

Zellbasierte Biosensoren

Hybride Systeme aus dreidimensionalen in vitro Netzwerken und Mikroelektroden Arrays

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von
Master of Engineering
Andreas Wolfgang Daus
aus Miltenberg

1. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Paul G. Layer
2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Bodo Laube
3. Referentin: Prof. Dr.-Ing. Christiane Thielemann

Tag der Einreichung: 12.03.2013
Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2013

Darmstadt 2013
D 17

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Modellsysteme in der biomedizinischen Forschung	1
1.2	Biosensoren	2
1.3	Physiologie der Neuronen	5
1.4	Physiologie der Kardiomyozyten	8
1.5	Extrazelluläre Ableitungen mit Mikroelektroden Arrays	10
1.6	Dreidimensionale in vitro Systeme	12
1.7	Biologische Primärreaktionen auf elektromagnetische Felder	14
1.8	Pharmakologische Wirkstoffsuche	16
1.9	Ziel der Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Dreidimensionale Zellkultur	19
2.2	Zweidimensionale Zellkultur	20
2.3	Extrazelluläre Ableitungen mit Mikroelektroden Arrays	20
2.4	Analyse extrazellulärer Potenziale der Kardiomyozyten	22
2.5	Multivariate Analyse neuronaler Sphäroidsignale	23
2.5.1	Definition eines dynamischen Thresholds	24
2.5.2	Multivariate Spikedetektion	25
2.5.3	Clustering	27
2.5.4	Burstanalyse	28
2.6	Pharmakologische Untersuchungen	29
2.7	Elektromagnetische Exposition	30
2.8	Mikroskopie	31
2.9	Statistik	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Elektrophysiologische und morphologische Eigenschaften der Kardiomyozyten	33
3.2	Pharmakologische Untersuchungen an Kardiomyozytsphäroiden	35
3.2.1	Modifikation der Feldpotenzialfrequenz durch Isoproterenol	35
3.2.2	Modifikation der Membranpermeabilität für bestimmte Ionenarten	36

3.3	Elektromagnetische Exposition der Sphäroide aus Kardiomyozyten	39
3.3.1	Dosimetrie	39
3.3.2	Zelluläre Effekte durch rein thermische Provokation	41
3.3.3	Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Proben­temperatur	42
3.3.4	Elektrophysiologische Untersuchungen	43
3.4	Elektrophysiologische und morphologische Eigenschaften der Neuronen . . .	46
3.5	Multivariate Spikedetektion mit dynamischen Thresholds	48
3.6	Pharmakologische Untersuchungen am ionotropen GABA _A -Rezeptor	51
3.6.1	Bicucullin	52
3.6.2	GABA	53
4	Diskussion	55
4.1	Physiologische Relevanz zellulärer Modellsysteme	55
4.2	Dreidimensionale Zellkultur	56
4.3	Extrazelluläre Ableitungen mit Mikroelektroden Arrays	57
4.4	Eigenschaften der Sphäroide aus Kardiomyozyten	59
4.5	Pharmakologische Untersuchungen an Kardiomyozyten	60
4.5.1	Isoproterenol	61
4.5.2	Lidocain	61
4.5.3	Diltiazem	63
4.5.4	4-Aminopyridin	64
4.6	Elektromagnetische Exposition	65
4.6.1	Versuchsumgebung	65
4.6.2	Thermische Effekte	67
4.6.3	Elektrophysiologische Primärreaktionen	68
4.7	Eigenschaften neuronaler Sphäroide	69
4.8	Multivariate Spikeanalyse	70
4.9	Pharmakologische Untersuchungen an neuronalen Sphäroiden	71
4.9.1	Bicucullin	72
4.9.2	GABA	73
5	Zusammenfassung und Ausblick	74
	Literaturverzeichnis	77
	Abbildungsverzeichnis	100
	Abkürzungsverzeichnis	101
	Verzeichnis fachspezifischer Anglizismen	103
	Lebenslauf und Ehrenwörtliche Erklärung	104

1 Einleitung

1.1 Modellsysteme in der biomedizinischen Forschung

Komplexe biologische Lebensformen sind aus einer Vielzahl funktional differenzierter Zellen aufgebaut, deren komplementäres Zusammenleben und Überleben nur durch den Austausch und die Verarbeitung von Informationen sichergestellt ist. Bei mehrzelligen Organismen erfolgt dies auf Basis chemischer oder elektrischer Prinzipien [Stein, 2004; Moyes & Schulte, 2007; Silverthorn, 2009].

Je nach Entfernung zur kompetenten Zielzelle sind chemische Signale beispielsweise über Diffusion bzw. endokrin vermittelt. Die Spezifität der physiologischen Reaktion wird durch distinkte Rezeptoren an der Empfängerzelle bestimmt [Hentze et al., 2000]. Elektrogene Zellen, wie z. B. Neuronen oder Kardiomyozyten, besitzen die Fähigkeit zur transienten Depolarisierung und Repolarisierung des Membranpotenzials. Diese elektrischen Impulse können sich innerhalb einer Zelle und deren Fortsätze ausbreiten und sich synaptisch auf andere Zellen übertragen [Kandel et al., 2000].

Zur Untersuchung elektrogener Signale auf makroskopischer Ebene stehen klinisch etablierte, nicht-invasive Methoden, beispielsweise in Form der Elektroenzephalografie (EEG), Elektrokardiografie (EKG) und Elektromyografie (EMG) zu Verfügung. Bei diesen Verfahren werden Elektroden nahe am elektrisch aktiven Gewebe aufgebracht, die zellulär induzierte Potenzialänderungen detektieren [Dössel, 1999; Jungblut, 2006]. Im klinischen Alltag können mit diesen Methoden Informationen über potenziell pathologische Zustände des Signalmusters, wie z. B. Arrhythmien im EKG oder Epilepsie im EEG, identifiziert werden [Schmidt et al., 2005].

Physiologische Fragestellungen lassen sich aufgrund ethischer oder methodischer Faktoren nicht immer am Menschen untersuchen. Insbesondere in der Pharmakologie, Toxikologie und der biomedizinischen Grundlagenforschung werden daher häufig Versuchstiere als Referenzorganismen herangezogen. Es wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass physiologische Prozesse des Referenzorganismus identisch oder ähnlich denen des Menschen sind und resultierende Erkenntnisse extrapoliert werden können [Silverthorn, 2009]. Die Wahl der Spezies ist heterogen und von der jeweiligen Fragestellung abhängig. In den

letzten Jahren wurden zunehmend transgene Tiere, deren Genom gezielt durch homologe Rekombination oder Vorkerninjektion mutiert wurde, herangezogen, um genetisch bedingte, menschliche Krankheiten an einem Modellsystem zu erforschen [Müller & Hassel, 2005; Schenkel, 2006].

Für ein detailliertes Verständnis interzellulärer Kommunikation sowie zellulärer Reaktionen auf chemische oder physikalische Provokation bieten sich jedoch *in vitro* Modelle an. Sie erlauben die Adressierung einzelner Zellen in Suspension oder in einem überschaubaren zellulären Netzwerk unter kontrollierten und reproduzierbaren Versuchsbedingungen. Daneben gibt es ethisch und wirtschaftlich motivierte Gründe, Versuche an Tieren durch geeignete *in vitro* Modelle zu ersetzen. Insbesondere in der pharmakologischen Wirkstoffsuche stehen große Substanzbibliotheken dem Anspruch schneller, kosteneffizienter, valider und moralisch vertretbarer Analysemethoden gegenüber. Den Anforderungen entsprechend ließen sich zellbasierte Testsysteme zwischen molekularen, rezeptorbasierten Verfahren auf der einen Seite und Tierversuchen auf der anderen Seite etablieren.

In vitro Testsysteme stellen daher ein vielversprechendes Instrument für die Grundlagenforschung und angewandte Forschung dar. Für eine breite Akzeptanz und den umfassenden Einsatz müssen *in vitro* Systeme zum einen den Ansprüchen eines physiologisch repräsentativen Abbilds genügen. Zum anderen werden technische Systeme benötigt, die sensitiv für zelluläre Reaktionen sind und eine detaillierte Analyse zellulären Verhaltens ermöglichen. Entsprechend sind sowohl von naturwissenschaftlicher als auch ingenieurwissenschaftlicher Seite viele Aktivitäten erforderlich, um neue Systeme zu entwickeln bzw. etablierte Systeme zu verbessern und den Ansprüchen eines qualifizierten Ersatzmodells zu genügen.

1.2 Biosensoren

Ein System, in dem ein biologisch sensitives Element an einen Signalwandler gekoppelt wird, um analytische oder funktionale Aussagen über physikalische oder chemische Stimuli zu erhalten, bezeichnet man als Biosensor [Bousse, 1996]. Das biologisch sensitive Element kann aus Enzymen, Antikörpern, Organellen aber auch ganzen Zellen und Netzwerken von Zellen gebildet werden [Byfield & Abuknesha, 1994].

Makromoleküle, wie z. B. Enzyme oder Antikörper, kommen in Form von katalytischen Biosensoren oder Bioaffinitätssensoren zum Einsatz. Im Gegensatz zu Bioaffinitätssensoren, die die Komplexbildung nach Antikörper-Antigen- bzw. Ligand-Rezeptor-Reaktion detektieren, werden in katalytischen Biosensoren Enzyme als selektive Katalysatoren an einen Signalwandler immobilisiert, der die Reaktion registriert [Gründler, 2004]. Die qualitative bzw. quantitative Erfassung der Reaktionen erfolgt auf Basis akustischer [Okahata et al., 1992], kalorimetrischer [Ramanathan & Danielsson, 2001], elektrochemischer [Wang, 2002] oder optischer [Piunno et al., 1995] Wandlerprinzipien. Den Wechselwirkungen zwischen

Analyt und Makromolekül liegen biochemische Prinzipien zugrunde und bieten lediglich eine analytische Information über den unbekanntem Stimulus, weshalb eine Spezifizierung als biochemische Sensoren angebracht ist.

Zellbasierte Biosensoren hingegen erlauben neben der analytischen Klassifizierung eine funktionale, physiologische Beschreibung der Interaktion von Stimulus und lebendem System. Hierzu werden einzelne Zellen oder Netzwerke von Zellen als biologisch sensitives Element an einen Signalwandler immobilisiert, um zelluläre Reaktionen in ein qualitativ bzw. quantitativ verwertbares Signal zu überführen [Bousse, 1996; Keusgen, 2002]. Zellbasierte Biosensoren zeichnen sich durch ihre Sensitivität und kurze Reaktionszeiten aus, weshalb sie in vielen Bereichen der Grundlagenforschung und angewandten Forschung Anwendung finden [Wang, 2010].

In der Vergangenheit wurde eine Reihe von Wandlerprinzipien für den Einsatz in biohybriden Systemen vorgeschlagen und realisiert. Zur Adressierung metabolisch assoziierter Parameter bieten sich Ionensensitive Feldeffekttransistoren (ISFETs) oder Lichtadressierbare Potenziometrische Sensoren (LAPS) an. Sie erlauben die Erfassung des extrazellulären pH-Wertes zur nicht-selektiven Beurteilung des Metabolismus oder des Sauerstoffverbrauchs aerober Zellen als Maß der mitochondrialen Aktivität. Werden mehrere Sensoreinheiten auf einem Chip implementiert, ist eine orts aufgelöste Multiparameter-Analyse im Mikrometerbereich möglich [Lehmann et al., 2001; Yotter & Wilson, 2004; Yoshinobu et al., 2005]. Die elektrochemische Impedanzspektroskopie ermöglicht die Detektion morphologischer Veränderungen in zellulären Netzwerken auf Basis von Apoptose, Adhäsion oder Proliferation [Robitzki et al., 2002; Arndt et al., 2004; Rahman et al., 2008]. Im Gegensatz zu konventionellen immunhistochemischen Analysemethoden werden diese Verfahren markerfrei durchgeführt, was eine kontinuierliche und nicht-invasive Messung ermöglicht.

Werden elektrogene Zellen *in vitro* immobilisiert, stehen häufig elektrophysiologische Fragestellungen im Vordergrund, da die Mechanismen zellulärer Erregbarkeit für ein Verständnis von Pathogenese sowie für die Entwicklung und Validierung neuer therapeutischer Ansätze von besonderer Bedeutung sind. Zur Untersuchung elektrischer Aktivität auf zellulärer bzw. molekularer Ebene wurden unterschiedliche Verfahren entwickelt. Eine direkte Messung des transmembranen Potentials ist durch intrazelluläre Kontaktierung möglich. Hodgkin und Huxley untersuchten Eigenschaften der Erregungsbildung und -propagation mittels feiner Drahtelektroden, die in Axone des *Loligo* inkorporiert waren und publizierten auf Basis der Ergebnisse ihr renommiertes mathematisches Modell zur Beschreibung des Aktionspotentials [Hodgkin & Huxley, 1952a,b,c,d; Hodgkin et al., 1952]. Elektrophysiologische Untersuchungen auf Einzelkanalebene sind mit der im Jahr 1976 vorgestellten Patch-Clamp-Technik möglich [Neher & Sakmann, 1976]. Hierbei wird die Zellmembran über eine mit Elektrolyt gefüllten Glaskapillare kontaktiert. Durch einen leichten Unterdruck im Inneren der Kapillare entsteht ein hochohmiger Widerstand zum extrazellulären

Milieu, was die Untersuchung von Ionenströmen im Pikoampere-Bereich sowie der Schaltkinetik von Ionenkanälen ermöglicht. Bei hinreichend großem Unterdruck kann die Membran geöffnet werden. Die Kapillare erreicht den intrazellulären Raum und somit die Konfiguration der Ganzzelleableitung [Hamill et al., 1981]. Um den Anforderungen eines hochparallelen und automatisierbaren Biosensors gerecht zu werden, wurde die Patch-Clamp-Methode in den letzten Jahren weiterentwickelt und potenzielle Verfahren für Hochdurchsatzmessungen vorgestellt [Dunlop et al., 2008]. Konventionelle intrazelluläre Methoden besitzen jedoch eindeutig invasiven Charakter, weshalb die Zellviabilität zeitlich auf wenige Stunden begrenzt ist [Pancrazio et al., 1999; Hierlemann et al., 2011]. Ultrafeine, vertikal ausgerichtete Nanoelektroden stellen einen Ansatz zur Reduzierung der mechanischen Belastung gegenüber konventionellen Verfahren mit Glaskapillaren bzw. Drahtelektroden dar. Der Zugang zum intrazellulären Raum kann durch eine elektrophoretisch induzierte Öffnung der Zellmembran erreicht werden [Xie et al., 2012].

Eindeutig nicht-invasive und daher stabile und langzeitfähige Messverfahren stellen extrazelluläre Ableitungen dar. Die transiente Depolarisierung der Membranspannung während eines Aktionspotenzials geht mit einer Umverteilung der extrazellulären Ionenkonzentration einher. Dies kann durch proximale extrazelluläre Metallelektroden oder Feldeffekttransistoren detektiert werden. Fromherz immobilisierte Retzius-Nervenzellen an das offene, nicht-metallisierte Gate eines p-Kanal Feldeffekttransistors. Aktionspotenziale induzierten eine Modulation der Ladungsträgerdichte im p-Kanal und damit einen lateralen Strom durch den Transistor. Auf diese Weise konnten spontane oder stimulierte Aktionspotentiale detektiert werden [Fromherz et al., 1991]. Halbleiterbauelemente, wie Feldeffekttransistoren, sind jedoch nur bedingt für den Einsatz in elektrolytischen Medien ausgelegt. Der Chip und seine Komponenten neigen zur Korrosion während der Messung und insbesondere während der Langzeitkultivierung [Hierlemann et al., 2011].

Einen etablierten Ansatz zur extrazellulären Ableitung bieten Mikroelektroden Arrays (MEAs). Bei diesem Verfahren werden elektrogene Zellen kapazitiv an planare Elektroden gekoppelt und Potenzialänderungen relativ zu einer Referenzelektrode gemessen. Die ersten extrazellulären Ableitungen mit MEAs wurden bereits 1972 vorgestellt [Thomas et al., 1972]. Die Fortschritte der Mikrosystemtechnik sowie Methoden der Datenverarbeitung erlauben heute die Implementierung und Ableitung einer Vielzahl von mikrostrukturierten Elektroden auf einem Biosensor. Damit sind extrazelluläre Ableitungen hochparallelisierbar und ermöglichen eine nicht-invasive Untersuchung zellulärer Netzwerke in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung. Das große Potenzial derartiger Systeme als Biosensor wurde in der Vergangenheit für Anwendungen in der Pharmakologie [z. B. Meyer et al., 2004a], Toxikologie [z. B. Johnstone et al., 2010] und Grundlagenforschung [z. B. Stett et al., 2003] zusammengefasst.

1.3 Physiologie der Neuronen

Neuronen weisen morphologisch eine hohe Variabilität auf, jedoch lassen sich funktional die Kompartimente Perikaryon, Axon, Dendriten und synaptische Endigungen determinieren. Das Perikaryon inkorporiert subzelluläre Organellen ähnlich anderer eukaryotischer Zellen. Aufgrund der hohen Proteinsyntheserate ist ein starkes raues endoplasmatisches Retikulum, das auch als Nissl-Substanz bezeichnet wird, ausgeprägt [Brady et al., 2009]. Dendriten bilden primär die rezeptive Oberfläche des Neurons. Die wichtigste efferente Leitungseinheit im Neuron ist das Axon. Strukturell lassen sich Axone als kurzer, primitiver Tubus, aber auch weit projizierend mit Kollateralen identifizieren. In seltenen Fällen, wie beispielsweise bei Amakrinzellen der Retina von Vertebraten, können Zellen ohne Axon existieren [Kandel et al., 2000].

Neuronale Signale unterliegen dem Prinzip einer transienten Änderung der elektrischen Potenzialdifferenz über der Zellmembran. Die molekulare Konzeption der Membran bestimmt daher wesentlich die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle. Die Zellmembran wird aus einer Phospholipiddoppelschicht gebildet, die für Ionen weitgehend undurchlässig ist. Der aktive bzw. passive Ionentransport findet über integrale, transmembrane Proteine statt [Reichert, 2000; Kandel et al., 2000].

