μl Wasser wurden für die Messungen in den Trog eingebracht. Für die Messung der Temperaturabhängigkeit wurde der Chip auf 40 °C aufgeheizt bevor die Heizung abgeschaltet wurde. Die Sensordaten wurden alle 5 Sekunden registriert. Aufgetragen wurde jeweils die Temperatur gegen den gemessenen Widerstand. Dem Widerstand R des eingebauten Temperatursensors wurde eine lineare Funktion mit Temperatur T als unabhängige Variable, der Temperatur bei 20 °C ($R_{20^\circ\text{C}}$) und dem Temperaturkoeffizienten α angepasst, siehe Gleichung 2.

$$R = R_{20^\circ\text{C}} \cdot (1 + \alpha(T - 20^\circ\text{C})) \quad (2)$$

7.3 Ergebnisse der Chipcharakterisierung

Die Messungen der Impedanz an neuen und alten Chips zeigten ein überwiegend kapazitives Verhalten, das heißt, die Imaginärteile liegen im negativen Bereich, während die Realteile im positiven Bereich sind (Abbildung 3). Der negative Imaginärteil in Kombination mit einem positiven Realteil deutet auf ein überwiegend kapazitiv gekoppeltes System hin (Frohne u. a., 2011: Kap. 5.3.5).

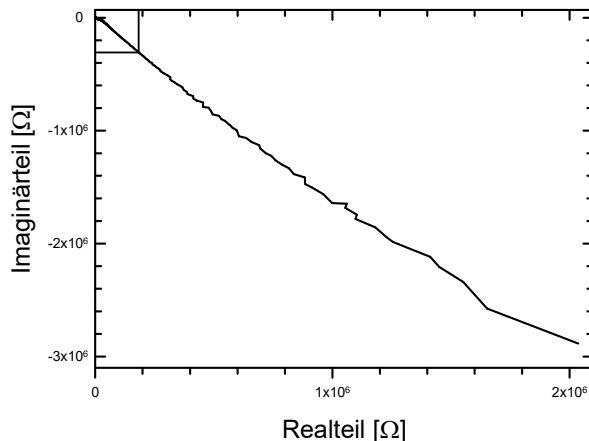


Abbildung 3: Beispiel einer Ortskurve für einen Chip mit 100 μm Padabstand und 25 μm Paddurchmesser. Real- und Imaginärteil bei 1 kHz sind mit geraden Linien markiert.

Für die Ermittlung der optimalen MEA – Geometrie wurden insgesamt 40 Messungen für die Analyse der gemessenen Signalstärke (Spannung Spitze zu Spitze in mV Abbildung 4 A u. B) ausgewertet. Der Durchmesser der Elektrodenpads hatte einen signifikanten Einfluss auf die gemessene Spannung der Signale, insbesondere zwischen 25 μm und 15 μm Elektrodendurchmesser ist der Unterschied signifikant (Abbildung 4 A).

Der Gitterabstand zwischen den Elektroden hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Signalstärke (Abbildung 4 B). Die Signalanzahl wurde weder durch den Durchmesser der Elektrodenpads, noch von dem Gitterabstand der Elektroden beeinflusst (Abbildung 4 C und D).

Für die Anpassung der invers quadratischen Gleichung (1) wurden $Z_0 = 670560 \Omega$, $a = -32592371 \Omega \cdot \mu\text{m}$ und $b = 530702210 \Omega \cdot \mu\text{m}^2$ ermittelt. Gebrauchte Chips wurden einzeln erfasst (Abbildung 4 F).

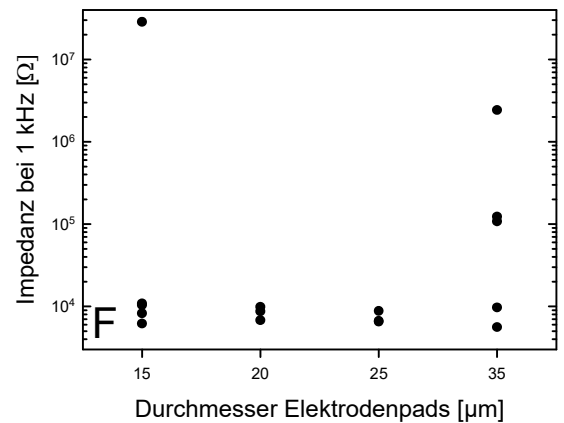
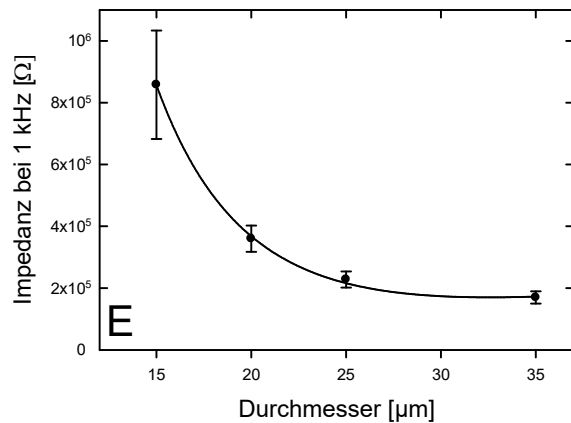
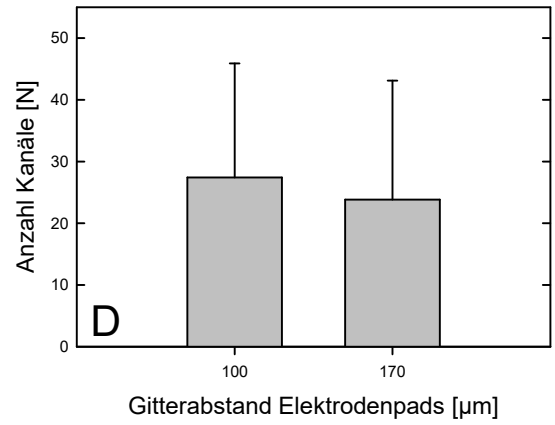
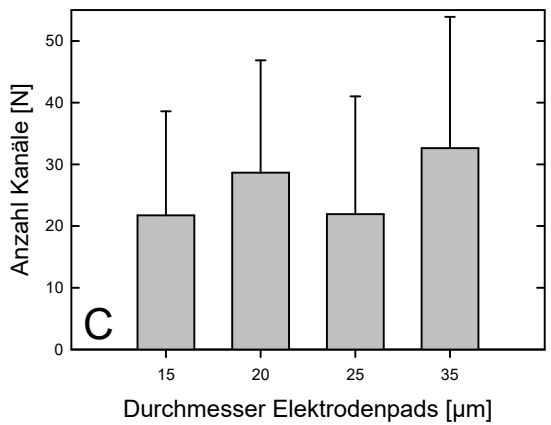
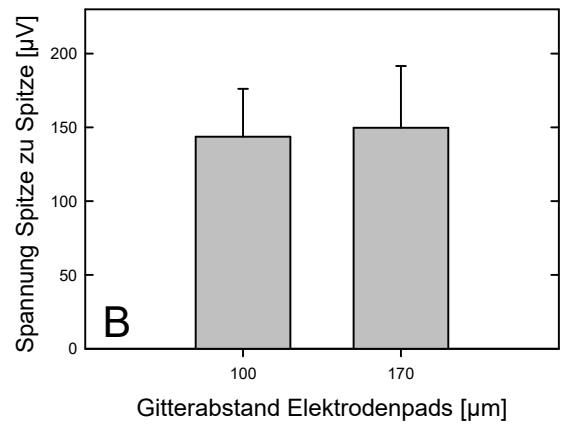
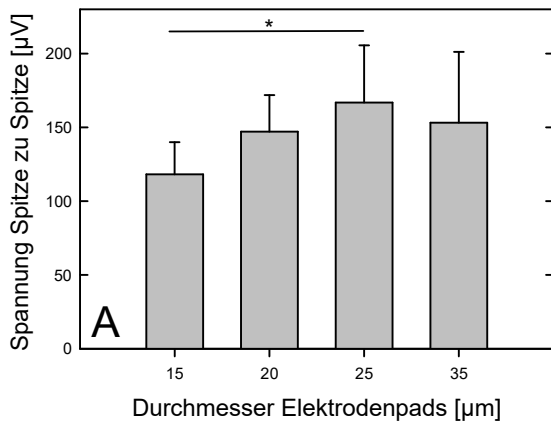


Abbildung 4: Charakterisierung der MEA auf den Glasneurochips: Durchschnittliche Signalspannung in Abhängigkeit von dem Durchmesser der Elektrodenpads (A) und von dem Gitterabstand der Elektrodenpads (B), durchschnittliche Anzahl der Kanäle pro Chip in Abhängigkeit von dem Durchmesser der Elektrodenpads (C) und Gitterabstand der Elektrodenpads (D) sowie Impedanz bei 1 kHz gemessen für ein Pad des MEAs pro Chip in Abhängigkeit vom Durchmesser der Elektrodenpads für neue (E) und ca. 3 Jahre alte Chips (F). Sterne markieren signifikante Unterschiede ($p \geq 0,05$). Der Einfluss des Paddurchmessers auf die Impedanz (E) ist signifikant ($p = 0,004$ getestet mit einer Anova on Ranks). Bei Abbildungen 4 A-E werden Mittelwerte \pm Stabw. grafisch dargestellt. Abbildung 4 A aus Buehler u. a., 2016.

Abbildung 5 zeigt die Anpassungen von Formel 2 auf die Messdaten von 5 verschiedenen GNC (Messpunkte ≥ 700) sowie Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw) des Widerstands bei 20°C.

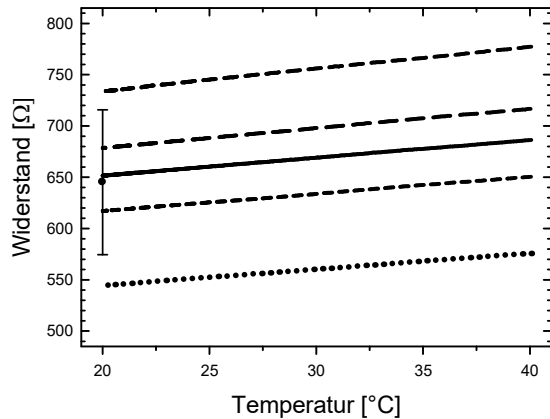


Abbildung 5: Widerstand von 5 Temperatursensoren verschiedener Chips zwischen 20 °C und 40 °C (Linien) und dem durchschnittlichen Widerstand und Standardabweichung bei 20 °C. Abbildung aus Buehler u. a., 2016.

Durch Anpassen von Gleichung 2 an die Sensordaten von 5 Chips wurden für Temperaturkoeffizient und Widerstand bei 20 °C Durchschnittswerte von $\alpha = 0.00283 \pm 0.00013 \text{ K}^{-1}$ und $R_{20^\circ\text{C}} = 645.12 \pm 70.63 \text{ } \Omega$ ermittelt.

7.4 Diskussion der Chipcharakterisierung

Die Impedanz, z. B. gemessen bei einer Frequenz von 1 kHz, ist eine gängige Größe zum Vergleich verschiedener MEA – Systeme wie auch der Qualität der Elektroden (Egert u. a., 1998; Gross u. a., 1985). Für ein optimales Signal / Rauschverhältnis ist eine geringe Impedanz der Elektroden wünschenswert (Wrobel u. a., 2007, 2008). Die Impedanz der Elektroden zeigt eine inverse quadratische Abhängigkeit zum Durchmesser (Abbildung 4 E) bzw. ist linear abhängig von der Fläche ($1/A$), wie dies bereits für andere Elektroden aus der Literatur bekannt ist (Gross u. a., 1985). Bei der Auswertung der Signalstärke ergibt sich ein Optimum für einen Durchmesser von 25 μm (Abbildung 4 A). Eine mögliche Ursache hierfür ist der Umstand, dass ein großes Pad mehr Kontaktfläche zum Medium bietet. Da das Medium direkten leitenden Kontakt zur Masse hat, kann dies die Abschwächung der Signale erklären (Wrobel u. a., 2007). Die Werte bei 15 μm Durchmesser zeigen eine größere Standardabweichung bei der Impedanz, was zum einen an Randeffekten und zum anderen an Diffusionslimitierungen während der Messung liegen könnte (Abbildung 4 E). Wichtig bei der Impedanzmessung sind konstante Rahmenbedingungen, da insbesondere der Einfluss einer elektrochemischen Doppelschicht stark von äußeren Bedingungen wie Temperatur, Bewegung in der Lösung und der Zusammensetzung der Lösung abhängig ist. Durch die Verwendung des standardisierten Messpuffers und Messung unter Laborbedingungen war dies bei unseren Messungen so weit wie möglich garantiert.

Bei den gebrauchten Chips deuten niedrigere Impedanzen unter $10^4 \Omega$ auf eine defekte Isolierung hin, dagegen sind über $10^6 \Omega$ ein Hinweis auf eine defekte Zuleitung oder Kontaktprobleme, wie sie insbesondere bei gebrauchten Chips mit mehr als 20 Nutzungsdurchläufen auftreten können (Abbildung 4 F). Beispielsweise können Leitungsbahnbrüche diese hohen Impedanzen von über $10^6 \Omega$ auslösen.

Der Abstand der Elektroden hatte weder auf die Signalstärke (Abbildung 4 B) noch auf die Signalanzahl (Abbildung 4 D) einen signifikanten Einfluss.

Die lineare Anpassung der Temperatursensoren zeigt die gute Eignung für die Messung der Temperatur und Temperaturänderungen. Allerdings ist eine individuelle Kalibrierung erforderlich, insbesondere, da die Sensitivität mit einem durchschnittlichen α von 0.00283 etwas geringer ist als sie bei kommerziellen Sensoren bzw. reinem Platin mit $\alpha=0.0036 \text{ K}^{-1}$ ist. Teilweise kann diese Differenz durch die Haftvermittlungsschicht auf den Glaschips aus Titan erklärt werden. Der Temperaturkoeffizient von α liegt bei 0.0026 K^{-1} , womit bei einem Verhältnis beim gegebenen Verhältnis der Schichtdicken (Platin: 100 nm; Titan: 10 nm) $\alpha = 0.0035 \text{ K}^{-1}$ zu erwarten wäre. Kontaktwiderstände der Federkontaktstifte, das Platinmaterial der Zuleitung, eventuelle Kristallstörungen der Gitter und weitere unbekannte Faktoren können diese Abweichung verursachen.

Diese Ergebnisse flossen neben weiteren (Bonk u. a., 2015a; Stubbe, 2012; Walther u. a., 2014) in die nächste Entwicklungsstufe des Glasneurochips ein (Abbildung 6). Neben dem standardisierten MEA (Abbildung 6 A) wurden die Masselektroden verkleinert (Abbildung 6 B) und ergänzt durch pH- (beschichtet) oder Sauerstoffsensoren (unbeschichtet, Abbildung 6 C), einem symmetrischen IDEs (Abbildung 6 D) und einer Teststruktur für die Schichtdicken (Abbildung 6 F). Die Schichtdicken liegen für Titan (Haftvermittler) bei 10 nm, für Platin (Elektroden) bei 100 nm, für Siliziumnitrit bei 60 nm für die pH-sensitive Sensorschicht und 1200 nm für die Isolierung.

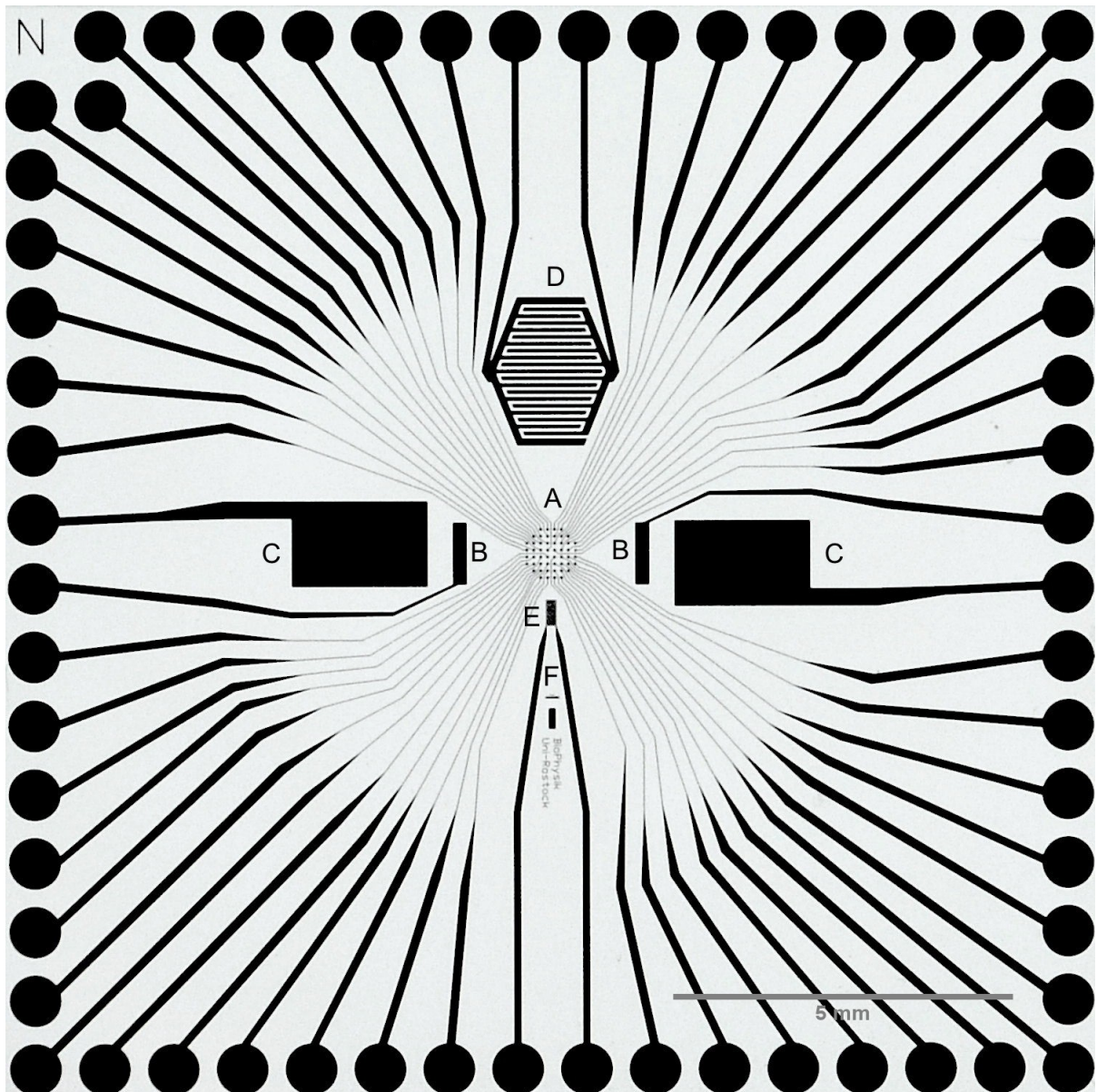


Abbildung 6 Verbesserter Glasneurochip mit optimierten Sensoren: MEA (A), Masse Elektroden (B), Elektrodenflächen für pH Messungen (beschichtet) (C), symmetrischer IDES (D) Temperatursensor (E) und Teststruktur mit Maßstab zur Schichtdickenmessung (F) Schichtdicken: Titan (Haftvermittler) 10 nm, Platin (Elektroden) 100 nm, Siliziumnitrit (Sensorschicht) 60 nm und Siliziumnitrit (Isolierung) 1200 nm.

8 Pharmakologie der Valproinsäure

8.1 Einleitung Pharmakologie der Valproinsäure

Als Referenzsubstanz für die Überprüfung des eigenen MEA – Systems wurde auf VPA zurückgegriffen. Es handelt sich hierbei um eine Substanz, die bei der Behandlung von Epilepsie oder Bipolarstörung eingesetzt wird (Johannessen, 2000). Die meisten der vorgeschlagenen Wirkmechanismen für VPA basieren auf der Erhöhung der intra- und extrazellulären Konzentrationserhöhung des inhibitorischen Neurotransmitters Gamma Amino Buttersäure (engl. GABA) (Johannessen, 2000; Sztajnkrzyer, 2002). VPA inhibiert eine Reihe von GABA assoziierten Enzymen, wie die Alpha Ketoglutarate Dehydrogenase, ein Enzym des Zitratzyklusses. Dieses Enzym baut eine Vorstufe von GABA, das Alpha Ketoglutarat ab. Eine Inhibition dieses Enzyms kann daher eine Erhöhung der GABA – Synthese bewirken (Luder u. a., 1990). Umgekehrt bewirkt VPA eine Inhibierung der Enzyme Succinat Semialdehyd Dehydrogenase und GABA Transaminase, die für den Abbau von GABA notwendig sind (Johannessen, 2000; Whittle, Turner, 1978). Durch die Verringerung der Aktivität des Zitratzyklus wäre allerdings eine Veränderung im Energiestoffwechsel der Zelle, also einer Verringerung der intrazellulären ATP Konzentration zu erwarten (Schoonen u. a., 2005). In seiner protonierten Form, die bei physiologischen pH – Werten überwiegt, ist VPA membrangängig und kann so die Blut – Hirschanke passieren (Krämer, Walden, 2013). Dadurch zeigt es bereits innerhalb von 5 Minuten nach Verabreichung seine Wirkung (Johannessen, 2000). In dem hier gezeigten Experiment wurde daher der Einfluss von VPA auf die neuronale Aktivität verglichen mit dem auf die Intrazelluläre ATP Konzentration. Diese Experimente wurden in Kooperation mit Dr. Bühler und Dr. Stubbe bei Herrn Professor Gimsa am LS BPY in Rostock durchgeführt. Die hier erzielten Ergebnisse wurden zudem bei der Zeitschrift „Biosystems“ des Verlags Elsevier, Amsterdam, Niederlande, zur Publikation eingereicht. Die Publikation wurde zwischenzeitlich angenommen: (Nissen u. a., 2016).

8.2 Material und Methoden Pharmakologie der Valproinsäure

Die Zellkultur entsprach dem in der Biophysik Rostock verwendeten Protokoll (Abschnitt 6.1). Ausgesät wurden 80000 Zellen pro Deckgläschen für den später durchgeführten ATP – Assay und 200000 Zellen pro Chip für die Messung der neuronalen Aktivität. Verwendet wurden nur Netzwerke mit mindestens 8 aktiven Kanälen. Der Einfluss der VPA auf die neuronale Aktivität wurde in einer einfachen Messreihe untersucht. Hierfür wurde eine 1 / 3 Verdünnungsreihe der VPA von 0,03 mM bis 65,61 mM in EZL hergestellt. Vor den Messungen wurde das Kulturmedium durch EZL ohne VPA ausgetauscht und nach einer Eingewöhnungszeit von 10 Minuten eine 15 Minuten lange Kontrollmessung aufgezeichnet. Nach neuerlichem Mediumtausch gegen das Medium mit einer Wirkstoffkonzentration der oben genannten Konzentrationsreihe wurde für weitere 15 Minuten die neuronale Aktivität

aufgezeichnet. Eine Vergleichsmessung mit EZL ohne Wirkstoff wurde ebenfalls durchgeführt, um die Stabilität des Systems zu belegen.

Für die Auswertung wurde die gemessene mittlere Aktionspotentialfrequenz (APF) jeder Zelle für die beiden untersuchten Zeiträume (Kontrollmessung + Messung mit VPA) berechnet. Mittelwert und Standardabweichung der APF für jede Konzentration und die Kontrollmessungen wurden für die weitere Auswertung verwendet.

Die ATP – Messung erfolgte nach 3 Tagen *in vitro* Zellkultur entsprechend der Anleitung des Herstellers (“ATPlite” Kit, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA). Für jede Konzentration und für die Kontrolle wurden je 8 unabhängige Messungen durchgeführt. Die Farbreaktion wurde mit einem LUMIstar Lumineszenz Microplatten Leser (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland) gemessen. Weitere Details entsprechen bereits publizierten Protokollen (Buehler u. a., 2011). Die Messwerte sind in % der Kontrolle angegeben. Vor der nachfolgenden Datenanalyse wurde der Henning Test (Raem, Rauch, 2006) zur Eliminierung von Ausreißern verwendet. Die statistische Analyse erfolgte mit einer „ANOVA on Ranks“ und anschließendem Vergleich gegen die Kontrollgruppe (Dunn’s Methods). Die IC_{50} Werte wurden durch anpassen einer logistischen Funktion (Lorentz, 1906) an die Messdaten ermittelt. Hierbei wurde der Startwert (ctrl) auf den Mittelwert der Kontrolle und der Endwert (min) auf 0 festgelegt:

$$f(c) = min + \frac{ctrl - min}{1 + (c/IC_{50})^{hs}} \quad (3)$$

In dieser Funktion hängt der Messwert $f(c)$ von der vorgegebenen Konzentration des Wirkstoffes VPA, dem Wert des Startplateaus (ctrl), dem Wert des Endplateaus (min), dem Hillslope (hs) und der halbmaximalen charakteristischen Konzentration (IC_{50}).

8.3 Ergebnisse Pharmakologie der Valproinsäure

Die Exposition mit VPA zeigte sowohl auf die gemessene APF als auch auf die gemessene ATP Konzentration einen signifikanten Einfluss (Abbildung 7 und Abbildung 8). Die Analyse ergab jedoch, dass der hemmende Effekt auf die APF bereits vor der Verringerung der ATP Konzentration einsetzt: Bei der gemessenen APF lagen die gemessenen Werte ab 7,29 mM signifikant unter dem Kontrollwert; bei der gemessenen ATP Konzentration war dies erst ab 21,87 mM der Fall. Entsprechend unterscheiden sich die ermittelten IC_{50} : Der IC_{50} für die APF ist mit 2,10 +/- 0,91 mM um Faktor 14 unterhalb des für die ATP – Konzentration ermittelten Wertes 28,27 +/- 3,42 mM, siehe Tabelle 1.

Tabelle 1 Ergebnisse Fits mit Gleichung 3, Werte angegeben als Mittelwert ± Standardfehler.

	APF	ATP
IC_{50} [mM]	2.10 ± 0.91	28.43 ± 14.5
hs	1.34 ± 0.76	1.71 ± 0.82
R ²	0.09	0.74

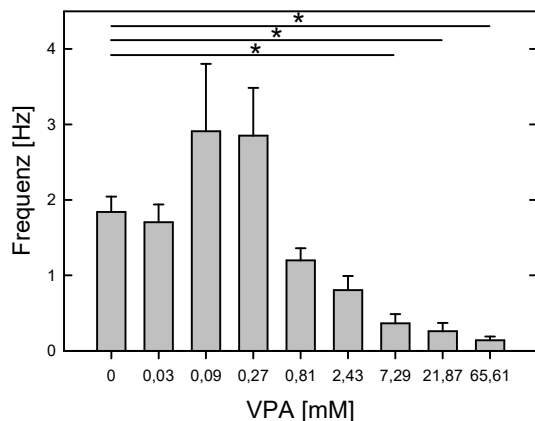


Abbildung 7: Aufgetragen ist die gemessene Frequenz der Aktionspotentiale [Hz] in Abhängigkeit von der VPA Konzentration [mM], n = 8 Netzwerke mit N >= 8 registrierten Signalen. Der Einfluss der VPA Konzentration auf die gemessene Frequenz ist signifikant (p=0,001 in einer ANOVA on Ranks). Im paarweisen Vergleich zeigt sich ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle bei 7,29, 21,87 und 65,61 mM VPA (p<0,05, mehrfacher Vergleich gegen Kontrolle nach Dunn). Der ermittelte IC₅₀ liegt 2,10 +/- 0,91 mM.