Im unerregten Zustand sind Ionen aufgrund der selektiven Permeabilität von Kanälen im intra- und extrazellulären Raum asymmetrisch verteilt, wodurch eine Potenzialdifferenz von etwa -75 mV über der Zellmembran entsteht. Die Spannung, die der asymmetrischen Verteilung *einer* diffusiblen Ionenart zugrunde liegt, wird als Nernst-Potenzial bezeichnet. Der saturierte Ruhezustand ergibt sich durch ein thermodynamisches Fließgleichgewicht aus osmotischer und elektrischer Komponente. Aktive Ionenpumpen, in Form großer integraler Membranproteine mit katalytischen Bindungsstellen für Natrium und Adenosin-triphosphat (ATP) im intrazellulären, und Kalium im extrazellulären Raum, halten die Konzentrationsgradienten stabil [Kandel et al., 2000]. Das resultierende Potenzial V_m lässt sich unter Berücksichtigung mehrerer Ionenarten mit unterschiedlichen Membranpermeabilitäten durch die Goldman-Gleichung (Gleichung 1.1) bestimmen [Goldman, 1943; Hodgkin & Katz, 1949; Reichert, 2000].

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum_{k=1}^n z_k P_k [X_k]_{extra} + \sum_{k=1}^n z_k P_k [Y_k]_{intra}}{\sum_{k=1}^n z_k P_k [X_k]_{intra} + \sum_{k=1}^n z_k P_k [Y_k]_{extra}} \quad (1.1)$$

R , T und F beschreiben die Gaskonstante, absolute Temperatur und Faraday Konstante und z die Wertigkeit des betreffenden Ions. Aus Gleichung 1.1 folgt, dass das Membranpotenzial insbesondere durch die Ionenarten bestimmt wird, die einen hohen Konzentrationsgradienten $[X_k]_{extra} : [X_k]_{intra}$ für positiv bzw. $[Y_k]_{intra} : [Y_k]_{extra}$ für negativ geladene

Ionen besitzen oder eine hohe Membranpermeabilität P_k aufweisen. Im nicht-erregten Zustand gilt $P_{K^+} : P_{Na^+} = 1 : 0,04$, d. h. die Membran ist primär für Kaliumionen permeabel [Hodgkin & Katz, 1949]. Daher entspricht das Ruhepotenzial ungefähr dem Nernst-Potenzial von Kalium.

Aktionspotenziale bilden sich nach hinreichender Depolarisierung des Membranpotenzials, beispielsweise durch einen exzitatorischen Stimulus, aus. Die Depolarisierung führt zu einer Öffnung spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle. Durch die erhöhte Permeabilität für Natriumionen nähert sich die Membranspannung (vgl. Gleichung 1.1) dem Na^+ Nernst-Potenzial von etwa +55 mV. Mit langsamerer Kinetik öffnen sich spannungsgesteuerte Ka^+ -Kanäle, die eine Repolarisierung initiieren. Mit kurzer Latenz gehen die spannungsgesteuerten Kanäle in einen inaktivierten bzw. geschlossenen Zustand über und das Ruhepotenzial stellt sich wieder ein. Auf jedes Aktionspotenzial folgt eine Refraktärphase von circa 1–2 ms, in der kein Aktionspotenzial ausgebildet werden kann [Reichert, 2000; Kandel et al., 2000]. Aktionspotenziale sind weitgehend formkonstant und stereotyp. Je nach Spezies existiert jedoch eine Vielzahl unterschiedlicher Ionenkanäle, die eine charakteristische Codierung von Form, Frequenz oder Muster der neuronalen Aktivität zulassen [Bean, 2007].

Die Genese eines Aktionspotenzials unterliegt der räumlichen und zeitlichen Summation inhibitorischer bzw. exzitatorischer postsynaptischer Potenziale [Magee, 2000]. Einzelne, isolierte Stimuli werden häufig als unterschwellige Depolarisation neutralisiert. Durch konvergierende, afferente exzitatorische Stimuli, die nach Integration hyperpolarisierender Potenziale etwa 10 mV überschreiten, können Aktionspotenziale ausgelöst werden. Überdauert die Depolarisation die Refraktärzeit, werden weitere Aktionspotenziale evoziert [Kandel et al., 2000]. Diese hochfrequenten Folgen von Aktionspotenzialen, sogenannte Bursts, werden, im Gegensatz zu einzelnen Aktionspotenzialen, zuverlässig vom prä- zum postsynaptischen Neuron übertragen [Lisman, 1997]. Bursts nehmen eine signifikante Rolle bei der Genese [Chiappalone et al., 2005], Plastizität [Pike et al., 1999], Dysfunktion [McCormick & Contreras, 2001], und insbesondere Kommunikation [Izhikevich et al., 2003; Krahe & Gabbiani, 2004] neuronaler Netzwerke ein. Bursts stellen daher ein wichtiges Element zur Charakterisierung intrinsischer bzw. provozierter Netzwerkaktivität dar [Chiappalone et al., 2005; Jungblut, 2006].

Der Axonhügel als initiales Element des Axons stellt im Wesentlichen die integrative Komponente eines Neurons dar. Durch eine höhere Dichte spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle liegt die Schwelle zur Aktivierung eines Aktionspotenzials niedriger [Kole et al., 2008]. Die Ausbreitung eines Aktionspotenzials entlang eines Neurits zu den terminalen Bereichen erfolgt durch autoregenerative Aktivierung der Ionenkanäle ohne Reduktion der Amplitude. Die Übertragung neuronaler Signale auf nachgeschaltete Zellen findet an elektrischen oder chemischen Synapsen statt.

Bei elektrischen Synapsen (siehe Abbildung 1.1 A) ist das Zytoplasma des prä- und postsynaptischen Neurons über Gap Junctions direkt verbunden, d. h. Signale können bidirektional, nahezu ohne Latenz übertragen werden [Kandel et al., 2000]. Elektrische Synapsen haben daher bei der schnellen Vermittlung von Reizen [Brink et al., 1996] und der Synchronisation [Landisman et al., 2002] in neuronalem Gewebe besondere Bedeutung. Gap Junctions bestehen aus zwei Hemikanälen (Connexons), die aus einem Hexamer konzentrisch strukturierter, membrandurchspannender Proteinuntereinheiten, den Connexinen aufgebaut sind. Sie bilden einen Kanal, durch den neben Ionen auch Nährstoffe, sekundäre Botenstoffe oder Metaboliten bis etwa 1 kD diffundieren können [Evans & Martin, 2002; Söhl et al., 2005]. Die Regulation kann auf Basis von Konformationsänderungen bzw. post-translatorischer Modifikationen wie z. B. Phosphorylierung erfolgen [Lampe & Lau, 2004; Söhl et al., 2005]. Elektrische Synapsen sind beispielsweise bei inhibitorischen Interneuronen im Kortex oder Thalamus existent, jedoch ist die interzelluläre Kommunikation im Säugerhirn überwiegend chemisch vermittelt [Galarreta & Hestrin, 2001].

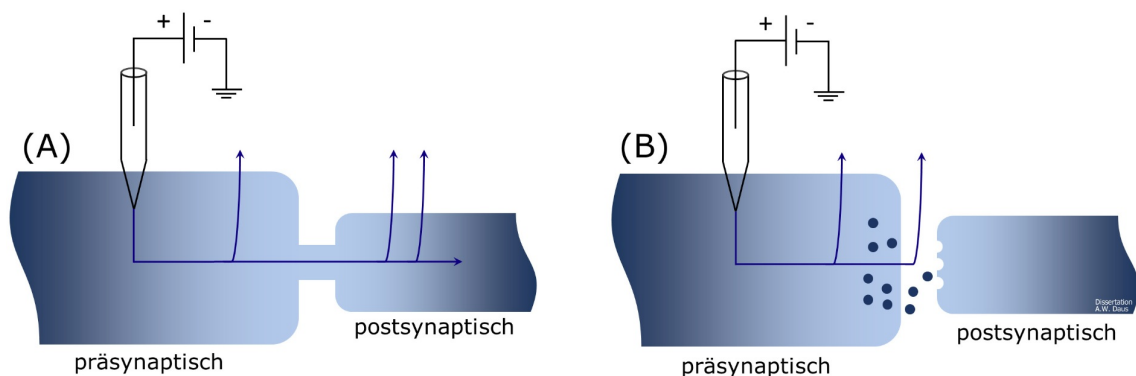


Abbildung 1.1: Signalübertragung an elektrischen und chemischen Synapsen. (A) An elektrischen Synapsen ist das Zytoplasma der prä- und postsynaptischen Zelle über Gap Junctions verbunden. Elektrische Ströme können praktisch ohne Latenzzeit übertragen werden. (B) An chemischen Synapsen fließen Ströme ausschließlich in den extrazellulären Raum. Ein Aktionspotential induziert präsynaptisch die Exozytose von in Vesikel inkorporierte Neurotransmitter (dunkelblaue Kreise). Die Neurotransmitter diffundieren zu den postsynaptischen Rezeptoren und führen dort zu einer Depolarisation bzw. Hyperpolarisation. Abbildung reproduziert nach [Kandel et al., 2000].

Bei chemischen Synapsen (siehe Abbildung 1.1 B) liegt keine zytoplasmatische Verbindung der Zellen vor. Die Übertragung der Signale erfolgt über chemische Botenstoffe, sogenannte Neurotransmitter. Neurotransmitter werden im Neuron synthetisiert und liegen präsynaptisch in membranumschlossenen Vesikeln inkorporiert vor. Die transiente Depolarisierung während eines Aktionspotenzials führt präsynaptisch zu einer lokalen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Durch den SNARE-Komplex (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) aus Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin wird die exozytotische Fusion der Vesikel mit der Zellmembran vermittelt [Jahn & Scheller, 2006; Vrljic et al., 2010]. Als wichtiger Ca^{2+} -Rezeptor wurde Synaptotagmin I identifiziert

[Fernandez-Chacon et al., 2001]. Bei der Exozytose werden die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt sekretiert und diffundieren zu den postsynaptischen Endigungen. Durch Interaktion mit den terminal lokalisierten Rezeptoren können inhibitorische bzw. exzitatorische postsynaptische Potenziale ausgelöst werden.

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste hemmende Neurotransmitter im Nervensystem [Silverthorn, 2009]. Er bindet an die ionotropen Rezeptoren $GABA_A$ und $GABA_C$, sowie den metabotropen Rezeptor $GABA_B$. $GABA_A$ -Rezeptoren gehören zur Klasse der cys-Loop Superfamilie ligandengesteuerter Ionenkanäle und bilden Heteropentamere, für deren Zusammensetzung mindestens 19 Untereinheiten (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , ρ_{1-3} und θ) zur Verfügung stehen. Daraus resultiert eine hohe Diversität GABAerger Rezeptoren und deren physiologischer und pharmakologischer Eigenschaften [Michels & Moss, 2007]. In den meisten Fällen setzen sich $GABA_A$ -Rezeptoren aus zwei α_2 , zwei β_2 und einer γ_2 Untereinheit zusammen, wobei die Bindungsstelle für GABA zwischen den α und β Einheiten lokalisiert ist [Chang et al., 1996; Michels & Moss, 2007]. Neben GABA als Neurotransmitter existieren eine Reihe allosterischer Modulatoren, wie Benzodiazepine, Barbiturate und neuroaktive Steroide, die, je nach Komposition der Untereinheiten, an distinkte Stellen des $GABA_A$ -Rezeptors binden [Sieghart, 2006].

Beim ionotropen $GABA_A$ -Rezeptor erhöht sich nach dem Bindungsereignis des Neurotransmitters die Permeabilität für Cl^- -Ionen. Die elektrochemische Triebkraft von Cl^- in den intrazellulären Raum führt zu einem hyperpolarisierenden Auswärtsstrom und folglich zu einem inhibitorischen postsynaptischen Potenzial [Fiederling, 2010]. Der kompetitive Antagonist Bicucullin konkurriert mit dem Neurotransmitter GABA um die Bindung am Rezeptor und inhibiert folglich die Entstehung hyperpolarisierender Potenziale.

1.4 Physiologie der Kardiomyozyten

Kardiomyozyten mit der Fähigkeit zu elektrisch induzierten, mechanischen Kontraktionen bilden den primären Teil des Herzmuskels. Sie liegen in der Regel mononukleär vor, sind jedoch über Gap Junctions verknüpft und stellen daher *in vivo* ein dreidimensionales (3D), funktionales Synzytium dar [Tortora & Grabowski, 2003; Huppelsberg & Walter, 2011]. Die Signalleitung über elektrische Synapsen gewährleistet die Synchronisation im Herzen. Etwa 1 % der Kardiomyozyten sind zur autorhythmischen Depolarisierung des Membranpotenzials qualifiziert. Diese, vor allem im sinoatrialen und atrioventrikulären Gewebe lokalisierten Schrittmacherzellen sind kleiner, weisen keine geordneten Sarkomere auf und tragen nicht wesentlich zur Kontraktionskraft bei [Silverthorn, 2009].

Schrittmacherzellen besitzen kein stabiles Ruhemembranpotenzial im engeren Sinne, da ausgehend vom maximalen diastolischen Potenzial von ungefähr -60 mV der unselektive Einstrom von Kationen ständig zur Depolarisierung führt [Huppelsberg & Walter, 2011].

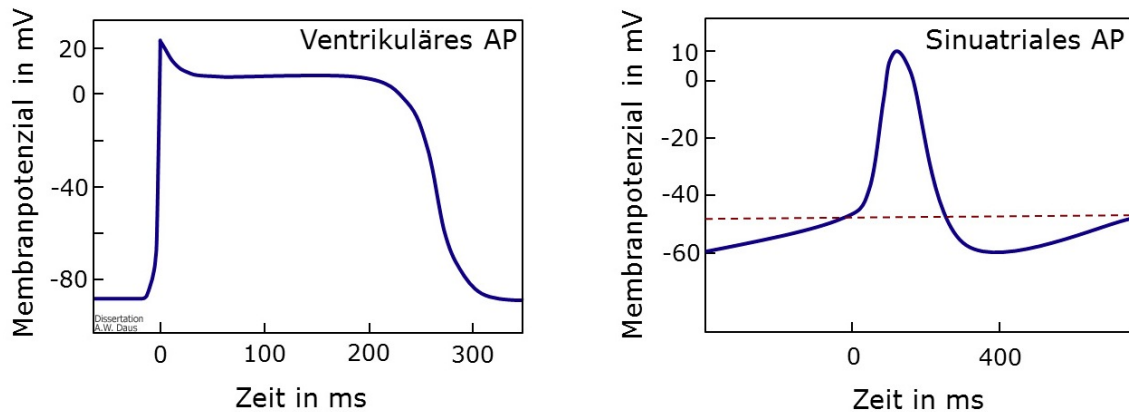


Abbildung 1.2: Aktionspotenziale (AP) kontraktiver ventrikulärer Kardiomyozyten (links) und autorhythmischer sinuatrialer Schrittmacherzellen (rechts). Erreicht die langsame diastolische Depolarisierung der Schrittmacherzellen einen Schwellwert von etwa -50 mV (rote Linie) wird ein Aktionspotenzial generiert. Daten reproduziert nach [Tortora & Grabowski, 2003].

Eine besondere Rolle nehmen hierbei HCN-Kanäle (hyperpolarization activated and cyclic nucleotide gated channels) ein, die durch Hyperpolarisation aktiviert und durch zyklische Nucleotide moduliert werden. Im sinuatrialen Gewebe ist primär die Isoform HCN₄ existent und für die kardiale Erregungsbildung essenziell [Stieber et al., 2003]. Im aktivierten Zustand sind HCN-Kanäle für Na⁺- und K⁺-Ionen permeabel und initiieren die endogene Depolarisation der Membranspannung [DiFrancesco, 1981; Biel et al., 2009]. Erreicht die langsame diastolische Depolarisation den Schwellwert von circa -50 mV, öffnen sich spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle. Durch den Anstieg der Ca²⁺-Permeabilität wird ein Aktionspotenzial induziert. Die Repolarisation erfolgt über K⁺-Kanäle (siehe Abbildung 1.2 rechts) [Silverthorn, 2009; Huppelsberg & Walter, 2011].

Über Gap Junctions erreichen die Aktionspotenziale die kontraktile Zellen und induzieren analog des Vorgangs in Neuronen ein autoregeneratives Öffnen spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle. Der schnelle Natriumstrom in den intrazellulären Raum depolarisiert das Membranpotenzial auf etwa +20 mV. Das charakteristische Plateau im Aktionspotenzial der Kardiomyozyten resultiert aus der Überlagerung eines Ca²⁺-Influx und K⁺-Efflux. Am Ende der Plateauphase sinkt die Membranpermeabilität für Ca²⁺-Ionen und durch den repolarisierenden Kaliumstrom wird das Ruhepotenzial von ungefähr -90 mV wieder erreicht (siehe Abbildung 1.2 links) [Silverthorn, 2009].

Die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration während eines Aktionspotenzials induziert eine Ca²⁺-aktivierte Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Diese Ionen diffundieren zu den kontraktile Elementen, heben durch Absättigung der Troponin-C-Bindungsstellen den Hemmeffekt des Tropomyosins auf und induzieren eine Kontraktion. Durch die Abnahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration lösen sich die Ionen vom Troponin bzw. Myosin vom Aktin und die kontraktile Filamente kehren in ihre

relaxierte Position zurück [Silverthorn, 2009; Huppelsberg & Walter, 2011]. Die Refraktärzeit von Kardiomyozyten überdauert den Kontraktionsprozess. Somit werden tetanische Kontraktionen verhindert und sichergestellt, dass erst im relaxierten Zustand ein weiteres Aktionspotenzial ausgelöst werden kann [Tortora & Grabowski, 2003].

1.5 Extrazelluläre Ableitungen mit Mikroelektroden Arrays

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung von *in vitro* Modellen stehen elaborierte Verfahren zu Verfügung. Transmembrane und fluoreszenzoptische Methoden bedingen einen mechanischen bzw. chemischen Eingriff, was zu einer messtechnischen Manipulation der Zellaktivität und -viabilität führen kann [Borkholder, 1998; Mennerick et al., 2010]. Mikroelektroden Arrays (MEAs) erlauben die markerfreie, nicht-invasive Ableitung extrazellulärer Signale. Bei diesem Verfahren werden dissoziierte Zellen, reaggregierte zelluläre Netzwerke oder akute Gewebeschnitte an planaren Mikroelektroden, die als Array in ein Glas- oder Siliziumsubstrat eingebettet sind, immobilisiert (siehe Abbildung 1.3).