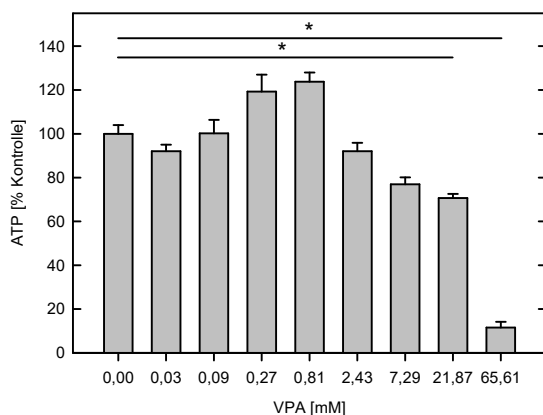


Abbildung 8: Aufgetragen ist die gemessene Adsorption verursacht durch die Nachweisreaktion des ATP – Assays bezogen auf den Kontrollwert von 111 relativen Einheiten [% Kontrolle] in Abhängigkeit von der VPA Konzentration [mM], n = 8 Messungen pro Konzentration. Der Einfluss der VPA Konzentration auf die gemessene Frequenz ist signifikant (p=0,001 in einer ANOVA on Ranks). Im paarweisen Vergleich zeigt sich ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle bei 21,87 und 65,61 mM VPA (p<0,05, mehrfacher Vergleich gegen Kontrolle nach Dunn). Der ermittelte IC₅₀ liegt 28,27 +/- 3,42 mM.

8.4 Diskussion Pharmakologie der Valproinsäure

Der ermittelte IC₅₀ für die neuronale Aktivität unter VPA – Einfluss liegt mit 1,7 mM im Bereich der bereits bekannten Messwerte aus der Literatur, die von unserer eigenen und externen Arbeitsgruppen publiziert wurden (Johnstone u. a., 2010; Koester u. a., 2010), womit die Reproduzierbarkeit der Daten, die mit dem MEA – Systems mit primären neuronalen Zellen des LS BPY gezeigt werden konnte. Hierbei ist insbesondere die geringe Anzahl der verwendeten Netzwerken herauszustellen, was im Sinn der Europäischen Institutionen für den Tierschutz ist (Der Rat der Europäischen Gemeinschaften, 1986). Die mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 %

letale Dosis (LD_{50}) von etwa 860 mg/kg in Maus, subcutan (PubChem, o. J.) entspricht bei einer groben Überschlagsrechnung ungefähr 6 mM VPA *in vitro* (Buehler u. a., 2011).

Bezüglich der Gegenüberstellung der beiden wichtigsten postulierten Wirkmechanismen für VPA, dem Zielort der Alpha Ketoglutarat Transaminase als Enzym des Zitratzyklus (Luder u. a., 1990) und der GABA abbauenden Enzyme (Johannessen, 2000; Whittle, Turner, 1978) spricht dies für eine größere Bedeutung der GABA abbauenden Stoffwechselwege, da der IC_{50} in der gemessenen ATP – Konzentration etwa Faktor 6 über der LD_{50} liegt, während der IC_{50} der APF ca. Faktor 3 unterhalb der LD_{50} liegt.

Auffällig ist, dass sowohl bei der APF, als auch bei der ATP – Konzentration bei genauer Betrachtung nicht nur ein einfacher Abfall, sondern ein tendenzieller Anstieg bei 0,09 bis 0,27 mM VPA für APF bzw. 0,27 bis 0,81 mM VPA bei der ATP Konzentration ermittelt wurde. Dies ist ein Hinweis auf eine möglicherweise biphasische Kinetik in der Reaktion auf VPA, wie sie bereits von anderen Arbeitsgruppen *in vivo* vorgeschlagen wurde (Biggs u. a., 1992). Auch bei *in vitro* – Daten gibt es entsprechende Hinweise für Anstieg der APF bei moderaten VPA Konzentrationen (McConnell u. a., 2012). Biphasische Kinetiken können ein Effekt einer Überkompensation oder im Falle des erhöhten ATP – Konzentration ein Hinweis auf einen erhöhten Stoffwechsel sein (Calabrese, 2008, 2010). Ein naheliegender Kandidat für einen erhöhten Energiebedarf ist ein aktiver Transporter wie das MDR – System. Erste Hinweise auf eine Rolle des MDR auf die Konzentration von VPA im Gehirn ergaben sich „Real Time Polymerase Chain Reaction“ (RT – PCR) – Messungen, wobei zum einen der Nachweis auf Proteinebene nicht geführt wurde und zum anderen Fragen in der genauen Datenanalyse offen blieben (Gibbs u. a., 2004).

9 Quantitativer Nachweis des „Multi Drug Resistance“ Komplexes über ELISA

9.1 Einleitung ELISA

Immunologische Methoden wie Westernblots oder „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) sind etabliert zur Quantifizierung von Einflüssen auf zellulärer Ebene. Bekannte Beispiele sind Stresstests mit Westernblots zur Detektion von „Heat Shock Protein 70 kD“ (HSP70) (Arts u. a., 2004; Schill u. a., 2004) oder der Nachweis von Resistenzen gegen Krebsmedikamente verursacht durch eine verstärkte Expression des MDR1 in Tumorzellen (Krech u. a., 2012; Noonan u. a., 1990).

Der Anstieg des intrazellulären ATPs (siehe Abschnitt 8) bei höheren VPA Konzentrationen legt die Vermutung nahe, dass durch VPA zellulären Schutzmechanismen induziert werden, die Energie benötigen. MDR1 als aktiver Transporter ist ein naheliegendes Protein, was in diesem Experiment mittels ELISA untersucht wurde.

9.2 Material und Methoden ELISA

Für jeden Ansatz wurden 1 000 000 Zellen in 25 ml Zellkulturflaschen (BD Bioscience Heidelberg, Deutschland Best. Nr. 353107) ausgesät und auf 5 ml Gesamtvolumen mit Präparationsmedium aufgefüllt. Nach 2 Tagen wurde das Präparationsmedium durch Kulturmedium mit oder ohne VPA ersetzt. Je 2 unabhängige Messungen je Konzentration, Inkubationszeit bzw. Kontrolle wurden durchgeführt: Die verwendeten Konzentrationen wurden mit einer 1 zu 3 Verdünnungsreihe von VPA von 21,87 bis 0,09 mM hergestellt, als Kontrolle wurde Kulturmedium ohne VPA verwendet. Die Zellen wurden entweder 21 oder 12 Tage unter VPA gehalten, womit insgesamt also 4 Messpunkte pro Konzentration vorhanden sind. Die kommerziell erworbenen ELISA für Beta Aktin (Bestellnummer: ABIN1874329, Antikörper Online GmbH, Aachen, Deutschland) und MDR1 (Bestellnummer: ABIN1143302, Antikörper Online GmbH, Aachen, Deutschland) vom Typ „sandwich – ELISA“ werden mit 96 beschichteten transparenten Mikroreaktionsgefäßen (engl. wells) mit einem genormten Halter ausgeliefert. Die Wells sind mit einem Antikörper gegen das Zielprotein beschichtet, sodass dieses stöchiometrisch beim Inkubieren von 0,1 ml der jeweiligen Probe gebunden wird. Ein zweiter Antikörper gegen das gleiche Zielprotein, aber mit einer anderen Bindedomäne, dient als Brücke zu dem sekundären Antikörper, an dem Meerrettich – Peroxidase (engl. hrp für horseradish peroxidase) kovalent gebunden ist. Die Nachweisreaktion basierten auf einer Farbumschlagsreaktion, bei der das Substrat 3,3',5,5' tetramethylbenzidin zum gelb gefärbten Oxid umgesetzt wird (Gallati, Pracht, 1985; Martin u. a., 1984; Olucha u. a., 1985; Yalow, Berson, 1960). Über die Messung der Absorption bei 450 nm Wellenlänge (Polarstar Micro Titer Plattenleser, BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland) konnte so auf den Proteingehalt der Probe zurückgeschlossen werden. Das gemessene MDR – Signal wurde auf das

Aktin – Signal normiert. Die detaillierte Durchführung der Proteinextraktion und des ELISA sind in den Anhängen A2 und A3 nachzulesen. Dem Anstieg des normierten Signals wurde die Formel

$$f(c) = ctrl + hm - \frac{hm}{(c/EC_{50})^{hs'}} \quad (\text{korrigiert}) \quad (4)$$

angepasst, wobei der Anstieg vom Kontrollwert (ctrl) auf das Hormeseplateau (hm) mit der charakteristischen exzitatorischen Dosis (EC_{50}) und dem Hillslope (hs') beschrieben wird.

9.3 Ergebnisse ELISA

Die getesteten Inkubationszeiten von 12 und 21 Tagen unter dem Einfluss von VPA wurden aus Gründen der Kompatibilität zu der Arbeit von Koester u.a. zum Thema Neurotoxizität von VPA (Koester u. a., 2010) gewählt. Bedingt durch die lange Inkubationszeit unter VPA Einfluss konnte nicht wie bei ELISA – Experimenten üblich auf die Zellzahl normiert werden, da auch das Zellwachstum durch VPA unterschiedlich beeinflusst wird. Ein Bestimmung des gesamten Proteingehalts als Bezugswerts über eine Färbung (Bradford, 1976) erwies sich als relativ ungenau ($R^2 = 0,96$ für die Eichgerade), daher wurde Aktin als Referenzprotein immunologisch detektiert (Arts u. a., 2004; Schill u. a., 2004). Für den relevanten Konzentrationsbereich bis 50 ng/ml ist $R^2 = 0,99$. Die niedrigste sicher zu detektierende Proteinkonzentration lag bei 3,12 ng/ml, was bei der höchsten VPA Konzentration unterschritten wurde, entsprechend ist der Wert für 21,87 nicht belastbar und wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Eine 2 Wege ANOVA wurde durchgeführt, wobei keine gleiche Varianz erreicht wurde. Dies ist auf Grund der lediglich doppelten Messung auch nicht zu erwarten gewesen, womit die Wahrscheinlichkeit für falsch negative Resultate erhöht ist. Trotzdem konnte für die unterschiedlichen VPA Konzentrationen ein signifikanter Einfluss auf den MDR1 Gehalt ermittelt werden ($p < 0,001$). Im Bonferoni-ttest (Multiple Comparison versus Control Group) wurde für 0,27, 0,81 und 2,43 mM VPA eine signifikante Erhöhung des MDR1 gegenüber der Kontrolle detektiert. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen 21 und 12 Tagen unter VPA ($p = 0,054$). Entsprechend wurden die Werte von 12 und 21 div für jede VPA Konzentration zusammenfasst (Abbildung 9). Zellphysiologisch zeigt die Messung, dass neuronale Zellen auf hohe Konzentrationen von VPA mit einer erhöhten Konzentration des MDR1 Transporters ab 0,2 mM VPA reagieren. Bei 7,29 mM VPA geht diese jedoch wieder auf das Ausgangsniveau zurück, 21,87 mM VPA hemmt das Zellwachstum bereits so weit, dass keine belastbare immunologische Messung mehr möglich war.

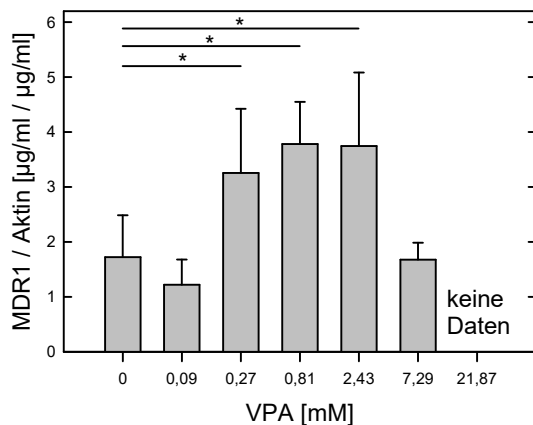


Abbildung 9 Ergebnis ELISA: Verhältnis des MDR1 gegen Aktin ELISA, zusammengefasste Daten von 12 und 21 Tagen unter VPA Einfluss. Durch eine zu geringe Zellzahl war bei 21,87 mM VPA keine belastbare Messung durchführbar.

Der ermittelte EC_{50} lag bei $0,20 \pm 0,07$ mM VPA.

9.4 Diskussion ELISA

VPA wirkt auf den auf den Zitratzyklus und GABA abbauende Enzyme (Johannessen, 2000; Luder u. a., 1990) und greift somit in den zellulären Stoffwechsel ein. Es ist zudem ein Substrat für das MDR1 – System (Gibbs u. a., 2004), und entsprechend konnten hier gezeigt werden, dass die Exposition mit VPA zu einer Erhöhung der MDR1 Konzentration führt. Dieser Reaktion kann zudem die tendenziell erhöhte ATP – Konzentration zwischen 0,27 und 0,81 mM VPA erklären (Abbildung 8). Es konnte kein Unterschied in der erhöhten Konzentration des MDR1 – Systems zwischen 12 und 21 Tagen detektiert werden. Dies deutet auf eine permanente Belastung der Zellen durch VPA hin. Vorherige Messungen zeigten bereits, dass die längere Exposition mit VPA (21 Tage) einen stärkeren Einfluss auf die APF hatte als eine kürzere Exposition (12 Tage) (Koester u. a., 2010). Eine mögliche Erklärung ist, dass die dauerhafte Belastung durch VPA zu einer langfristigen Schädigung der Zellen des Netzwerkes geführt hat, wodurch die APF über die Zeit im Mittel vermindert wurde.

10 Simulation Biphasischer Kinetiken

10.1 Einleitung biphasische Kinetik

Wie bereits in den Abschnitten 8 und 9 diskutiert, gibt es Anzeichen für eine hormetische Reaktion des Stoffwechsels bei moderaten VPA Konzentrationen. Ähnliche Reaktionen wurden auch für andere Zellen und Stoffe oder auch physikalische Einflüsse beobachtet (Blackman, 1905; Calabrese, 2008, 2010; Goodman, Mattson, 1996; Mattson, 2008). Erste Ansätze zur Modellierung biphasischer Kinetiken mit Abwandlungen einfach sigmoidaler Gleichungen finden sich bereits in der Literatur, wobei diese einen überwiegend phänomenologischen Charakter haben (Belz, Piepho, 2012, 2015). Eine genauere Modellierung erlaubt eine doppelt logistische Gleichung (Buehler u. a., 2011), da mit ihr physiologisch relevantere Parameter extrahiert werden können.

Unabhängig von der physiologischen Bedeutung einer biphasischen oder hormetischen Kinetik stellt sich die Frage nach der Relevanz in dem derzeitigen Hauptanwendungsgebiet von Tierversuchersatzsystemen, der Toxikologie. Hierbei ist insbesondere die Frage, in wie weit die Berechnung des IC_{50} als maßgeblichen toxikologischen Parameter und dessen Vergleichbarkeit auf Größen ohne biphasische Kinetik, wie die LD_{50} , eine Rolle spielt. Aufbauend auf den Messwerten für die APF wurde hier über die nichtparametrische Statistik hinaus exemplarisch gezeigt, dass die hormetischen Reaktionen als Überkompensation in der Reaktion auf eine Störung interpretiert werden können.

10.2 Material und Methoden Kinetik

An die auf 100% Kontrolle normierten Messdaten für den Einfluss der VPA auf die APF wurde ein Modell einer biphasischen Kinetik mit dem Programm Origin Labs 8.1 Pro angepasst (Buehler u. a., 2011):

$$APF(c) = \min + \frac{ctrl + hm - \min}{1 + (c/IC_{50})^{hs}} - \frac{hm}{1 + (c/EC_{50})^{hs'}} \quad (5)$$

mit der APF c , \min , $ctrl$, hm , IC_{50} , hs , EC_{50} , und hs' , die den Anstieg von der Kontrolle $ctrl$ zum Hormeseplateau hm mit dem Hillslope (engl. Hangneigung) hs' um den Wendepunkt beim EC_{50} und dem darauffolgenden Abfall zum Minimum \min um den Wendepunkt beim IC_{50} mit Hillslope hs (Abbildung 10). Dies entspricht zwei logistischen Funktionen: Die erste, die den Anstieg bei EC_{50} repräsentiert und die zweite, die den Abfall bei IC_{50} zeigt.

Da die das Anpassen der Funktion mit den sieben freien Parametern auf die Daten über den Einfluss von VPA auf die APF nicht reproduzierbar konvergiert, wurden einige Beschränkungen vorgenommen, um ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten: $ctrl$ wurde auf den Startwert von 100 % gesetzt, \min wurde auf 0 % gesetzt. Die Hillslopes für den Anstieg und Abfall wurden durch visuelles Anpassen an die Steigungen auf 3 für den Anstieg und 1 für den Abfall festgelegt.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, wie sich das hm auf den berechneten IC_{50} auswirkt. Zu diesem Zweck wurde eine einfache logistische Kurve (Gleichung 3) mit dem $hs = 2$, $IC_{50} = 1$, $ctrl = 100$ und $min = 0$ simuliert. Ausgehend von erhöhten Startwerten ($ctrl$ Werte: 120 %, 140 %, 160 %, 180 % und 200 %) wurde Gleichung 3 an die simulierten Werte für normierte Konzentration oberhalb des IC_{50} angepasst und die so ermittelten Werte für IC_{50} und hs in Abhängigkeit von hm aufgetragen (Abbildung 11).

10.3 Ergebnisse Kinetik

Das Anpassen der Daten an Gleichung 5 zeigte eine Überlagerung zwischen dem Anstieg und Abfall, wodurch ein lokales Minimum bei ca. 0.02 mM VPA detektiert wird. Dem folgt ein Anstieg auf das grafisch abzulesende Hormeselevel (hmg) bei ca. 0.15 mM. Die Überlagerung zwischen Anstieg und Abfall führt zudem dazu, dass hmg deutlich unterhalb des berechneten hm Wert bleibt (Abbildung 10 und Tabelle 2). Das rechnerische Hormeselevel $ctrl + hm$ lässt sich hierbei als der theoretische Maximalwert der Messgröße beschreiben. Dieser Wert sinkt mit steigender Wirkstoffkonzentration (gepunktete Linie in Abbildung 10).

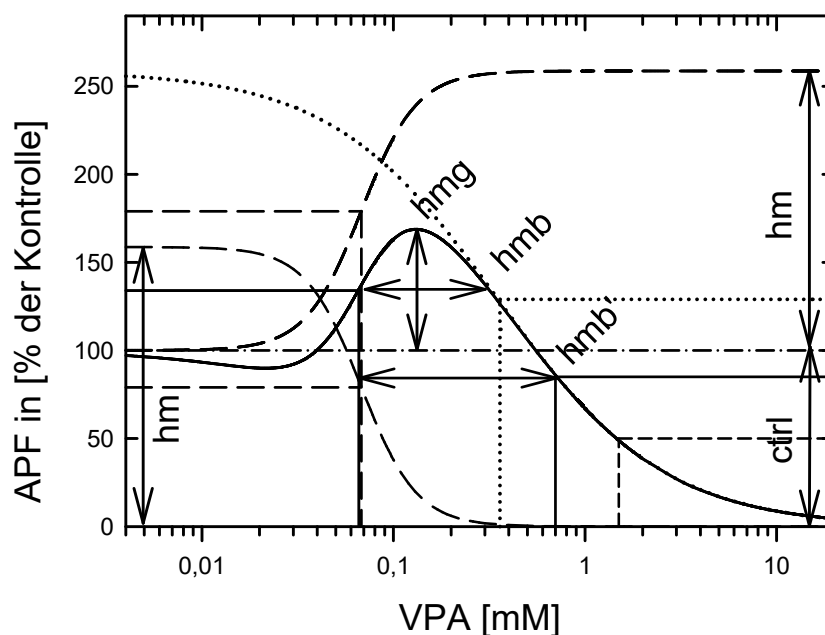


Abbildung 10: Modell einer Biphasischen Kinetik angewendet auf die Messdaten der APF (durchgezogene Kurve). Das Modell besteht aus einem Anstieg (gestrichelte Linie) vom Kontrolllevel ($ctrl$) auf das rechnerische Hormeselevel ($ctrl + hm$) und einem Abfall vom $hm + ctrl$ auf den Nullpunkt (gepunktete Linie). Rechnerisch wird hierfür von der Kurve für den Abfall (gepunktete Linie) die gespiegelte Linie des Anstiegs von hm zum Nullpunkt abgezogen. Aus dem Verlauf der Kurve (schwarze Linie) kann der maximal erreichte Wert (hmg für grafische Hormese) abgelesen werden. Der Bereich der Hormese (hmb oder hmb') kann unterschiedlich definiert werden: hmb bezieht sich auf die Ebene auf halben Weg von $ctrl$ zu ($hmg + ctrl$), hmb' bezieht sich auf die aus dem Grafen abgelesenen Werte für EC_{50} (durchgezogene Gerade nach links) und IC_{50} (durchgezogene Gerade nach rechts). Die rechnerischen Werte für EC_{50} und IC_{50} aus der Anpassung von Gleichung 5 sind mit einer gestrichelten Linie von der Abszisse zur linken Ordinate bzw. gepunktete Linie von der Abszisse zur rechten Ordinate hin abgetragen. Die kurz gestrichelte Linie von der Abszisse zur rechten Ordinate hin markiert den korrigierten IC_{50} berechnet mit Gleichung 6, siehe Abschnitt 10.4. Verändert nach Nissen u. a., 2016.

Tabelle 2: Parameter für Biphasische Kinetik

	Berechnete Parameter (mw ± SE)	Abgelesener Wert
ctrl [Hz]	100 (fix)	100
hm [Hz]	158,68 ± 101.3	69,0 (hmg)
EC _{50c} [mM]	0,07 ± 0,02	0,07
IC ₅₀ [mM]	0,36 ± 0,24	0.7
IC ₅₀ ^{cor} [mM] (siehe Diskussion Abschnitt 10.4)	1,46	1,46
hs	1 (fix)	
hs'	3 (fix)	
hmb [mM]		4,14
hmb' [mM]		11,6
R ²	0,1	

Die separate Simulation des Abfalls zeigt, dass ein erhöhtes Ausgangsplateau zu einer Verringerung des ermittelten IC₅₀ führt. Gleichzeitig verringert sich der gefundene hs (siehe Abbildung 11 und eingefügte Grafik in Abbildung 11).

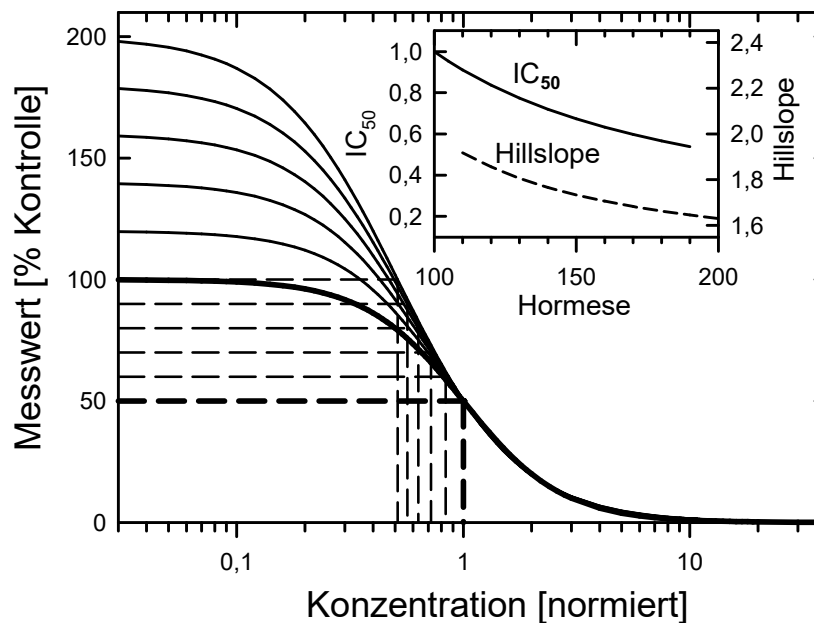


Abbildung 11 Simulation des abfallenden Astes der Hormese mit Gleichung 3. Gestrichelte Linien zeigen jeweils den abgelesenen IC₅₀ und den zugehörigen halbmaximalen Wert an. Die Einfügung zeigt die Veränderung des IC₅₀ und des Hill slopes in Abhängigkeit vom simulierten Hormeseplateau. Verändert nach Nissen u. a. 2016.

10.4 Diskussion Kinetik

Für die Modellierung wurde eine Funktion mit vielen freien Parametern benötigt, um den Verlauf der Kinetik gut beschreiben zu können (siehe Gleichung 5). Bei einem paarweisen Vergleich sind weitere Konzentrationen signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, insbesondere liegt auch die APF bei 0,27 mM VPAs signifikant höher als die Kontrolle. Durch die große Anzahl von durchgeführten Vergleichen muss jedoch eine Korrektur des Alpha – Wertes für den statistischen Test durchgeführt werden, da sonst das Risiko für falsch positive Testergebnisse steigt: Bei einem α 5 % (akzeptiertes Restrisiko) für einen falsch positiven Test und 28 paarweise Vergleichen bei 8 verschiedenen Messwerten wird üblicher Weise der Alpha Wert für die Berechnungen verringert. Für einen normal verteilten Datensatz würde dies z. B. mit der Bonferroni Korrektur als Modifikation des T-Tests durchgeführt (Bailey, 1977; Bonferroni, 1961), oder wie im diesen Fall ein modifizierter Rangsummentest nach Dunn (Dunn, 1964). Allerdings führen diese Anpassungen auch zu einem erhöhten Risiko falsch negativer Aussagen, da weniger starke Unterschiede das verschärfte Kriterium eventuell nicht erfüllen können.

Alternativ gibt es Ansätze den direkten Vergleich verschiedener, biphasischer und einfach logistischer Modelle und der Vergleich der Passung an den jeweiligen Datensatz über das „Akaike Information Kriterium“ (engl. AIC) heranzuziehen (Akaike, 1973; Belz, Piepho, 2012, 2015). Im Vergleich zu Parametern wie R^2 , die auf dem Mittleren Fehlerquadrat der Messpunkte zum Kurvenverlauf basieren, geht beim AIC zusätzlich die Anzahl der frei zu bestimmenden Parameter der verwendeten Funktion ein, um Modelle und mit unterschiedlicher Anzahl von Parametern sinnvoller vergleichen zu können. Da hier aufgrund der großen Streuung der Daten aber h_s und h_s' vorab festgelegt werden mussten um reproduzierbar konvergente Anpassungen zu erhalten, ist dies wenig aussagekräftig. Weitere Messpunkte mit zusätzlichen Konzentrationen von VPA würden zwar unter Umständen eine bessere Anpassung der Funktionsparameter ermöglichen, führen aber auch zu einer Verschärfung des Multiplizitätsproblems. Alternativ können auch rein phänomenologische Funktionen ohne mechanistisches Modell verwendet werden (Belz, Piepho, 2012), wobei hier der Informationsgewinn bezüglich der zugrunde liegenden Kinetik begrenzt ist. So haben laut der Autoren Belz und Piopho die mit den phänomenologischen Gleichungen gewonnenen Parameter teilweise keine biologische Relevanz (Belz, Piepho, 2015).

Bei der hier vorgestellten Gleichung wird durch die moderate Belastung mit einem Wirkstoff eine Verringerung der gemessenen APF registriert (Abbildung 10 bei etwa 0,02 mM), aber erst bei höheren Konzentrationen erfolgt eine aktive Gegenreaktion, die sich in einem durch h_s' und EC_{50} beschriebenen Anstieg äußert. Man kann spekulieren, dass der durch die Anpassung von Gleichung 5 ermittelte Wert für h_m eine physiologische Bedeutung als die maximal mögliche Reaktion im Messparameter sein könnte. Anders ausgedrückt würde dies darauf hindeuten, dass $ctrl + h_m$ dem theoretischen Maximum ohne inhibierenden Effekte entspricht. Bei der hier gemessenen APF wird dieser Wert jedoch in der Praxis nicht erreicht, da vorher

der Prozess der Inhibition überhand nimmt. Der durch IC_{50} und hs definierte Abfall im Bereich um 0,2 mM (gepunktete Linie in Abbildung 10) verläuft nahezu parallel zum Abfall der APF im gleichen Bereich (durchgezogene Kurve in Abbildung 10). Die Phänomenologie des Modells zeigt damit anschaulich die Abhängigkeit von der real gemessenen APF und dem theoretischem Maximalwert $hm + ctrl$ von der Wirkstoffkonzentration.