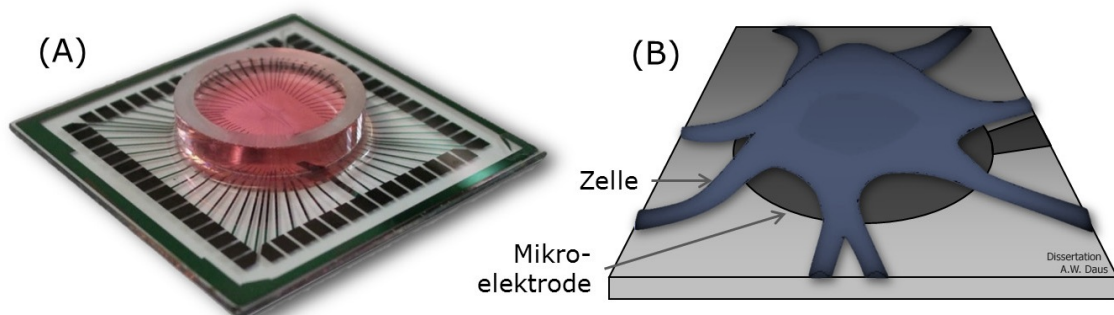


Abbildung 1.3: Extrazelluläre Ableitung mit Mikroelektroden Arrays. (A) 60-Kanal MEA von Multichannel Systems, Reutlingen. (B) Schematische Darstellung der Zell-Elektroden-Kopplung. Elektrogene Zellen werden auf planare, in ein Substrat eingebettete Mikroelektroden kultiviert. Zelluläre Aktionspotenziale können nicht-invasiv detektiert werden.

Zwischen kompetenter Zelle und Elektrode bildet sich ein mit Zellkulturmedium gefüllter Spalt von einigen Nanometern [vgl. Gleixner, 2004]. Der durch ein Aktionspotenzial verursachte Ionenstrom führt in diesem Bereich zu einem Spannungsabfall, der über die Mikroelektroden detektiert wird [Borkholder, 1998]. Die Signaltransduktion wurde in der Vergangenheit an vereinfachten Modellen für MEAs und FETs charakterisiert (siehe Abbildung 1.4) [Regehr et al., 1989; Bove et al., 1995; Offenhäusser & Knoll, 2001; Martinoia et al., 2004].

Das Messsignal ist dem intrazellulären Potenzialverlauf nicht kongruent und wesentlich von der Zell-Elektroden-Kopplung abhängig. Die Amplitude extrazellulärer Signale liegt im Bereich von $10^2 - 10^3 \mu V$ und steht in reziprokem Zusammenhang mit dem Zell-Elektroden-Abstand. Da das Messsignal von thermischem und biologischem Rauschen begleitet wird, ist der Messradius konventioneller MEAs auf etwa $100 \mu m$ limitiert [Egert et al., 2002a].

Werden intra- und extrazelluläre Potenziale korreliert, ist neben den Aktionspotenzialrauschen auch die Analyse der zugrunde liegenden Ionenströme möglich [Egert & Meyer, 2005]. Ferner erlaubt die Implementierung mehrerer Mikroelektroden als Array auf einem Chip die Analyse zeitlicher und räumlicher Aktivitätsmuster von *in vitro* Netzwerken aus Neuronen [z. B. Soussou et al., 2006] und Kardiomyozyten [z. B. Igelmund et al., 1999], deren Kontraktionen konventionelle Untersuchungen mit transmembranen oder optischen Verfahren komplizieren [Egert et al., 2006]. Damit stellen MEAs ein attraktives Instrument zur funktionalen Analyse zellulärer Aktivität in Kurzzeit- und Langzeitstudien dar. Je nach *in vitro* System lassen sich elektrophysiologische Untersuchungen über Wochen und Monate realisieren [Potter & DeMarse, 2001].

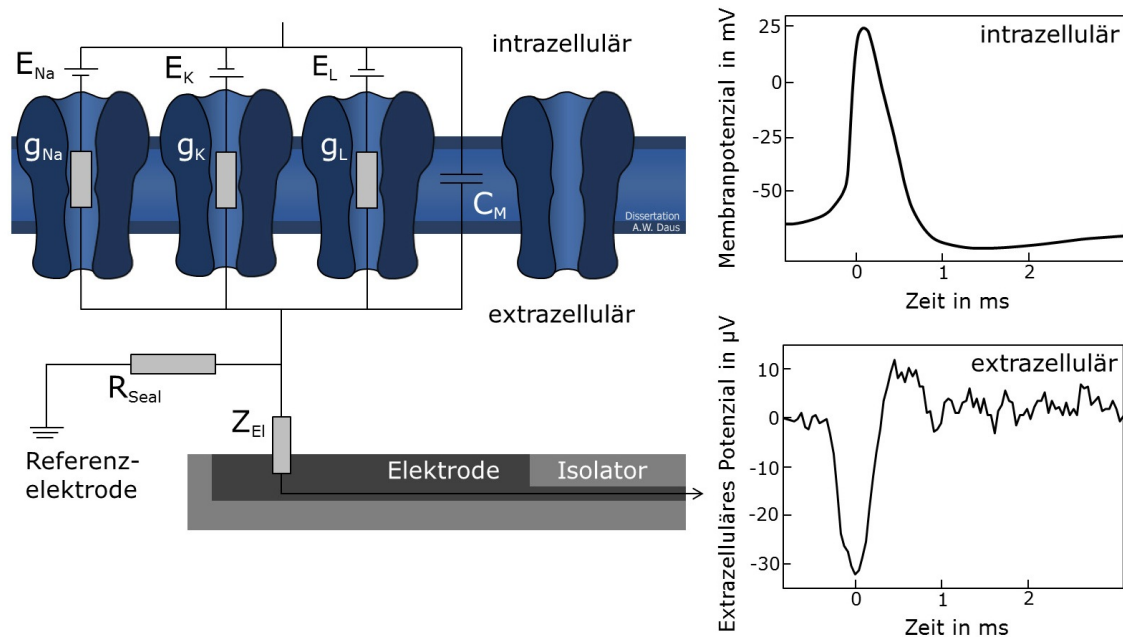


Abbildung 1.4: Prinzip der extrazellulären Ableitung mit MEAs (Struktur in Anlehnung an [Hierlemann et al., 2011]). In Abhängigkeit vom Nernst-Potenzial (E_x), der Leitfähigkeit der Ionenkanäle (g_x) für bestimmte Ionenarten x (Na^+ , K^+ bzw. L als Zusammenfassung geringerer Ionenanteile) und der Membrankapazität (C_M) wird während eines Aktionspotenzials ein Strom induziert [Hodgkin & Huxley, 1952d]. Zwischen Zelle und Elektrode führt dieser Ionenstrom zu einem Spannungsabfall, der dem Widerstand des Elektrolyten (R_{seal}) proportional ist [Borkholder, 1998]. Da R_{seal} wesentlich vom Abstand von Zelle und Elektrode bestimmt wird, stellt die Kopplung einen signifikanten Faktor dar. Daneben ist eine niedrige Elektrodenimpedanz (Z_{EI}) für ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis essenziell. Das Minimum im Verlauf des extrazellulären Signals korreliert zeitlich mit der schnellen Na^+ -Depolarisation im Aktionspotenzial [Egert et al., 2006].

Das Potenzial elektrophysiologischer Untersuchungen mit MEAs wurde in der Vergangenheit für Anwendungen der Pharmakologie [Meyer et al., 2004a], Toxikologie [Johnstone et al., 2010] und Grundlagenforschung [Stett et al., 2003] zusammengefasst. Als adäquates *in vitro* Modell wurden für den Biosensor dissoziierte Neuronen [z. B. Keefer et al., 2001; O’Shaughnessy et al., 2003; Chiappalone et al., 2003; Martinoia et al., 2005; Xiang et al., 2007] und Kardiomyozyten [z. B. Meyer et al., 2004a; Egert & Meyer, 2005; Natarajan et al., 2006] oder akute Gewebeschnitte aus dem Herzen [z. B. Bussek et al., 2009], Cortex [z. B. Bakker et al., 2009], Hippocampus [z. B. Jones et al., 2010], Cerebellum [z. B. Mapelli & D’Angelo, 2007] oder Retina [z. B. Neumann et al., 2008] herangezogen.

Akute Gewebeschnitte erhalten ihre native Netzwerkstruktur für einige Stunden [Heuschkel et al., 2006] und können daher für Kurzzeitexperimente als physiologisches Modellsystem verwendet werden. Limitiert wird die Versuchsdauer insbesondere durch die reduzierte Nährstoffversorgung zu zentralen Bereichen [Lin & Chang, 2008] bzw. an der Grenzfläche von MEA und Gewebeschnitt [Heuschkel et al., 2006]. Werden dissoziierte Zellen aus embryonalem Gewebe des Herzens oder Zentralnervensystems an MEAs immobilisiert, reorganisieren diese sich zu einem funktionalen, zweidimensionalen (2D) *in vitro* System. Kardiomyozyten bilden ein konfluentes Synzytium, das nach etwa ein bis drei Tagen intrinsische Aktivität – begleitet von synchronen Kontraktionen – zeigt [Connolly et al., 1990; Natarajan et al., 2006; Jiao et al., 2006]. Charakteristisch für die Entwicklung neuronaler *in vitro* Netzwerke ist die Formation von Neuriten und Synapsen. Elektrische Aktivität in Form einzelner spontaner Aktionspotenziale lassen sich nach wenigen Tagen in Kultur beobachten [Morefield et al., 2000; Chiappalone et al., 2003].

1.6 Dreidimensionale *in vitro* Systeme

Biohybride Systeme aus MEAs und Kardiomyozyten bzw. Neuronen stellen eine etablierte Methode zur multiparallelen, nicht-invasiven Ableitung elektrogener Aktivität in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung dar. Dissoziierte Zellen formen ein funktionales 2D Monolayer Netzwerk an der Elektrodenoberfläche und reagieren sensitiv auf chemische oder physikalische Stimulation. In einem lebenden Organismus sind Zellen jedoch in einer 3D Architektur organisiert und interagieren mit angrenzenden Zellen bzw. der extrazellulären Matrix über biochemische oder mechanische Signale [Pampaloni et al., 2007]. Die Kultivierung von *in vitro* Systemen als 2D Organisation an artifiziellen Oberflächen geht mit der Veränderung zellulärer Kommunikation und dem Verlust gewebespezifischer Eigenschaften einher [Abbott, 2003; Lin & Chang, 2008].

Während Methoden zur Kultivierung seit Jahrzehnten bekannt sind [Moscona, 1961; Eldale & Bard, 1972; Vollmer & Layer, 1986] und 3D Modelle erfolgreich, beispielsweise für Anwendungen der Onkologie [Hoffman, 1991; Mueller-Klieser, 1997] oder Entwicklungsbio-

logie [Layer et al., 1992; Layer & Willbold, 1993], eingesetzt wurden, konzentrierten sich *in vitro* Studien primär auf 2D Kultursysteme. Durch vergleichende systematische Untersuchungen gewannen 3D gegenüber 2D Modellen erst in den letzten Jahren zunehmendes Interesse und wurden als kompetenteres Ersatzmodell propagiert [Zhang, 2004; Pampaloni et al., 2007; Lin & Chang, 2008].

Je nach Kulturmethode unterscheiden sich zelluläre Eigenschaften in einer 2D bzw. 3D Architektur hinsichtlich Proliferation [Hindie et al., 2006], Morphologie [Weaver et al., 1997], Differenzierung [Willerth et al., 2006] oder Genexpression [Birgersdotter et al., 2005]. Native elektrophysiologische Eigenschaften ventrikulärer Kardiomyozyten zeigen in einem 3D *in vitro* System gegenüber der Monolayerkultur höhere *in vivo* Analogie [Bursac et al., 2003]. Wirkeigenschaften chemischer [McDonald et al., 1972] oder physikalischer [Behravesch et al., 2005] Provokation sind signifikant durch die Wahl des Kulturmodells bestimmt. Die Funktionalität elektrogener Zellen wie Kardiomyozyten und Neuronen ergibt sich durch die Organisation zu einem Netzwerk. In einem Monolayer System sind sowohl die sich aus z. B. Migration, Proliferation oder Differenzierung resultierende Netzwerkstruktur als auch die Ausbreitung elektrogener Signale auf den 2D Raum begrenzt und können die Situation im lebenden Organismus nur bedingt reproduzieren.

Zur Etablierung dreidimensionaler *in vitro* Modelle existieren unterschiedliche Methoden. Auf Trägerstrukturen basierende Verfahren nutzen synthetische Polymere oder Biomaterialien (z. B. Collagen oder Matrigel™) als 3D Gerüst. Trägerstrukturen können jedoch die Migration hemmen und Einfluss auf die Selbstorganisation des Netzwerks haben. Entsprechen die lateralen Abmessungen der Trägerstrukturen etwa denen der Zellen, liegt zwar ein 3D Netzwerk vor, jedoch bilden einzelne Zellen mit dem Gerüst eine 2D Mikroumgebung [Zhang, 2004].

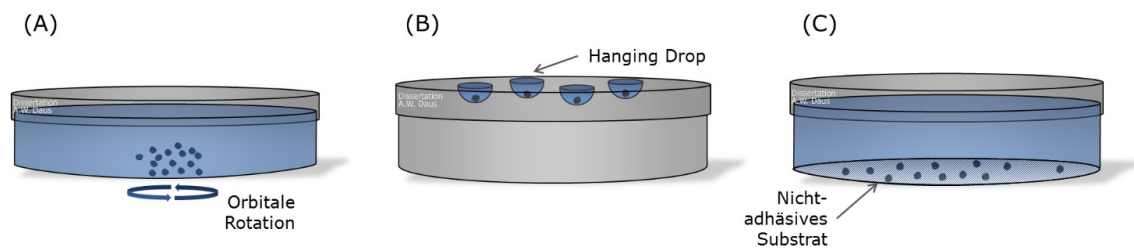


Abbildung 1.5: Methoden zur Reaggregation dissoziierter Zellen zu 3D Sphäroiden. (A) Rotationskultur (B) Hanging-Drop-Verfahren (C) Zellkultivierung auf nicht-adhäsiven Oberflächen.

Sphärische Reaggregate aus dissoziierten Zellen, sogenannte Sphäroide, verzichten auf exogene Trägerstrukturen. Sphäroide sind in etwa $300 - 500 \mu\text{m}$ groß, bestehen aus einigen $100 - 500 \cdot 10^3$ Zellen [Layer et al., 2001] und können beispielsweise durch Rotationskul-

tur [Moscona, 1961; Layer & Willbold, 1993], Hanging-Drop-Verfahren [Kelm et al., 2003] oder Verwendung nicht-adhäsiver Substrate [Yuhás et al., 1977] generiert werden (siehe Abbildung 1.5). Daneben lassen sich insbesondere für Hochdurchsatzverfahren Sphäroide auf chipimplementierten Mikrokavitäten reaggrieren [Rieke et al., 2008]. Durch die spezifische Netzwerk-Selbstorganisation und deren zugrunde liegenden Prozessen, wie Zell-Zell-Erkennung, Aggregation, Sortierung sowie Proliferation und Differenzierung, können sich histotypische Strukturen in einem Sphäroid ausbilden [Layer et al., 2001]. Dissoziierte Zellen aus der Retina embryonaler Hühner reaggrieren zu Sphäroiden mit distinktiven Zellschichten ähnlich der intakten Retina [Layer et al., 2002], was die Untersuchung neuroentwicklungsbiologischer Prozesse unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* erlaubt. In der Onkologie können Sphäroide als Modell für Tumore herangezogen werden, da sie Eigenschaften wie Proliferation oder Nährstoffversorgung imitieren [Kunz-Schughart et al., 1998]. Die Impedanzspektroskopie kann hierbei als nicht-invasives Verfahren zur Analyse der Zellphysiologie dienen [Robitzki et al., 2002; Kloss et al., 2008b]. Weiterhin lassen sich durch extrazelluläre Ableitung der Sphäroide mit Mikroelektroden Arrays Wirkeigenschaften chemischer oder physikalischer Stimulation, z. B. für Studien der Pharmakologie oder der Effekte elektromagnetischer Felder auf biologisches Gewebe, an einem avaskulären System untersuchen [Daus et al., 2011b, 2012].

1.7 Biologische Primärreaktionen auf elektromagnetische Felder

Elektrische und magnetische Felder sind nicht ausschließlich anthropogene Phänomene technologischer Entwicklungen in der mobilen Kommunikation, Energieversorgung oder medizinischer Therapie und Diagnostik. Sie treten natürlich auf, beispielsweise in Form des Erdmagnetfeldes oder der Potenzialdifferenz zwischen Ionosphäre und Erdoberfläche [Antonopoulos, 2003; Demtröder, 2008]. Die zunehmende Verbreitung des Mobilfunks und dessen niederfrequent modulierten, hochfrequenten elektromagnetischen Felder (EMF) erforderten jedoch eine Bewertung der damit verbundenen Risiken sowie der Festlegung von wissenschaftlich belastbaren Grenzwerten.

Der Energieeintrag durch die Absorption von EMF in biologisches Gewebe wird durch die spezifische Absorptionsrate (SAR) beschrieben. Die gesetzlichen Grenzwerte orientieren sich weitgehend an der dielektrischen Erwärmung in Folge der Absorption. Es wird davon ausgegangen, dass bei SAR-Werten unter 0,08 W/kg bei Ganzkörper- bzw. 2 W/kg bei Teilkörperexposition unter Berücksichtigung endogener Thermoregulationsprozesse keine gesundheitsschädlichen Effekte zu erwarten sind [ICNIRP, 1998].

Neben den thermischen Effekten, die die Basis für die Grenzwertfestlegung bilden, existieren athermische Wechselwirkungen, insbesondere der elektrischen Feldkomponente mit

biologischen Systemen. Starke Wechselfelder induzieren elektrokinetische Effekte an geladenen bzw. polarisierbaren Elementen, die in Form der Dielektrophorese oder Elektrorotation für die Zell- und Partikelcharakterisierung Anwendung finden. Die erforderlichen Feldstärken liegen bei etwa 5 kV und damit eindeutig im Bereich thermischer Effekte [Gimsa, 2006; Glaser, 2009].

Die Existenz athermischer Phänomene bei Einhaltung der gesetzlichen Basisgrenzwerte wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Genotoxische Effekte lassen sich quantenphysikalisch nicht direkt begründen, da die Energie elektromagnetischer Felder nicht zur Ionisation eines Moleküls bzw. zur Induzierung eines DNA-Strang-Bruchs ausreicht. Ein mutagenes Potenzial elektromagnetischer Felder müsste daher über sekundäre Mechanismen, beispielsweise den Reparaturprozessen, begründet sein [Phillips et al., 1998, 2009]. Experimentell konnten genotoxische Effekte bisher nicht reproduziert werden [Glaser, 2009]. Daneben wurden elektrophysiologische Effekte an unterschiedlichen Modellsystemen untersucht und insbesondere mögliche Wirkmechanismen an der Zellmembran diskutiert. Einen nichtlinearen Einfluss amplitudenmodulierter EMF auf die Kalziumhomöostase wurde in einer Reihe früher Arbeiten durch Verwendung radioaktiver Isotope beschrieben [Bawin et al., 1975; Blackman et al., 1980]. Die Existenz eines determinierten Fenstereffekts ist thermodynamisch jedoch kaum haltbar und konnte durch Patch-Clamp Messungen experimentell nicht bestätigt werden [Gimsa, 2006]. Die Heterogenität der Dielektrizitätseigenschaften von Zellmembran und -kompartimenten führte zur Diskussion über mögliche Demodulationsmechanismen in biologischen Systemen. Jedoch existiert weder eine theoretische noch eine experimentelle Bestätigung für den Demodulationsprozess [Gimsa, 2006; Glaser & Haberland, 2009].

Zusammenfassend gibt es derzeit keine wissenschaftlich akzeptierten Wirkmodelle für athermische Effekte schwacher elektromagnetischer Felder. Dennoch berichteten einige Studien sowohl bei Neuronen als auch Kardiomyozyten über veränderte Spontanaktivität nach bzw. während der Exposition [z. B. Seaman & DeHaan, 1993; Abbate et al., 1996; Tattersall et al., 2001]. Dies führt in aktuellen Zusammenfassungen zu einem uneinheitlichen Bild und trägt zur weitgehenden Unsicherheit bei der Grenzwertfestlegung bei [D'Andrea et al., 2003; Heynick et al., 2003; Juutilainen et al., 2011]. Studien auf epidemiologischer Ebene bzw. Experimente an einzelnen Versuchspersonen und Tiermodellen leisten einen wichtigen Beitrag zur Evaluierung potenzieller Gesundheitsrisiken. Epidemiologische Studien implizieren jedoch die Problematik systematischer Fehler bei der Auswahl und Klassifikation der Kontrollgruppen bzw. der untersuchten Endpunkte [Kundi, 2009]. Die Schwierigkeit bei *in vivo* Experimenten liegt in der Charakterisierung und Reproduzierung der Versuchsbedingungen, insbesondere der Dosimetrie. Werden individuelle Versuchstiere zur Beurteilung athermischer Effekte herangezogen, lässt sich der Stimulus im Vergleich zu pharmakologischen Studien nicht beliebig skalieren, da sonst mit thermischen Artefakten zu rechnen wäre [Leszczynski & Xu, 2010].

1.8 Pharmakologische Wirkstoffsuche

Die Arzneimittelentwicklung bedient sich unterschiedlicher molekularbiologischer, gentechnologischer bzw. biotechnologischer Methoden, um Schlüsselmechanismen von Krankheitsbildern und deren zugrunde liegenden Zielstrukturen zu identifizieren. Aus einer Leitstruktur wird eine Reihe von Substanzen, die mit distinkten Zielstrukturen interagieren, entwickelt und hinsichtlich Pharmakokinetik und Metabolismus optimiert. Diese Wirkstoffkandidaten werden in der präklinischen Phase durch intensive *in vivo* bzw. *in vitro* Experimente auf ihre pharmakologischen, toxikologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften untersucht. Für den Übergang zur klinischen Phase und zur Erstanwendung am Menschen muss ein detailliertes Wirkprofil vorliegen und die Substanz den allgemein geforderten Qualitätsansprüchen genügen [Estler & Schmidt, 2007].

Ionenkanäle sind integrale Bestandteile der Zellmembran und Zielstruktur für eine Vielzahl pharmakologischer Wirkstoffe wie beispielsweise Lokalanästhetika, Antikonvulsiva oder Antiarrhythmika [Graefe et al., 2011]. In der Neuropharmakologie sind GABAerge Rezeptoren mit ihren Bindungsstellen für Barbiturate oder Benzodiazepine von besonderem Interesse. Benzodiazepine, wie z. B. Diazepam, zählen zu den wirksamsten Substanzen zur Therapie von Schlafstörungen oder epileptischen Zuständen. Durch allosterische Modulation wird die GABA induzierte Öffnungsfrequenz von Cl⁻-Kanälen erhöht und daher die Genese hyperpolarisierender Potenziale induziert. Durch die kooperative Wechselwirkung wird den Wirkstoffen nur minimale Toxizität zugeschrieben [Sieghart, 2006].

Zur medikamentösen Therapie kardialer Dysfunktionen, wie z. B. Herzrhythmusstörungen, bieten sich Antiarrhythmika, eine Reihe selektiver Ionenkanalblocker, an. Phänomenologisch lassen sich Antiarrhythmika durch ihre Wirkung auf Aktionspotenziale den Na⁺-Kanalblocker (Klasse I), β -Rezeptorenblocker (Klasse II), K⁺-Kanalblocker (Klasse III) und Kalziumantagonisten (Klasse IV) zuordnen und können je nach pathophysiologischer Situation zum Einsatz kommen. Einfluss auf die Herzfunktion können jedoch auch nicht-kardiale Arzneimittel, wie z. B. Antibiotika oder Psychopharmaka, in Form proarrhythmischen Potenzials haben [Lüllmann et al., 2010].

Die experimentelle, funktionale Untersuchung der elektrophysiologischen Wirkmechanismen von pharmakologischen Substanzen stellt damit einen konstitutiven Bestandteil der Arzneimittelentwicklung dar. Im industriellen Maßstab sind insbesondere in der präklinischen Phase Verfahren erforderlich, die neben wissenschaftlichen auch wirtschaftlichen und ethischen Ansprüchen genügen.

1.9 Ziel der Arbeit

Die Symbiose zellulärer *in vitro* Systeme und mikrostrukturierter Sensoren birgt für Anwendungen der Pharmakologie, Toxikologie oder Grundlagenforschung hohes Potenzial, evoziert jedoch eine insbesondere multidisziplinäre Aufgabe. Es werden zum einen Zellkulturen benötigt, die den Ansprüchen eines physiologisch repräsentativen Abbilds der *in vivo* Situation genügen. Zum anderen müssen technische Systeme und Analysemethoden entwickelt werden, die zelluläre Reaktionen qualitativ und quantitativ verwertbar machen.

Rotationsvermittelte Reaggregate, sogenannte Sphäroide, erlauben die *in vitro* Kultivierung dissoziierter Zellen in einer 3D Architektur. Zellen adhären dabei nicht an artifizialen Substraten, sondern können durch selbstorganisierende Prozesse ein funktionales, histotypisches Netzwerk reetablieren und analog der *in vivo* Situation eine 3D interzelluläre Kommunikation und gewebespezifische Struktur erhalten.

Sphäroide aus Kardiomyozyten bzw. Neuronen wurden in der Vergangenheit für Anwendungen der Pharmakologie [Bartholomä et al., 2005], Toxikologie [van Vliet et al., 2008], oder zur Untersuchung neuronaler Plastizität [Uroukov & Bull, 2008] vorgeschlagen. Jedoch wurden sie bisher im Allgemeinen nicht als zuverlässiges Analysesystem akzeptiert. Biohybride Systeme aus Sphäroiden und MEAs könnten jedoch – insbesondere im Bereich der klinischen Pharmakologie und Toxikologie bzw. in der Grundlagenforschung – wertvolle Informationen zur Beurteilung elektrophysiologischer Eigenschaften zellulärer Netzwerke liefern und die Lücke zwischen biochemischen Methoden auf der einen Seite und Tierversuchen auf der anderen Seite schließen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Biosensor aus Sphäroiden und Mikroelektroden Arrays entwickelt werden, der zelluläre Reaktionen auf chemische und physikalische Provokation qualitativ und quantitativ verwertbar macht. Dazu werden Kardiomyozyten bzw. Neuronen embryonaler Hühner in Rotationskultur zu Sphäroiden reaggregiert und nicht-invasiv an Mikroelektroden Arrays gekoppelt. Gewebe des Herzens ist im nativen Zustand durch regelmäßige, synchrone Netzwerkaktivität sowie charakteristischen Membranpotenzialänderungen während eines Aktionspotenzials gekennzeichnet. Mit geeigneten Referenzsubstanzen soll geprüft werden, ob sich der Biosensor zur Beurteilung der Ionenströme, Kontraktionsfrequenz, Synchronisation oder möglichen Arrhythmien eignet und somit funktionale Aussagen über den Stimulus auf ein lebendes System zulässt.

Messsignale von neuronalen Netzwerken auf MEAs sind durch einzelne, asynchrone Spikes (extrazellulär abgeleitete Aktionspotenziale) und Bursts (hochfrequente Gruppen von einzelnen Spikes) sowie Rauschanteilen geprägt. Durch die 3D Strukturierung des Netzwerks ist im Vergleich zu 2D Systemen eine höhere Anzahl von Neuronen am Signal beteiligt, die in unterschiedlichen horizontalen Ebenen des Sphäroids liegen und damit unterschiedliche Zell-Elektroden-Konfigurationen aufweisen. Daher ist zu erwarten, dass konventionel-

le, thresholdbasierte Ansätze und Algorithmen zur Signalklassifikation nicht geeignet sind. Auf Basis elaborierter Methoden sollen im Rahmen dieser Arbeit neue Algorithmen entwickelt werden, die eine valide Quantifizierung und Interpretation neuronaler Sphäroidsignale zulässt. Diese Algorithmen sollen anschließend zur Untersuchung chemisch provozierter Effekte durch Applikation von GABA_A-bindenden Substanzen herangezogen werden.

Neben chemisch stimulierten Effekten sollen an Sphäroiden aus Kardiomyozyten auch Wechselwirkungen von biologischem Gewebe und hochfrequenten elektromagnetischen Feldern untersucht werden. Dazu wird der Biosensor in einen Expositionsaufbau implementiert und elektromagnetische Felder mit für den Mobilfunk relevanten Frequenzen und Feldstärken appliziert. Zur Beurteilung der Feld- bzw. Temperaturbedingungen werden Finite Elemente Simulationen herangezogen und messtechnisch verifiziert.

Teilaspekte der vorliegenden Arbeit wurden bereits in den Journalen *Bioelectromagnetics* [Daus et al., 2011b], *Sensors and Actuators* [Daus et al., 2012] und *Journal of Neuroscience Methods* [Bestel, Daus et al., 2012] publiziert, zur Veröffentlichung in *Transactions on Biomedical Engineering* [Nick, Daus et al., 2013] eingereicht sowie als Konferenzbeiträge [Daus et al., 2009; Daus et al., 2010a; Daus et al., 2010b; Daus et al., 2011a; Daus & Thielemann, 2010; Goldhammer, Daus et al., 2009; Thielemann, Daus et al., 2012] vorgestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Dreidimensionale Zellkultur

Für die *in vitro* Kultivierung primärer Zellen in einer 3D Architektur gibt es unterschiedliche Ansätze und Methoden. In dieser Arbeit wurde die Sphäroidtechnik gewählt, da diese seit Jahren für unterschiedliche Gewebearten etabliert ist und auf exogene Trägerstrukturen verzichtet. Damit war sichergestellt, dass Zellsortierungsprozesse aber auch mechanische Kontraktionen im Falle der Kardiomyozyten nicht durch artifizielle Substrate beeinflusst wurden.

Zur Herstellung von Sphäroiden aus Kardiomyozyten wurde das Herzgewebe embryonaler Hühner (Stadium 28–29 HH, [Hamburger & Hamilton, 1951]) isoliert und mit F12 (Medien bezogen von CC Pro, Oberdorla, sofern nicht anders vermerkt) gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe mit einer Mikroschere in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) zerkleinert und resultierende Fragmente in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der erste enzymatische Dissoziierungsschritt erfolgte in 10 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) bei 37 °C. Nach 10 min wurde der Überstand abgenommen und verworfen, da hier primär nicht-kontraktile Zellen, wie z. B. Fibroblasten, enthalten waren [Sperelakis, 1978]. Es folgte eine erneute Zugabe von 3,5 ml Trypsin/EDTA. Nach 8 min Inkubation bei 37 °C wurde der Überstand in eiskaltes DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum) überführt, 3,5 ml frisches Trypsin/EDTA den Fragmenten zugegeben und etwa 10 mal vorsichtig auf- und abpipettiert. Dieser Schritt wurde 3–5 mal wiederholt, bis das Gewebe vollständig dissoziiert war. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Porengröße 40 μm) transferiert, um restliche Fragmente zu beseitigen und 10 min bei 900 rpm zentrifugiert (Labofuge 400 R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Das resultierende Zellpellet wurde in Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FCS, 2 % CS (Chicken Serum), 0,5 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin) resuspendiert und zunächst in einer Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Dies hatte zur Folge, dass ein Teil der Fibroblasten und Endothelzellen adhärirten und im Überstand ein höherer Anteil kontraktiler Zellen vorlagen. Der Überstand konnte nach 1 h abgezogen und die Zelldichte mit einer Neubauer improved Zählkammer bestimmt werden. $1,8 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Zellkulturmedium wurden in 35 mm Petrischalen überführt und diese auf einen orbitalen Rotationsschüttler (72 rpm, 20 mm Orbit) in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO_2)

platziert. 5–7 mal wöchentlich fand ein Austausch des Zellkulturmediums durch frisches, vorgewärmtes statt.

Neuronale Sphäroide wurden aus dissoziierten Zellen des Mesencephalons von Hühnerembryonen (Stadium 28–29 HH) reaggregiert. Die mechanische und enzymatische Vereinzelung erfolgte analog der Kardiomyozyten, jedoch waren nur 2–3 Verdauungsschritte in Trypsin/EDTA nötig und auf eine Vorkultivierung in Zellkulturflaschen wurde verzichtet. Die Zellkonzentration wurde vor der Kultivierung auf $2 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Medium eingestellt.

2.2 Zweidimensionale Zellkultur

Für vergleichende Untersuchungen wurden dissoziierte Kardiomyozyten bzw. Neuronen auch als Monolayer auf Petrischalen und MEAs kultiviert. Die anorganischen Substrate reflektierten jedoch nicht die Eigenschaften biologischen Gewebes, stellten für Zellen folglich eine unattraktive Umgebung dar und mussten einer physikalischen bzw. chemischen Vorbehandlung unterzogen werden. MEAs sind im nativen Zustand hydrophob und wurden daher für 5 min mit Sauerstoffplasma (Femto 40 kHz, Diener, Nagold) exponiert. Dies führte zur Spaltung von Oberflächenmolekülen und Bildung einer polaren und somit hydrophilen Oberfläche [Egert & Meyer, 2005]. Weiterhin erfolgte vor der Zellaussaat eine Immobilisierung von Adhäsionspromotoren an den MEA bzw. Petrischalenoberflächen. Für die 2D Kultivierung von Kardiomyozyten wurden die Substrate ganzflächig mit $50 \mu\text{g/ml}$ Fibronectin in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bedeckt und inkubiert. Nach 2 h wurde das Fibronectin abgenommen und die Oberfläche dreifach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension mit $250 \cdot 10^3$ Zellen als Tropfen auf die MEAs bzw. Petrischalen appliziert und nach 5 h mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Die Kultivierung von neuronalen Zellen erfolgte auf Substrate, die mit Poly-D-Lysin (Sigma Aldrich, Taufkirchen) beschichtet waren. Poly-D-Lysin wurde dazu in PBS gelöst und in einer Konzentration von $0,1 \text{ mg/ml}$ über Nacht auf MEAs bzw. Petrischalen gegeben. Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschrte und dissoziierte Neuronen ($125 \cdot 10^3$ Zellen in $100 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium) konnten direkt auf die Substrate gegeben werden.

2.3 Extrazelluläre Ableitungen mit Mikroelektroden Arrays

Die verwendeten MEA-Chips (Multichannel Systems MCS GmbH, Reutlingen) inkorporierten 60 Elektroden in einem Glassubstrat. Neben Standard MEAs, deren Elektroden ($30 \mu\text{m}$ Elektrodendurchmesser, $200 \mu\text{m}$ Abstand zwischen den Elektroden) in einer 8×8 Konfiguration angebracht waren, kamen High-Density (HD) MEAs ($10 \mu\text{m}$ Elektroden-

durchmesser, $30\ \mu\text{m}$ Abstand zwischen den Elektroden) mit zwei 5×6 Konfigurationen auf einem Chip zum Einsatz. Die Elektroden bestanden aus Titannitrid (TiN), das durch chemische Gasphasenabscheidung (CVD, chemical vapor deposition) von Stickstoff auf native Titansubstrate prozessiert wurde. Herstellungsbedingt resultierte aus dem CVD-Verfahren eine nanofraktale Oberflächenstruktur der Elektroden, was durch die vergrößerte Oberfläche zu einer niedrigeren Elektrodenimpedanz und im Vergleich zu Gold- oder Platinelektroden niedrigeren Rauschverhältnissen führte [Fejtl et al., 2006]. Unter Annahme stationärer Bedingungen betrug der Effektivwert (rms, root mean square) des Rauschens bei Standard MEAs mit $30\ \mu\text{m}$ Elektrodendurchmesser etwa wenige $10^{-6}\ \text{V}$. HD MEAs besaßen kleinere Elektroden und damit eine reduzierte Elektrodenoberfläche, erlaubten jedoch durch die geringeren Elektrodenabstände die Adressierung und Ableitung mehrerer Bereiche eines Sphäroids (vgl. Abbildung 2.1). Standard MEAs lieferten auf 1–4 Elektroden verwertbare Signale, bei HD MEAs wurden bis zu 20 aktive Elektroden pro Sphäroid registriert, was eine detaillierte Analyse zeitlicher und räumlicher Aktivitätsmuster zuließ.