Trotzdem stellt sich aufgrund der mathematischen Schwierigkeiten bei der Anpassung der Gleichung an die Daten die Frage, inwiefern die Betrachtung der biphasische Kinetik für die mechanistischen und toxikologischen Fragestellungen notwendig ist. Wie die hier durchgeführte Simulation (Abbildung 11) zeigt, ist es für reine Toxikologie und dem hier üblichen Kennwert IC_{50} von untergeordneter Bedeutung, da sie zu einer Verringerung des ermittelten IC_{50} führt, und somit aus toxikologischer Sicht auf der sicheren Seite ist (Abbildung 11, eingefügte Grafik).

Es stellt sich jedoch die Frage, wie sich die ermittelten IC_{50} Werte zu den etablierten LD_{50} Werten verhalten. Da eine Erhöhung eines Stoffwechselfparameters wie die APF oder ATP Konzentration definitionsgemäß vom LD_{50} nicht erfasst wird, empfiehlt es sich, die zwischenzeitliche Erhöhung mathematisch zu berücksichtigen. Ein Vorschlag hierfür ist die Konzentration abzulesen, bei der der gemessene Parameter auf 50% der Kontrolle gefallen ist (siehe Abbildung 11, breite gestrichelte Linie für den normierten Fall). Mathematisch lässt sich dieser herleiten, indem $f(c)=(ctrl + min)/2$ in Gleichung 3 eingesetzt wird und nach c aufgelöst wird:

$$IC_{50}^{cor} = c = IC_{50} \sqrt[hs]{\frac{ctrl+hm-min}{(ctrl+min)/2-min} - 1} \quad (6)$$

Dieser Wert liegt mit 1,46 mM oberhalb des mit Gleichung 5 ermittelten IC_{50} von 0,36 mM (Tabelle 2) liegt jedoch unterhalb des mit Gleichung 3 ermittelten Wertes von 2,1 mM (Tabelle 1). Diese Abweichung liegt in einem für die Toxikologie akzeptablen Rahmen, kann jedoch für die genauere Betrachtung von Wirkmechanismen durchaus von Bedeutung sein.

Nachtrag: In Erweiterung zu dem Kapiteln 8 und 10 ist nach der ersten Einreichung dieser Dissertation eine noch ausführlichere Betrachtung mit weiteren Modellen zur Betrachtung von biphasischen Kinetiken in der Publikation Nissen u. a., 2016 erschienen.

Neben der Reaktion eines Netzwerkes aus Neuronen auf eine Substanz wie VPA ist ein weiterer Aspekt, der eine ausführlichere mathematische Betrachtung erforderlich macht, die Frage der Struktur des Netzwerkes an sich, welche im folgenden Kapitel angerissen wird.

11 Netzwerkstruktur

11.1 Einleitung Netzwerkstruktur

Neben der Analyse des Gesamtnetzwerkes, wie es für die Chipentwicklung und Pharmakologie durchgeführt wurde (Abschnitte 7 und 8) kann es von Interesse sein, die individuellen Zellen und ihren Einfluss auf die Gesamtaktivität zu analysieren. In Kooperation mit Sebastian Hanisch wurde hier die Netzwerkstruktur von Kulturen aus dissoziierten Neuronen auf den MEA analysiert. Insbesondere sollte untersucht werden, ob einzelne Nervenzellen durch mehrere MEA – Elektroden registriert werden. Der bereits publizierte Algorithmus (Engel, Hanisch, 2014) wurde hier an zwei Netzwerken getestet und mit den theoretischen Erwartungswerten und einer klassischen Kreuzkorrelation (Aertsen, Gerstein, 1985) verglichen.

11.2 Material und Methoden der Netzwerkstruktur

Für die Analyse der Netzwerkstruktur wurden Netzwerke mit 200000 ausgesäten Zellen untersucht.

Der Algorithmus zum Auffinden von Nachbarschaften erwartet verschiedene Vorgaben als Kriterien für die Nachbarschaft: Max Delay: maximaler erwarteter Wert für die Signalübertragung zwischen zwei Elektroden; Epsilon: Maximalwert für systematische Abweichungen zwischen zwei Signalen. Standard Nu: Anzahl der Übereinstimmungen im gegebenen Zeitfenster, die für einen Treffer notwendig sind, Start und Endpunkt des betrachteten Zeitfensters. Kreuzkorrelationen wurden mit Neuroexplorer 3 (Nex Technologies, Madison, AI, USA) durchgeführt. Hierfür wurden nacheinander alle aktiven Kanäle jeweils als Referenzkanal ausgewählt und die Ergebnisse der Korrelationen nach MS Excel exportiert. Ausgehend von den Zeitmarken des ausgewählten Referenzkanals wurde die Aktivität auf allen anderen Kanälen untersucht. Hierfür wurde die Anzahl der registrierten Aktionspotentiale in Intervallen von 0,1 ms gezählt. Es wurde ein Zeitraum von +/- 1 s, ausgehend von dem jeweiligen Aktionspotential des Referenzkanals betrachtet.

Dies wurde für alle Zeitmarken des Referenzkanals wiederholt und die registrierten Aktionspotentiale in je einem Histogramm pro Kanal aufsummiert (Abbildung 12 und Abbildung 13). Bei Kanälen mit korrelierter Aktivität ergibt sich so im gegebenen Zeitfenster um den Zeitpunkt 0 eine erhöhte Anzahl von registrierten Aktionspotentialen. Hier wurde von einer Korrelation ausgegangen, wenn die Anzahl der registrierten Aktionspotentiale im Histogramm im Bereich von -5 bis +5 ms 5 mal höher war als im übrigen Bereich des Histogramms.

Die gefundenen Treffer beider Auswertemethoden wurden in eine Elektrodenkarte für jedes Netzwerk eingetragen.

11.3 Ergebnisse der Netzwerkstruktur

Die Ergebnisse vom Nachbarschaftsalgorithmus sind in Tabelle 3 gelistet, die Ergebnisse der Kreuzkorrelation sind in Tabelle 4 gelistet. Alle Ergebnisse sind visuell dargestellt in Abbildung 14.

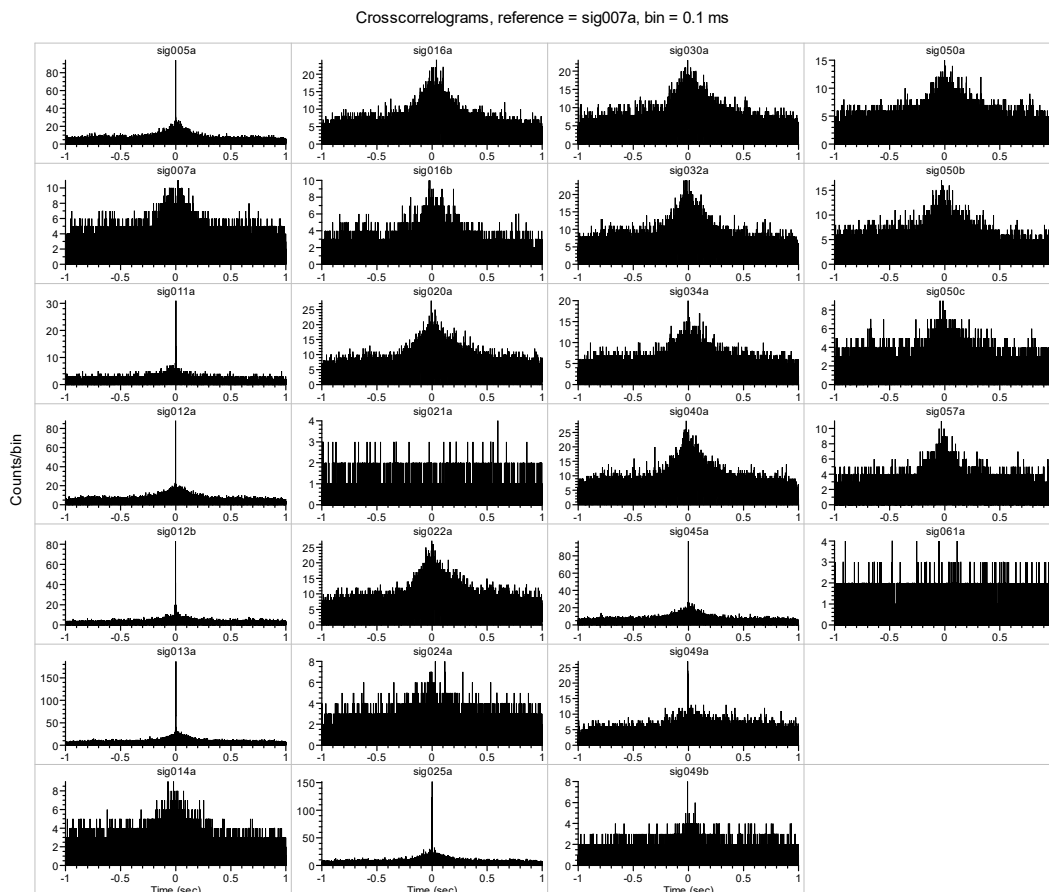


Abbildung 12: Kreuzkorellogram für Chip 1, Referenzsignal sig007a

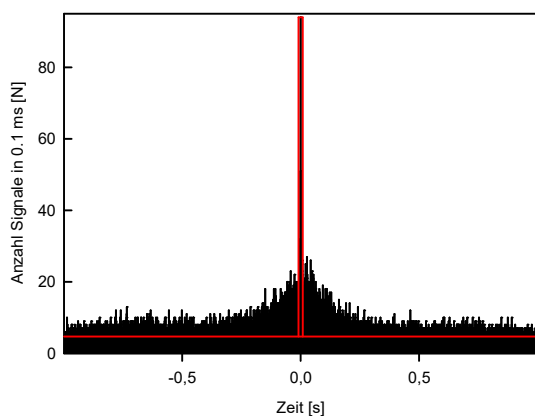


Abbildung 13 Ausschnitt aus Abbildung 12, Signal 5 a. Für die Auswertung wurde die durchschnittliche Anzahl von AP im Bereich $\pm 0,5$ ms um den Zeitpunkt eines AP auf dem Referenzkanal berechnet. Dieser Wert wurde mit dem Durchschnitt des übrigen Intervalls von ± 1 s ohne den zentralen Bereich

verglichen: Wenn der zentrale Bereich fünffach über dem Durchschnitt des übrigen Bereichs lag, wurde von einer starken Beeinflussung ausgegangen. Mittelwerte der beiden Bereiche sind markiert durch rote Linien.

Tabelle 3: Gefundene Nachbarschaften in zwei verschiedenen Netzwerken (Quelle: S. Hanisch, persönliche Kommunikation)

Netzwerk	1			2		
Anzahl Kanäle	21			41		
Durchmesser / Abstand	25 µm / 170 µm			15 µm / 100 µm		
Parameter Algorithmus	Epsilon: 0.1ms Max_delay: 2ms Starting Time: 0s Ending Time: 1000s Standard Nu: 1000	Epsilon: 0.1ms Max_delay: 2ms Starting Time: 0s Ending Time: 1000s Standard Nu: 2000	Epsilon: 0.1ms Max_delay: 2ms Starting Time: 0s Ending Time: 1000s Standard Nu: 5000	Epsilon: 0.1ms Max_delay: 2ms Starting Time: 0s Ending Time: 1000s Standard Nu: 1000	Epsilon: 0.1ms Max_delay: 2ms Starting Time: 0s Ending Time: 1000s Standard Nu: 2000	Epsilon: 0.1ms Max_delay: 2ms Starting Time: 0s Ending Time: 1000s Standard Nu: 5000
Gruppen von als ähnlich erkannten Kanälen (jede Gruppe in jeweils einer Zeile)	5 12 45 12 45 49 13 25 16 30 20 22 20 22 30 32 34 40 32 40	5 12 45 16 30 20 22 20 22 30 32 34 40 32 40	5 12 45 20 22 32 40	11 13 11 13 33 37 28 50 50 58 60 50 58 60 61 58 60 58 60 61 60 61 60 61 62	28 50 50 58 60 60 61 62	58 60

Tabelle 4: Mit Kreuzkorrelation gefundene Übereinstimmungen

Netzwerk	1	2
Durchmesser / Abstand	25 µm / 170 µm	15 µm / 100 µm
Parameter Kreuzkorrelation	Startzeit: 0s Ende: 1000 Histogrammbreite: -1 bis 1s Intervall: 0,1ms Grenzwert für Korrelation im Zentrum: Faktor 5 über Durchschnittswert	
Gruppen von als ähnlich erkannten Kanälen (jede Gruppe in jeweils einer Zeile)	5a 7a 12a 12b 45a 7a 5a 11a 12a 13a 25a 45a 11a 7a 13a 25a 12a 5a 45a 49a 50c 12b 5a 45a 49b 13a 11a 25a 14a 16a 16b 20a 22a 30a 32a 34a 40a 57a 16a 14a 20a 22a 30a 32a 34a 40a 16b 24a 32a 40a 20a 14a 16a 24a 30a 22a 14a 16a 20a 24a 30a 24a 16b 20a 22a 30a 25a 7a 11a 13a 30a 14a 16a 20a 22a 24a 32a 34a 40a 32a 14a 16a 30a 34a 40a 57a 34a 14a 16a 30a 32a 40a 57a 40a 14a 16a 30a 32a 34a 57a 45a 5a 7a 12a 12b 49b 49a 12b 49b 5a 12a 12b 45a 57a 14a 32a 34a 40a	7a 11a 13b 31a 33a 39b 11a 7a 13a 13b 31a 33b 39a 11b 7a 13a 13b 31a 33b 39a 11c 13a 13b 25a 33b 37a 39a 13a 11a 11b 11c 33b 13b 7a 11a 11b 11c 31a 33a 33b 39a 39b 14a 16a 16a 14a 30a 19a 43a 45a 20b 30a 25a 11c 45a 28a 58a 60b 61a 28b 50a 30a 16a 16b 31a 11a 11b 11c 13b 33a 33b 39a 39b 33a 7a 13b 31a 39a 39b 33b 11a 11b 11c 13a 13b 31a 37a 37b 39a 37a 13b 33b 39a 37b 33b 37c 33b 39a 11a 11b 11c 13a 13b 33a 33b 37a 39b 7a 13b 31a 33b 41a 43a 45a 43a 41a 45a 45a 19a 28a 43a 50a 58a 60b 50a 28a 28b 58a 60b 50b 58a 60a 61a 61b 62a 58a 50a 50b 60b 60a 50b 61a 61b 62a 60b 50a 58a 61a 28a 50a 50b 60a 60b 62a 61b 60a 62a 50b 61a

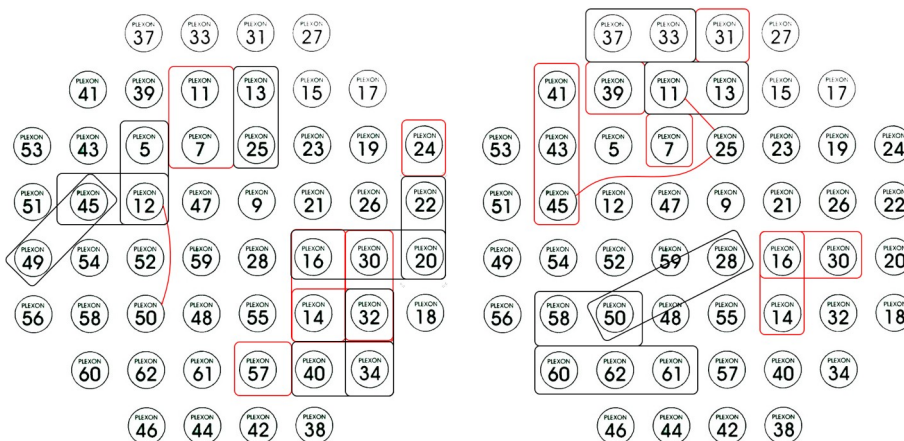


Abbildung 14: Visualisierung der detektierten Korrelationen und Nachbarschaften auf Chip 1 (links) und Chip 2 (rechts). Rot und schwarz: Durch die Kreuzkorrelation detektierte Verbindungen. Schwarz: Untermenge der detektierten Nachbarschaften vom Nachbarschaftsalgorithmus.

11.4 Diskussion der Netzwerkstruktur

Der getestete Algorithmus von Engel und Hanisch (2014) dient der Detektion von mehrfach kontaktierten Neuronen im MEA und wird als „Nachbarschaft“ interpretiert. Wie wahrscheinlich solche Nachbarschaften für die vorhandenen Kulturen sind, lässt sich aus einer einfachen Überschlagsrechnung bei bekannter Zellzahl und Signalzahl abschätzen: Bei Kulturen mit ca. 200 000 ausgesäten Zellen (Z_{ges}) auf dem GNC sind bei einem Anteil von geschätzt 10 % Neuronen 20 000 Neurone (N_{ges}) auf einem Chip. Der Flächenanteil des MEAs von der insgesamt bewachsenen Fläche ist in etwa ebenfalls 1/10, womit in erster Näherung ca. 2 000 Neurone im Bereich des MEA (N_{MEA}) liegen. Bei Chip zwei wurden von ca. 40 unterscheidbare Signalen (S) von Neuronen detektiert. Damit liegt die Wahrscheinlichkeit (w), dass eines der angenommenen 2000 Neurone detektiert wird bei ca. 1/25:

$$w = S/N_{\text{MEA}} = 40/2000 = 1/25 \quad (7)$$

Die Wahrscheinlichkeit w_k für eine mehrfache Kontaktierung (k) eines dieser Neurone berechnet sich daher wie folgt:

$$w_k = w^k = (1/25)^2 = 1/625 \quad (8)$$

Die zu erwartende Anzahl n_k der mehrfach kontaktierten Neurone in dem Bereich des MEAs sind entsprechend:

$$n_k = w_k \cdot 2000 = 1/625 \cdot 2000 = 3,2 \quad (9)$$

Für Chip 1 mit 21 detektierten Kanälen bei gleicher Zellzahl sinkt der Erwartungswert jedoch auf 0,22 doppelt verbundene Zellen. Für dreifache Kontaktierung liegen die Erwartungswerte bei 0,002 bzw. 0.128 für die Netzwerke 1 und 2. Die gefundenen Treffer des Nachbarschaftsalgorithmus liegen alle in einer räumlichen Nachbarschaft (Abbildung 14), was eine biologische Relevanz der gefundenen Ergebnisse wahrscheinlich erscheinen lässt. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Algorithmus nicht nur tatsächlich gleiche Zellen als identisch detektiert, sondern unterschiedliche Zellen mit ähnlichen Mustern erkennt. Eine klassische Methode zum Finden ähnlicher Aktivitäten ist die Kreuzkorrelation, die in diesem Fall einige weitere Zellen in die gleichen Gruppen mit aufnimmt. Die vom Nachbarschaftsalgorithmus gefundenen Treffer sind also eine Untermenge der Treffer der Kreuzkorrelation. Dies ist zu erwarten, da Signale von der gleichen Zelle zwangsläufig korrelieren müssen. Die größer als erwartete Anzahl der gefundenen Treffer, insbesondere von Zellen mit dreifacher Kontaktierung, deutet jedoch darauf hin, dass die Trennschärfe zwischen korrelierenden und identischen Signalen nicht ausreichend für eine sichere Unterscheidung ist.

Eine Möglichkeit zur Eingrenzung der Treffer liegt in der Wahl strengerer Parameter, um nicht korrelierende aber identische Zellen falsch zu detektieren. Die bisher von Engel und Hanisch zum Testen des Nachbarschaftsalgorithmus verwendeten künstlich generierten Daten bieten hierfür einen guten Ansatzpunkt, jedoch schlagen wir vor, dieses Modell näher an die biologische Wirklichkeit zu bringen. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden rein zufällig generierte Signale verwendet,

was jedoch die hohe Synchronisierung von Zellen durch Burstaktivität nicht berücksichtigt. Die Integration von Modellnetzwerken mit Burstaktivität (Kowalski u. a., 1992) könnte helfen, die Parametrisierung des Nachbarschaftsalgorithmus zu präzisieren.

Ein weiterer Ansatz zur Analyse der Netzwerkstruktur wurde 2007 von Bettencourt u. a. publiziert. Hier wurde das aus der Nachrichtentechnik und Genvorhersage bekannte Modell der „Markov Kette“ verwendet. Die Markov Kette ist ein Algorithmus, der einen Datenstrom in mehrere Zustände unterteilt. Im Falle von Nachrichtenübertragungen mit Funk also beispielsweise die Zustände „Information“ oder „Rauschen“, bei der Analyse einer genetischen Sequenz die Zustände „kodierend“ und „nicht kodierend“. Die Entscheidung der Einteilung erfolgt über die Berechnung von Übergangswahrscheinlichkeiten mit bekannten Trainingsdaten. Bettencourt u. a. verwendeten die gemessenen Frequenzen einzelner Kanäle als Trainingssequenz für die Bewertung der anderen Kanäle eines Netzwerkes, um über ermittelte Grenzwerte zu entscheiden, ob die Information auf jeweils zwei Kanälen identisch, beeinflusst oder unabhängig ist (Bettencourt u. a., 2007). Im Vergleich zu dem strikten detektieren von mehrfach angebundenen Neuronen ist dies ein pragmatischer Ansatz, da es fraglich ist, ob die im Einzelfall gefundene identische Information auf dieselbe Nervenzelle als Ursprung rückschließen lässt oder durch die Vernetzung und damit korrelierte Aktivität entsteht.

Ein weiterer Ansatz den Einfluss verschiedener Zellen im Netzwerk zu analysieren ist die gezielte Stimulation einzelner Zellen eines Netzwerkes. Eine neue Methode hierfür ist die UV Laserstimulation aus Kapitel 12.

12 Laserstimulation

12.1 Einleitung der Laserstimulation

Die Stimulation von Neuronen über elektrische Impulse und gleichzeitige Ableitung von elektrischen Signalen kann naturgemäß zu Artefakten führen. Alternativ zur elektrischen Stimulation bietet sich die Stimulation über Licht an. Üblicherweise werden hierfür die Neurone mit lichtempfindlichen Kanälen wie der Kalziumkanal Channelrhodopsin – 2 (ChR2) aus Grünalgen der Gattung *Chlamydomonas* transfiziert, die in die Zellmembran der Neurone eingebaut werden müssen (Packer u. a., 2013; Zhang u. a., 2007, 2009).

Hierbei wurde auf Entwicklungen der Gentherapie aus den 1990er Jahren aufgebaut, mit denen verschiedene Erbkrankheiten über das Einschleusen eines gentechnisch veränderten Virus (Gen Vektor) in einen Organismus behandelt werden. Auf diese Weise kann eine homozygot rezessive Erbkrankheit durch das Einbringen eines funktionsfähigen Allels des betreffenden Gens kompensiert werden. Erste Anwendung fand diese Methode bei erblichen Erkrankungen des Immunsystems (Adenosin Desaminase – Severe Combined Immunodeficiency, kurz ADA-SCID), wobei diese Therapien jedoch 2003 abrupt, nach ein durch Gentherapie verursachtes Krebsleiden eines Patienten endeten (Blaese u. a., 1995; Ferrari u. a., 1991; Hacein-Bey-Abina u. a., 2003). Ursache dieser Nebenwirkung waren die hierfür verwendeten Viren, Leukemia Viren aus der Gruppe der Retroviren. Diese haben den Vorteil, dass sie sich stabil in das Genom der Wirtszelle einbauen lassen und relativ große Gene transportieren können (8000 Basenpaare, kurz 8 kb), aber das Risiko bergen, Krebserkrankungen auszulösen (Thomas u. a., 2003). Für Tierversuche werden Leukämia Viren nach wie vor verwendet (Matsuyama u. a., 2015), weitere Versuche am Menschen wurden aber nur noch mit als sicher geltenden Adeno Viren (Kaplitt u. a., 2007) oder Adeno assoziierten Viren (Simonelli u. a., 2010) durchgeführt. Als weitere Sicherheitsmaßnahme wurden keine systemischen sondern nur noch räumlich eng begrenzten Gentherapien durchgeführt, zum Beispiel am Auge. So wurden Mutationen des „Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein“ (RPE65 gen, 109 Basenpaare) behandelt, ein essentielles Protein für den Stoffwechsel der Rezeptorzellen, das für die Umwandlung des abreagierten all-trans Retinol zu reaktionsfähigem 11 cis Retinal notwendig ist (Acland u. a., 2001, 2005; Cideciyan u. a., 2008). Im Tierversuch wurden fehlende Rezeptorzellen im Auge durch Transfektion von Bipolarzellen der Retina mit ChR2 behandelt, die somit ersatzweise als Fotorezeptor funktionieren (Lagali u. a., 2008).

Für den Einsatz *in vitro* und im Tierversuch gibt es inzwischen ein umfangreiches Sortiment geeigneter Kanäle für verschiedene Wellenlängen und entsprechender Gen – Vektoren für unterschiedliche Gewebe (Mattis u. a., 2012). Glasfaser Arrays für die Stimulation mit verschiedenen Wellenlängen (Kwon u. a., 2015) oder auch alternative Konzepte mit Hitze absorbierenden Nanopartikeln, die ohne Gentechnik

auskommen (Carvalho-de-Souza u. a., 2015), sind neuste Entwicklungen in diesem Gebiet. Anwendung findet diese als „Optogenetik“ etablierte Methode neben der bereits erwähnten Behandlung von Augenerkrankungen auch bei der Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson (Kravitz u. a., 2010).

Eine weitere Vereinfachung wäre die Stimulation mit Licht einer Wellenlänge, die bereits natürlicherweise von Nervengewebe in Hitze umgewandelt wird. Erste Vorversuche in diese Richtung wurden mit einem Kurzpuls UV – Laser (337.1 nm) durchgeführt (Bennet u. a., 2012). Der von Bennet u. a. postulierte Mechanismus ist die Absorption der Strahlung durch NADH und NADPH und einer entsprechenden thermischen Reizung. Insbesondere vermuten Bennet u. a., dass eine kurzzeitige Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch eine Schädigung der mitochondriellen Membranen und einer daraus folgenden Ausschüttung von Kalzium in das Zytoplasma ursächlich für die beobachtete Reaktion der Zellen sein könnte.

Aufbauend auf diesen Vorversuchen habe ich während eines Forschungsaufenthaltes in Kooperation mit Professor Guenther Gross und Ryan Bennet vom CNNS Denton, TX, USA die Methode weiterentwickelt und Ihre Möglichkeiten ausgetestet. Schwerpunkte waren die Charakterisierung der physikalischen Parameter des Systems, Ermittlung geeigneter Stimulationsparameter, Wiederholbarkeit der Stimulationen und Stärke der Reaktionen. Die statistische Analyse erfolgte durch von mir konzeptionierte und maßgeblich programmierte Software.

12.2 Material und Methoden der Laserstimulation

12.2.1 Zellkultur und Aufzeichnung der neuronalen Aktivität

Die Zellkultur am CNNS erfolgt nach etablierten Protokollen, wobei die Pflege und Verwendung von Tieren hierfür durch den institutionellen Ausschusses für die Pflege und Verwendung von Tieren der University of North Texas genehmigt wurde und in Übereinstimmung mit seinen Richtlinien erfolgte (Gross, Pancrazio, 2006; Wu u. a., 2014).

Kortikales Gewebe von embryonalen IRC Mäusen (Harlan Sparque, Dawley) wurde zwischen 15 und 16 Tagen nach der Verpaarung gewonnen. Das Gewebe wurden mit einem isotonischen Lysispuffer mit Papain und DNase verdaut (DISGH, siehe Abschnitt 6.1) und mit Präparationsmedium (DMEM mit 5 % fötales Kälberserum und 5 % Pferdeserum) auf eine Zellzahl von 600000 Zellen/ml eingestellt. 100 µl dieser Suspension wurden auf den mit PDL / Laminin beschichteten Multielektrodenarray (MEA) mit 64 Elektroden ausgesät (Gross u. a., 1985; Keefer u. a., 2001).