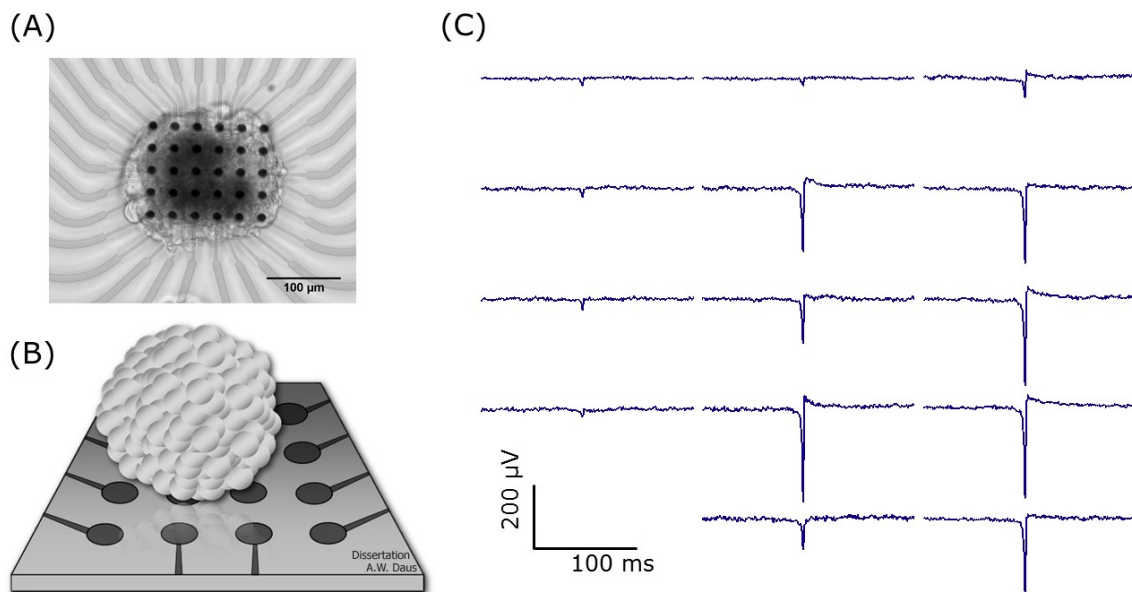


Abbildung 2.1: Analyse zeitlicher und räumlicher Aktivitätsmuster mit High-Density MEAs. (A) Einzelner Sphäroid auf HD MEA Oberfläche. Neben des Sphäroids sind die Elektroden als schwarze, quadratisch angeordnete Kreise, sowie deren assoziierten, halbtransparenten Leiterbahnen ersichtlich. (B) Schematische Darstellung der Sphäroid-Elektroden-Kopplung. Die Implementierung eines Arrays in einer 5×6 Konfiguration mit $30\ \mu\text{m}$ Elektrodenabstand erlaubte die Adressierung und Ableitung multipler Netzwerkpositionen, vgl. (C). Abbildung modifiziert nach [Daus et al., 2012].

Die Elektrodenfelder waren von einem Glasring umgeben (vgl. Abbildung 1.3, Kapitel 1), was die Zugabe von 1–2 ml Zellkulturmedium und pharmakologischen Substanzen ermöglichte. Die Leiterbahnen bestanden aus Titan (Standard MEAs) bzw. Indiumzinnoxid (HD

MEAs) und waren durch eine 500 nm dicke Siliziumnitridschicht von Medium und Zellen isoliert. Mit einem Heizelement konnte die Temperatur während der Experimente konstant auf 37 °C gehalten werden.

Über einen Vorverstärker (MEA 1060, Multichannel Systems) mit einem Verstärkungsfaktor von 1200 für das Frequenzband 1 Hz–3 kHz wurden die Elektroden den analogen Eingängen einer Messkarte (NI 6071 E, National Instruments, Austin, USA) zugeführt und kontinuierliche extrazelluläre Potenziale in digitale, zeitdiskrete Signale gewandelt. Die Abtastrate betrug für Kardiomyozyten 20 kHz und für Neuronen 25–50 kHz. Die Messdatenerfassung und -speicherung wurde über eine LabVIEW-basierte Softwareumgebung realisiert [Steininger, 2005; Bestel, 2010]. Die Algorithmen zur Messdatenauswertung wurden in der Programmiersprache MATLAB (The MathWorks, Natick, USA) implementiert. Bedingt durch die unterschiedliche Ausprägung extrazellulärer Potenziale von Kardiomyozyten und Neuronen wurde die Analyse separat behandelt (siehe Kapitel 2.4 und 2.5).

2.4 Analyse extrazellulärer Potenziale der Kardiomyozyten

Im funktional suffizienten Herzgewebe sind rhythmische, formkonstante und quasi netzwerksynchron auftretende Aktionspotenziale kontraktiler Kardiomyozyten charakteristisch. Endogene bzw. exogene Faktoren können Einfluss auf diese elektrophysiologischen Eigenschaften haben und pathologische Zustände induzieren oder in Form kardioaktiver Substanzen zur medikamentösen Therapie bei Herzinsuffizienz Einsatz finden. Daher wurden zur Charakterisierung des sphäroidbasierten Biosensors, bzw. zur Untersuchung chemisch oder physikalisch provozierten Reaktionen primärer Kardiomyozyten die Kontraktionsfrequenz, die Rhythmik bzw. Arrhythmien, der zeitliche Verlauf einzelner Feldpotenziale, sowie die Netzwerksynchronizität als Kriterien herangezogen.

Zellsignale wurden durch Definition einer Schwellspannung (Threshold) vom Rauschen diskriminiert. Unter Annahme approximativer Normalverteilung errechnete sich der Threshold für jede Elektrode individuell nach $T = 7 \cdot \sigma_R$, wobei σ_R der Standardabweichung des Signalrauschens entspricht [Chiappalone et al., 2005]. Wurde der Threshold vom Messsignal überschritten, wurde das absolute Minimum des Verlaufs ermittelt und dies als Zeitstempel (Timestamp) gespeichert. Nach jedem Timestamp war eine Refraktärperiode von 200 ms festgesetzt, in der kein weiteres Aktionspotenzial detektiert werden konnte. Die zeitlichen Abstände zwischen zwei aufeinanderfolgenden Timestamps wurden als Interfeldpotenzialintervalle (IFI) definiert.

Die Feldpotenzialfrequenz (FP Frequenz) ergab sich aus dem reziproken Median aller IFIs einer Messung. Der Median entspricht dem 0,5-Quantil $\tilde{x}_{0,5}$ einer sortierten Folge und ist

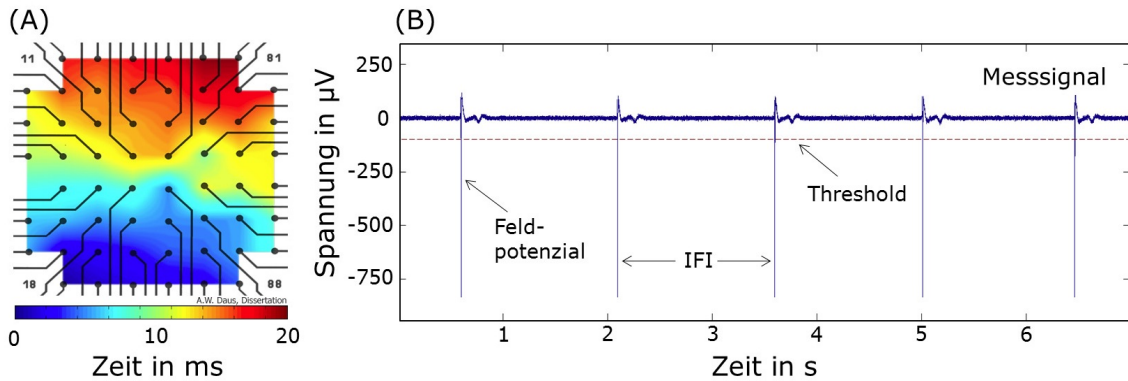


Abbildung 2.2: Kriterien zur Analyse elektrophysiologischer Eigenschaften von Kardiomyozyten. (A) Signalausbreitung in einem 2D Netzwerk auf einem MEA. Die zeitliche Verzögerung der Feldpotenziale ist durch Falschfarben dargestellt und dokumentiert synchronisierte Netzwerkaktivität. (B) Extrazellulär abgeleitetes Signal von Kardiomyozyten. Modifiziert nach [Daus et al., 2011b].

damit unabhängig von der Verteilungsfunktion und unempfindlich gegenüber z. B. messtechnisch bedingten Ausreißern. Daher wurde der Median als robuster Schätzer dem Arithmetischen Mittel vorgezogen. Die mittlere absolute Abweichung vom Median (MAD) ist ein Maß für die Streuung der IFIs und wurde zur Bewertung der Rhythmik verwendet. Das Aktionspotential einer Herzmuskelzelle folgt einem charakteristischen Verlauf, der spezifischen transienten Ionenströmen unterliegt. Bei einer Abtastrate von 20 kHz (vgl. Kapitel 2.3) lässt sich das extrazellulär abgeleitete Aktionspotential der Dauer 300 ms (vgl. Kapitel 1.4) durch $6 \cdot 10^3$ Datenpunkte rekonstruieren und somit einzelne Phasen des Signals bewerten. Änderungen im Signalmuster wurden durch Applikation pharmakologisch wirksamer Referenzsubstanzen provoziert, um Rückschlüsse auf die Bedeutung distinkter Elemente im repetitiven extrazellulären Potenzial zu ziehen. Die Evaluierung der Netzwerksynchronizität ergab sich durch Korrelation der Feldpotenzialfrequenz an unterschiedlichen Netzwerkpositionen eines Sphäroids. Hierzu wurden insbesondere HD MEAs verwendet, die mit einem Interelektrodenabstand von $30 \mu\text{m}$ eine hohe räumliche Auflösung gewährleisten.

2.5 Multivariate Analyse neuronaler Sphäroidsignale

Während das extrazellulär abgeleitete Signal von Kardiomyozyten durch das rhythmische Auftreten netzwerksynchroner Feldpotenziale geprägt ist, liegt bei neuronalen Zellen ein scheinbar stochastisches Muster aus einzelnen Spikes und Bursts vor. Konventionelle Verfahren, die auf Basis statischer Thresholds zur Analyse zweidimensionaler Netzwerke herangezogen werden [z. B. Morefield et al., 2000; Chiappalone et al., 2005; Xiang et al., 2007], konnten für Sphäroide nicht angewandt werden. Die 3D Architektur von Sphäroiden führt im Detektionsradius der Messelektrode zu einer lokal höheren Zelldichte und

Partizipation multipler Neuronen am Messsignal. Bedingt durch den individuellen Zell-Elektroden-Abstand sind Amplituden der Spikes höchst variabel und können in manchen Fällen nicht augenscheinlich isoliert werden. Daneben werden Bursts durch niederfrequente Signalanteile begleitet und können zu deutlichen Artefakten führen (vgl. Abbildung 2.3).

Zur Analyse neuronaler Sphäroidsignale wurde daher eine neue Vorgehensweise entwickelt und angewandt. Mittels robuster statistischer Methoden wurde ein dynamischer Threshold berechnet, der im ersten Schritt potenzielle Spikes isolierte. Anschließend wurden insgesamt 17 Attribute für jeden Spike ermittelt und klassifiziert. Im letzten Schritt wurden die Zellsignale durch eine multivariate Betrachtung vom Rauschen diskriminiert und eine Spike- bzw. Burstanalyse durchgeführt.

2.5.1 Definition eines dynamischen Thresholds

Konventionelle Algorithmen zur Analyse zweidimensionaler Netzwerke nutzen lediglich die Amplitude als Parameter zur Spikeextraktion. Dazu wird ein Teil des Messsignals isoliert, in dem keine Zellsignale vorliegen und die Standardabweichung σ des Rauschens ermittelt [vgl. Egert et al., 2002a]. Unter Annahme stationärer Bedingungen und eines normalverteilten Rauschsignals lassen sich durch $7 \cdot \sigma_R$ über 99,999 % des Rauschens eliminieren. Im Falle von neuronalen Sphäroiden sind Signalabschnitte, die ausschließlich Rauschen repräsentieren, jedoch nicht eindeutig definierbar. Partizipieren extrazelluläre Potenziale niedriger Amplitude in diesen Bereichen, kann nur bedingt von stationären bzw. normalverteilten Bedingungen ausgegangen werden und Thresholds lassen sich nicht präzise bestimmen.

Daher wurde das Gesamtsignal zur Berechnung des Thresholds verwendet. Es konnte angenommen werden, dass der Anteil zellulärer Signale klein ist im Vergleich zu Rauschanteilen und die mittlere Abweichung vom Median (MAD) \tilde{D} als robuster Parameter zur Thresholddefinition herangezogen werden kann. Der Threshold T berechnete sich nach

$$T = 3 \cdot \tilde{D} + \tilde{x}_{0,5} \quad (2.1)$$

Der Median $\tilde{x}_{0,5}$ diene als Korrektorelement für messtechnisch bedingte Nullpunktfehler. Wäre das Messsignal standardnormalverteilt, würde nach Formel 2.2 [Huber, 1981; Owen, 2010]

$$\sigma = \frac{1}{\Phi(\frac{3}{4})} \cdot \tilde{D} \approx 1,483 \cdot \tilde{D} \quad (2.2)$$

der Threshold etwa 2σ entsprechen. Aus dieser Berechnung folgt, dass das Rauschen nicht eindeutig isoliert wurde und neben zellulären Spikes auch Spikeartefakte vorlagen. Die-

se wurden in einem zweiten Analyseschritt durch Evaluation mehrerer spikespezifischer Attribute (vgl. nachfolgenden Abschnitt 2.5.2) eliminiert.

Ausgeprägte Burstereignisse wurden häufig von niederfrequenten Signalanteilen begleitet. Tiefe Frequenzen können zwar durch Anwendung geeigneter Hochpassfilter (vgl. Abbildung 2.3 B) unterdrückt werden, jedoch geht dies mit dem Verlust bzw. der Manipulation spikespezifischer Informationen im Frequenz- und Zeitbereich einher. Daher wurde ein dynamisches Thresholdmodell entwickelt, das robust gegenüber niederfrequenten Artefakten ist (vgl. Abbildung 2.3 A).

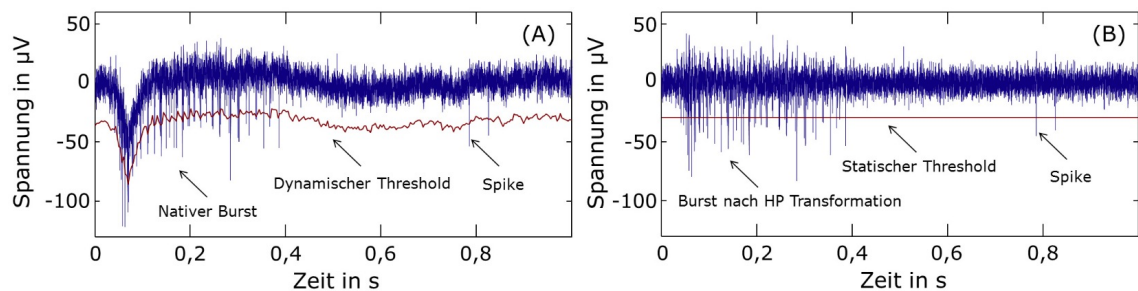


Abbildung 2.3: Potenzialverlauf während eines Bursts. (A) Bursts werden von niederfrequenten Signalanteilen begleitet. Das dynamische Thresholdmodell folgt tiefen Frequenzen und erlaubt eine robuste Signalanalyse. (B) Durch 100 Hz Hochpass (HP) Transformation lassen sich niederfrequente Anteile eliminieren. Dies geht jedoch mit dem Verlust bzw. der Manipulation spikespezifischer Informationen einher.

Das Messsignal wurde zunächst durch gleitende Polynomannäherung nach Savitzky und Golay [Savitzky & Golay, 1964] geglättet. Dabei wurden die Messwerte eines gleitenden Fensters durch Regressionsanalyse einem Polynom 1. Ordnung approximiert. Das geglättete Signal wurde nach dem in Formel 2.1 errechneten Schwellwert verschoben und diente als neuer Threshold. Im Gegensatz zu statischen Verfahren folgte der dynamische Threshold niederfrequenten Signalanteilen und konnte zur verlässlichen Spikedetektion herangezogen werden.

2.5.2 Multivariate Spikedetektion

Aus dem dynamischen Thresholdverfahren resultierten eine Reihe potenzieller Spikes, die neben zellulären Signalen rauschbedingte Artefakte involvierten. Da eine reine Diskriminierung über die Amplitude bei Sphäroiden keine verwertbaren Ergebnisse lieferte, wurden die Signale anhand multipler Eigenschaften im Zeit- und Frequenzbereich untersucht. Neben der negativen Amplitude wurden für jeden der detektierten Spikes weitere 16 Attribute berechnet (siehe Abbildung 2.4).

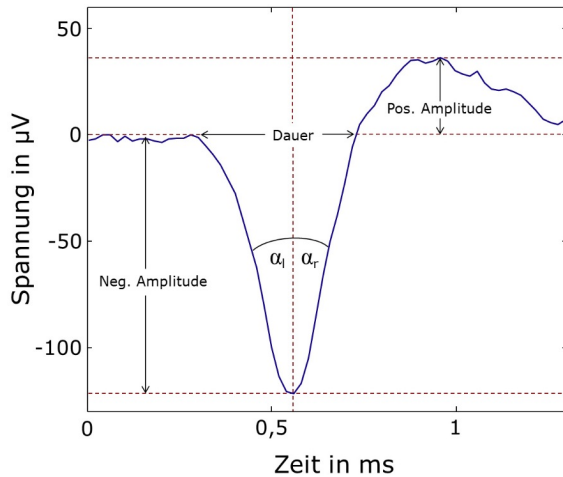


Abbildung 2.4: Multivariate Spikedetektion. Potenzielle Spikes wurden anhand multipler Attribute im Zeit- und Frequenzbereich diskriminiert:

- Positive und negative Signalamplitude
- Winkel der steigenden und fallenden Flanke
- Spikedauer
- Negative und positive Signalenergie
- NEO Koeffizient
- 1.–3. Hauptkomponente
- 1.–3. Wavelet Verteilungskoeffizient
- 1.–3. Wavelet Shannon Entropie Koeffizient

Die negative bzw. positive Amplitude ergab sich aus dem absoluten Minimum bzw. Maximum eines Spikes. Ausgehend vom absoluten Minimum konnte der Winkel nach links, entsprechend der fallenden Flanke, der Winkel nach rechts, entsprechend der steigenden Flanke, sowie die Dauer des Spikes mittels einfacher trigonometrischer Funktionen berechnet werden. Die positive bzw. negative Signalenergie kann insbesondere bei schwachem Signal-Rausch-Verhältnis (SNR, signal-to-noise-ratio) oder niedrigen Abtastraten dienen und wurde für das Signal $s(t)$ nach Gleichung 2.3 berechnet [Bestel, Daus et al., 2012].

$$E_s = \int_{-\infty}^{\infty} s^2(t) dt \quad (2.3)$$

Der nichtlineare Energieoperator (NEO) ist ein Schätzer des Energiegehaltes einer linearen Oszillation und amplifiziert hochfrequente Anteile in stochastischen Signalen [Kaiser, 1990; Mukhopadhyay & Ray, 1998]. Für zeitdiskrete Signale $x(n)$ lässt sich der NEO $\Psi_d[x(n)]$ nach Gleichung 2.4 bestimmen [Maragos et al., 1993].

$$\Psi_d[x(n)] = x^2(n) - x(n-1) \cdot x(n+1) \quad (2.4)$$

Neben geometrischen Merkmalen wurden frequenz- und vektorbasierte Attribute berechnet [Algorithmen entsprechend Bestel, 2011] und zur Klassifikation herangezogen. Die Hauptkomponentenanalyse ist ein etabliertes Verfahren der multivariaten Statistik, bei dem die Varianz eines n -dimensionalen Datensatzes durch unkorrelierte Faktoren, sogenannte Hauptkomponenten, beschrieben wird [Jolliffe, 2002]. Die Hauptkomponenten ergeben sich aus der Linearkombination des nativen Datensatzes, der sich aus Spannungswerten der potenziellen Spikes zusammensetzt. Die Eigenvektoren der korrespondierenden Kovarianz-

matrix bilden die Koeffizienten der Linearkombination. Zur Merkmalsextraktion wurden die ersten drei Hauptkomponenten herangezogen, wobei die erste die größtmögliche Varianz beschreibt. Folgende Hauptkomponenten sind jeweils orthogonal, nicht korreliert und erfassen die Varianz, die von vorausgehenden Hauptkomponenten nicht erfasst wurden [Schendera, 2004; Bestel, 2011; Bestel, Daus et al., 2012].

Als Attribute im Frequenzbereich wurden zwei Varianten von Wavelet Koeffizienten der Wavelet-Paket-Transformation (WPT) herangezogen. Zeitsignale können allgemein durch Fourier Transformation in den Frequenzbereich abgebildet werden. Um Zeitinformationen nicht-stationärer Signale zu erhalten, bietet sich die gefensterter Fourier Transformation an, die in ihrer Frequenz- und Zeitauflösung jedoch nicht adaptiv ist [Stark, 2005]. Die Wavelet Transformation wurde entwickelt, um frequenz- und zeitspezifische Informationen eines Signals zu erhalten. Die Wavelet Transformation eines kontinuierlichen Signals $f(t)$ ist daher eine Funktion der variablen Skalierungsfaktoren a bzw. Translationsfaktoren b und lässt sich nach Gleichung 2.5 darstellen [Hulata et al., 2002].

$$W(a, b) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{a}} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) f(t) dt \quad (2.5)$$

Für zeitdiskrete Signale erfolgt die WPT analog eines rekursiven Filterprozesses, in dem das Signal in Hochpass- bzw. Tiefpasskomponenten getrennt wird. Aus den Iterationen resultiert eine Reihe von Wavelet Koeffizienten. Die drei Wavelet Koeffizienten, die die Unterschiede im Signalmuster am exaktesten beschreiben konnten, wurden durch Evaluierung der individuellen Verteilungsfunktion ermittelt und als Attribute herangezogen. Daneben wurde die Shannon Entropie für die einzelnen Wavelet Koeffizienten berechnet und als drei weitere Attribute zur Spikediskriminierung verwendet [Bestel, 2011; Bestel, Daus et al., 2012].

2.5.3 Clustering

Um aus den 17 berechneten Attributen geeignete Merkmale zur Spikediskriminierung zu extrahieren, wurden zunächst die Verteilungsfunktionen der Attribute auf Bi- bzw. Multimodalität und Redundanz untersucht. Dazu wurde die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Merkmale durch n -modale Funktionen approximiert [Algorithmen entsprechend Bestel, 2011].

War das Attribut durch eine unimodale Verteilungsfunktion beschrieben (vgl. Abbildung 2.5 B), wurde es in der Analyse nicht verwertet, da es keine kausale Diskriminierung ermöglichte. Lag eine Korrelation mit anderen Merkmalen vor, lieferte das Attribut keine

konstruktive Information und wurde daher ebenfalls nicht zur Separation in Betracht gezogen. Aus den resultierenden Attributen wurden bis zu $n = 8$ ausgewählt, die aufgrund ihrer Verteilungsfunktion die höchste Trennschärfe auswiesen [Bestel, 2011].

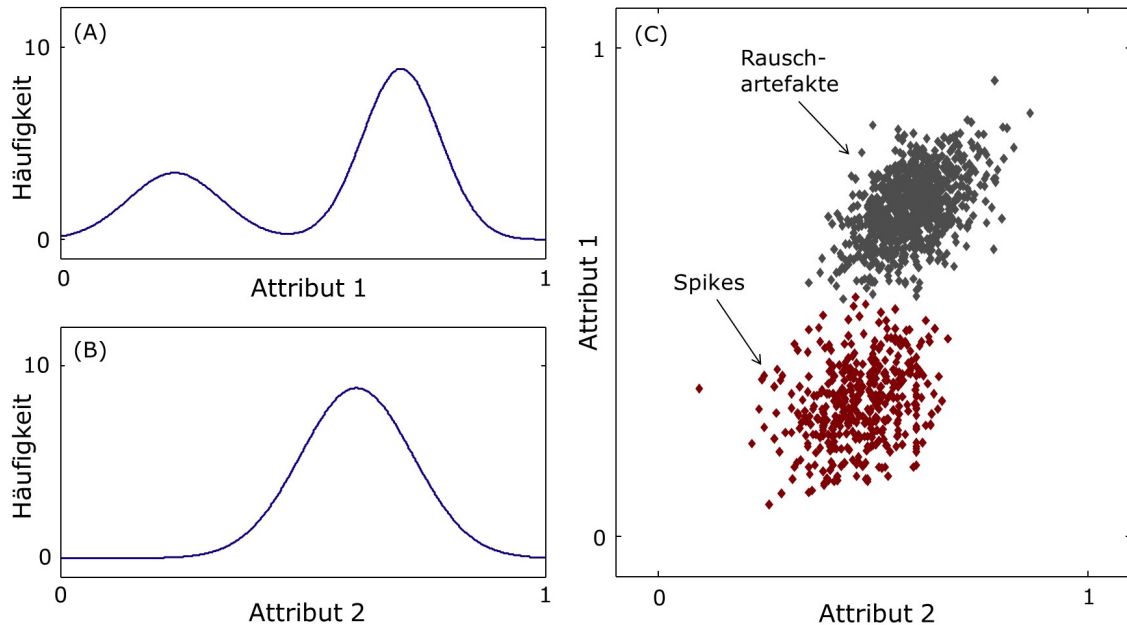


Abbildung 2.5: Ergebnis der multivarianten Spikeanalyse. (A) Attribute mit bimodaler Verteilung wurden je nach Ausprägung der Trennschärfe zur Spikediskriminierung herangezogen. (B) Lag eine unimodale Verteilungsfunktion vor, war das Attribut nicht zur Separation geeignet. (C) Die Darstellung im zweidimensionalen Merkmalsraum lässt augenscheinlich zwei Objektgruppen, sogenannte Cluster, identifizieren. Durch weiche Clusteranalyse mit dem EM Algorithmus lassen sich die Datenpunkte zellulären Spikes (rot) oder Rauschartefakten (grau) zuordnen.

Im letzten Schritt fand die Trennung von zellulären Spikes und Rauschartefakten durch Clusteranalyse mittels EM (Expectation Maximization) Algorithmus [Dempster et al., 1977] statt. Die Daten im n -dimensionalen Merkmalsraum wurden iterativ durch Approximation Gaußscher Mischverteilung beschrieben [Bestel, 2011]. Somit konnte jeder Datenpunkt mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Gaußfunktion und entsprechend dem Cluster Spikes oder Rauschartefakte (siehe Abbildung 2.5 C) zugeordnet werden.

2.5.4 Burstanalyse

Zur Bewertung der elektrischen Aktivität und Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurde neben der Anzahl der Spikes pro Minute (Spikerate) auch die Anzahl der Bursts (Burstrate) herangezogen, da diese Ereignisse für neuronale Netzwerke charakteristisch sind. Dazu wurden die detektierten Spikes und deren Zeitstempel (Timestamps)

in ein binäres Muster, den Spiketrain, überführt und die zeitlichen Abstände der Spikes (Interspikeintervalle, ISI) ermittelt. Ein Burst wurde nach der Methode der maximalen Intervalle mit folgenden Parametern definiert [Tam, 2002; Jungblut et al., 2009]:

- Interspikeintervall bei Burstbeginn ≤ 10 ms
- Interspikeintervall bei Burstende ≤ 20 ms
- Interburstintervall ≥ 500 ms
- Anzahl von Spikes in einem Burst ≥ 3

Entsprechend wurde eine hochfrequente Folge von Spikes als Burst gewertet, wenn diese aus mindestens 3 Spikes im maximalen Abstand von jeweils 10 ms bestand. Terminiert wurden die Bursts durch das maximale Interspikeintervall von 20 ms sowie dem minimalen Burstabstand der Dauer 500 ms [Jungblut, 2006].

2.6 Pharmakologische Untersuchungen

Die intrinsischen Signalmuster der Sphäroide wurden durch Applikation pharmakologisch wirksamer Substanzen modifiziert, um Aussagen über Sensitivität bzw. Selektivität des Biosensors zu treffen. Dazu wurden die MEAs entsprechend Kapitel 2.2 präpariert, jedoch wurde bei Experimenten mit Kardiomyozyten auf die Fibronectinimmobilisierung an der Substratoberfläche verzichtet. Die MEAs wurden mit 1 ml Zellkulturmedium gefüllt, einzelne Sphäroide der Rotationskultur entnommen und auf den Elektroden platziert. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C, um eine stabile Zell-Elektroden-Kopplung sicherzustellen. Nach mindestens 2 h wurden die MEAs aus dem Brutschrank entnommen und die native Aktivität über die Dauer von 1–3 min aufgezeichnet. Die kardio- bzw. neuroaktiven Substanzen wurden mit Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt und konnten den Sphäroiden direkt zugegeben werden. Dabei war zu beachten, dass durch die Applikation die Menge des im MEA existenten Mediums um maximal 10 % verändert wurde. Somit konnten mechanische bzw. metabolische Effekte reduziert werden. Es folgte eine zweite Messung, deren extrahierte Parameter auf die Kontrollsituation normiert wurden. Die Sphäroide wurden jeweils nach den Experimenten verworfen und nicht zur Untersuchung weiterer Substanzen herangezogen.

An Kardiomyozyten wurden die Substanzen Isoproterenol, Lidocain, Diltiazem und 4-Aminopyridin (Sigma-Aldrich) zwischen 3–10 div (days in vitro, Tage in Kultur) untersucht. Isoproterenol ist ein β -adrenozeptor Agonist, der ähnlich dem Adrenalin positive chronotrope Wirkung besitzt [Aravanis et al., 2001]. Lidocain bzw. Diltiazem sind Antiarrhythmika, die sich aufgrund ihrer elektrophysiologischen Wirkmechanismen der Klasse I (Natriumkanalblocker) bzw. Klasse IV (Kalziumkanalblocker) zuordnen lassen [Freissmuth

et al., 2012]. 4-Aminopyridin hemmt reversibel die Kaliumleitfähigkeit durch Interaktion mit der α -Untereinheit des entsprechenden Kanalproteins [Koch, 2004].

Die elektrischen Aktivitätsmuster von neuronalen Sphäroiden wurden an den Kulturtagen 14–21 durch Applikation von GABA und Bicucullin (Sigma-Aldrich) modifiziert. Bicucullin ist ein kompetitiver GABA Antagonist und konkurriert direkt mit dem Neurotransmitter um die Bindung am Rezeptorkomplex. Die inhibitorische Wirkung von GABA wird somit durch Bicucullin gehemmt, was im Gehirn zu einer Zunahme der Aktivität bzw. epileptischen Zuständen führen kann [Alger & Möhler, 2001; Jungblut, 2006].

2.7 Elektromagnetische Exposition

Die elektromagnetische Felderzeugung zur Untersuchung biologischer Primärreaktionen wurde mit einem offenen, transversal elektromagnetischen (TEM) Wellenleiter (Stripline) realisiert [Goldhammer, 2008, 2009]. Die Stripline (siehe Abbildung 2.6) bestand aus zwei planparallelen Metallplatten im Abstand von 50 mm. Das Hochfrequenzsignal wurde mit einem Signalgenerator (SML03, Rohde & Schwarz, München) erzeugt, verstärkt (AP32 SV125, Prâna, Brive, Frankreich) und über eine Koaxialverbindung dem oberen Metallelelement, dem Septum zugeführt. Dies hatte zur Folge, dass sich zwischen Septum und unterer Platte, die als Massefläche diente, ein homogenes TEM Feld ausbilden konnte. Elektrische und magnetische Feldkomponente waren zueinander orthogonal angeordnet, wobei der elektrische Vektor vertikal polarisiert war.

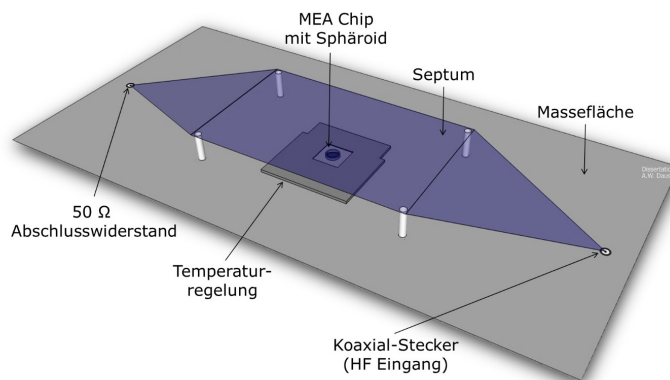


Abbildung 2.6: Erzeugung transversal elektromagnetischer Felder mittels Stripline. Über einen Koaxialstecker wurde die HF Energie in die Stripline überführt, wodurch sich ein homogenes Feld zwischen Septum und Massefläche ausbildete. Die Geometrie war auf einen Wellenwiderstand der Stripline von $50\ \Omega$ ausgelegt. Zur Vermeidung von Reflexionen und stehenden Wellen wurde das System mit einem Abschlusswiderstand terminiert. Mit einer Gesamtlänge von 1000 mm und einem Abstand von 50 mm zwischen Septum und Massefläche konnten elektromagnetische Felder im Frequenzbereich 0 Hz bis über 2 GHz erzeugt werden. Abbildung reproduziert nach Vorlage von [Goldhammer, 2009].

Dielektrische bzw. metallische Materialien zwischen Septum und Massefläche können Inhomogenitäten in elektromagnetischen Feldern induzieren. Für die exakte Bestimmung der Dosimetrie mussten daher neben Stripline auch Temperaturregler, MEA, Zellkulturmedium, Sphäroid und Elektrode berücksichtigt werden. Die Berechnung der Feldbedingungen und SAR-Werte erfolgte auf Basis von Finite Elemente Simulationen. Das System wurde dazu in eine finite Anzahl von Komponenten diskretisiert und die Lösung rechnergestützt numerisch approximiert.

Im ersten Teil der Expositionsexperimente wurden Sphäroide und MEAs analog Kapitel 2.6 präpariert und in der Stripline platziert. Nach Aufzeichnung der nativen Aktivität wurden die Sphäroide mit gepulsten elektromagnetischen Feldern (900 MHz; 8,3 Hz Puls) für 1 min exponiert. Der durchschnittliche SAR-Wert innerhalb der Sphäroide betrug 0 mW/kg (=Kontrolle), 100 mW/kg und 250 mW/kg. Anschließend erfolgte eine zweite Messung zur Identifizierung möglicher Kurzzeiteffekte. Im zweiten Teil wurde die Pulsfrequenz exakt auf die native Feldpotenzialrate der Sphäroide eingestellt. Durch Modifikation der Pulsfrequenz um 5–20 % wurden potenzielle direkte Interferenzen untersucht.

Elektromagnetische Felder können bei hinreichenden SAR-Werten zu thermischen Effekten führen. Daher wurde für alle Experimente eine Temperaturregelung eingesetzt, die eine konstante Proben temperatur von 37 °C sicherstellte. In Kontrollexperimenten wurde diese Regelung eingesetzt, um die Proben temperatur im Bereich von 36–38 °C zu variieren und rein thermisch begründete Änderungen im Aktivitätsmuster der Kardiomyozyten zu analysieren.

2.8 Mikroskopie

Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden die Sphäroide zunächst mit 2,5 % Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich) fixiert. Nach 2,5 h wurden das Glutaraldehyd abgenommen und über die Dauer von 60 min drei Waschschr itte mit PBS durchgeführt. Anschließend erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe. Dazu wurden die Sphäroide für jeweils 15 min in 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 100 % Ethanol inkubiert. Die Dehydrierung wurde mit drei weiteren Inkubationsschr itten in 25 %, 50 % Hexamethyldisilazan (HMDS) in Ethanol und 100 % HMDS abgeschlossen. Nachdem das HMDS vollständig verdunstet war, wurden die Sphäroide unter dem Rasterelektronenmikroskop Hitachi TM 1000 (Hitachi, Japan) untersucht.

Die Entwicklung der *in vitro* Netzwerke und die intrinsischen Kontraktionseigenschaften von Kardiomyozyten wurden mit dem Durchlichtmikroskop Eclipse Ti (Nikon, Japan) analysiert. Zur Größenbestimmung der Sphäroide wurden die inversmikroskopischen Aufnahmen mittels Schwellwertverfahren in ein binäres Abbild überführt und durch die Software NIS-Elements (Nikon) die Durchmesser der Flächenmuster automatisch extrahiert.

2.9 Statistik

Die Experimente wurde an n Proben aus m unterschiedlichen Präparationen durchgeführt. Die Messdaten wurden jeweils auf den Wert des nativen Zustands normiert und für jede Dosis als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Untersuchung der statistischen Signifikanz erfolgte durch den t-Test mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,05$. Zur Prüfung der Normalverteilung wurde der Lilliefors-Test herangezogen.