Als Kulturmedium wurde DMEM mit 6 % HS verwendet, wobei zweimal wöchentlich je 50 % des Mediums gewechselt wurden. Nach 4 Wochen in vitro bildeten sich aus den Zellen elektrisch aktive Netzwerke, deren Aktivität mit einem 32 Kanal Verstärker (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) digitalisiert und aufgezeichnet wurde. Die 32 Kanäle konnten hierbei den 64 MEA – Elektroden frei zugeordnet werden. Die an einem Kanal registrierten Signale konnten anhand ihrer Signalform über eine „Principle component analysis“ (PCA) unterschiedlichen Zellen zugeordnet und in einzelnen

Signalspuren gespeichert werden. Bis zu 4 Zellen konnten hierbei in separaten digitalen Kanälen gespeichert werden (bezeichnet als „digital signal processor, (dsp)“). Wenn mehr als 4 unterschiedliche Signalformen pro Kanal vorhanden waren, wurden diese zusätzlichen Signale in einem 5. Kanal zusammengefasst, womit beispielsweise für einen Kanal dsp002 mit 4 separierten Signalen (dsp002a bis dsp002d) und weiteren nicht separierten Signalen (dsp002i) fünf Signalspuren aufgezeichnet wurden. Alle Aufnahmen wurden in maximal 3 Stunden lange Abschnitte unterteilt.

12.2.2 Versuchsaufbau Laserstimulation, Stimulationsparameter

Für die Laserstimulation wurde ein geschlossenes System mit Durchfluss verwendet (Gross, Schwalm, 1994; Meyer u. a., 2009). In diesem System wird der pH-Wert und die Osmolarität durch mit CO₂ angereicherter Luft (10 % CO₂) und eine Wasserkompensation konstant gehalten. Die Temperatur ist auf 35 °C geregelt (Abbildung 15).

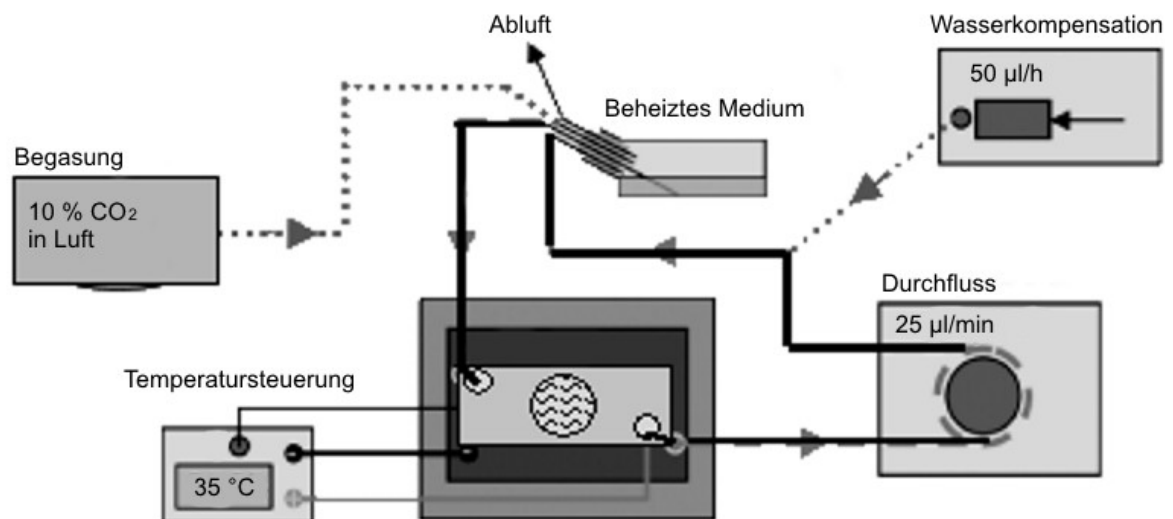


Abbildung 15: Schematische Skizze der geschlossenen Messkammer (Grafik verwendet mit freundlicher Genehmigung vom CNNS, Denton, TX, USA). Der pH - Wert wird durch kontrollierte Begasung und die Osmolarität durch Verdunstungskompensation konstant gehalten. Ein Durchfluss von 25 µl/min Medium garantierte die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen (Meyer u. a., 2009).

Die Messkammer dieses Systems ist in den Objektisch des Laserarbeitsplatzes (Abbildung 16 und Abbildung 17) montiert. Die Kulturen konnten über mehrere Tage kontinuierlich beobachtet werden. Der Sensor für die Messung der Laserstärke wurde über Koaxialkabel an ein Oszilloskop und über einen 1 k Ω Widerstand an einen Kanal des Plexon Vorverstärkers angeschlossen. Über die Plexon Software konnten so exakte Zeitmarken der Laserpulse aufgezeichnet werden.

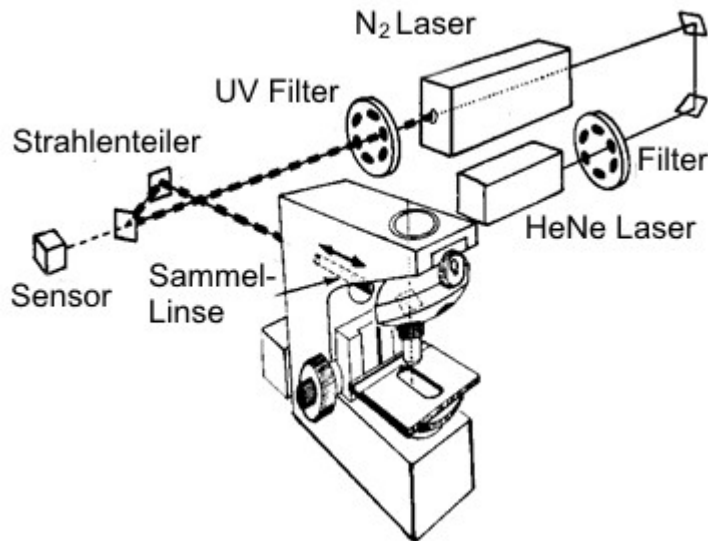


Abbildung 16: Schematische Skizze des Mikroskop Arbeitsplatz mit UV Laser (Grafik verwendet mit freundlicher Genehmigung vom CNNS, Denton, TX, USA). HeNe Laser (650 nm, permanent) und N₂ Laser (337 nm, 12 ns Pulse) werden über ein System optischer Spiegel parallelisiert und über eine Sammellinse (interface optics) auf der Objektebene fokussiert. Über einen Strahlenteiler (beam aligner) und eine Photodiode (output monitor) wird die Stärke der Laserpulse gemessen (Kirkpatrick u. a., 1985).

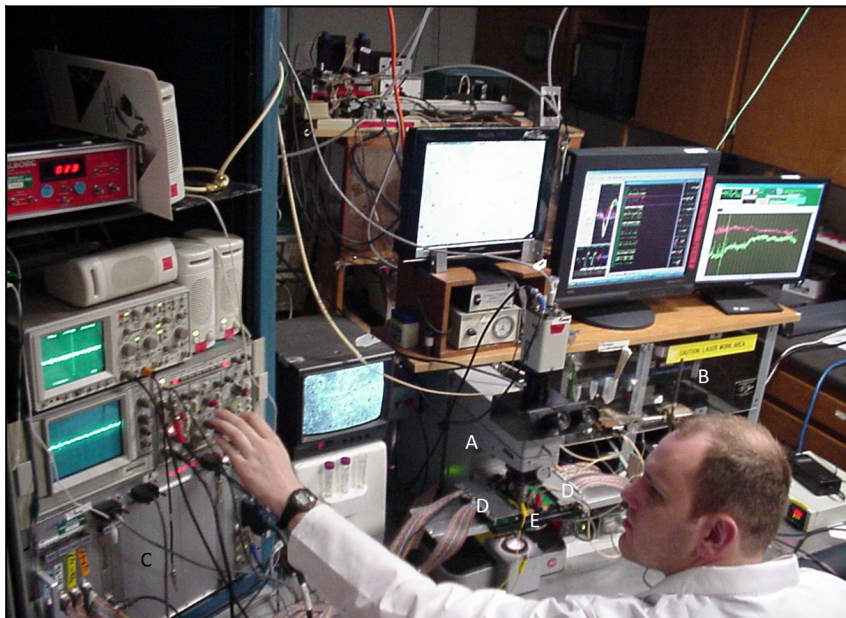


Abbildung 17: Arbeitsplatz mit Mikroskop (A), Lasersystem (B), Verstärker (Plexon, C), 2 Vorverstärker (D), Messkammer und elektrischer Heizung (e)

12.2.3 Kalibrierung des Lasersensors und Durchführung der Stimulationsexperimente

Die vom Lasersystem am Ende des Strahlengangs bereitgestellte Leistung wurde mit einem thermischen Sensor „Power Max 150“ (Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA) gemessen und so die ausgegebene Spannung des Lasersensors (Abbildung 16 und Abbildung 17) kalibriert: In Vorversuchen wurde ab 70 mV Spannung am Sensor erfolgreich stimuliert, dies entspricht ca. 27 W Laserleistung auf der Objektebene der geschlossenen Messkammer. Die Bestrahlungsfläche auf der Objektebene wurde mit einem präparierten Objektträger getestet, der mit einer UV – sensitiven Farbe („Sharpie black“, Sanford Ink Company, Downers Grove, Il., USA) beschichtet war. Unter Annahme eines Rechteckpulses mit einer Dauer von 12 ns auf einer gleichmäßig bestrahlten Fläche mit einem Durchmesser von ca. 15 µm (entspricht etwa 176,7 µm²) ergibt sich eine Bestrahlungsstärke von 0,225 J/cm² (2,25 kJ/m²) durch einen Puls.

Für die Stimulationsexperimente wurden einzelne Pulse oder Pulsfolgen mit einer Frequenz von 10 Hz verwendet. Für jedes Netzwerk wurde zudem ein mindestens 3 h langer Zeitraum als Leermessung ohne Stimulationen aufgezeichnet. Für Laserchirurgie wurden Frequenzen bis zu 100 Hz verwendet.

12.2.4 Auswertung Laserstimulation

In die quantitative Gesamtauswertung gingen nur Netzwerke mit mehr als 20 registrierten Zellen ein. Insgesamt wurden 121 Stimulationen an 7 Netzwerken untersucht. Die Zeitmarken für eine Stimulation (Anfangspunkt und Dauer der Stimulation) wurden in eine Tabelle eingetragen, die für die Auswertung von Leermessung und die Messung mit den Stimulationen verwendet wurde.

Für die Auswertung wurden die Zeitmarken eines 3 h Abschnitts der ermittelten Aktionspotentiale mit der Software Neuroexplorer 3 (Madison, AL, USA) als Tabelle mit je einer Spalte pro Signalspur im CSV Format abgespeichert. Diese Tabellen wurden in die Arbeitsumgebung „Matlab R2013“ (Natick, MS, USA) importiert und in zwei Matrizen für die Zeitmarken und die Kanalbezeichnung abgespeichert (Skript „plexon_read.m“ (siehe Anhang A1.1) und weiter ausgewertet (Skript „plexon_table_file“, siehe Anhang A1.2).

Der für die Aufzeichnung der Laserpulse verwendete Kanal wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt aber für eventuelle weitere Bearbeitung in eine eigene Matrix verschoben. Für die nachfolgende Auswertung wurde der betrachtete Zeitraum in einzelne Zeitschritte von 0,1 s unterteilt. Für jeden Zeitschritt wurde zum einen die Anzahl der registrierten Aktionspotentiale für jede Signalspur, zum anderen die Gesamtzahl der Aktionspotentiale über alle Signalspuren ausgezählt.

Für die Auswertung eines jeden Stimulationspulses wurde ein Zeitraum von 60 s Gesamtlänge untersucht: Die Zeitpunkte des Stimulationsstarts wurden jeweils auf die nächste Zeitmarke abgerundet, die Stimulationsdauer entsprechend aufgerundet. Unter Berücksichtigung der Stimulationsfrequenz von 10 Hz entspricht die Anzahl der Pulse dem Zehnfachen der Stimulationszeit gemessen in Sekunden. Bei einer

Stimulationsdauer von 0,1 s wurde also jeweils ein Puls ausgelöst. Ausgehend vom Zeitpunkt des Stimulationsstartes wurde ein Zeitraum von 30 s vor der Stimulation verglichen gegen einen Zeitraum 30 s nach dem Start der Stimulation. Die Zeitspanne der eigentlichen Stimulation wurde dabei herausgenommen. Über einen T-Test wurde festgestellt, ob sich die auf einer Signalspur registrierte Aktivität vor einem Puls signifikant von der Aktivität nach einem Puls unterscheidet. Der Anteil der Signalspuren mit einer veränderten Aktivität wurde ausgerechnet und ausgewertet (Abbildung 24). Für die Visualisierung wurde diese Berechnung auf Basis aller an einer Elektrode gemessenen Signale wiederholt und die Veränderungen der Aktivität an den Elektroden sowie die Signifikanz der Veränderung in einer Matrix dargestellt (Abbildung 21).

Die Gesamtaktivität der Netzwerke 30 s vor einer Stimulation bis 30 s nach einer Stimulation wurde jeweils grafisch dargestellt (Abbildung 22). Der Start der Stimulation wird auf den Zeitpunkt 0 s gesetzt.

Zur Quantifizierung der Reaktion wurde dem Zeitraum ab dem Start der Stimulation eine phänomenologische Funktion angepasst, die aus der Überlagerung einer linearen Auslenkung mit der Steigung a ($a \cdot t$) und einer exponentiellen Rückführung mit der Zerfallskonstante b ($e^{-b \cdot t}$) auf das Grundlevel f_g zusammengesetzt wurde:

$$f(t) = at \cdot e^{-b \cdot t} + f_g \quad (10)$$

Diese Funktion kann die nächste größere Veränderung in der Gesamtaktivität finden, unabhängig davon, ob es sich um eine Erhöhung oder Verringerung durch die intrinsische Netzwerkaktivität oder durch die Stimulationen handelt. Aufgrund der Überlagerung der linearen Auslenkung und der exponentiellen Zurückführung beeinflussen sich Steigung a und Zerfallskonstante b jedoch insoweit, dass diese nicht direkt als Parameter verwendet werden können. Aus diesem Grund wurde der jeweilige Extremwert des Funktionsverlaufes f_e ausgelesen, also das Minimum bei Inhibition bzw. das Maximum bei einer Anregung und für die nachfolgende Abschätzung von Reaktionszeit und Reaktionsdauer verwendet. Da der exponentielle Zerfall mit einer Funktion der Basis e (ca. 2.72) beschrieben wird (10), wurde $(f_e - f_g)/e$ als Kriterium für eine charakteristische Frequenz (f_c) festgelegt:

$$f_c = \frac{f_e - f_g}{e} + f_g \quad (11)$$

Dies entspricht einem Wert von ca. $100/e = 36,8\%$ der Differenz zwischen f_e und f_g . Die Zeitpunkte des Erreichens von f_c während der Auslenkung bzw. Rückführung der Aktivität wurden numerisch bestimmt. Diese charakteristischen Zeiten für Anstieg und Abfall wurden als Maß für die Reaktionszeit (Abbildung 26) und die Reaktionsdauer (Abbildung 27) auf die Stimulationen statistisch ausgewertet. Bei den Kontrollzeitpunkten entsprechen diese Werte der „Zeit bis zur nächsten Veränderung“ und „Dauer der nächsten Veränderung“, wie zum Beispiel einem Burst oder eine Aktivitätspause. Des Weiteren wurde aus f_e und f_g die prozentuale Veränderung der Netzwerkaktivität berechnet und als Maß für die Reaktionsstärke statistisch ausgewertet (Abbildung 25).

Um zu überprüfen, ob die Gesamtnetzwerkaktivität wieder auf das Ursprungsniveau zurückgeht, wurde der Zeitraum vor der Stimulation mit dem Zeitraum nach Ablauf der charakteristischen Zeit des Abfalls bis zum Ende des Betrachtungszeitraums (30 s nach Stimulationsstart) statistisch ausgewertet und als Veränderung des Grundlevels in Prozent abgespeichert.

Vergleichswerte zur statistischen Analyse wurden mit der Auswertung der Leermessungen des jeweiligen Netzwerkes ermittelt. Hierfür wurden die gleichen Zeitpunkte für Stimulationsstart und Stimulationslänge auf die Leermessung angewendet (Script „opendata“, siehe Anhang A1.3). Die mit Matlab ermittelten Parameter wurden in einer Tabelle gesammelt und ausgewertet (Microsoft Excel 2010, Redmond, WA, USA). Boxplots und Mann-Whitney Rank Sum Test wurden mit Sigmaplot 11 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) berechnet. Im Boxplot wird der Median als durchgehende Linie in der Box, 25 % und 75 % Quartil als obere und untere Grenze der Box, 10 % und 90 % Perzentile als Fehlerbalken dargestellt. Ausreißer sind als Kreise eingetragen.

12.3 Ergebnisse der Laserstimulation

12.3.1 Visuell eindeutige Reaktionen auf den Laser

Mittels Laserstimulation können verschiedene Strukturen entweder stimuliert oder bei größerer Intensität auch zerstört werden. Letzteres ist quasi das Gegenstück zur Stimulation im Sinne einer Veränderung der Aktivität durch das Auslösen einzelner Neurone oder neuronaler Fasern (Kirkpatrick u. a., 1985). Abbildung 18 zeigt eine derartige Situation, wo ein Durchschneiden eines Zellfortsatzes zu dem temporären Auslösen der Aktivität an einer Elektrode führte. Interessanterweise war dies nicht permanent, sondern nach ca. 3 Minuten waren die Zellen wieder aktiv, wobei sich die Aktivität des Netzwerkes von einzelnen, wenig koordinierten Signalen hin zu einer koordinierten, rhythmischen Aktivität (engl. „bursting network“) entwickelt hat.

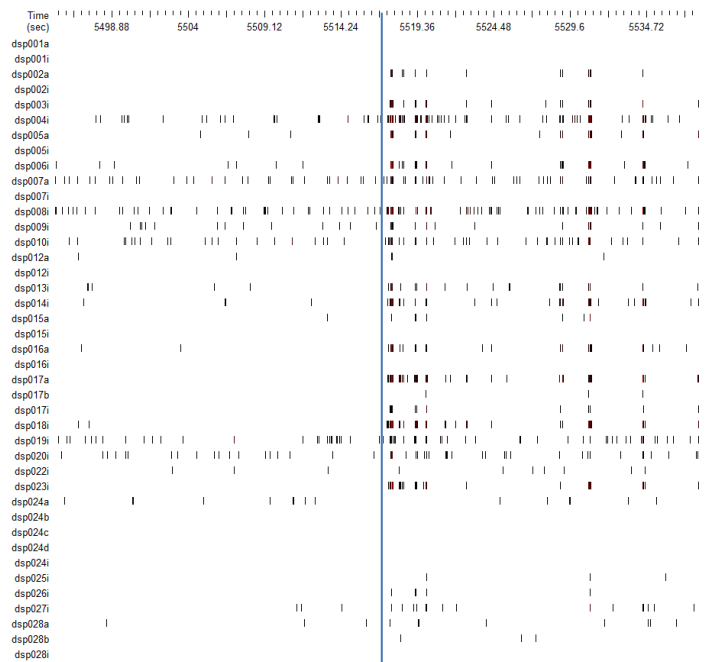
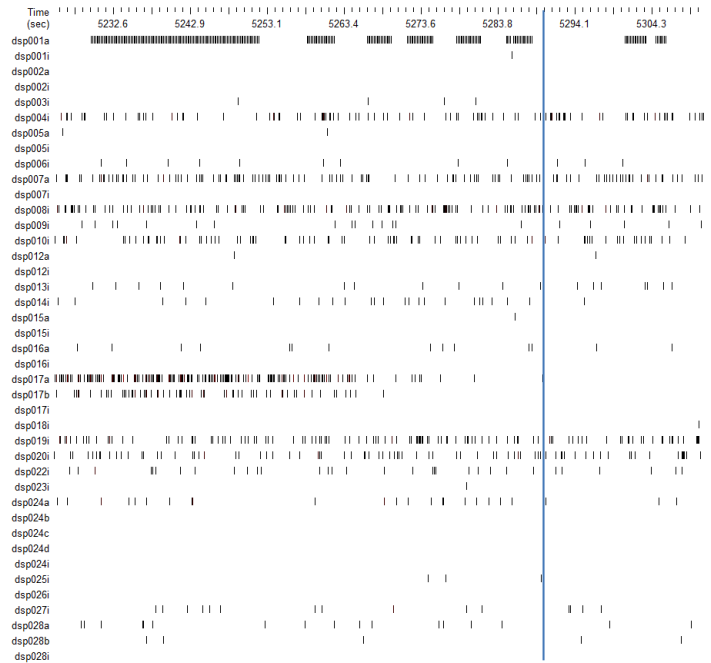
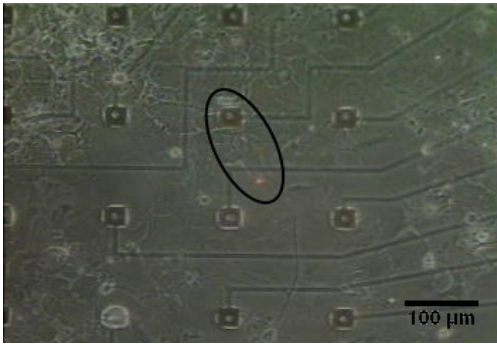


Abbildung 18, links: Das Durchtrennen eines Zellfortsatzes führte zum vorübergehenden Auslöschen der Aktivität an einer benachbarten Elektrode (mit Ellipse markiert); rechts: Netzwerkaktivität in 2d Ansicht. Gezeigt wird ein Zeitstrahl von links nach rechts aufsteigend in Sekunden, aktive Kanäle werden als dsp untereinander dargestellt. Jeder horizontale schwarze Strich entspricht einem registrierten Signal, rote Striche zeigen an, dass die einzelnen Signale bei der gewählten grafischen Auflösung nicht mehr separat angezeigt werden können. Zeitmarken für die Laserpulse werden in dsp001a dargestellt. Elektrode 17 zeigt nach einigen Pulsen keine Aktivität mehr (letzter Puls markiert mit einer blauen Linie), diese erholt sich jedoch wieder nach 3 Minuten (unten rechts, erster Puls markiert mit einer blauen Linie).

Das folgende Beispiel zeigt eine Netzwerkreaktion nach der Stimulation einer einzelnen Zelle (Abbildung 19). Die Zelle war innerhalb des betrachteten Zeitraums

von 10 Minuten nach der Stimulation nicht mehr erkennbar, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Laserpuls zurückzuführen ist (vgl. Bildabfolge Abbildung 19). Trotzdem zeigte sich nach der Stimulation eine entsprechende lokale Reaktion des Netzwerkes (Abbildung 20 und Abbildung 21), die die Gesamtnetzwerkaktivität kurzzeitig um 188 % im Vergleich zum Grundlevel fg ansteigen ließ (Abbildung 22).

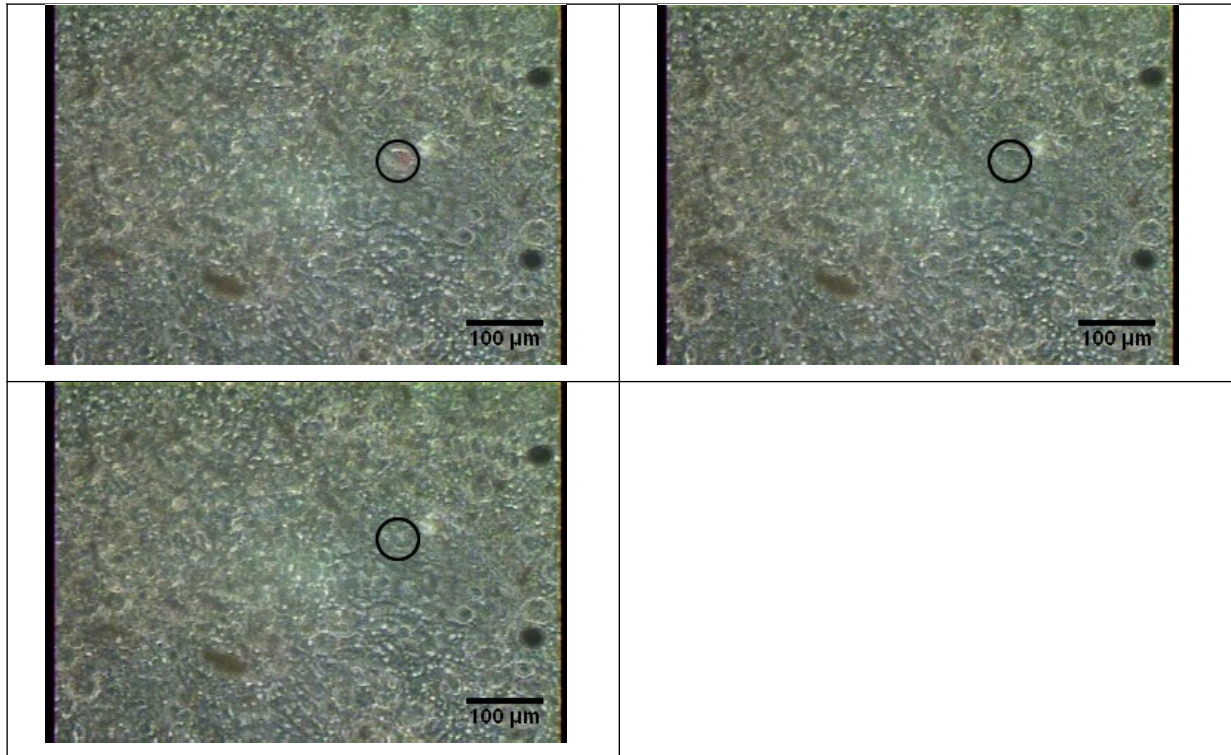


Abbildung 19: Stimulation einer Zelle (markiert im Kreis): Oben links vor der Stimulation (mit rotem Zielpunkt), oben rechts nach der Stimulation und unten links nach 10 min. Die Zelle ist auf dem letzten Bild nicht mehr vorhanden. (Abbildung 19 bis Abbildung 22 gehören zur gleichen Stimulation). Am rechten Bildschirmrand sind 2 Elektroden erkennbar.

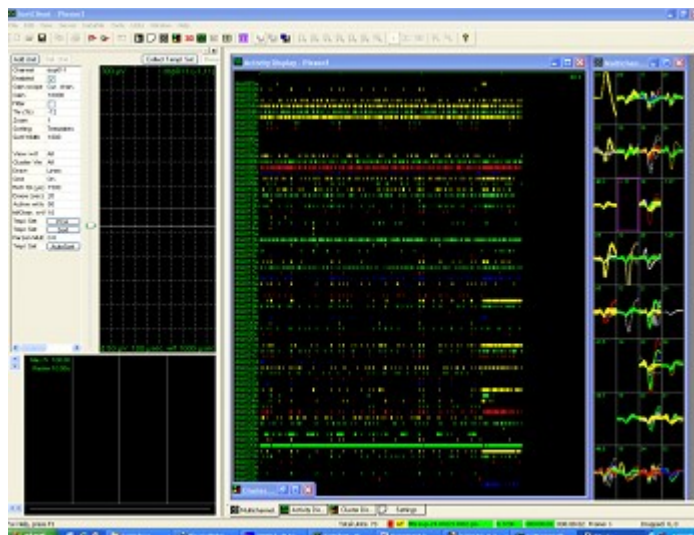


Abbildung 20: Plexon Sort Client mit separierten AP-Signalformen, Laser für die Stimulationen ist an Kanal dsp001a. Netzwerkreation auf eine kurze Pulsfolge (Abbildung 19 bis Abbildung 22 gehören zur gleichen Stimulation). Der linken Bereich des Fensters dient zur Separation der einzelnen AP-Signalformen aus einem Kanal (dsp) (leer, da kein aktiver Kanal ausgewählt ist). Der mittlere Bereich zeigt die Aktivität der separierten AP-Signalformen, wobei jeder vertikale Strich ein AP repräsentiert (dsp002a bis dsp032d). Rechts: 32 Kanäle mit den jeweils separierten Kanalformen. Dargestellter Zeitraum jeweils 40 s.

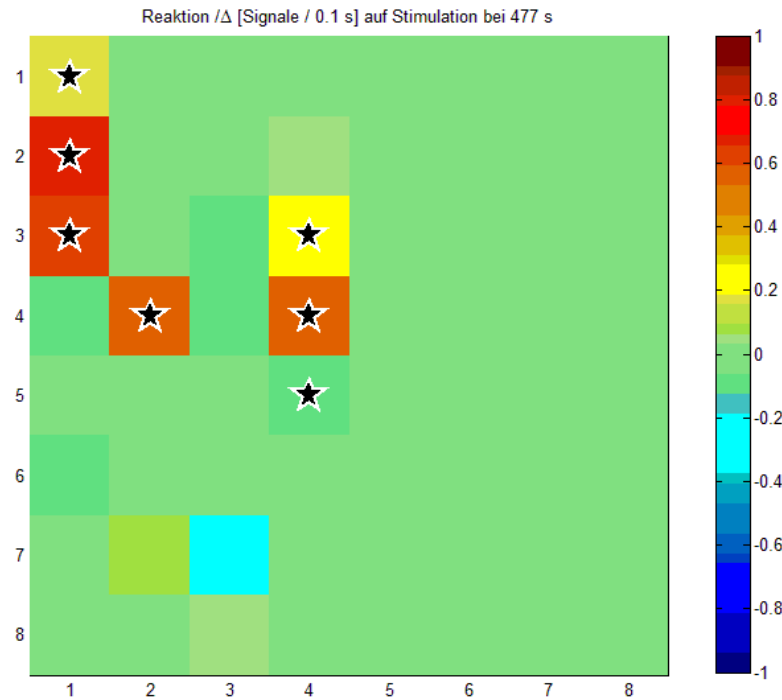


Abbildung 21: Beispiel für die Visualisierung einer Reaktion auf eine Stimulation einer Zelle zwischen Zeile 2 und 3, Spalte 1. Dargestellt wird die Veränderung in der Anzahl der gezählten Signale pro 0,1 s, Sterne markieren Signifikanz (T-Test $p < 5$). (Abbildung 19 bis Abbildung 22 gehören zur gleichen Stimulation)

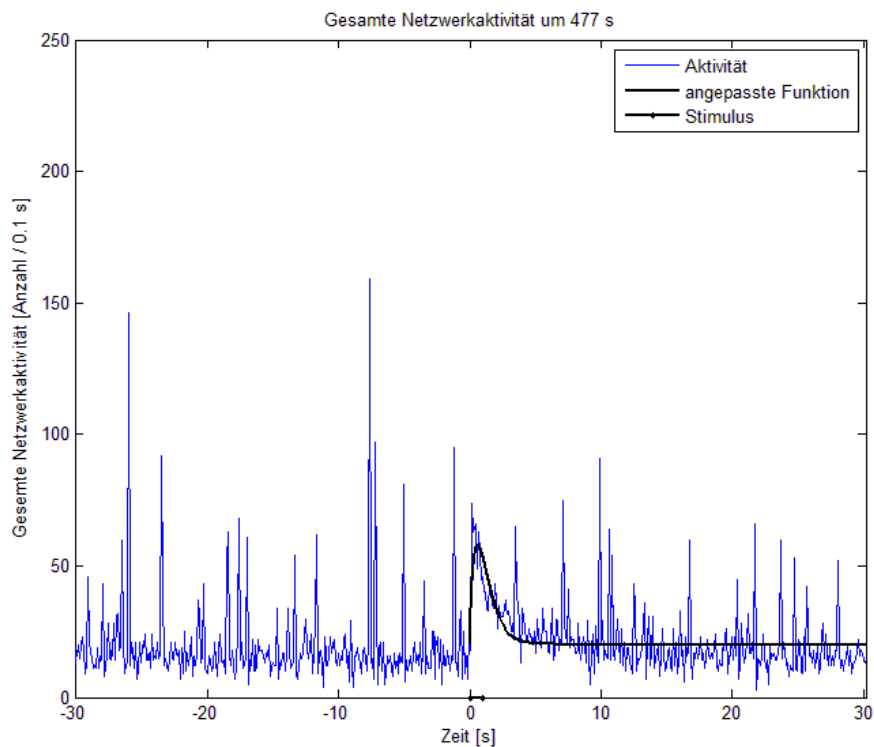


Abbildung 22: Gesamtaktivität über alle Kanäle im Zeitraum 30 s vor dem Stimulationsstart bis 30 s nach dem Stimulationsstart. Gezeigt wird die Anzahl der Spikes pro Zeiteinheit (blaue Linie), der Zeitraum des Stimulus (schwarze Linie mit Start- und Endpunkt) und Ergebnis der Anpassung von Gleichung 1 für den Zeitraum nach Beginn der Stimulation (schwarze Linie) (Abbildung 19 bis Abbildung 22 gehören zur gleichen Stimulation)

Das folgende Beispiel zeigt die wiederholte Stimulation an einem Zellcluster mittels des Lasers (Abbildung 23). Drei Stimulationen im Abstand von ca. 1 – 1,5 Minuten bewirkten jeweils eine Erhöhung der Gesamtnetzwerkaktivität, jedoch mit fallender Tendenz: Die Netzwerkaktivität stieg jeweils um 139 %, 136 % beziehungsweise 30 %.

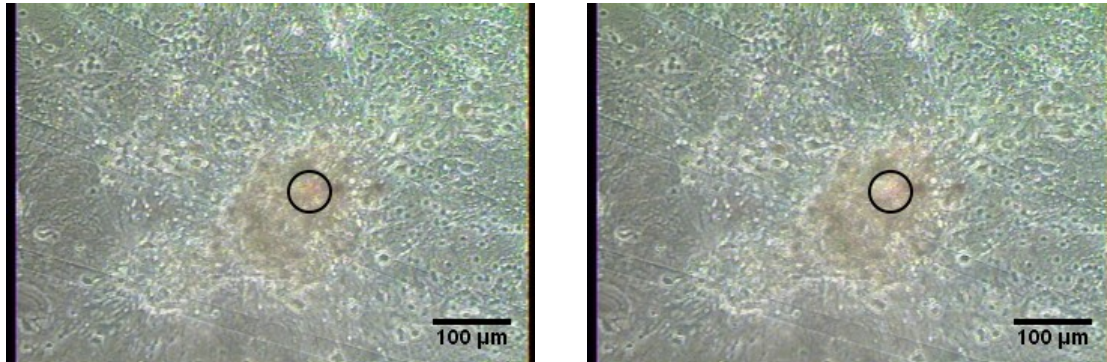


Abbildung 23: Stimulierter Zellcluster vor und nach 3 Stimulationen. Im direkten Vergleich ist eine veränderte Struktur nach den Laserpulsen erkennbar. Der Kreis markiert den bestrahlten Bereich.

12.3.2 Quantifizierung der Laserstimulationen

In der Gesamtauswertung über alle durchgeführten Stimulationen wurde der Anteil der Kanäle mit veränderter Aktivität [%] (Abbildung 24), die Stärke der nächsten Änderung im Vergleich [% des Grundlevels] (Abbildung 25), die Zeit bis zur nächsten Veränderung [s] (Abbildung 26) und die Dauer der nächsten Veränderung [s] (Abbildung 27) statistisch ausgewertet. Da diese Werte nicht normalverteilt sind, wurden nichtparametrische Verfahren zur statistischen Auswertung und visuellen Darstellung verwendet.

Statistisch signifikante Unterschiede in dem jeweils untersuchten Parameter beim Vergleich der Stimulationen und Leermessung gab es bei dem Anteil der Kanäle mit veränderter Aktivität ($p=0,001$ im Rank Sum Test), der Stärke der nächsten Veränderung [%] ($p=0,001$), und der Dauer der nächsten Veränderung [s] ($p=0,009$), jeweils getestet mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test. Auffällig ist, dass der Anteil der Kanäle mit veränderter Aktivität bei der Leermessung in nur 3 % Fällen über 25 % ging, während dies bei 19 % der Stimulationen geschah.

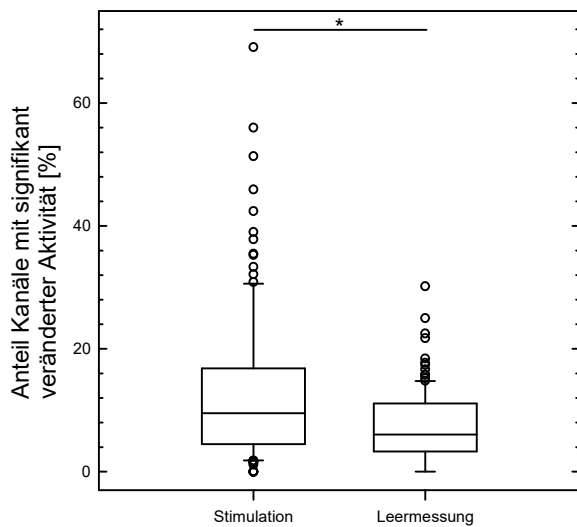


Abbildung 24: Anteil der Kanäle mit signifikant veränderter Aktivität $p=0,001$ Mann-Whitney Rank Sum Test. Vergleichszeiträume waren jeweils 30 Sekunden vor einem Stimulationszeitpunkt und 30 Sekunden nach einem Stimulationszeitpunkt ohne die eigentliche Stimulation. Bei der Leermessung wurden die gleichen Zeitmarken auf einen Zeitraum ohne Stimulationen angewendet. Daten basieren auf 121 Stimulationen an 7 Netzwerken.

Die Auswertung der Veränderung der Aktivität nach einem gegebenen Zeitpunkt zeigte, dass den Stimulationen in 17% der Fälle eine Inhibition folgte, in 82 % der Fälle war eine Erhöhung der Gesamtaktivität feststellbar. Bei den Leermessungen war in 29,75 % der Fälle eine Verringerung und in 70,25 % der Fälle eine Erhöhung nach einem gegebenen Zeitpunkt der in Leermessungen feststellbar.

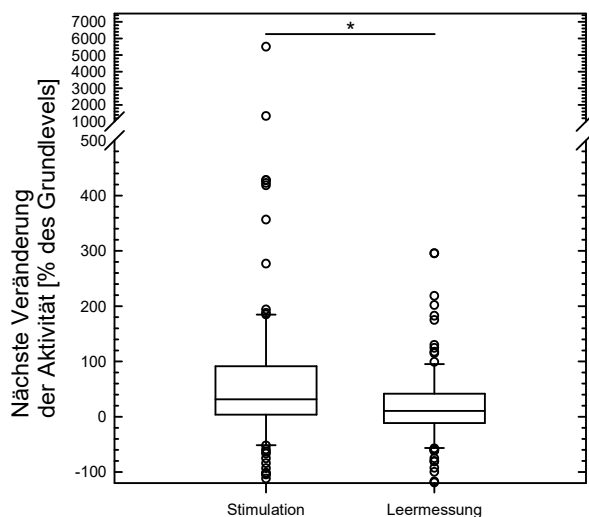


Abbildung 25: Die nach den Stimulations- oder Vergleichszeitpunkten registrierten Veränderungen als prozentuale Veränderungen bezogen auf die jeweils ermittelten Grundlevel. Die Stimulationen haben einen signifikanten Effekt ($p=0.001$ Mann-Whitney Rank Sum Test). Vergleichszeiträume waren jeweils 30 Sekunden vor einem Stimulationszeitpunkt und 30 Sekunden nach einem Stimulationszeitpunkt ohne die eigentliche Stimulation. Bei der Leermessung wurden die gleichen Zeitmarken auf einen Zeitraum ohne Stimulationen angewendet. Daten basieren auf 121 Stimulationen an 7 Netzwerken.

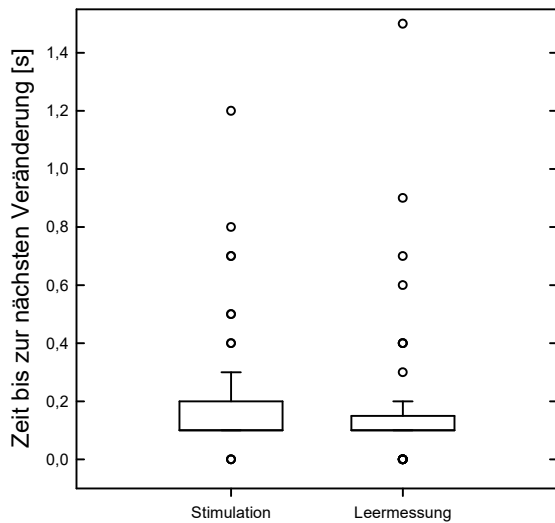


Abbildung 26: Die nach den Stimulations- oder Vergleichszeitpunkten ermittelte Zeit bis zu dem ersten Erreichen der jeweils berechneten charakteristische Frequenz (berechnet mit Gleichung 6) als Maß für die Reaktionszeit einer Stimulation. Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Zeitspanne bis zur nächsten Veränderung ($p=0,057$ Mann-Whitney Rank Sum Test). Vergleichszeiträume waren jeweils 30 Sekunden vor einem Stimulationszeitpunkt und 30 Sekunden nach einem Stimulationszeitpunkt ohne die eigentliche Stimulation. Bei der Leermessung wurden die gleichen Zeitmarken auf einen Zeitraum ohne Stimulationen angewendet. Daten basieren auf 121 Stimulationen an 7 Netzwerken.

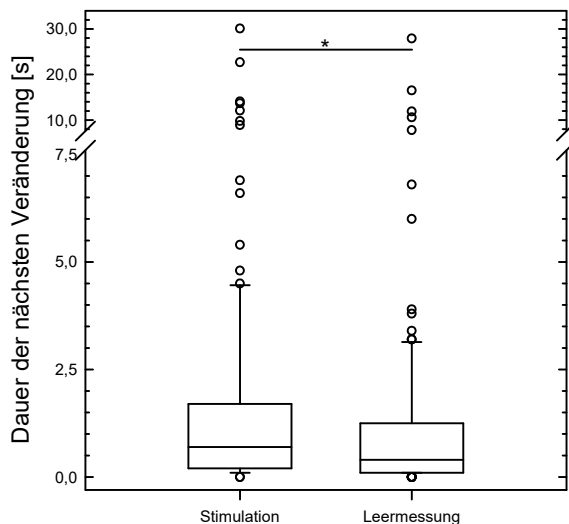


Abbildung 27: Die nach dem Stimulations- oder Vergleichszeitpunkten ermittelte Zeit bis zu dem zweiten Erreichen der jeweils berechneten charakteristische Frequenz (berechnet mit Gleichung 6) als Maß für die Dauer einer Reaktion auf eine Stimulation. Es gibt einen signifikanten Unterschied in der Zeitspanne bis zum Abklingen der jeweiligen Veränderung ($p=0,009$ Mann-Whitney Rank Sum Test). Vergleichszeiträume waren jeweils 30 Sekunden vor einem Stimulationszeitpunkt und 30 Sekunden nach einem Stimulationszeitpunkt ohne die eigentliche Stimulation. Bei der Leermessung wurden die gleichen Zeitmarken auf einen Zeitraum ohne Stimulationen angewendet. Daten basieren auf 121 Stimulationen an 7 Netzwerken.

In 26,7 % der Fälle gab es eine signifikante Änderung des Grundlevels. Dabei lag in 51,5 % der Fälle die Aktivität nach dem Ende der Reaktion über der ursprünglichen Aktivität, in 48,5 % der Fälle unterhalb der ursprünglichen

Netzwerkaktivität. Bei den Leermessungen lagen die Werte für signifikante Änderungen der Netzwerkaktivität bei 33 % der Untersuchten Zeiträume, davon lag in 60,0 % der Fälle eine Erhöhung und in 40,0 % der Fälle eine Verringerung der Aktivität vor.

Die Dauer der Stimulationen bzw. Anzahl der Pulse als Maß für die eingebrachte Energie zeigte keine Korrelation mit den untersuchten Parametern (Tabelle 5).

Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten berechnet zwischen der Dauer der Stimulation und den untersuchten Parametern (Anteil Kanäle mit veränderter Aktivität, Reaktionsstärke, Reaktionszeit, Reaktionsdauer). Der Korrelationskoeffizienten von 1 würde eine direkte lineare Abhängigkeit anzeigen, bei Werten von über 0,95 spricht man von einem signifikanten Zusammenhang, Wert zwischen 0,95 und 0,5 bezeichnet man als tendenziellen Zusammenhang.

Untersuchter Parameter	Korrelationskoeffizient
Anteil Kanäle mit veränderter Aktivität	0,15
Reaktionsstärke	0,4
Reaktionszeit	0,1
Reaktionsdauer	0,05

12.4 Diskussion der Laserstimulation

Spontan aktive Netzwerke von Neuronen besitzen nicht nur die Fähigkeit auf externe Stimulationen zu reagieren (Bennet u. a., 2012; Gross u. a., 1993b; Wagenaar u. a., 2004, 2005; Wagenaar, Potter, 2004), sondern haben darüber hinaus eine große Eigendynamik (Aihara u. a., 1990; Bettencourt u. a., 2007; Gross u. a., 1993a). Diese Eigendynamik erschwert die statistische Analyse der Daten, da es natürlicherweise jederzeit zu spontanen Änderungen in der elektrischen Aktivität in einem Netzwerk kommen kann. Dies macht den Vergleich der Stimulationen gegen Leermessungen in der statistischen Analyse unabdingbar. Durch die Verwendung derselben Zeitmarken für die Stimulationen auf die Leermessung und die Messung mit Stimulationen des jeweiligen Netzwerkes wird zudem die Gewichtung des individuellen Einflusses eines jeden Netzwerkes berücksichtigt. Auf diese Weise konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Stimulation der Neurone über einen UV-Kurzpulslaser eine funktionale Alternative sein kann, da jede 5. Stimulation eine Veränderungen in der Aktivität von mehr als 25 % der registrierten Kanäle eines Netzwerkes bewirkte. Auch bei der Reaktionsstärke und der Reaktionsdauer gibt es einen signifikanten Effekt der Stimulationen. Bei der Reaktionszeit ist dies nicht erkennbar, was an einer zu geringen zeitlichen Auflösung liegen könnte: Die theoretisch zu erwartende Reaktionsgeschwindigkeit bei einer monosynaptischen Übertragung liegt im Bereich von 1 ms, sodass die in Auswertungsprogramm gewählte Intervallbreite von 100 ms dies nicht mehr erfassen kann. Kleinere Zeitintervalle waren jedoch nicht sinnvoll, da zum einen dadurch sehr viele leere Intervalle vorhanden sind, was in der weiteren Berechnung zu Artefakten führen kann, da sich die Verteilung der gemittelten Frequenzen für kleine betrachtete Zeitschritte von einer näherungsweise Normalverteilung verändert zu einer

Verteilung ähnlich einer F – Verteilung mit einer großen Anzahl Zeitschritten mit keiner Aktivität. Auf Basis einzelner Spikes arbeitende Algorithmen wie „poison surprise“ (Legéndy, Salcman, 1985) können diesen Beginn genauer auflösen, jedoch sind sie anfällig für zufällige Signale im Umfeld der Stimulation und können so zu verfälschten, eventuell sogar negativen Reaktionszeiten führen. Zusätzlich wurden die für die untersuchten Parameter, Anteil Kanäle mit veränderter Aktivität, Reaktionsstärke, Reaktionszeit und Reaktionsdauer erhobenen Daten jeweils mit einer 2 Wege ANOVA, angewendet auf die Ränge, statistisch untersucht. Für keinen dieser Parameter zeigte sich eine statistische Interaktion zwischen den verschiedenen Netzwerken und den Reaktionen auf die Laserstimulationen. Somit konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Netzwerke im Ergebnis vergleichbar auf die Laserstimulation reagiert haben.

Wiederholte Stimulation der gleichen Neurone, wie es bei elektrischer Stimulation üblich ist (Marom, Shahaf, 2002; Shahaf, Marom, 2001), sind im Fall der UV-Laserstimulation nur eingeschränkt möglich. Neben dem Umstand, dass es keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Dauer der Stimulation und den untersuchten Parametern gibt, deutet dies darauf hin, dass der genaue Mechanismus, der zur Netzwerkantwort führt noch nicht ausreichend beschrieben ist. Der von Bennet u. a. (2012) vorgeschlagene Mechanismus über eine Ausschüttung von Kalzium aus den Mitochondrien der Zelle müsste vor diesem Hintergrund genauer überprüft werden, zum Beispiel durch „Calcium Imaging“ kombiniert mit MEA – Aufzeichnungen (Renault u. a., 2015) oder durch Simulationen, wie sie für den Vergleich von optogenetischer und elektrischer Stimulation bereits durchgeführt wurden (Williams, Entcheva, 2015). Eine Option für die weitere Entwicklung ist der Test anderer Wellenlängen, um eine elektrische Reaktion der Zellen auszulösen. Je nach Wellenlänge könnten unterschiedliche zelluläre Moleküle als lichtabsorbierendes Pigment zu einer Temperaturerhöhung im Membranbereich führen, womit eine Depolarisation jenseits des Aktivierungspotentials einer Nervenzelle ausgelöst werden könnte. Zudem ist UV – Licht in der hier vorliegenden Bestrahlungsstärke von $0,225 \text{ J/cm}^2$ ($2,25 \text{ kJ/m}^2$) ein sehr hoher Wert, auch wenn diese Exposition nur auf einer kleinen Fläche und in sehr kurzer Zeit auftritt. Zum Vergleich: Die gesetzlichen Expositionsgrenzen in der EU für künstliche UV-Strahlung bei einem Menschen liegen bei 30 J/m^2 für einen 8 Stunden Arbeitstag (Das europäische Parlament, Rat der europäischen Union, 2006).

Neben der UV – Bestrahlung gibt es eine weitere physikalische Einwirkung, die in dieser Arbeit mit dem MEA untersucht wurde. Hierbei handelt es sich um die Auswirkungen von hohem Luftdruck auf die neuronale Aktivität (Kapitel 13).

13 Auswirkungen von hyperbarem Luftdruck auf neuronale Aktivität

13.1 Einleitung Luftdruck

Auf Initiative von Dr. Marco Stubbe wurde im Rahmen dieser Kooperation eine Druckkammer für den GNC von ihm entwickelt. Diese wurde für Messungen der Auswirkungen von hohem Druck auf die neuronale Aktivität verwendet (Stubbe u. a., 2015). Ziel ist ein Tierversuchersersatzsystem um die Auswirkungen von Tauchgängen auf die neuronale Aktivität untersuchen zu können.

13.2 Material und Methoden Luftdruck

Die Zellkultur entsprach im Wesentlichen der in Abschnitt 6.1 beschriebenen, lediglich beim Kulturmedium wurden Veränderungen vorgenommen: Der Gehalt an Pferdeserum wurde auf 6 % reduziert. Zusätzlich wurde ein serumfreies Medium mit 2 % B27 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) an Stelle des Pferdeserums getestet. In Erweiterung des bekannten Aufbaus (Abschnitt 6.2) wurde ein Labview Script (Vernac, freundliche Überlassung vom CNNS, Denton) verwendet, um die Gesamtzahl an registrierten AP des Netzwerkes pro Minute (Netzwerk – APF) aufzuzeichnen und in Echtzeit darzustellen.

Die Druckkammer bestand aus einem Druckzylinder mit Anschluss für eine Handpumpe zum Erhöhen des Druckes Abbildung 28. Zum Vermindern der Verdunstung wurde eine Teflonmembran auf dem Rand des Troges aufgelegt.

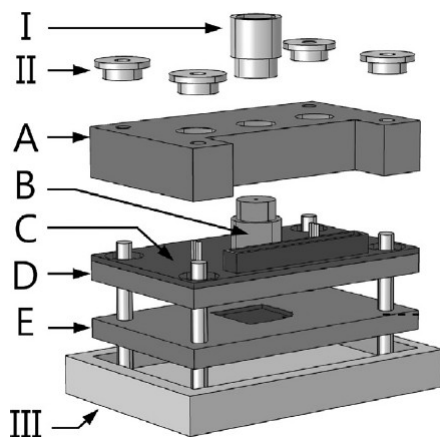


Abbildung 28: Druckkammer mit Druckanschluss (I), Rändelschrauben (II), Heizung (III), Deckel (A), Hochdruckzylinder (B), Leiterbahn (C), Kontakthalter (D) und Chiphalter (E). Aus Stubbe u.a., 2015.

Gemessen wurde die neuronale Aktivität bei Umgebungsdruck (ca. 1 bar), bei 2 bar, 4 bar und abschließend wieder bei Umgebungsdruck. Nach dem Einstellen eines neuen Druckes wurde, nachdem sich eine stabile Netzwerk – APF eingestellt hatte, für jeweils 30 Minuten die neuronale Aktivität aufgezeichnet und ausgewertet. Insgesamt 27 Kulturen mit serumhaltigen und 18 mit B27 – haltigem Medium wurden für die Messungen verwendet. Weitere Details sind der Publikation Stubbe u. a., 2015 zu entnehmen.

13.3 Ergebnisse Luftdruck

Der erhöhte Luftdruck hatte einen signifikanten Einfluss auf die Netzwerk – APF. Kulturen im serumhaltigen Medium zeigten eine erhöhte Aktivität bei 2 bar und bei 4 bar und eine verminderte Aktivität nach der Dekompression. Im serumfreien Medium war die Sensitivität geringer, lediglich bei 4 bar war eine signifikante Erhöhung der Aktivität feststellbar. Bei beiden Medien war nach der Dekompression die Varianz der gemessenen Aktivitäten größer.

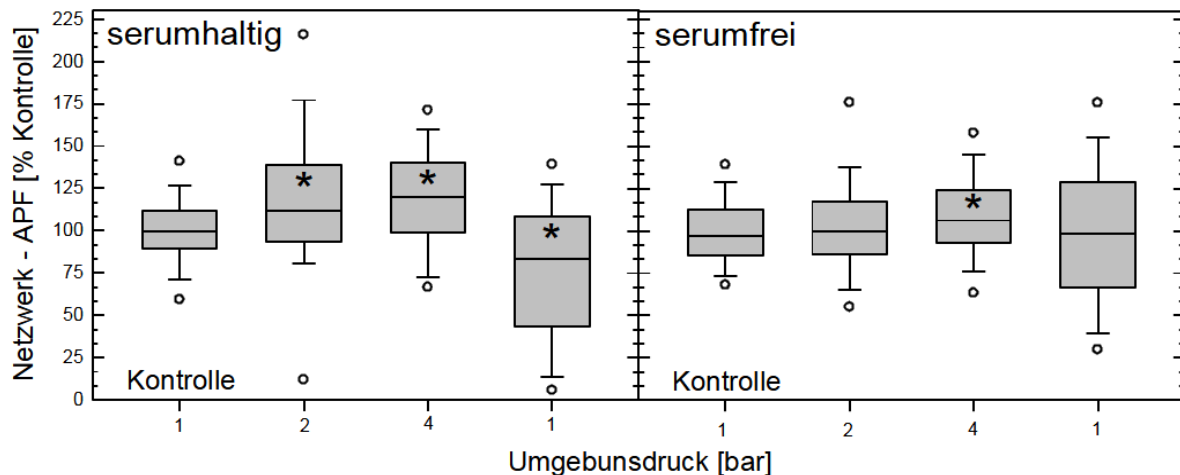


Abbildung 29: Boxplot der druckabhängigen Netzwerk - APF für verschiedene Zellkulturmedien, verändert nach Stubbe u. a. 2015. Im Boxplot wird der Median als durchgehender Linie in der Box, 25 und 75 % Quartil als obere und untere Grenze der Box, 10% und 90 % Perzentile als Fehlerbalken dargestellt. Ausreißer sind als Kreise eingetragen. Sterne markieren einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$ in einer ANOVA on Ranks mit anschließendem statistischen Vergleich gegen die Kontrolle nach Dunn.) Aus Stubbe u.a., 2015.