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung an neuronalen Sphäroiden wurde durch nichtlineare Regression unter Verwendung der Sigmoidfunktion

$$y(c) = \frac{y_{nat} - y_{sat}}{\left(\frac{c}{c_0}\right)^{n_H} + 1} + y_{sat} \quad (2.6)$$

approximiert. Die Variablen y_{nat} und y_{sat} beschreiben die elektrische Aktivität im nativen bzw. gesättigten Zustand, c_0 die mittlere effektive (EC_{50}) bzw. inhibitorische (IC_{50}) Konzentration und n_H den Hill-Koeffizienten [vgl. Jungblut et al., 2009].

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische und morphologische Eigenschaften der Kardiomyozyten

Die aus dem Herzgewebe von Hühnerembryonen isolierten und dissoziierten Zellen reaggregierten in Rotationskultur zu dreidimensionalen Sphäroiden. Durch die kontinuierliche, horizontale orbitale Rotation waren quasi Mikrogravitationsbedingungen existent und Zellen adhärten nicht an der Petrischale, sondern lagerten sich zu einzelnen Reaggregaten zusammen. Erste kontraktile Cluster aus etwa 100 Zellen konnten nach 6 Stunden in Rotationskultur identifiziert werden. Nach 24 Stunden hatten sich morphologisch stabile sphärische Reaggregate, sogenannte Sphäroide formiert. Aus einer Präparation (10 embryonale Herzen, Stadium 28–29 HH) entstanden ungefähr 700–1000 Sphäroide, die jeweils ein individuelles und autonomes *in vitro* Netzwerk darstellten (siehe Abbildung 3.1 B).

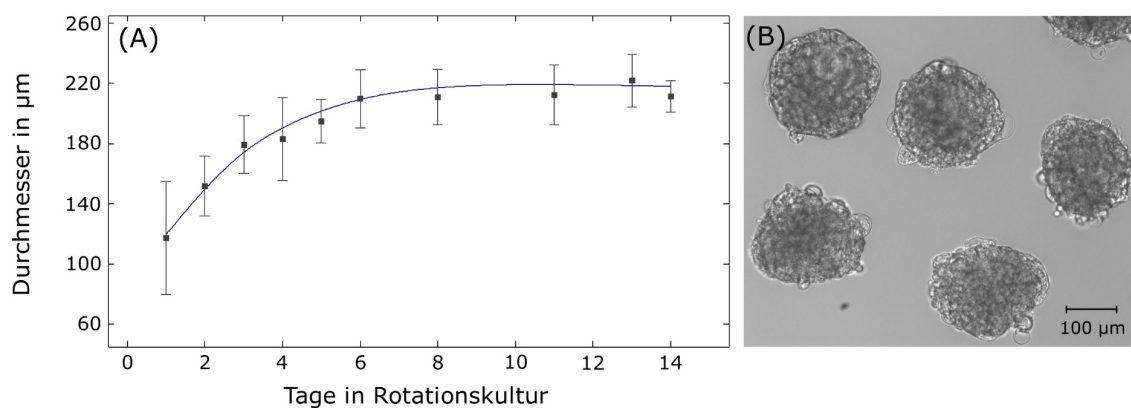


Abbildung 3.1: Reaggregation dissoziierter Zellen aus dem Herzgewebe zu Sphäroiden. (A) Durchschnittliche Größe der Sphäroide (Mittelwert aus $m = 3$ Präparationen) in Abhängigkeit der Kulturdauer, geglättet (blaue Linie) durch gleitende Polynomannäherung. (B) Inversmikroskopische Aufnahme einzelner Sphäroide nach 7 div.

Die Durchmesser der Sphäroide nach 1 div betragen etwa $120 \mu\text{m}$, gefolgt von einer deutlichen Zunahme der Größe an 2 bzw. 3 div. Nach einer Woche in Rotationskultur wurden

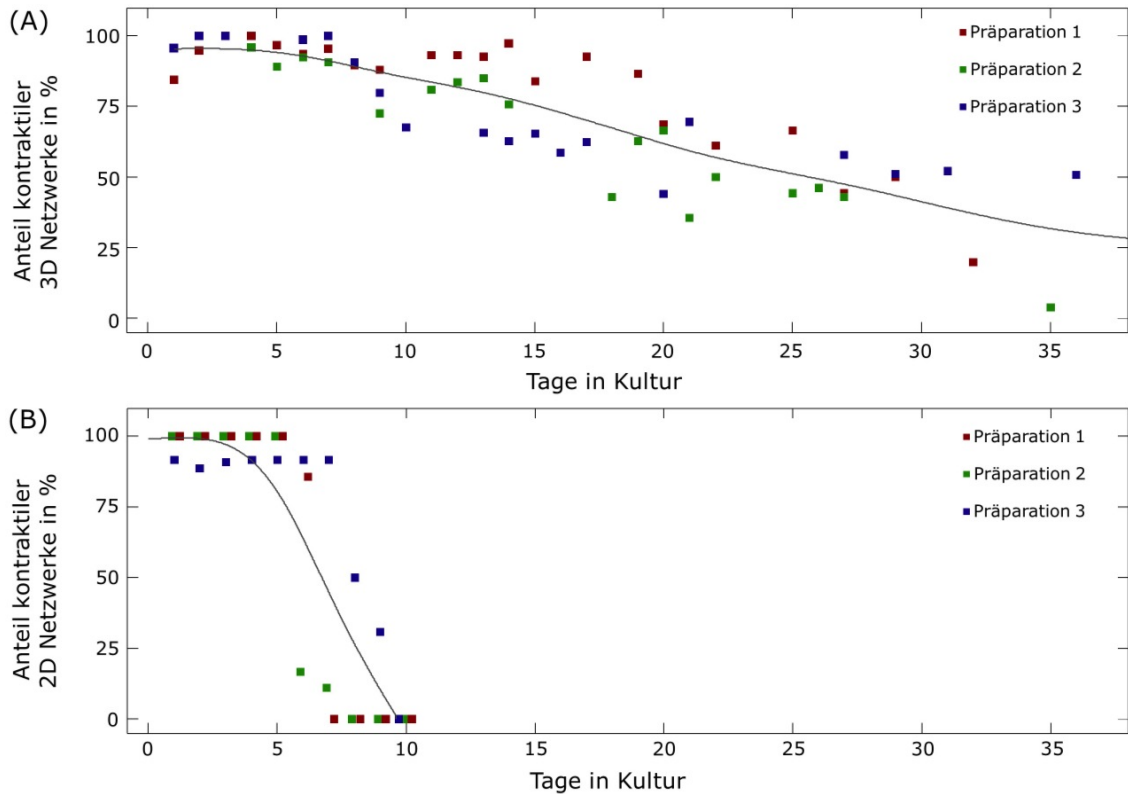


Abbildung 3.2: Intrinsic contractions 2D and 3D kultivierter Kardiomyozyten. (A) Sphäroide zeigten über mehrere Wochen autorhythmische Aktivität. (B) Intrinsic contractions von Monolayer Netzwerken konnten je nach Präparation bis etwa 5–10 div identifiziert werden.

keine signifikanten Änderungen der Größe identifiziert und die Durchmesser der Sphäroide erreichten eine Sättigung bei 200–250 μm (siehe Abbildung 3.1 A). Einzelne Sphäroide wiesen höhere Durchmesser auf, überschritten 300 μm im Allgemeinen jedoch nicht.

Autorhythmische Kontraktionen sind eine wesentliche Eigenschaft von Kardiomyozyten. Die Formation von Sphäroiden aus isolierten und dissoziierten Zellen ermöglichte die selbstorganisierende Reetablierung eines Netzwerkes, einschließlich der Ausbildung von Schrittmacherzentren, der interzellulären Signalpropagation über Gap Junctions und der Entwicklung spontaner mechanischer Kontraktionen. Der Anteil kontraktile Sphäroide am Tag 2 in Rotationskultur betrug 98,4% ($m = 5$ Präparationen). Für elektrophysiologische Experimente wurden die Sphäroide zwischen 3–10 div herangezogen, jedoch wurden autorhythmische Kontraktionen bis zu einigen Wochen in Kultur beobachtet (siehe Abbildung 3.2 A). Im Untersuchungszeitraum (3–10 div) zeigten 82,3% der 3D Netzwerke intrinsic Aktivität ($m = 5$ Präparationen).

Wurden dissoziierte Kardiomyozyten in einer konventionellen 2D Architektur kultiviert, zeigte das reetablierte Netzwerk analog der Sphäroide regelmäßige Kontraktionen nach 1 div. Waren initial multiple Schrittmacherzentren in einem Netzwerk existent, konnte im Allgemeinen nach spätestens 48 h eine Synchronisierung beobachtet werden. Über 90% der

Netzwerke waren bis 5 div kontraktile, jedoch wurde in den folgenden Tagen eine Abnahme der intrinsischen Aktivität festgestellt. Nach 10 div konnten bei den 2D Netzwerken visuell keine Kontraktionen identifiziert werden (siehe Abbildung 3.2 B).

3.2 Pharmakologische Untersuchungen an Kardiomyozytsphäroiden

Mechanische Kontraktionen der Sphäroide aus Kardiomyozyten gingen mit der Ausbildung von Aktionspotenzialen einher, die extrazellulär mit MEAs abgeleitet wurden. Die Amplituden der gemessenen Signale erreichten mehrere $100\ \mu V$ und variierten je nach Zell-Elektroden-Konfiguration. Mit Standard MEAs konnten 1–4 Elektroden je Sphäroid ausgewertet werden. HD MEAs zeigten ein geringeres Signal-Rausch-Verhältnis, erlaubten jedoch die Ableitung von bis zu 20 aktiven Elektroden pro Sphäroid. Die Analyse der zeitlichen und räumlichen Signalmuster zeigte eine synchronisierte Netzwerkaktivität in den Sphäroiden. In keinem der Experimente wurden multiple Areale mit abweichenden Kontraktions- bzw. Feldpotenzialfrequenzen identifiziert.

Zur Bewertung des Biosensors aus MEA und Sphäroid hinsichtlich Sensitivität und Selektivität wurden die nativen Signale durch Applikation pharmakologisch wirksamer Referenzsubstanzen modifiziert. Da die Feldpotenzialfrequenz sowie der formkonstante Verlauf der Membranspannung während eines Aktionspotenzials charakteristische und hervorsteckende Merkmale zellulärer Aktivität im Herzgewebe sind, wurden primär diese Parameter in den Experimenten adressiert.

3.2.1 Modifikation der Feldpotenzialfrequenz durch Isoproterenol

Die initiale, native Feldpotenzialfrequenz (FP Frequenz) variierte je nach Sphäroid bzw. Kulturdauer und erreichte bis zu 1,5 Hz, entsprechend 90 detektierten Feldpotenzialen pro Minute. In Abbildung 3.3 A ist das native Signalmuster eines einzelnen Sphäroids dargestellt. Die Analyse der Abstände zwischen individuellen Aktionspotenzialen (IFI) dokumentierte homogene und regelmäßige Aktivität (vgl. hierzu Abbildung 3.3 D). Die Applikation des β -adrenozeptor Agonisten Isoproterenol im Nanomolarbereich zeigte eine dosisabhängige Steigerung der Feldpotenzialfrequenz (siehe Abbildung 3.3 B und C). Für die Konzentrationen 1,25 nM bzw. 125 nM betrug die mittlere auf den nativen Zustand normierte Steigerung $139,7\% \pm 12,7\%$ bzw. $154,4\% \pm 16,5\%$ ($n = 5$ Experimente). Aus einer weiteren Erhöhung der Konzentration resultierte keine Steigerung der Feldpotenzialfrequenz. Sie betrug nach Applikation von 1,25 μM Isoproterenol $152,6\% \pm 20,7\%$. Höhere Konzen-

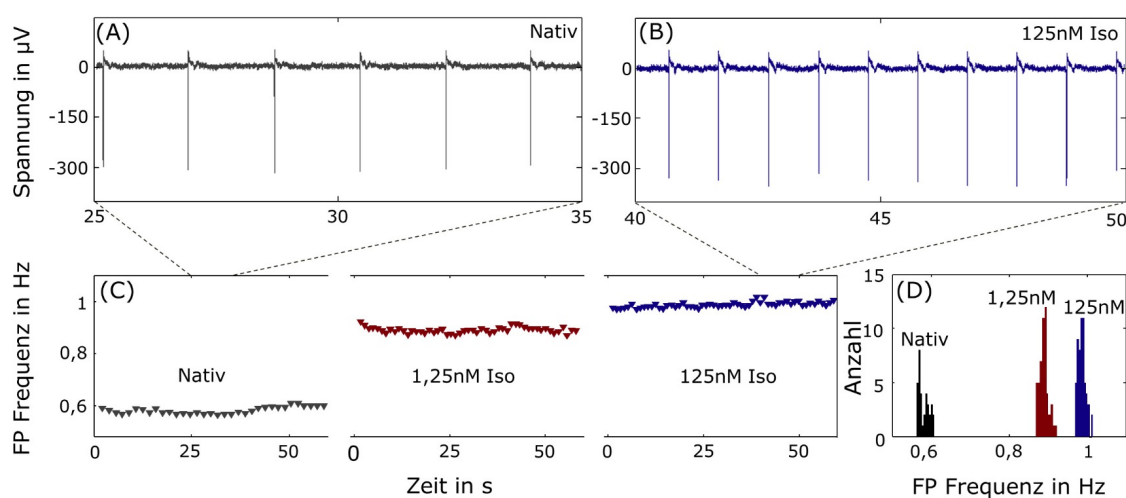


Abbildung 3.3: Extrazelluläre Potenziale von Sphäroiden aus Kardiomyozyten. Die native Aktivität (A) konnte durch Applikation des β -adrenozeptor Agonisten Isoproterenol (Iso) im Nanomolarbereich gesteigert werden (B, C). Die Analyse der FP Frequenz dokumentierte regelmäßige Aktivität (D). Abbildung modifiziert nach [Daus et al., 2012].

trationen wurden nicht untersucht. In Kontrollexperimenten wurde den Sphäroiden nach Aufzeichnung der nativen Aktivität $50 \mu\text{l}$ reines Zellkulturmedium zugegeben und eine erneute Messung durchgeführt. Hierbei wurden keine signifikanten Änderungen identifiziert. Die normierte Feldpotenzialfrequenz betrug für $n = 7$ Experimente $101,0\% \pm 4,8\%$.

3.2.2 Modifikation der Membranpermeabilität für bestimmte Ionenarten

Das extrazellulär abgeleitete Feldpotenzial kontraktiler Kardiomyozytsphäroide variierte je nach individueller Messung, jedoch konnten repetitive Muster in den Signalen identifiziert werden. Das initiale Element eines Feldpotenzials war ein schneller Spannungsabfall zur maximalen negativen Amplitude. Anschließend war eine Plateau-ähnliche Phase der Dauer 100–200 ms und eine Repolarisierung zum Nullpotenzial zu beobachten (vgl. Abbildung 3.5 A). Durch Korrelation der Komponenten des extrazellulären Feldpotenzials und des zugrunde liegenden Aktionspotenzials lassen sich Eigenschaften transientser Ionenströme bzw. Mechanismen an Ionenkanälen untersuchen. Zur Beurteilung distinkter Elemente der Feldpotenziale wurden die Substanzen Lidocain, Diltiazem und 4-Aminopyridin appliziert und die modifizierten Signalmuster ausgewertet.

Inhibition der Natriumpermeabilität durch Lidocain

Lidocain ist ein Lokalanästhetikum vom Säureamidtyp, das beispielsweise zur Oberflächen- oder Spinalanästhesie eingesetzt wird [Kistner, 2009]. Im Herzgewebe hemmt Lidocain den

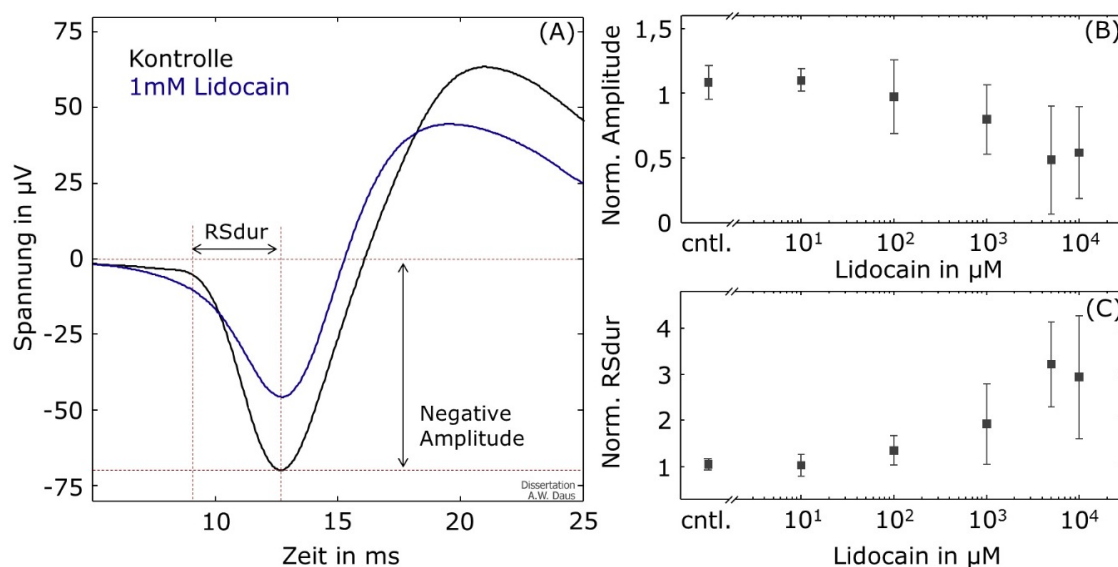


Abbildung 3.4: Inhibition der Natriumpermeabilität durch Lidocain. (A) Die Applikation von Lidocain in Konzentrationen bis 10 mM führte zu einer augenscheinlichen Modifikation der initialen Feldpotenzialkomponente. Die maximale negative Amplitude (B) und die Dauer des schnellen Spannungsabfalls RSdur (C) waren signifikant verändert ($n \geq 6$). Abbildung modifiziert nach [Daus et al., 2012].

schnellen Einstrom von Natrium durch Blockierung der Ionenkanäle und ist als membranstabilisierendes Antiarrhythmikum zur Behandlung ventrikulärer Extrasystolie indiziert [Estler & Schmidt, 2007]. Die Sphäroide zeigten nach Applikation von Lidocain eine dosisabhängige Abnahme der maximalen negativen Amplitude und eine Verzögerung des schnellen Spannungsabfalls RSdur (siehe Abbildung 3.4).