13.4 Diskussion Luftdruck

Die gemessene Erhöhung der Frequenz könnte durch die Diffusion von Stickstoffgas in die Membran verursacht werden, was die Membranpermeabilität für verschiedene Ionen beeinflussen kann (Golan, Grossman, 1992; Grossman, Kendig, 1988). Die höhere Sensitivität für Kulturen mit serumhaltigem Medium kann eventuell auf eine höhere Dichte der Glia – Zellen zurückgeführt werden, da im Pferdeserum enthaltene Wachstumsfaktoren deren Proliferation begünstigt. Die Zeit, die ein Netzwerk zum Erreichen einer konstanten Netzwerk – APF brauchte, scheint im Wesentlichen durch die Diffusion der Gase begründet zu sein:

Eine Erhöhung des Luftdrucks und damit des Sauerstoff – und Stickstoffpartialdrucks bewirkt jedoch keine unmittelbare Veränderung der Gaskonzentrationen, sondern erfolgt zeitlich verzögert durch die physikalischen Vorgänge der Lösung und Diffusion.

In Abweichung zu dem bisherigen Versuchen wurde hier auf eine niedrigere Konzentration von Pferdeserum im Kulturmedium zurückgegriffen. Eine neue Charge des Pferdeserums scheint eine höhere Konzentration von Wachstumsfaktoren beinhaltet zu haben, weswegen die Serumkonzentration von 10 % auf 6 % reduziert wurde, um ein Überwachsen der Kulturen durch die Gliazellen zu vermindern. Eine

weitere Neuerung für den LS BPY war die Verwendung der Netzwerk – APF. Dieser Parameter kann durch die Verwendung des Software „Vernac“, eine Eigenentwicklung des CNNS, bereits während der Messung angezeigt werden. Dies hat den Vorteil, dass man bereits während der Messung den Effekt eines Versuches betrachten kann. Durch die unterschiedliche Signalanzahl der Netzwerke muss bei Verwendung der Netzwerk – APF aber jedes Netzwerk auf einen Kontrollwert ohne Behandlung normiert werden, um vergleichbare Werte zwischen verschiedenen Netzwerken zu bekommen. Bei der Betrachtung der einzelnen Kanäle der Netzwerke ist dieser Schritt optional aber nicht obligatorisch.

14 Zusammenfassende Diskussion

Bezogen auf das Thema der Arbeit, die Charakterisierung des MEA als Sensor für Tierversuchersersatzsysteme ist es hier gelungen, die Funktionalität des in der Biophysik Rostock entwickelten Systems zu zeigen, sowohl in seiner physikalischen Charakterisierung, als auch in der angewandten Forschung. Herauszuheben ist zudem die Optimierung der MEA – Struktur mit dem gefundenen Optimum bei 25 µm Paddurchmesser und die Charakterisierung des Temperatursensors.

Insbesondere die Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten mit anderen Arbeitsgruppen konnte anhand der Messungen mit VPA gezeigt werden, sowohl mit älteren Daten aus dem eigenen Labor (Koester u. a., 2010) als auch mit Daten aus anderen Laboren (Johnstone u. a., 2010; McConnell u. a., 2012).

VPA besitzt verschiedene Wirkmechanismen, die zu einer biphasischen Veränderung der Konzentration des inhibierenden Neurotransmitters GABA führt (Biggs u. a., 1992). Die wichtigsten diskutierten Wirkorte sind die Alpha Ketoglutarate Dehydrogenase im Zitratzyklus, die zu einer Anreicherung einer GABA – Vorstufe führen kann (Luder u. a., 1990), und die Inhibierung der Enzyme Succinat Semialdehyd Dehydrogenase und GABA Transaminase, die für den Abbau von GABA notwendig sind (Johannessen, 2000; Whittle, Turner, 1978). Hier konnte mit dem Vergleich zweier messbarer Parameter, der APF und der intrazellulären ATP Konzentration, eine Prognose über den Mechanismus der Toxizität für VPA erstellt werden. Der zytotoxische Aspekt über die Beeinflussung des Zitratzyklus nimmt demnach eine untergeordnete Rolle ein, die direkte neurologische Wirkung durch Erhöhung der hemmenden Neurotransmitter zeigt bereits bei deutlich niedrigeren VPA Konzentrationen Wirkung. Dementsprechend liegt der IC_{50} der AFP mit 2.10 ± 0.91 mM VPA deutlich näher bei der LD_{50} vom 6 mM VPA als der für die intrazelluläre ATP Konzentration gemessene IC_{50} von 28.43 ± 14.5 mM VPA. Darüber hinaus ist VPA ein Substrat für zelluläre Entgiftungssysteme, wie das MDR1 (Gibbs u. a., 2004). Mit dem Nachweis des Anstiegs der Konzentration des MDR1 Proteins konnte gezeigt werden, dass der tendenzielle Anstieg in der ATP Konzentration bei moderaten VPA Konzentrationen möglicherweise mit der Detoxifizierung der Zelle über das ATP verbrauchende MDR1 System in Zusammenhang steht. Mit der Modellierung der biphasischen oder hormetischen Kinetik konnte durch die Verwendung einer doppelt logistischen Funktion (Buehler u. a., 2011) gezeigt werden, wie die Überkompensation der Effekte der VPA eine Erhöhung der APF über das Grundlevel hinaus erzeugen kann.

In Kooperation mit Sebastian Hanisch vom mathematischen Institut der Universität Rostock wurde die Funktionalität des Algorithmus zum Finden von mehrfach über das MEA kontaktierter Zellen, den so genannten „Nachbarschaften“, gezeigt (Engel, Hanisch, 2014). Jedoch wurden deutlich mehr „Nachbarschaften“ als statistisch zu erwarten waren gefunden. Dies könnte auf eine geringe Trennschärfe zwischen Korrelationen durch die mehrfache Kontaktierung einer Zelle im MEA und für Korrelationen durch die Vernetzung der Zellen untereinander hinweisen. Darauf

deuten die Ergebnisse der klassischen Kreuzkorrelation (Aertsen, Gerstein, 1985) hin, die, wie hier durchgeführt, alle Korrelationen gleichermaßen detektiert.

Ein weiteres Kernstück dieser Arbeit ist die UV Laserstimulation. Hier wurde mittels eines UV – KurzpulsLasers die Aktivität der Neuronen aktiv beeinflusst (Bennet u. a., 2012). In dieser Arbeit wurde ein statistischer Ansatz für Auswertung von Stimulationen entwickelt, der über die bisherigen überwiegend visuellen Beschreibungen von Stimulationen hinausgeht (Bennet u. a., 2012; Gross u. a., 1993b; Meyer u. a., 2009; Shahaf, Marom, 2001; Wagenaar u. a., 2004) und insbesondere auch mit der Problematik umgehen kann, dass wiederholte Stimulationen an derselben Nervenzelle weniger effektiv waren. Zudem erschweren die spontanen Änderungen der APF von Netzwerken aus Neuronen die statistische Analyse von Stimulationen, da diese induzierten Veränderungen nicht zweifelsfrei von den natürlichen Änderungen zu unterscheiden sind. Daher ist hier ein mehrstufiges statistisches Verfahren angewendet worden, wobei zunächst für jedes registrierte Neuron die Aktivität vor einem Puls mit der nach einem Puls verglichen wurde. Hieraus wurde der Anteil der Neurone eines Netzwerkes berechnet, deren Aktivität sich signifikant verändert hat. Zu jeder Stimulation wurde zudem ein Vergleichszeitpunkt ohne Stimulation (Leermessung) in gleicher Weise betrachtet. Eine direkte Aussage, wie hoch der Anteil der erfolgreichen Stimulationen war, lässt sich auf Grund der jederzeit auftretenden spontanen Änderungen der APF nicht sagen. Daher muss ein Grenzwert festgelegt werden, um Vergleiche zwischen Leermessung und Stimulationen durchführen zu können, zum Beispiel ein Grenzwert von 25 % Kanälen mit signifikant veränderter Aktivität. Dieser wurde bei 19 % der Stimulationen überschritten und trat damit über sechsmal häufiger auf, als dies bei den Leermessungen mit 3 % der Fall war.

Des Weiteren wurde die Gesamtaktivität der Netzwerke herangezogen um weitere Parameter wie Reaktionsgeschwindigkeit, Reaktionsstärke und Reaktionslänge abzuschätzen. Hierfür wurde mit einem automatisierten Programm eine phänomenologische Gleichung an die Daten der Netzwerk – APF angepasst. Der Extremwert der ersten Veränderung nach dem Stimulations bzw. Vergleichszeitpunkt und das Grundlevel wurden aus dem Kurvenverlauf abgelesen. Aus dem Grundlevel und dem Extremwert wurde ein Grenzwert berechnet, an dem die Werte für Reaktionszeit und Reaktionslänge am Kurvenverlauf abgelesen wurden, die im weiteren Verlauf statistisch ausgewertet wurden. Durch dieses mehrstufige Verfahren konnte gezeigt werden, dass überdurchschnittlich starke und andauernde Veränderungen in der Folge einer Stimulation auftraten, die sich signifikant von zufälligen Veränderungen bei den ausgewerteten Vergleichszeitpunkten unterscheiden. Da die Netzwerkaktivität sich jedoch ständig ändert, konnten keine Unterschiede in der Zeit bis zur nächsten Veränderung zwischen Leermessung und Stimulationen detektiert werden.

Eine weitere erfolgreiche Kooperation war der Ansatz, die vorhandenen GNC in eine Druckkammer zu integrieren (Stubbe u. a., 2015). Dieser Aufbau ermöglichte es den Einfluss von hyperbaren Drücken auf die Aktivität der Netzwerke zu untersuchen. So konnte gezeigt werden, dass die bei der Caissonkrankheit

(Taucherkrankheit, oder auch Tiefenrausch genannt) auftretenden bewußtseinsverändernden Effekte ihre Entsprechung in der veränderten Aktivität der Netzwerke unter Druck finden. Interessanter Weise traten diese Effekte vermindert auf, wenn Netzwerke mit verminderter Gliazellzahl in einem Minimalmedium gehalten wurden: Bei der üblicherweise verwendeten Mischkultur waren signifikante Erhöhungen der Aktivität bei 2 und bei 4 bar zu beobachten, auf dem Minimalmedium mit reduzierten Gliazellwachstum waren diese Änderungen nur bei 4 bar signifikant. Dies bedeutet zum einen, dass für ein möglichst sensibles Testsystem die Mischkultur zu bevorzugen ist, zum anderen, dass die Gliazellen eine größere Rolle bei der Caissonkrankheit haben könnten als bisher bekannt.

15 Ausblick

Der technologische Fortschritt im Bereich MEA liegt zur Zeit vor allem in der Erhöhung der Elektrodendichte zu den sogenannten High Density MEA (kurz: HD MEA. Dies, und besser werdende Auflichtmikroskopie wird es in Zukunft ermöglichen die Strukturen der Neuronalen Netzwerke auf den MEA genauer zu Untersuchen. Dies wird die hier verwendeten mathematischen Ansätze zur Analyse der Netzwerkstruktur ergänzen.

HD MEA ermöglichen einen genaueren Einblick in Netzwerkstruktur, in Ausbreitung von Signalen in Zellen und ergänzt in Zukunft sicher die hier gemachten Berechnungen zur Netzwerkstruktur. Selbstlernende Algorithmen, auch künstliche Intelligenz genannt, könnten die Analyse der zu erwartenden großen Datenmengen in Zukunft unterstützen. Dies ermöglicht auch im Bereich der Pharmakologie weitere Möglichkeiten, z. B. die Analyse der Laufzeiten in Axonen und Dendriten in Echtzeit und entsprechend den Einfluss von Wirkstoffen auf selbige.

Im Bereich Stimulation mit dem UV – Laser müsste der Fokus auf die Untersuchung weiterer Wellenlängen abseits der 337,1 nm gelegt werden, zumal der Stickstofflaser durch seine physikalischen Eigenschaften, insbesondere der Limitierung auf die sehr kurzen Pulse schnell an seine Grenzen kommen wird. Das Konzept der „Optogenetik ohne Genetik“ ist jedenfalls vielversprechend.

Eine naheliegende weitere Anwendung für die Druckkammer ist zum einen im Bereich Tauchen der Test von Gasmischungen, die für tieferes und längeres Tauchen verwendet werden. Auch die Untersuchung von Gasförmigen Schadstoffen ist eine mögliche Anwendung.

16 Literaturverzeichnis

Acland, G. M.; Aguirre, G. D.; Bennett, J.; Aleman, T. S.; Cideciyan, A. V.; Bennicelli, J.; Dejneka, N. S.; Pearce-Kelling, S. E.; Maguire, A. M.; Palczewski, K.; Hauswirth, W. W.; Jacobson, S. G. (2005): „Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness“. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 12 (6), S. 1072–1082, DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.08.008.

Acland, G. M.; Aguirre, G. D.; Ray, J.; Zhang, Q.; Aleman, T. S.; Cideciyan, A. V.; Pearce-Kelling, S. E.; Anand, V.; Zeng, Y.; Maguire, A. M.; Jacobson, S. G.; Hauswirth, W. W.; Bennett, J. (2001): „Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness“. *Nature Genetics*. 28 (1), S. 92–95, DOI: 10.1038/ng0501-92.

Aertsen, A. M. H. J.; Gerstein, G. L. (1985): „Evaluation of neuronal connectivity: Sensitivity of cross-correlation“. *Brain Research*. 340 (2), S. 341–354, DOI: 10.1016/0006-8993(85)90931-X.

Aihara, K.; Takabe, T.; Toyoda, M. (1990): „Chaotic neural networks“. *Physics Letters A*. 144 (6–7), S. 333–340, DOI: 10.1016/0375-9601(90)90136-C.

Akaike, H. (1973): „Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle“. In: Petrov, B. N.; Csaki, F. (Hrsg.) *2nd International Symposium on Information Theory*. Budapest: Akademiai Kiado, S. 267–281.

Arts, M.-J. S. J.; Schill, R. O.; Knigge, T.; Eckwert, H.; Kammenga, J. E.; Köhler, H.-R. (2004): „Stress Proteins (hsp70, hsp60) Induced in Isopods and Nematodes by Field Exposure to Metals in a Gradient near Avonmouth, UK“. *Ecotoxicology*. 13 (8), S. 739–755, DOI: 10.1007/s10646-003-4473-5.

Bailey, B. J. R. (1977): „Tables of the Bonferroni t Statistic“. *Journal of the American Statistical Association*. 72 (358), S. 469–478, DOI: 10.1080/01621459.1977.10481023.

Bakkum, D. J.; Frey, U.; Radivojevic, M.; Russell, T. L.; Müller, J.; Fiscella, M.; Takahashi, H.; Hierlemann, A. (2013): „Tracking axonal action potential propagation on a high-density microelectrode array across hundreds of sites“. *Nature Communications*. 4 (2181), DOI: 10.1038/ncomms3181.

Baumann, W.; Lehmann, M.; Schwinde, A.; Ehret, R.; Brischwein, M.; Wolf, B. (1999): „Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells“. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 55 (1), S. 77–89, DOI: 10.1016/S0925-4005(99)00116-1.

Baumann, W.; Schreiber, E.; Krause, G.; Stüwe, S.; Podssun, A.; Homma, S.; Anlauf, H.; Freund, I.; Rosner, R.; Lehmann, M. (2002): „Multiparametric neurosensor microchip“. *Proc. Euroensors XVI.*, S. 1169–1172.

Belz, R. G.; Piepho, H.-P.; Wu, Rongling (Hrsg.) (2012): „Modeling Effective Dosages in Hormetic Dose-Response Studies“. *PLoS ONE*. 7 (3), S. e33432, DOI: 10.1371/journal.pone.0033432.

Belz, R. G.; Piepho, H.-P. (2015): „Statistical modeling of the hormetic dose zone and the toxic potency completes the quantitative description of hormetic dose responses“. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 34 (5), S. 1169–1177, DOI: 10.1002/etc.2857.

Benabid, A. L.; Benazzouz, A.; Hoffmann, D.; Limousin, P.; Krack, P.; Pollak, P. (1998): „Long-Term Electrical Inhibition of Deep Brain Targets in Movement Disorders“. *Movement Disorders*. 13 (S3), S. 119–125, DOI: 10.1002/mds.870131321.

Benabid, A. L.; Pollak, P.; Seigneuret, P.; Hoffmann, D.; Gay, E.; Perret, J. (1993): „Chronic VIM thalamic stimulation in Parkinson’s disease, essential tremor and extra-pyramidal dyskinesias.“. *Acta neurochirurgica. Supplementum*. 58 , S. 39.

Bennet, R. A.; Perez, J.; Gross, G. W. (2012): „Photonic stimulation of neurons in vitro at 337.1 nm“. Stett, Alfred; Zeck, Günther (Hrsg.) *Conference Proceedings of the 8th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays July 10 - July 13, 2012, Reutlingen, Germany*. Reutlingen: NMI Natural and Medical Sciences Institute at the University of Tuebingen, S. 194–196. — ISBN: 2194-5519

Bettencourt, L. M. A.; Stephens, G. J.; Ham, M. I.; Gross, G. W. (2007): „Functional structure of cortical neuronal networks grown in vitro“. *Physical Review E*. 75 (2), S. 021915, DOI: 10.1103/PhysRevE.75.021915.

Biggs, C. S.; Pearce, B. R.; Fowler, L. J.; Whitton, P. S. (1992): „The effect of sodium valproate on extracellular GABA and other amino acids in the rat ventral hippocampus: an in vivo microdialysis study“. *Brain Research*. 594 (1), S. 138–142, DOI: 10.1016/0006-8993(92)91038-G.

Blackman, F. F. (1905): „Optima and Limiting Factors“. *Annals of Botany*. os-19 (2), S. 281–296.

Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, P.; Greenblatt, J. J.; Rosenberg, S. A.; Klein, H.; Berger, M.; Mullen, C. A.; Ramsey, W. J.; Muul, L.; Morgan, R. A.; Anderson, W. F. (1995): „T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA– SCID: Initial Trial Results After 4 Years“. *Science*. 270 (5235), S. 475–480, DOI: 10.1126/science.270.5235.475.

Bonferroni, C. E. (1961): *Elementi di statistica generale: anno accademico 1940-41-XIX*. Milano: Università commerciale L. Bocconi.

Bonk, S. M.; Oldorf, P.; Peters, R.; Baumann, W.; Gimsa, J. (2015a): „Fast Prototyping of Sensorized Cell Culture Chips and Microfluidic Systems with Ultrashort Laser Pulses“. *Micromachines*. 6 (3), S. 364–374, DOI: 10.3390/mi6030364.

Bonk, S.; Stubbe, M.; Buehler, S.; Tautorat, C.; Baumann, W.; Klinkenberg, E.-D.; Gimsa, J. (2015b): „Design and Characterization of a Sensorized Microfluidic Cell-Culture System with Electro-Thermal Micro-Pumps and Sensors for Cell Adhesion,

Oxygen, and pH on a Glass Chip“. *Biosensors*. 5 (3), S. 513–536, DOI: 10.3390/bios5030513.

Bradford, M. M. (1976): „A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding“. *Analytical Biochemistry*. 72 (1–2), S. 248–254, DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Brischwein, M.; Motrescu, E. R.; Cabala, E.; Otto, A. M.; Grothe, H.; Wolf, B. (2003): „Functional cellular assays with multiparametric silicon sensor chips“. *Lab on a Chip*. 3 (4), S. 234–240, DOI: 10.1039/B308888J.

Buehler, S. M.; Stubbe, M.; Gimsa, U.; Baumann, W.; Gimsa, J. (2011): „A decrease of intracellular ATP is compensated by increased respiration and acidification at sub-lethal parathion concentrations in murine embryonic neuronal cells: Measurements in metabolic cell-culture chips“. *Toxicology Letters*. 207 (2), S. 182–190, DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.09.005.

Buehler, S.; Stubbe, M.; Bonk, S.; Nissen, M.; Titipornpun, K.; Klinkenberg, E.-D.; Baumann, W.; Gimsa, J. (2016): „Cell Monitoring and Manipulation Systems (CMMSs) based on Glass Cell-Culture Chips (GC3s)“. *Micromachines*. 7 (7), S. 106, DOI: 10.3390/mi7070106.

Calabrese, E. J. (2010): „Hormesis and Homeopathy: Introduction“. *Human & Experimental Toxicology*. 29 (7), S. 527–529, DOI: 10.1177/0960327110369769.

Calabrese, E. J. (2008): „Hormesis: Principles and Applications for Pharmacology and Toxicology“. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 3 (1), S. 59–71, DOI: 10.3844/ajptsp.2008.59.71.

Carvalho-de-Souza, J. L.; Treger, J. S.; Dang, B.; Kent, S. B. H.; Pepperberg, D. R.; Bezanilla, F. (2015): „Photosensitivity of Neurons Enabled by Cell-Targeted Gold Nanoparticles“. *Neuron*. 86 (1), S. 207–217, DOI: 10.1016/j.neuron.2015.02.033.

Cideciyan, A. V.; Aleman, T. S.; Boye, S. L.; Schwartz, S. B.; Kaushal, S.; Roman, A. J.; Pang, J.; Sumaroka, A.; Windsor, E. A. M.; Wilson, J. M.; Flotte, T. R.; Fishman, G. A.; Heon, E.; Stone, E. M.; Byrne, B. J.; Jacobson, S. G.; Hauswirth, W. W. (2008): „Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105 (39), S. 15112–15117, DOI: 10.1073/pnas.0807027105.

Das europäische Parlament; Rat der europäischen Union (2006): „Richtlinie 2006/25/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 5. April 2006 über Mindestvorschriften zum Schutz von Sicherheit und Gesundheit der Arbeitnehmer vor der Gefährdung durch physikalische Einwirkungen (künstliche optische Strahlung) (19. Einzelrichtlinie im Sinne des Artikels 16 Absatz 1 der Richtlinie 89/391/EWG)“. *Amtsblatt der Europäischen Union*. L 114 , S. 38–59.

Das europäische Parlament; Rat der europäischen Union (2012): *Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der*

Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. Brüssel: Europäische Gemeinschaft.

Der Rat der Europäischen Gemeinschaften; Waldegrave, W (Hrsg.) (1986): *Richtlinie des Rates 86/609/EWG vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der fuer Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.* Brüssel: Europäische Wirtschaftsgemeinschaft.

Dick, E.; Rajamohan, D.; Ronksley, J.; Denning, C. (2010): „Evaluating the utility of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells for drug screening“. *Biochemical Society Transactions.* 38 (4), S. 1037–1045, DOI: 10.1042/BST0381037.

Dunn, O. J. (1964): „Multiple Comparisons Using Rank Sums“. *Technometrics.* 6 (3), S. 241–252, DOI: 10.1080/00401706.1964.10490181.

Egert, U.; Schlosshauer, B.; Fennrich, S.; Nisch, W.; Fejtl, M.; Knott, T.; Müller, T.; Hämmerle, H. (1998): „A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays“. *Brain Research Protocols.* 2 (4), S. 229–242, DOI: 10.1016/S1385-299X(98)00013-0.

Ehret, R.; Baumann, W.; Brischwein, M.; Schwinde, A.; Stegbauer, K.; Wolf, B. (1997): „Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures“. *Biosensors and Bioelectronics.* 12 (1), S. 29–41, DOI: 10.1016/0956-5663(96)89087-7.

Engel, K.; Hanisch, S. (2014): „Reconstruction of cell-electrode-adjacencies on multielectrode arrays“. *Journal of Computational Neuroscience.*, DOI: 10.1007/s10827-014-0524-6.

Ferrari, G.; Rossini, S.; Giavazzi, R.; Maggioni, D.; Nobili, N.; Soldati, M.; Ungers, G.; Mavilio, F.; Gilboa, E.; Bordignon, C. (1991): „An in vivo model of somatic cell gene therapy for human severe combined immunodeficiency“. *Science (New York, N.Y.).* 251 (4999), S. 1363–1366.

Frohne, H.; Löcherer, K.-H.; Müller, H.; Harriehausen, T.; Schwarzenau, D. (2011): *Moeller Grundlagen der Elektrotechnik.* 22., verb. Aufl. 2011. Vieweg+Teubner Verlag. — ISBN: 978-3-8348-0898-1

Fuhr, G.; Muller, T.; Schnelle, T.; Glasser, H.; Gimsa, J.; Hofmann, U.; Wagner, B. (1997): „Handling and investigation of adherently growing cells and viruses of medical relevance in three-dimensional micro-structures“. *Tenth Annual International Workshop on Micro Electro Mechanical Systems, 1997. MEMS '97, Proceedings.* IEEE, S. 344–349, DOI: 10.1109/MEMSYS.1997.581851. — ISBN: 0-7803-3744-1

Gallati, H.; Pracht, I. (1985): „Bestimmung von Peroxidase mit H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin“. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry.* 23 (8), S. 453–460.

Gibbs, J. P.; Adeyeye, M. C.; Yang, Z.; Shen, D. D. (2004): „Valproic acid uptake by bovine brain microvessel endothelial cells: role of active efflux transport“. *Epilepsy Research*. 58 (1), S. 53–66, DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2003.12.008.

Gimsa, J.; Habel, B.; Schreiber, U.; Rienen, U. van; Strauss, U.; Gimsa, U. (2005): „Choosing electrodes for deep brain stimulation experiments—electrochemical considerations“. *Journal of Neuroscience Methods*. 142 (2), S. 251–265, DOI: 10.1016/j.jneumeth.2004.09.001.

Golan, H.; Grossman, Y. (1992): „Synaptic transmission at high pressure: Effects of $[Ca^{2+}]_o$ “. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 103 (1), S. 113–118, DOI: 10.1016/0300-9629(92)90249-P.

Goodman, Y.; Mattson, M. P. (1996): „Ceramide Protects Hippocampal Neurons Against Excitotoxic and Oxidative Insults, and Amyloid β -Peptide Toxicity“. *Journal of Neurochemistry*. 66 (2), S. 869–872, DOI: 10.1046/j.1471-4159.1996.66020869.x.

Gross, G. W.; Pancrazio, J. J. (2006): „Neuronal Network Biosensors“. In: Knopf, George K.; Bassi, Amarjeet S. (Hrsg.) *Smart Biosensor Technology*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group (Optical Science and Engineering). — ISBN: 978-0-8493-3759-8

Gross, G. W.; Rhoades, B.; Jordan, R. (1992): „Neuronal networks for biochemical sensing“. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 6 (1–3), S. 1–8, DOI: 10.1016/0925-4005(92)80022-P.

Gross, G. W.; Rhoades, B. K.; Azzazy, H. M. E.; Ming-Chi Wu (1995): „The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors“. *Biosensors and Bioelectronics*. 10 (6–7), S. 553–567, DOI: 10.1016/0956-5663(95)96931-N.

Gross, G. W.; Rhoades, B. K.; Kowalski, J. M. (1993a): „DYNAMICS OF BURST PATTERNS GENERATED BY MONOLAYER NETWORKS IN CULTURE“. In: Bothe, Hans-Werner; Eckmiller, Rolf; Samii, Madjid (Hrsg.) *Neurobionics*. Amsterdam: Elsevier, S. 89–121. — ISBN: 978-0-444-89958-3

Gross, G. W.; Rhoades, B. K.; Reust, D. L.; Schwalm, F. U. (1993b): „Stimulation of monolayer networks in culture through thin-film indium-tin oxide recording electrodes“. *Journal of Neuroscience Methods*. 50 (2), S. 131–143, DOI: 10.1016/0165-0270(93)90001-8.

Gross, G. W.; Rieske, E.; Kreutzberg, G. W.; Meyer, A. (1977): „A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro“. *Neuroscience Letters*. 6 (2–3), S. 101–105, DOI: 10.1016/0304-3940(77)90003-9.

Gross, G. W.; Schwalm, F. U. (1994): „A closed flow chamber for long-term multichannel recording and optical monitoring“. *Journal of Neuroscience Methods*. 52 (1), S. 73–85, DOI: 10.1016/0165-0270(94)90059-0.

Gross, G. W.; Wen, W. Y.; Lin, J. W. (1985): „Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures“. *Journal of Neuroscience Methods*. 15 (3), S. 243–252, DOI: 10.1016/0165-0270(85)90105-0.

Grossman, Y.; Kendig, J. J. (1988): „Synaptic integrative properties at hyperbaric pressure“. *Journal of Neurophysiology*. 60 (4), S. 1497–1512.

Hacein-Bey-Abina, S.; von Kalle, C.; Schmidt, M.; Le Deist, F.; Wulffraat, N.; McIntyre, E.; Radford, I.; Villeval, J.-L.; Fraser, C. C.; Cavazzana-Calvo, M.; Fischer, A. (2003): „A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency“. *New England Journal of Medicine*. 348 (3), S. 255–256, DOI: 10.1056/NEJM200301163480314.

Heikkilä, T. J.; Ylä-Outinen, L.; Tanskanen, J. M. A.; Lappalainen, R. S.; Skottman, H.; Suuronen, R.; Mikkonen, J. E.; Hyttinen, J. A. K.; Narkilahti, S. (2009): „Human embryonic stem cell-derived neuronal cells form spontaneously active neuronal networks in vitro“. *Experimental Neurology*. 218 (1), S. 109–116, DOI: 10.1016/j.expneurol.2009.04.011.

Ilchmann, F.; Ressler, J.; Meyer, J.; Grothe, H.; Wolf, B. (2006): „Recording chamber for glass sensor chips with MEA and integrated oxygen-, pH- and temperature sensors“. Stett, Alfred (Hrsg.) *Conference proceedings of the 5th International Meeting on Substrate Integrated Micro-Electrode Arrays July 4 - 7, 2006, Reutlingen, Germany*. Stuttgart: BIOPRO Baden-Württemberg GmbH, S. 222–223. — ISBN: 3-938345-02-0

Johannessen, C. U. (2000): „Mechanisms of action of valproate: a commentary“. *Neurochemistry International*. 37 (2–3), S. 103–110, DOI: 10.1016/S0197-0186(00)00013-9.

Johnstone, A. F. M.; Gross, G. W.; Weiss, D. G.; Schroeder, O. H.-U.; Gramowski, A.; Shafer, T. J. (2010): „Microelectrode arrays: A physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century“. *NeuroToxicology*. 31 (4), S. 331–350, DOI: 10.1016/j.neuro.2010.04.001.

Joye, N.; Schmid, A.; Leblebici, Y. (2009): „Electrical modeling of the cell–electrode interface for recording neural activity from high-density microelectrode arrays“. *Neurocomputing*. 73 (1–3), S. 250–259, DOI: 10.1016/j.neucom.2009.09.006.

Kaplitt, M. G.; Feigin, A.; Tang, C.; Fitzsimons, H. L.; Mattis, P.; Lawlor, P. A.; Bland, R. J.; Young, D.; Strybing, K.; Eidelberg, D.; Doring, M. J. (2007): „Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson’s disease: an open label, phase I trial“. *The Lancet*. 369 (9579), S. 2097–2105, DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60982-9.

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 and Bioelectronics*. 16 (7–8), S. 513–525, DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00165-8.

Kirkpatrick, J. B.; Higgins, M. L.; Lucas, J. H.; Gross, G. W. (1985): „In vitro Simulation of Neural Trauma by Laser“. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 44 (3), S. 268–284.

Knollmann, B. C. (2013): „Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes Boutique Science or Valuable Arrhythmia Model?“. *Circulation Research*. 112 (6), S. 969–976, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300567.

Koester, P. J.; Buehler, S. M.; Stubbe, M.; Tautorat, C.; Niendorf, M.; Baumann, W.; Gimsa, J. (2010): „Modular glass chip system measuring the electric activity and adhesion of neuronal cells—application and drug testing with sodium valproic acid“. *Lab on a Chip*. 10 (12), S. 1579–1586, DOI: 10.1039/B923687B.

Kowalski, J. M.; Albert, G. L.; Rhoades, B. K.; Gross, G. W. (1992): „Neuronal networks with spontaneous, correlated bursting activity: Theory and simulations“. *Neural Networks*. 5 (5), S. 805–822, DOI: 10.1016/S0893-6080(05)80141-8.

Krämer, G.; Walden, J. (2013): *Valproinsäure*. Springer-Verlag. — ISBN: 978-3-642-56329-4

Kravitz, A. V.; Freeze, B. S.; Parker, P. R. L.; Kay, K.; Thwin, M. T.; Deisseroth, K.; Kreitzer, A. C. (2010): „Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry“. *Nature*. 466 (7306), S. 622–626, DOI: 10.1038/nature09159.

Krech, T.; Scheuerer, E.; Geffers, R.; Kreipe, H.; Lehmann, U.; Christgen, M. (2012): „ABCB1/MDR1 contributes to the anticancer drug-resistant phenotype of IPH-926 human lobular breast cancer cells“. *Cancer Letters*. 315 (2), S. 153–160, DOI: 10.1016/j.canlet.2011.09.038.

Kulpa-Eddy, J.; Srinivas, G.; Halder, M.; Hill, R.; Brown, K.; Roth, J.; Draayer, H.; Galvin, J.; Claassen, I.; Gifford, G.; Woodland, R.; Doelling, V.; Jones, B.; Stokes, W. S. (2011): „Non-animal replacement methods for veterinary vaccine potency testing: state of the science and future directions“. *Procedia in Vaccinology*. (International Workshop on Alternative Methods to Reduce, Refine, and Replace the Use of Animals in Vaccine Potency and Safety Testing: State of the Science and Future Directions) 5, S. 60–83, DOI: 10.1016/j.provac.2011.10.005.

Kwon, K. Y.; Lee, H.-M.; Ghovanloo, M.; Weber, A.; Li, W. (2015): „Design, fabrication, and packaging of an integrated, wirelessly-powered optrode array for optogenetics application“. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 9 (69), DOI: 10.3389/fnsys.2015.00069.

Lagali, P. S.; Balya, D.; Awatramani, G. B.; Münch, T. A.; Kim, D. S.; Busskamp, V.; Cepko, C. L.; Roska, B. (2008): „Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration“. *Nature Neuroscience*. 11 (6), S. 667–675, DOI: 10.1038/nn.2117.

Legédy, C. R.; Salzman, M. (1985): „Bursts and recurrences of bursts in the spike trains of spontaneously active striate cortex neurons“. *Journal of Neurophysiology*. 53 (4), S. 926–939, DOI: 10.1152/jn.1985.53.4.926.

Lorentz, H. A. (1906): *Versuch einer Theorie der electrischen und optischen Erscheinungen in bewegten Körpern*. Leipzig: B.G. Teubner.

Luder, A. S.; Parks, J. K.; Frerman, F.; Parker, W. D. (1990): „Inactivation of beef brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by valproic acid and valproic acid

metabolites. Possible mechanism of anticonvulsant and toxic actions.“. *Journal of Clinical Investigation*. 86 (5), S. 1574–1581, DOI: 10.1172/JCI114877.

Marom, S.; Shahaf, G. (2002): „Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: lessons beyond anatomy“. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 35 (01), DOI: 10.1017/S0033583501003742.

Martin, T. L.; Mufson, E. J.; Mesulam, M. M. (1984): „The light side of horseradish peroxidase histochemistry.“. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 32 (7), S. 793–793, DOI: 10.1177/32.7.6736628.

Matsuyama, M.; Ohashi, Y.; Tsubota, T.; Yaguchi, M.; Kato, S.; Kobayashi, K.; Miyashita, Y. (2015): „Avian sarcoma leukemia virus receptor-envelope system for simultaneous dissection of multiple neural circuits in mammalian brain“. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112 (22), S. E2947–E2956, DOI: 10.1073/pnas.1423963112.

Mattis, J.; Tye, K. M.; Ferenczi, E. A.; Ramakrishnan, C.; O’Shea, D. J.; Prakash, R.; Gunaydin, L. A.; Hyun, M.; Fenno, L. E.; Gradinaru, V.; Yizhar, O.; Deisseroth, K. (2012): „Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins“. *Nature Methods*. 9 (2), S. 159–172, DOI: 10.1038/nmeth.1808.

Mattson, M. P. (2008): „Hormesis defined“. *Ageing Research Reviews*. (Hormesis) 7 (1), S. 1–7, DOI: 10.1016/j.arr.2007.08.007.

McConnell, E. R.; McClain, M. A.; Ross, J.; LeFew, W. R.; Shafer, T. J. (2012): „Evaluation of multi-well microelectrode arrays for neurotoxicity screening using a chemical training set“. *NeuroToxicology*. 33 (5), S. 1048–1057, DOI: 10.1016/j.neuro.2012.05.001.

Meyer, J. F.; Wolf, B.; Gross, G. W. (2009): „Magnetic Stimulation and Depression of Mammalian Networks in Primary Neuronal Cell Cultures“. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 56 (5), S. 1512–1523, DOI: 10.1109/TBME.2009.2013961.

Nick, C.; F. Schlaak, H.; Thielemann, C. (2015): „Simulation and Measurement of Neuroelectrodes’ Characteristics with Integrated High Aspect Ratio Nano Structures“. *AIMS Materials Science*. 2 (3), S. 189–202, DOI: 10.3934/matricsci.2015.3.189.

Nissen, M.; Buehler, S. M.; Bonk, S. M.; Stubbe, M.; Baumann, W.; Gimsa, J. (2012): „Sensors for Glass Cell-Culture Chips (GC3)“. Stett, Alfred; Zeck, Günther (Hrsg.) *Conference Proceedings of the 8th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays July 10 - July 13, 2012, Reutlingen, Germany*. Reutlingen: NMI Natural and Medical Sciences Institute at the University of Tuebingen, S. 290. — ISBN: 13 978-3-938345-08-5

Nissen, M.; Buehler, S. M.; Stubbe, M.; Gimsa, J. (2016): „Neuronal in vitro activity is more sensitive to valproate than intracellular ATP: Considerations on conversion problems of IC50 in vitro data for animal replacement“. *Biosystems*. 144 , S. 35–45, DOI: 10.1016/j.biosystems.2016.04.009.

Noonan, K. E.; Beck, C.; Holzmayer, T. A.; Chin, J. E.; Wunder, J. S.; Andrulis, I. L.; Gazdar, A. F.; Willman, C. L.; Griffith, B.; Hoff, D. D. V. (1990): „Quantitative analysis

of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction.“. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87 (18), S. 7160–7164, DOI: 10.1073/pnas.87.18.7160.

Olucha, F.; Martínez-García, F.; López-García, C. (1985): „A new stabilizing agent for the tetramethyl benzidine (TMB) reaction product in the histochemical detection of horseradish peroxidase (HRP)“. *Journal of Neuroscience Methods*. 13 (2), S. 131–138, DOI: 10.1016/0165-0270(85)90025-1.

Packer, A. M.; Roska, B.; Häusser, M. (2013): „Targeting neurons and photons for optogenetics“. *Nature Neuroscience*. 16 (7), S. 805–815, DOI: 10.1038/nn.3427.

Parenti, C.; Turnaturi, R.; Aricò, G.; Gramowski-Voß, A.; Schroeder, O. H.-U.; Marrazzo, A.; Prezzavento, O.; Ronsisvalle, S.; Scoto, G. M.; Ronsisvalle, G.; Pasquinucci, L. (2013): „The multitarget opioid ligand LP1’s effects in persistent pain and in primary cell neuronal cultures“. *Neuropharmacology*. 71 , S. 70–82, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.008.

PubChem (o. J.): „Valproic Acid“. *PubChem*. Abgerufen am 29.06.2023 von <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3121>.

Raem, A.; Rauch, P. (2006): „8.1.1 Henning Test“. In: *Immunoassays*. Auflage: 2006. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, S. 276–277. — ISBN: 978-3-8274-1636-0

Ransom, B. R.; Neale, E.; Henkart, M.; Bullock, P. N.; Nelson, P. G. (1977): „Mouse spinal cord in cell culture. I. Morphology and intrinsic neuronal electrophysiologic properties“. *Journal of Neurophysiology*. 40 (5), S. 1132–1150.

Reimer, T.; Baumann, W.; Gimsa, J. (2012): „Population Bursts of Parvalbumin-Positive Interneurons Inhibit Spiking Pyramidal Cells in Spontaneously Active Cortical in Vitro Networks“. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 6 (11), S. 1033–1042.

Renault, R.; Sukenik, N.; Descroix, S.; Malaquin, L.; Viovy, J.-L.; Peyrin, J.-M.; Bottani, S.; Monceau, P.; Moses, E.; Vignes, M. (2015): „Combining microfluidics, optogenetics and calcium imaging to study neuronal communication in vitro“. *PLoS One*. 10 (4), S. e0120680, DOI: 10.1371/journal.pone.0120680.

Santoro, F.; Dasgupta, S.; Schnitker, J.; Auth, T.; Neumann, E.; Panaitov, G.; Gompper, G.; Offenhäusser, A. (2014): „Interfacing Electrogenic Cells with 3D Nanoelectrodes: Position, Shape, and Size Matter“. *ACS Nano*. 8 (7), S. 6713–6723, DOI: 10.1021/nn500393p.

Schill, R. O.; Steinbrück, G. H. B.; Köhler, H.-R. (2004): „Stress gene (hsp70) sequences and quantitative expression in *Milnesium tardigradum* (Tardigrada) during active and cryptobiotic stages“. *Journal of Experimental Biology*. 207 (10), S. 1607–1613, DOI: 10.1242/jeb.00935.

Schoonen, W. G. E. J.; de Roos, J. A. D. M.; Westerink, W. M. A.; Débiton, E. (2005): „Cytotoxic effects of 110 reference compounds on HepG2 cells and for 60 compounds on HeLa, ECC-1 and CHO cells.: II Mechanistic assays on NAD(P)H,

ATP and DNA contents“. *Toxicology in Vitro*. 19 (4), S. 491–503, DOI: 10.1016/j.tiv.2005.01.002.

Shahaf, G.; Marom, S. (2001): „Learning in Networks of Cortical Neurons“. *The Journal of Neuroscience*. 21 (22), S. 8782–8788.

Simonelli, F.; Maguire, A. M.; Testa, F.; Pierce, E. A.; Mingozzi, F.; Bennicelli, J. L.; Rossi, S.; Marshall, K.; Banfi, S.; Surace, E. M.; Sun, J.; Redmond, T. M.; Zhu, X.; Shindler, K. S.; Ying, G.-S.; Ziviello, C.; Acerra, C.; Wright, J. F.; McDonnell, J. W.; High, K. A.; Bennett, J.; Auricchio, A. (2010): „Gene Therapy for Leber’s Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1.5 Years After Vector Administration“. *Molecular Therapy*. 18 (3), S. 643–650, DOI: 10.1038/mt.2009.277.

Stubbe, M. (2012): *Anwendung elektrischer Polarisationsphänomene in Lab-on-Chip-Systemen: Zellcharakterisierung und Medienmanipulation*. Rostock: Universitätsbibliothek Rostock.

Stubbe, M.; Nissen, M.; Schroeder, J.; Gimsa, J. (2015): „The effect of hyperbaric air on the electric activity of neuronal in vitro networks“. *Biosensors and Bioelectronics*. 73 (1), S. 153–159, DOI: 10.1016/j.bios.2015.05.052.

Sztajnkrzyca, M. D. (2002): „Valproic Acid Toxicity: Overview and Management“. *Clinical Toxicology*. 40 (6), S. 789–801, DOI: 10.1081/CLT-120014645.

Thomas, C. E.; Ehrhardt, A.; Kay, M. A. (2003): „Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy“. *Nature Reviews Genetics*. 4 (5), S. 346–358, DOI: 10.1038/nrg1066.

Thomas Jr., C. A.; Springer, P. A.; Loeb, G. E.; Berwald-Netter, Y.; Okun, L. M. (1972): „A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells“. *Experimental Cell Research*. 74 (1), S. 61–66, DOI: 10.1016/0014-4827(72)90481-8.

Toivonen, S.; Ojala, M.; Hyysalo, A.; Ilmarinen, T.; Rajala, K.; Pekkanen-Mattila, M.; Aanismaa, R.; Lundin, K.; Palgi, J.; Weltner, J.; Trokovic, R.; Silvennoinen, O.; Skottman, H.; Narkilahti, S.; Aalto-Setälä, K.; Otonkoski, T. (2013): „Comparative Analysis of Targeted Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs) and Human Embryonic Stem Cells Reveals Variability Associated With Incomplete Transgene Silencing in Retrovirally Derived hiPSC Lines“. *Stem Cells Translational Medicine*. 2 (2), S. 83–93, DOI: 10.5966/sctm.2012-0047.

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: the official journal of the Society for Neuroscience*. 25 (3), S. 680–688, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4209-04.2005.

Wagenaar, D. A.; Pine, J.; Potter, S. M. (2004): „Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays“. *Journal of Neuroscience Methods*. 138 (1–2), S. 27–37, DOI: 10.1016/j.jneumeth.2004.03.005.

Wagenaar, D. A.; Potter, S. M. (2004): „A versatile all-channel stimulator for electrode arrays, with real-time control“. *Journal of Neural Engineering*. 1 (1), S. 39, DOI: 10.1088/1741-2560/1/1/006.

Walther, S.; Bonk, S. M.; Stubbe, M.; Baumann, W.; Gimsa, J. (2014): „Mikrofluidik, innere Sensorik und Strukturentwurf für ein 3D-Zellkultursystem“. In: Neumann, Hans-Georg; Klinkenberg, Ernst-Dieter (Hrsg.) *Knöchernen Geweberegeneration Zellphysiologie im Dreidimensionalen*. Herzogenrath: Shaker, S. 73–112. — ISBN: 978-3-8440-3049-5

Whittle, S. R.; Turner, A. J. (1978): „Effects of the anticonvulsant sodium valproate on gamma-aminobutyrate and aldehyde metabolism in ox brain.“. *Journal of Neurochemistry*. 31 (6), S. 1453–1459, DOI: 10.1111/j.1471-4159.1978.tb06572.x.

Williams, J. C.; Entcheva, E. (2015): „Optogenetic versus Electrical Stimulation of Human Cardiomyocytes: Modeling Insights“. *Biophysical Journal*. 108 (8), S. 1934–1945, DOI: 10.1016/j.bpj.2015.03.032.

Wolf, B.; Brischwein, M.; Baumann, W.; Ehret, R.; Kraus, M. (1998): „Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The PhysioControl-Microsystem (PCM®)“. *Biosensors and Bioelectronics*. 13 (5), S. 501–509, DOI: 10.1016/S0956-5663(97)00136-X.

Wolf, B.; Brischwein, M.; Grothe, H.; Stepper, C.; Ressler, J.; Weyh, T. (2006): „Lab-on-a-Chip Systems for Cellular Assays“. In: Urban, Gerald A. (Hrsg.) *BioMEMS*. Springer US (Microsystems), S. 269–307. — ISBN: 978-0-387-28731-7

Wrobel, G.; Höller, M.; Ingebrandt, S.; Dieluweit, S.; Sommerhage, F.; Bochem, H. P.; Offenhäusser, A. (2008): „Transmission electron microscopy study of the cell–sensor interface“. *Journal of the Royal Society Interface*. 5 (19), S. 213–222, DOI: 10.1098/rsif.2007.1094.

Wrobel, G.; Zhang, Y.; Krause, H.-J.; Wolters, N.; Sommerhage, F.; Offenhäusser, A.; Ingebrandt, S. (2007): „Influence of the first amplifier stage in MEA systems on extracellular signal shapes“. *Biosensors and Bioelectronics*. 22 (6), S. 1092–1096, DOI: 10.1016/j.bios.2006.03.023.

Wu, C.; V. Gopal, K.; Lukas, T. J.; Gross, G. W.; Moore, E. J. (2014): „Pharmacodynamics of potassium channel openers in cultured neuronal networks“. *European Journal of Pharmacology*. 732 , S. 68–75, DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.03.017.

Yalow, R. S.; Berson, S. A. (1960): „IMMUNOASSAY OF ENDOGENOUS PLASMA INSULIN IN MAN“. *Journal of Clinical Investigation*. 39 (7), S. 1157–1175.

Zhang, F.; Wang, L.-P.; Brauner, M.; Liewald, J. F.; Kay, K.; Watzke, N.; Wood, P. G.; Bamberg, E.; Nagel, G.; Gottschalk, A.; Deisseroth, K. (2007): „Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry“. *Nature*. 446 (7136), S. 633–639, DOI: 10.1038/nature05744.

Zhang, J.; Laiwalla, F.; Kim, J. A.; Urabe, H.; Wagenen, R. V.; Song, Y.-K.; Connors, B. W.; Zhang, F.; Deisseroth, K.; Nurmikko, A. V. (2009): „Integrated device for optical stimulation and spatiotemporal electrical recording of neural activity in light-sensitized brain tissue“. *Journal of Neural Engineering*. 6 (5), S. 055007, DOI: 10.1088/1741-2560/6/5/055007.

17 Danksagung

Mein Dank gilt Professor Jan Gimsa¹, Professor Guenter Gross² und Dr. Werner Baumann¹ für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die Ermöglichung und Betreuung der Forschungsarbeiten für diese Dissertation. Darüber hinaus gilt mein Dank Dr. Sebastian Bühler^{1,3}, Dr. Oliver Klink¹, Dr. Tom Reimer¹, Dr. Marco Stubbe¹, Sebastian Hanisch¹, Ryan Bennet² und Ali Khademian² für die Unterstützung und Kooperation im wissenschaftlichen Bereich, Thomas Kröger¹, Jannika Lossner¹, Dr. Carsten Tautorat¹, Ahmet Ors², Keith Rommel² und John White² für die Unterstützung und Kooperation im technischen Bereich, Jessica Schröder¹, Reik Modrozynski¹, Akadiri Aziz², Karan Bhakta², Nicole Calderone² und Christina Nguyen² für die Unterstützung im Bereich der Zellkultur, Dr. Gerd Nürnberg³ für die Beratung bei der Modellierung der VPA - Daten sowie Sebastian Bonk¹, Phillip Wysotzki¹, Jason Gibson², David Smith², Stefanie Frankholz, Lennart Jörn Peter Frankholz sowie meinen Eltern, Barbara Nissen und Detlef Nissen.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich beim DFG Graduiertenkolleg welisa (1505/1 und 1505/2).

1 Angehörige oder Alumni der Universität Rostock, Deutschland

2 Angehörige oder Alumni der University of North Texas, Denton, TX, USA

3 Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf, Deutschland

18 Anhang

A1.1 Programm für den Datenimport: „plexon_read“

Programmierung: Jannika Lossner, LS BPY der Universität Rostock, Rostock, Deutschland

Das Programm öffnet und importiert die Messdaten in die Matlab Programmierumgebung. Als Eingang wird eine Tabelle erwartet, die mit dem Programm Neuroexplorer aus der von dem Verstärker bereitgestellten Datei erzeugt wird.

```
function [data_array, names_array]= plexon_read(filename_m)
%%%%---- Datei öffnen ----%%%%

filename='\big.uni-rostock.de\jl285\Profile\Desktop\Experiment 24.txt';
fid=fopen(filename_m, 'r');
if(fid<0)
    fprintf('Kann Datei %s nicht öffnen \n', filename_m);
    return;
end
%%
tic % start zählen den verbrauchten rechenzeit

%%%%---- Zeilen zählen ----%%%%

numlines=0;
tline=fgetl(fid);

while(tline~-=-1)
    numlines=numlines+1;
    tline=fgetl(fid);
end

fclose(fid); % Datei schließen und neu öffnen, um Daten einzulesen
fid=fopen(filename_m, 'r');

%%%%---- Spalten zählen und Namen einlesen ----%%%%

numchannels=1;
names_array(1,1:7)=''; % Namenarray erst mit einer Spalte, wird in jedem Schritt erweitert

tline=fgetl(fid); % Erste Zeile (Spaltenbeschriftungen) einlesen

tlen=numel(tline)+1;
tline(tlen)=' '; % Whitespace anhängen, um letztes Spalten-"Ende" zu markieren
buffer=' ';

c=1;
s=0;
```

```

while(c<=tlen)
    if(isspace(tline(c)))    % True: Spalte zu Ende, False/Else: Ziffer/Zeichen
        if(s==0)           % Wenn vor diesem Whitespace seit dem letzten Char keiner anderer war
            if(numel(buffer)>1) % Und etwas in dem Buffer steht
                names_array(numchannels,1:numel(buffer))=buffer; % Namen aus dem Buffer in das Array,
auslesbar als channelnames(kanalnr,:)
                buffer=' '; % Buffer resetten
            end
            numchannels=numchannels+1;
            s=1;
        else
            s=0;
        end
    else % Wenn kein Whitespace, Charakter in den Buffer schreiben
        buffer(numel(buffer)+1)=tline(c);
        s=0;
    end
    c=c+1;

end
disp('read data from file ');
disp('created channel names array');
toc
disp('processing... ');
%%%
numchannels=numchannels-1; % Schleife zählt immer 1 zu weit, kann aber nicht bei 0 beginnen

%%%%%%---- Werte, beginnend in Zeile 2 (nach Überschrift) einlesen ----%%%%%%%%
%%%

l=150; %---- Welche Länge soll der gleitende Mittelwert haben?

data_array=NaN(numchannels,numlines,5); % Größe des Datenarray vordefinieren, um Zeit zu sparen
% Mit NaN füllen, damit keine
% falschen Einträge entstehen
% Format zum abrufen: channel(kanalnr, zeile, p)
% p=1: Timestamp
% p=2: Zeitdifferenz
% p=3: Gleitender Mittelwert
% p=4: Mittlere Frequenz (1 / mittlere Zeit zwischen Impulsen)
% p=5: Burst ja/nein

line=1;
tline=fgetl(fid);

while(tline~= -1)
    tlen=numel(tline)+1; % Whitespace an das Ende anhängen, um Spaltenende zu markieren
    tline(tlen)=' ';
    s=0;
    c=1;
    buffer='0';
    column=1;

```

```

while(c<=tlen)
    if(isspace(tline(c)))    % True: Spalte zu Ende, False/Else: Ziffer/Zeichen
        if(s==0)           % Wenn vor diesem Whitespace seit dem letzten Char keiner anderer war
            if(numel(buffer)>1) % Und etwas in dem Buffer steht

                %%% CONVERT BUFFER: String to double %%%
                TIME=str2double(buffer(2:numel(buffer)));
                buffer='0';

                %%% TIMESTAMP %%%
                data_array(column,line,1)=TIME;

            end

            column=column+1;
            s=1;
        else
            s=0;
        end
        else % Falls es kein Whitespace ist, in Buffer laden
            buffer(numel(buffer)+1)=tline(c);
            s=0;
        end
        c=c+1;
    end

    line=line+1;
    tline=fgetl(fid);
end
disp(' ');
disp('created channel data array');
toc % anzeigen der verbrauchten cpu time
disp('processing... ');

```

A1.2 Programm zur Auswertung: „plexon_table_file“

Konzeptionierung: Matthias Nissen, LS BPY der Universität Rostock, Rostock, Deutschland

Programmierung: Jannika Lossner, Matthias Nissen und Dr. Marco Stubbe LS BPY der Universität Rostock, Rostock, Deutschland

Programm zur Auswertung der Messdaten. Die mit dem Programm A1.1 in Matlab eingelesenen Daten werden zu den jeweiligen Stimulationszeitpunkten auf Reaktionen untersucht. Das Programm kann als Funktion in Matlab aufgerufen werden. Es wird jeweils der Stimulationszeitpunkt (stim_first) und die Stimulationsdauer (stim_length) als Parameter übergeben. Weitere Details zur Bedienung siehe Abschnitt 12.2.4.

```

function []= plexon_table_file(data_array, names_array, stim_first, stim_length, basename)

% Setting time frames and time points

bin_size=1;           % Binsize for calculations [s]
%stim_first=7781;     % Starting point of stimulations [s], array for multiple stimulations [1.,2.,3.]
(array buggy)
%stim_length=1;      % Duration of stimulations [s], array is buggy
length_before=60;    % Length of the observed time frame before stimulations [s]
length_after=60-stim_length; % Length of the observed time frame after the end of the stimulations [s]
stim_dsp=61;         % Index of the dsp with the stimulus input, 0 if none or already set in
opendata.

%%%%%%%%%% Setting variables

filename = [basename,'_',num2str(stim_first),'_',num2str(stim_length)]; % Speicherpfad für die txt-
Tabelle OHNE Endung. Graphik wird mit gleichem Namen als .pgm gespeichert

% Ttest-settings

alpha = 0.05;        % Significance level
vartype = 'unequal'; % Null hypothesis
tail = 'both';       % two sided reaction if inhibitions are taken into concern

% Plot-Settings
%base=0;             % Offset, removed not scientifically correct.

graphik=1;          % Generate graphics (yes/no) (1/0)

% Allignemnt of the amplifier's digital signalprozessors (dsp) to the MEA-
% pads
% Left (element position in vector): Mea pad number
% Right (element value in vector): dsp
% Not recorded MEA electrodes are commented out (only 32 dsp amp on 64 MEA
% pads)

chan_sig=zeros(64);
chan_sig=(1:64); %% for a 64 channel amplifier

% Positions of the pads in the MEA
signalmap=[64, 24, 26, 29, 32, 35, 37, 64;
           21, 22, 25, 30, 31, 36, 39, 40;
           19, 20, 23, 28, 33, 38, 41, 42;
           16, 17, 18, 27, 34, 43, 44, 45;
           15, 14, 13, 4, 57, 48, 47, 46;
           12, 11, 8, 3, 58, 53, 50, 49;
           10, 9, 6, 1, 60, 55, 52, 51;
           64, 7, 5, 2, 59, 56, 54, 64];

% data_array;
% size(data_array)
% names_array
% size(names_array)

```

```

%% Find and separate channels recording stimulus input to matrix stim
% stim_dsp=1; %check weather allready set in the header!
if stim_dsp~=0 && (exist('stim','var') == 0)
dsps=(zeros(1,length(names_array)));
for c=1:length(names_array)
dsps(c,1)=str2double(names_array(c,5:7));
end
nsc=length(dsps(dsps==stim_dsp)); % number stimulus channels, if more than one
nsc0=nsc;

stim = (zeros(nsc,size(data_array,2)));
for c=1:length(names_array)
if dsps(c,1)==stim_dsp
stim (nsc0-nsc+1,:) = stim (nsc0-nsc+1,:) + data_array(c,:,1);
data_array(c,:,1) = [NaN];
nsc=nsc-1;
end
end
end

%% More variables
numchannels=numel(data_array(:,1,1));
numlines=numel(data_array(1,:,1));

maxtime=nanmax(nanmax(nanmax(data_array)));
count=zeros(floor(maxtime/bin_size)+1, numchannels);
total=zeros(floor(maxtime/bin_size)+1,1);

%% Start Calculations for every Stimulus
for s=1:size(stim_first)

seg=zeros(4);
seg(2) = floor(stim_first(s)/bin_size); % Stimulation Start (rounded down)
seg(1) = seg(2) - floor(length_before/bin_size) -1; % Start observed time frame before
stimulation < bin_size wird trotzdem ein Wert beachtet
seg(3) = seg(2) + floor(stim_length(s)/bin_size) +1; % Stimulation stop (rounded up)
seg(4) = seg(3) + floor(length_after/bin_size) +1; % Stop observed time frame (rounded up)

file_data=zeros(numchannels, 6); % 1 for names

ttest_h=zeros(numchannels,1); % Variable für Hypothesenerfüllung
ttest_p=zeros(numchannels,1); % Variable für P auf Ttest

for c=1:numchannels %%% Daten ermitteln und berechnen
l=1;

%% Timestamps auszählen bei welchem bin ist signal vorhanden und eintragen %%%
%% Count loop for calculation of signal counts/bin %%%

while(l<=numlines && ~isnan(data_array(c,l,1)))

```

```

stamp=data_array(c,l,1);

count(floor(stamp/bin_size)+1, c) = count(floor(stamp/bin_size)+1, c)+1; %Pro Kanal zählen
total(floor(stamp/bin_size)+1) = total(floor(stamp/bin_size)+1)+1; % Gesamtzählung
l=l+1;
end

% %%% Uncomment for converting counts/bin [N/bin_size s] to frequency [Hz]
% count=count./bin_size;
% total=total./bin_size;

% %%% Auszugebende Daten ermitteln %%%
% %%% Calculating Mean and Standarddeviation before, during and after
% %%% stimulation, respectively

for h=1:3
    file_data(c,h*2-1)=nanmean(count(seg(h):seg(h+1),c));
    file_data(c,h*2)=nanstd(count(seg(h):seg(h+1),c));
end

% %%% Ttest comparing values before stimulation start and after
% %%% stimulation end
% [ttest_h(c),ttest_p(c)]=ranksum(count(seg(3):seg(4),c),count(seg(1):seg(2),c),'Alpha',alpha,'Tail',tail);
% [ttest_h(c),ttest_p(c)]=ttest2(count(seg(3):seg(4),c),count(seg(1):seg(2),c),'Alpha',alpha,'Tail',tail,'Vartype',v
artype);

end

%Percent Participation per channel
participation_c = (100.*length(ttest_h(ttest_h==1))/length(ttest_h(~any(isnan(ttest_h), 2), :))));

% %%% Marco Stubbe; zusammenzählen der signale pro pad zur statistischen
% analyse --> Version funktioniert auch gibt komplette matrix über alle
% bins aus
% % count
% padnames = [];
% padcount = [];
% padcountall = [];
%
% ll=1;
% tic
% for c=1:(numchannels-2) %%% sortieren+ summieren der counts pro elektrode für jedes bin, -2 weil
hinten start und stopp dranne hängt in count
%
% if c == 1
%     a=0;
%     padnames = {names_array(c,5:7)}; % erster name für die pads
% elseif c>1
%     a=1;
% end
% padname1 = (names_array(c-a,5:7));
% padname2 = (names_array(c,5:7));
% trufal = isequal(padname2,padname1);
%

```

```

%   if trufal == 0
%       padnames = horzcat(padnames,padname2);
%       padcount = [];
%       ll=ll+1;
%   end
%
%   padcount = horzcat(padcount, count(:,c));
%   padcountall(:,ll) = sum(padcount,2);
% end
%% padnames
%% padcountall
%
% for i = 1: length(padnames)
%
%
[ttest_h(i),ttest_p(i)]=ttest2(padcountall(seg(3):seg(4),i),padcountall(seg(1):seg(2),i),'Alpha',alpha,'Tail',tail,'Vart
ype',vartype);
%
% end
% toc

%% Marco Stubbe; zusammenzählen der signale pro pad zur statistischen
% analyse --> Version funktioniert auch gibt komplette 2 matrizen über alle
% bins vor und nach aus --> 10% schneller als oberes
% count

countvor = [count(seg(1):seg(2),1:end-2)];
countnach = [count(seg(3):seg(4),1:end-2)];
padcountvor = [];
padcountnach = [];
padnames = [];

ll=1;
for c=1:(size(countvor,2))           %%%% sortieren+ summieren der counts pro elektrode für jedes bin, -2 weil
hinten start und stopp dranne hängt in count

    if c == 1
        a=0;
        padnames = num2str(names_array(c,5:7)); % erster name für die pads
    elseif c>1
        a=1;
    end
    padname1 = (names_array(c-a,5:7));
    padname2 = (names_array(c,5:7));
    trufal = isequal(padname2,padname1);

    if trufal == 0
        padnames = vertcat(padnames,padname2);
        padcountvor = [];
        padcountnach = [];
        ll=ll+1;
    end

    padcountvor = horzcat(padcountvor, countvor(:,c));

```

```

    padcountvorall(:,ll) = sum(padcountvor,2);

    padcountnach = horzcat(padcountnach, countnach(:,c));
    padcountnachall(:,ll) = sum(padcountnach,2);
end

[ttest_h_pad,ttest_p_pad]=ttest2(padcountnachall,padcountvorall,'Alpha',alpha,'Tail',tail,'Vartype',vartype);

%Percent participation per pad
ttest_h_pad_t=ttest_h_pad';
participation_p =
(100.*length(ttest_h_pad_t(ttest_h_pad_t==1))/length(ttest_h_pad_t(~any(isnan(ttest_h_pad_t), 2), :)));
%%

%%% Numbering of several stimulation timepoints in an array: Not used anymore.
num="";
% % if(size(stim_first)>1) % Number for multiple stimulations in array
% %   z=floor(s/10);
% %   num='_'+('0'+z)+('0'+s-z);
% % end

%%% Fitting the stimulus
Data = [[bin_size*(seg(2):seg(4))-stim_first]',total(seg(2):seg(4))];
t1 = Data(:,1);
y = Data(:,2);

% Function in plain text: Y=ax*exp(-lambda x)+c
F = @(x,xdata)x(1).*xdata.*exp(-x(2).*xdata)+x(3);
x0 = [100 2 10];
opts=optimset('Display','off');

[x,resnorm,~,exitflag,output] = lsqcurvefit(F,x0,t1,y,[],[],opts);

% Safe result to speed up script
Fval=F(x,t1);

% maximal/minimal value
y2=max(Fval);
if y2<=x(3)
    y2=min(Fval);
end
% y2

% time, when maximal/minimal value was reached
x2=(find(Fval==y2)-1).*bin_size;
x2=x2(1);

% frequency at half value: (delta f/2)+baseline
f_05=x(3)+(y2-x(3))/2;

% estimation of the stimulus first half max/min
for i=1:length(Fval)
    if y2>x(3)&& Fval(i)>=f_05
        t_05_1=(i-1).*bin_size;
    end
end

```

```

        break
    elseif y2<=x(3)&& Fval(i)<=f_05
        t_05_1=(i-1).*bin_size;
        break
    else
        t_05_1=x2/2;
    end
end
% t_05_1

% estimation of the stimulus second half max/min
for i=length(Fval):-1:1
    if y2>x(3)&& Fval(i)>=f_05
        t_05_2=(i-1).*bin_size;
        break
    elseif y2<=x(3)&& Fval(i)<=f_05
        t_05_2=(i-1).*bin_size;
        break
    else
        t_05_2=(log(2)/x(2));
    end
end

%% characteristic frequency (/e instat of /2)
car_f=x(3)+(y2-x(3))./exp(1);

% estimation of the stimulus first car. time
for i=1:length(Fval)
    if y2>x(3)&& Fval(i)>=car_f
        car_t_1=(i-1).*bin_size;
        break
    elseif y2<=x(3)&& Fval(i)<=car_f
        car_t_1=(i-1).*bin_size;
        break
    else
        car_t_1=x2/2;
    end
end
%car_t_1;

% estimation of the stimulus second car. time
for i=length(Fval):-1:1
    if y2>x(3)&& Fval(i)>=car_f
        car_t_2=(i-1).*bin_size;
        break
    elseif y2<=x(3)&& Fval(i)<=car_f
        car_t_2=(i-1).*bin_size;
        break
    else
        car_t_2=(log(2)/x(2));
    end
end
end

```

```

%% ending of the fitted reaction: b estimated on characteristic time of the decrease
end_pulse=seg(2)+car_t_2/bin_size;

%% Statistics on total activity to find irreversible effects
% length_total_before = length(total((seg(1):seg(2))));
mean_total_before = nanmean(total((seg(1):seg(2))));
std_total_before = nanstd(total((seg(1):seg(2))));

% length_total_during = length(total((seg(1):seg(2))));
mean_total_during = nanmean(total((seg(2):(end_pulse))));
std_total_during = nanstd(total((seg(2):(end_pulse))));

% length_total_after=length(total((end_pulse:seg(4))));
mean_total_after=nanmean(total((end_pulse:seg(4))));
std_total_after=nanstd(total((end_pulse:seg(4))));

[ttest_h_total_before_after,ttest_p_total_before_after]=ttest2(total((seg(1):seg(2))),
(total((end_pulse:seg(4))),'Alpha',alpha,'Tail',tail,'Vartype',vartype);
change=100*(mean_total_after - mean_total_before)/mean_total_before;

%% Textfile with mean +/- sd before, during and after stimulus for every
%% channel and in total
txt_filename=[filename num '.txt'];
f=fopen(txt_filename,'wt');

fprintf(f,'Binsize [s]: \t%f\t Start stimulation [s]: \t%f\t Duration stimulation [s]: \t%f\t Time before [s]: \t%f\t
Time after [s]: \t%f\t Significance level: \t%f\t null hypothesis: \t%s\n', bin_size, stim_first, stim_length,
length_before, length_after, alpha, vartype);
fprintf(f,'Kanal \t Mean bef. [counts / bin] \t std bef. [counts / bin] \t Mean stim. [counts / bin] \t std stim.
[counts / bin] \t Mean after [counts / bin] \t std after [counts / bin] \t ttest H before-after \t ttest P before-after \n');

for c=1:numchannels
    fprintf(f,'%s\t%d\t%d\t%d\t%d\t%d\t%d\t%i\t%d\n',names_array(c,:),file_data(c,1),file_data(c,2),file_data(c,3),file_data(c,4),file_data(c,5),file_data(c,6),ttest_h(c,
1),ttest_p(c,1));
end

% percent participation per channel
fprintf(f,'\n%s\t%i\n', 'Participation per channel [%]';,participation_c);

% Total network activity with ending of stimulus calculated from fitted car. freq.
fprintf(f,'\n%s\n', 'Total activity (ending of stimulus is calculated from fitted car. freq.):');
fprintf(f,'%s\t%d\t%d\t%d\t%d\t%d\t%d\t%i\t%d\n', 'total',mean_total_before,std_total_before,mean_total_during,std_total_during,mean_total_after,std_total_after
,ttest_h_total_before_after,ttest_p_total_before_after);

% Results fit
% fprintf(f,'%s\t%d\t%d\t%d\t%d\t%d\t%d\t%i\t%d\n', 'Slope increase',x(1), 'Decay', x(2), 'final
plateau',x(3), 'resnorm',resnorm, 'car. time inc. [s]', delay);

% Activity per pad
fprintf(f, '\n\n');
fprintf(f, '\n\n');

```



```

plot1=plot(bin_size*(seg(1):seg(4))-stim_first,total(seg(1):seg(4)));

%% Plot fit
hold on
plot2=plot(t1,Fval);
% plot2=plot([-length_before; t1],[x(3); Fval]); %Fit with line before stim
set(plot2,'Color','k','linewidth',1.5);
hold off;

%% Stimulation start and stop
hold on
plot3=plot([0,stim_length],[0,0], 'Marker', '.', 'Color', 'k', 'MarkerSize', 10);
set(plot3,'linewidth',1.5);
hold off

% Format graph and save file
legend('activity', 'fit','stimulus');
% axis tight;
axis([(seg(1)*bin_size-stim_first) (seg(4)*bin_size-stim_first) 0 max(total)]);
ylim ([0, 250]);
xlabel('Time / s');
ylabel(['Total network activity [counts / ' ,num2str(bin_size),' s]']);
title(['Total network activity around ' ,num2str(stim_first),' s']);
saveas(h1,[filename num '_total_activity.jpg']);
saveas(h1,[filename num '_total_activity.fig']);

%% Generate raster graph

if(graphik==1)

    %% Create image array

    % Needed variables
    % ending=cell(4,1);
    % titles=cell(4,1);
    % colormaps=cell(4,1);

    ending{1}='_mean_before';
    ending{2}='_mean_after';
    ending{3}='_mean_difference';
    ending{4}='_ttest_p';
    ending{5}='_ttest_h';

    titles{1}=['Mean activity [counts / ' num2str(bin_size) ' s] before stimulation at ' num2str(stim_first) ' s'];
    titles{2}=['Mean activity [counts / ' num2str(bin_size) ' s] after stimulation at ' num2str(stim_first) ' s'];
    titles{3}=['Reaction  $\Delta$  [counts / ' num2str(bin_size) ' s] of stimulation at ' num2str(stim_first) ' s'];
    titles{4}=['Significance of reaction on stimulation at ' num2str(stim_first) ': 1 - P']; %(heller = besser)
    titles{5}=['Significance of reaction on stimulation at ' num2str(stim_first) ': H'];

    colormaps{1}='hot';
    colormaps{2}='hot';
    colormaps{3}='jet';
    colormaps{4}='gray';

```

```

colormaps{5}='gray';

caxiss{1}=(0, 4);
caxiss{2}=(0, 4);
caxiss{3}=(0, 1);
caxiss{4}=(0, 1);
caxiss{5}=(0, 1);

i_v=1;
i_n=5;

%% set number and size of figures
% Grid, 8+1 to fix axes. 5 Layers generated for mean before stimulation, mean
%after stimulation, difference before / after, Ttest P and Ttest H.

img=zeros(9,9,5);

%% figures signal mean...
for h=1:8          %% Grid height loop
    for w=1:8      %% Grid width loop

        ch=chan_sig(signalmap(h,w));
        if(ch~=0)
            for c=1:numchannels
                dsp=names_array(c,5:7);
                chan=str2double(dsp);

                if(chan==ch)
                    %           if(img(h,w,1)<base||img(h,w,2)<base) % set offset
                    %           img(h,w,1)=base;
                    %           img(h,w,2)=base;
                    %           end
                    img(h,w,1)=img(h,w,1)+file_data(c,i_v);
                    img(h,w,2)=img(h,w,2)+file_data(c,i_n);
                    img(h,w,3)=img(h,w,3)+file_data(c,i_n)-file_data(c,i_v);
                end
            end
        end
    end
end          % w
end          % h

%% statistic figure p-value
for h=1:8          %% Grid height loop
    for w=1:8      %% Grid width loop
        ch=chan_sig(signalmap(h,w));
        if(ch~=0)
            for c=1:length(padnames)
                dsp=padnames(c,:);
                chan=str2double(dsp);

                if(chan==ch)
                    img(h,w,4)=1-ttest_p_pad(c);
                    img(h,w,5)=ttest_h_pad(c); % carefull, may contain nan
                end
            end
        end
    end
end

```

```

        end
    end
end          % w
end          % h
img(isnan(img))=0; %remove nan....
    %calculate vectors for plotting stars
    XSTARS=(img(1:8,1:8,5).*[1:8;1:8;1:8;1:8;1:8;1:8;1:8;1:8]);
    XSTARS=XSTARS(XSTARS~=0)+0.5; % correct X position
    YSTARS=(img(1:8,1:8,5).*[1:8;1:8;1:8;1:8;1:8;1:8;1:8;1:8]);
    YSTARS=YSTARS(YSTARS~=0)+0.5; % correct Y position
%%% plot figures
%%%% Write color plots and image files

for p=1:3 % 1:5 if seperated plots for p and h are needed

h2=figure(p);
    colormap(colormaps{p});
    pcolor(img(:,:,p));
    caxis(caxiss{p});
    %insert significance stars (MN)
    figure(p)
    if p==3
        hold on
        h3=plot(XSTARS,YSTARS, 'MarkerFaceColor',[0 0 0],...
            'MarkerEdgeColor',[1 1 1],...
            'MarkerSize',20,...
            'Marker','pentagram',...
            'LineWidth',1.5,...
            'LineStyle','none',...
            'Color',[0 0 0]);
        hold off
    end

    shading flat;
    colorbar();%add colorbar (MN PW)
    axis([1 9 1 9]);
    axis square;
    set(gca,'YTick',[1.5 2.5 3.5 4.5 5.5 6.5 7.5 8.5]);
    set(gca,'YTickLabel',{'1' '2' '3' '4' '5' '6' '7' '8'});
    set(gca,'XTick',[1.5 2.5 3.5 4.5 5.5 6.5 7.5 8.5]);
    set(gca,'XTickLabel',{'1' '2' '3' '4' '5' '6' '7' '8'});
    view(0,-90);

    title(titles{p});
    img_filename=[filename num ending{p}];
    saveas(h2,[img_filename '.jpg']);
    saveas(h2,[img_filename '.fig']);

end

end

%overwrite vectors, please leave for working with loops!
XSTARS=zeros(8,8);
YSTARS=zeros(8,8);

```

```

%      close all;

end % Ende Durchlauf Stimulation auswerten

disp(' ');
disp('data sets and figures created');
disp('data sets and figures stored');
toc % stopp measuring time for operation --> was started in plexon_read.m
disp('FINISHED ');

```

A1.3 Programm zur Automatisierung: „opendata“

Programmierung: Matthias Nissen und Dr. Marco Stubbe, LS BPY der Universität Rostock, Rostock, Deutschland

Programm zur Automatisierung der beiden Programme A1.1 und A1.2. Das Programm erwartet als Variable den Dateinamen der jeweiligen Tabelle als Textdatei.

Für jedes Experiment muss der Kanal, der Die Stimulationen aufgezeichnet hat, in der Variable stim_dsp eingetragen werden. In diesem Beispiel Kanal Nr. 61.

Die Startpunkte und Dauer der Stimulationen werden in der Matrix „Stimulations“ eingetragen. Diese Stimulationen wurden zuvor mit dem Programm Neuroexplorer visuell herausgesucht und notiert.

```

function opendata ()

clc;

[filename_m, pathname] = uigetfile('*.txt', 'Datenfile öffnen', 'multiselect','off');

[data_array, names_array]=plexon_read(filename_m);

basename = strrep(filename_m, '.txt', '');

%% Find and separate channels recording stimulus input to matrix stim
stim_dsp=61; %check weather allready set in the header!
if stim_dsp~=0 && (exist('stim','var') == 0)
dsps=(zeros(1,length(names_array)));
for c=1:length(names_array)
dsps(c,1)=str2double(names_array(c,5:7));
end
nsc=length(dsps(dsps==stim_dsp)); % number stimulus channels, if more than one
nsc0=nsc;

stim = (zeros(nsc,size(data_array,2)));
for c=1:length(names_array)
if dsps(c,1)==stim_dsp
stim (nsc0-nsc+1,:) = stim (nsc0-nsc+1,:) + data_array(c,:,1);
data_array(c,:,1) = [NaN];

```

```

        nsc=nsc-1;
    end
end
end

% Matix for stimulus start and stimulus length in seconds.
Stimulations=[1830,4;
    1955,1;
    2163,0.3;
    2185,0.3;
    2823,0.3
    ];

for i=1:length(Stimulations)
    stim_first=Stimulations(i,1);
    stim_length=Stimulations(i,2);

plexon_table_file(data_array, names_array, stim_first, stim_length, basename);
end
end

```

A2 Protokoll Proteinextraktion

Quelle: Persönliche Kommunikation mit Dr. Sebastian Bühler, FBN Dummerstorf, verändert.

Protokoll zur Gewinnung eines Proteinextraktes aus einer Zellkultur zur weiteren Verwendung bei einem Elisa oder Westerblott.

Reagenzien:

- HEPES
- Tris Base
- HCl, 37 %
- EGTA
- EDTA
- Triton – X 100
- Beta Glycerophosphat
- Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate
- Tetra Sodium Orthovandate
- NaFl
- Proteinasehemmer (Nr. 2714, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Selze, Deutschland)
- PBS (P4417-50TAB, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Selze, Deutschland)
- Stickstoff, flüssig

Stammlösungen:

- Tris, 1mol/l, HEPES 0,5 m:
12,1g Tris Base und 11,92 g HEPES in 90 ml dest. Wasser lösen, mit gesättigter HCl auf pH 7,45 einstellen und auf 100 ml auffüllen. Sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.
- EGTA 0,1 mol/l
3,8g EGTA in dest. Waser lösen, dafür schrittweise mit NaOH Plättchen (ca. 6 Stück) versetzen und auf 100 ml auffüllen. Sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.
- EDTA (0,1 mol/l)
3,72 g EDTA in dest. Wasser lösen, dafür schrittweise mit NaOH Plättchen (ca. 3 Stück) versetzen und auf 100 ml auffüllen. Sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.
- Proteinasehemmer Sigma
Gelieferte Flasche mit der vorgegebenen Menge PBS auffüllen und aliquotieren in 1 ml Eppendorf Cups. Nicht benötigte Menge bei -20°C einfrieren.

Präparationspuffer, 50 ml:

Folgende Substanzen in folgender Reihenfolge zusammengeben und lösen:

Stammlösung oder Stoff	Volumen /Menge	Endkonzentration
Tris/Hepes	5 ml	100 mmol/l bzw. 50 mmol/l
EGTA	2 ml	4 mmol/l
EDTA	5 ml	10 mmol/l
Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate	330 mg	15 mmol/l
Tetra Sodim Orthovandate	46 mg	5 mmol/l
NaFl	5,25 mg	1,5 mmol/l
Triton X100	50 µl	10 mmol/l

pH Wert mit HCl 37 % auf pH 7,4 einstellen und auf 100 ml auffüllen.

Durchführung Proteinextraktion von Proben in 25 ml Zellkulturflaschen:

- Benötigtes Volumen des Extraktionspuffers abnehmen und mit Proteinasehemmer versetzen, hier: 1 ml Proteinasehemmer auf 14 ml Extraktionspuffer, 15 ml Gesamtvolumen.
- Puffer und PBS auf Eis lagern.
- Medium aus Zellkulturflasche abnehmen.
- Zellkulturflasche zweimal mit je 1 ml PBS auswaschen.
- 1 ml des gebrauchsfertigen Extraktionspuffers in die Zellkulturflasche einfüllen und durch schwenken gleichmäßig verteilen. Der Zellkulturrasen sollte sich komplett lösen, eventuell noch mal unter dem Mikroskop kontrollieren.
- Bei Bedarf Zelltrümmer bei 1000g für 10 min bei 4 °C abzentrifugieren. Überstand abnehmen und weiter verwenden.
- Wenn die Proben sofort gebraucht werden, auf Eis lagern.
- Zur späteren Verwendung Probe in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C bis zum Gebrauch lagern.

A3 Protokoll „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Quelle: Persönliche Kommunikation mit Reik Modrozinsky, LS BPY Rostock

Ansetzen der Protein-Standards, 1 zu 2 Verdünnungsreihe in PBS oder Extraktionspuffer, je nach verwendeter Probe:

100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml; 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,12 µg/ml; 1,56 µg/ml, 0 µg/ml

Assay Prozedere:

1. Medium aus der 24 Well Platte entnehmen und verwerfen
2. **500µl** PBS in die nun leeren Wells
3. Zellen lysieren: 24 Well-Platte **2x bei -80°C einfrieren / tauen**
4. lysierte Zellen (500µl) in ein **1,5ml** Eppi überführen
5. spin: **5min, 5000g, 4°C**
6. **100µl des Überstandes bzw. der vorher aufgetauten Proben**, dem reinen Extraktionspuffer als Kontrolle und je 100µl der Standards in je ein Well der Testplatte überführen
7. Inkubation: **2h bei 37°C**, Platte mit **Klarsichtfolie** verschließen (Verdunstungsschutz)
8. ÜS entnehmen und verwerfen
9. **100µl Lösung A** hinzu, Platte mit **Klarsichtfolie** schließen
10. Inkubation: **1h bei 37°C**
11. **3 x 100µl** mit Waschpuffer waschen, je Waschschrift **1min** Inkubation
12. Platte umdrehen und leicht auf Tuch abtupfen
13. **100µl Lösung B** hinzu, Platte mit **Klarsichtfolie** schließen
14. Inkubation: **30min bei 37°C**
15. **3 x 100µl** mit Waschpuffer waschen, je Waschschrift **1min** Inkubation
16. Platte umdrehen und leicht auf Tuch abtupfen
17. **90µl Substrat** hinzu, Platte mit Klarsichtfolie schließen
18. Inkubation: **15 min bei 37°C, Platte dunkel stellen**
19. **50µl Stop-Lösung** hinzu (falls die Farbreaktion nicht einheitlich stattfindet die Platte leicht schütteln)
20. Messung: bei **450nm** Adsorption