Die auf den nativen Zustand normierte Amplitude war in der Kontrollmessung ($0 \mu\text{M}$) sowie der minimal applizierten Dosis ($10 \mu\text{M}$) leicht erhöht. Für höhere Konzentrationen ($\geq 1 \text{ mM}$) wurde jedoch eine signifikante Abnahme der Amplitude identifiziert. Der maximale Effekt lag bei 5 mM Lidocain vor. Bei dieser Dosis erreichte die Amplitude 48,21 % des nativen Wertes (siehe Abbildung 3.4 B).

Der schnelle Spannungsabfall zur maximalen negativen Amplitude stellt zeitlich die erste Komponente im extrazellulär abgeleiteten Aktionspotenzial dar und war nach Applikation von Lidocain dosisabhängig verzögert. Die Detektionsgrenze, bei der eine signifikante Änderung der RSdur vorlag, betrug 1 mM. Analog der negativen Amplitude war bei 5 mM ein maximaler Effekt zu beobachten. Die Dauer des schnellen Spannungsabfalls betrug hierbei 321,45 % gegenüber der des nativen Zustandes (siehe Abbildung 3.4 C). Nach Zugabe von 10 mM Lidocain konnten in 81 % der Sphäroide keine Feldpotenziale registriert werden ($n = 16$). Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht.

Inhibition der Kalziumpermeabilität durch Diltiazem

Diltiazem ist ein Benzothiazepinderivat, das den Kalziumeinstrom in die Zelle durch eine reversible Blockade spannungsabhängiger L-Typ Kalziumkanäle hemmt [Herdegen, 2010]. Als kardiodepressiver Kalziumantagonist ist Diltiazem der Klasse IV Antiarrhythmika zugeordnet, kann durch Verkürzung der Refraktärperiode jedoch auch proarrhythmische Wirkung besitzen [Graefe et al., 2011].

In den Experimenten war eine dosisabhängige Verkürzung der Plateauphase im extrazellulär abgeleiteten Aktionspotenzial zu beobachten, was analog eine Reduzierung der Feldpotenzialdauer (FPdur) zur Folge hatte. Diese Änderungen waren für die Diltiazemkonzentrationen $10\ \mu\text{M}$ und $100\ \mu\text{M}$ signifikant. Nach Applikation von $100\ \mu\text{M}$ Diltiazem betrug die auf den nativen Zustand normierte Dauer der Feldpotenziale $77,22\ \% \pm 11,27\ \%$. Ein sekundäres positives Maximum im Feldpotenzialverlauf wurde durch Diltiazem reduziert. Bei hohen Konzentrationen (vgl. Abbildung 3.5 A, $100\ \mu\text{M}$ Diltiazem) war der sekundäre Peak nicht mehr identifizierbar.

Die Kontrollexperimente wurden mit reinem Zellkulturmedium durchgeführt. Es zeigte sich in $n=10$ Experimenten eine leichte Erhöhung der Feldpotenzialdauer (siehe Abbildung 3.5 B). Das sekundäre positive Maximum im Verlauf der Feldpotenziale war analog der nativen Situation ausgeprägt.

Inhibition der Kaliumpermeabilität durch 4-Aminopyridin

Die Inhibition transienter Kaliumionenströme führt zu einer Verzögerung der Repolarisierung am Ende eines Aktionspotenzials und ist mit der Affinität zur Ausbildung von ventrikulären Tachykardien bzw. Arrhythmien, wie z. B. Torsade de Pointes, assoziiert [Meyer et al., 2007; Thomas et al., 2010]. Damit ist die zeitliche Verschiebung der Repolarisierung und analog die Dauer individueller Aktions- bzw. Feldpotenziale ein wichtiger Parameter bei der Generierung pharmakologisch-toxikologischer Profile für neue Wirkstoffe.

4-Aminopyridin ist ein Kaliumkanalblocker, der reversibel die spannungsabhängige Kaliumpermeabilität inhibiert. In den Experimenten wurde 4-Aminopyridin in den Konzentrationen $1\ \mu\text{M}$ bis $10\ \text{mM}$ appliziert, was zu einer Verlängerung der Feldpotenziale führte (siehe Abbildung 3.5 C). Signifikant waren diese Änderungen im Signalmuster für die Konzentrationen über $10\ \mu\text{M}$. Der maximale Effekt wurde bei $2,5\ \text{mM}$ erreicht. Hierbei betrug die FPdur $146,9\ \% \pm 7,7\ \%$ gegenüber des nativen Zustands. Nach Zugabe von $10\ \text{mM}$ 4-Aminopyridin konnten keine Feldpotenziale im Messsignal identifiziert werden. Jedoch zeigte sich nach dreifachem Austausch des Additivs durch reines, vorgewärmtes Zellkulturmedium eine sukzessive Regenerierung intrinsischer Aktivität und Kontraktionen. Konzentrationen über $10\ \text{mM}$ wurden nicht untersucht.

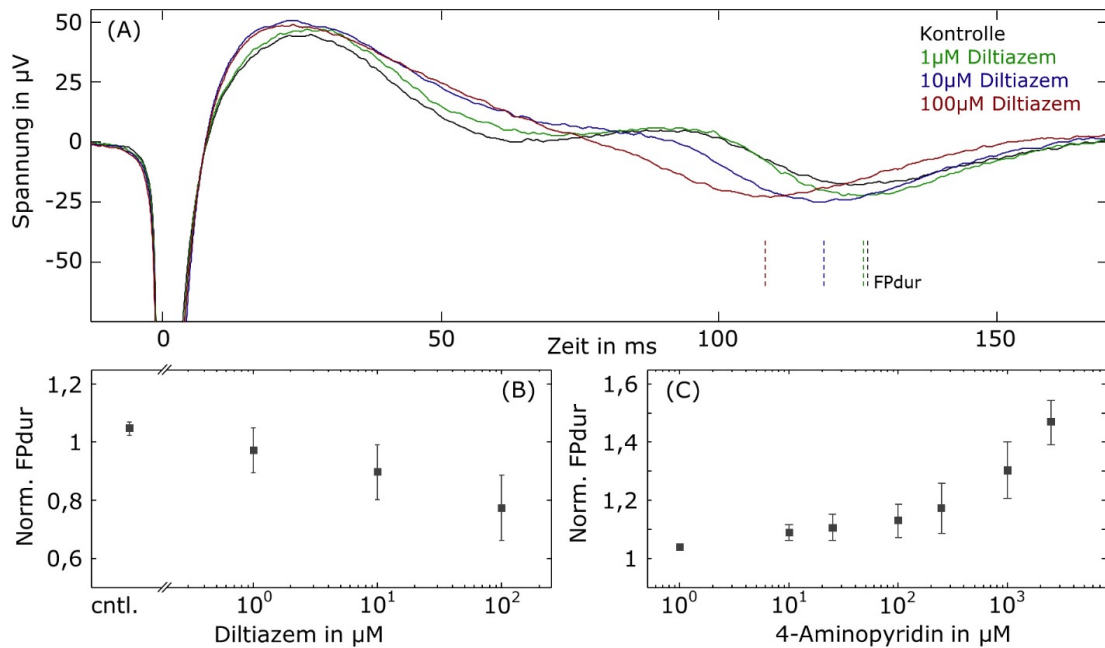


Abbildung 3.5: Modifikation der Feldpotenzialdauer (FPdur) durch Diltiazem und 4-Aminopyridin. (A) Plateauphase des extrazellulär abgeleiteten Aktionspotenzials eines Herzmuskelsphäroids. Die Applikation von Diltiazem führte zu einer augenscheinlichen Verkürzung der Feldpotenzialdauer. Ein zweiter positiver Peak am Ende der Plateauphase wurde mit zunehmender Dosis in seiner Ausprägung reduziert. (B) Die Änderung von FPdur war signifikant für die Konzentrationen 10 μM und 100 μM ($n \geq 10$). In Kontrolleexperimenten wurde eine leichte Zunahme von FPdur festgestellt. (C) Nach Zugabe von 4-Aminopyridin ($n \geq 8$) war eine dosisabhängige Verlängerung von FPdur zu beobachten. Abbildung modifiziert nach [Daus et al., 2012].

3.3 Elektromagnetische Exposition der Sphäroide aus Kardiomyozyten

Eine kausale Betrachtung hochfrequenter elektromagnetischer Felder und zellulärer Aktivität erfordert zum einen exakt definierte und reproduzierbare Feldbedingungen und zum anderen die zuverlässige Diskriminierung und Interpretation athermischer und thermischer Effekte. Daher erfolgte zunächst eine ausführliche Betrachtung von Dosimetrie bzw. Feldverteilung. Anschließend wurde der Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Proben temperatur analysiert und Kontrolleexperimente zur Provokation rein thermisch begründeter Reaktionen durchgeführt. Auf Basis dieser Untersuchungen konnten Expositionsstudien an Sphäroiden aus Kardiomyozyten durchgeführt und elektrophysiologische Eigenschaften vor, während und nach der Befeldung analysiert werden.

3.3.1 Dosimetrie

Die Exposition wurde mittels transversal elektromagnetischem Wellenleiter (Stripline) durchgeführt. Ausgehend von stationären Feldbedingungen erfolgte die Dosimetrie durch

Finite Elemente Simulation. Eine HF Eingangsleistung von 1 W erzeugte bei der Frequenz 900 MHz ein homogenes elektromagnetisches Feld von etwa 140 mV zwischen Septum und Massefläche. Elektromagnetische Felder werden jedoch durch dielektrische bzw. metallische Materialien beeinflusst. Zur Berechnung der Feldstärken und der SAR-Werte wurden daher Komponenten wie Temperaturregelung, MEA-Chip, Zellkulturmedium, Elektrode und Sphäroid einbezogen.

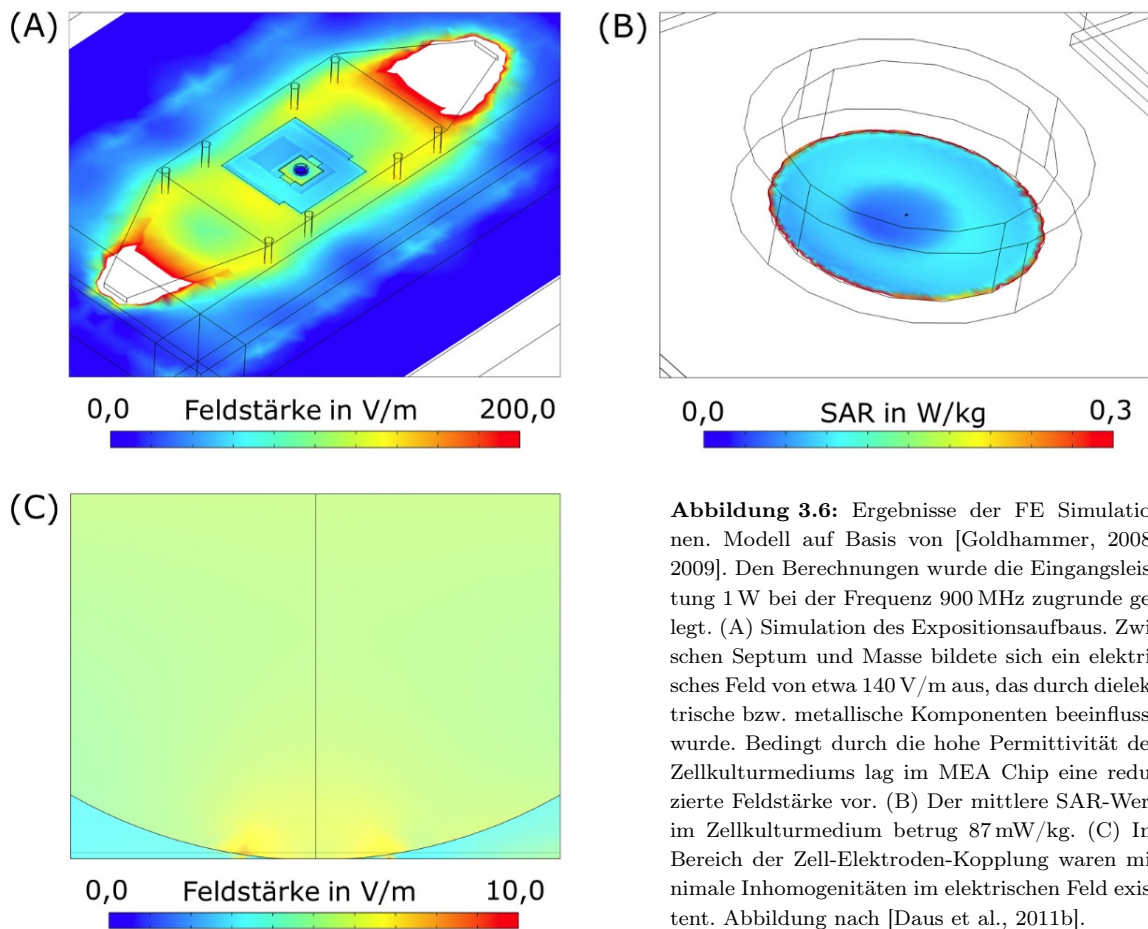


Abbildung 3.6: Ergebnisse der FE Simulationen. Modell auf Basis von [Goldhammer, 2008, 2009]. Den Berechnungen wurde die Eingangsleistung 1 W bei der Frequenz 900 MHz zugrunde gelegt. (A) Simulation des Expositionsaufbaus. Zwischen Septum und Masse bildete sich ein elektrisches Feld von etwa 140 V/m aus, das durch dielektrische bzw. metallische Komponenten beeinflusst wurde. Bedingt durch die hohe Permittivität des Zellkulturmediums lag im MEA Chip eine reduzierte Feldstärke vor. (B) Der mittlere SAR-Wert im Zellkulturmedium betrug 87 mW/kg. (C) Im Bereich der Zell-Elektroden-Kopplung waren minimale Inhomogenitäten im elektrischen Feld existent. Abbildung nach [Daus et al., 2011b].

Abbildung 3.6 A zeigt die Feldverteilung im Expositionsaufbau. Die maximale Feldstärke wurde nahe der Eingangs- bzw. Ausgangskopplung identifiziert und war durch den reduzierten Plattenabstand begründet. Die Nutzung der abgewinkelten Bereiche des Septums ist für Striplines im Allgemeinen jedoch nicht vorgesehen und bedarf somit keiner weiteren Betrachtung. Die Platzierung der Proben erfolgte im mittleren Element der Stripline, da hier eine planparallele Konfiguration von Septum und Massefläche vorlag. Auf Basis der Feldverteilung in der Stripline wurden die Feldstärken und SAR-Werte in MEA-Chip und Sphäroid berechnet.

Für das Zellkulturmedium wurde die relative Permittivität $\epsilon_r = 71$ und die elektrische Leitfähigkeit $\sigma = 2,5 \text{ S/m}$ verwendet [Schuderer et al., 2004b]. Die Permittivität ist bei gleicher Flussdichte \vec{D} zur elektrischen Feldstärke \vec{E} reziprok. Bedingt durch diesen Zusammenhang ist im Bereich des MEAs in Abbildung 3.6 A das elektrische Feld reduziert. Der durchschnittliche SAR-Wert im Zellkulturmedium betrug 87 mW/kg für die normierte Eingangsleistung 1 W . In Abbildung 3.6 B ist die spezifische Absorptionsrate als zweidimensionaler horizontaler Schnitt dargestellt. Die gezeigte Ebene befindet sich $100 \mu\text{m}$ über dem MEA Substrat und durchläuft das Zentrum des Sphäroids.

Die Sphäroide aus Kardiomyozyten wurden als geometrisch homogene Kugeln mit gewebetypischen Eigenschaften simuliert. Für Permittivität bzw. Konduktivität dienten die zur Bestimmung spezifischer Absorptionsraten standardisierten Werte $\epsilon_r = 42$ bzw. $\sigma = 0,99 \text{ S/m}$ [EN50361, 2002]. Im Simulationsmodell waren die Sphäroide unmittelbar an Mikroelektroden mit dem Durchmesser $30 \mu\text{m}$ gekoppelt, die als ideale Leiter angesehen wurden. Im Bereich der Zell-Elektroden-Kopplung wurden geringe Inhomogenitäten im elektrischen Feld, im Übrigen jedoch eine homogene Feldverteilung mit einer durchschnittlichen Feldstärke von $5,9 \text{ V/m}$ identifiziert. Die Feldmaxima im unteren Bereich des Sphäroids erreichten maximal $7,3 \text{ V/m}$. Daraus resultierte ein mittlerer SAR-Wert von 32 mW/kg im Sphäroid.

In den Expositionsexperimenten wurden diese Simulationen zur Berechnung der Eingangsleistung herangezogen, um die intendierten SAR-Werte zu erreichen. Die in den Versuchen angegebenen Werte beziehen sich stets auf die mittlere spezifische Absorptionsrate im Sphäroid. Damit waren nicht die umgebenden Medien, sondern das Gewebe selbst das Bezugssystem für die Dosimetrie.

3.3.2 Zelluläre Effekte durch rein thermische Provokation

Hochfrequente elektromagnetische Felder induzieren eine Erhöhung der kinetischen Energie in biologischen Systemen. Diese thermischen Wirkmechanismen, wie die Anregung von Dipolmolekülen oder Ionenströmen, können bei hinreichender Intensität zur Erwärmung des Gewebes führen [Gimsa, 2006]. Daher wurde in Kontrollexperimenten der Einfluss der Proben temperatur auf die elektrische Aktivität der Sphäroide untersucht.

Ausgehend von einer nativen Proben temperatur von $37,0 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde diese in einem physiologisch relevanten Bereich durch eine externe Temperaturregelung modifiziert. Eine Erhöhung der Temperatur auf $38,0 \text{ }^\circ\text{C}$ hatte eine Steigerung der Feldpotenzialfrequenz um $7,8 \%$ zur Folge. Wurde die Proben temperatur auf $36,0 \text{ }^\circ\text{C}$ gesenkt, war eine Reduktion der Feldpotenzialfrequenz um $4,1 \%$ zu beobachten (siehe Abbildung 3.7). Eine Polynom anpassung 1. Ordnung der Messpunkte im untersuchten Datenbereich nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ergab eine Steigung von $5,89 \%$ pro Kelvin.

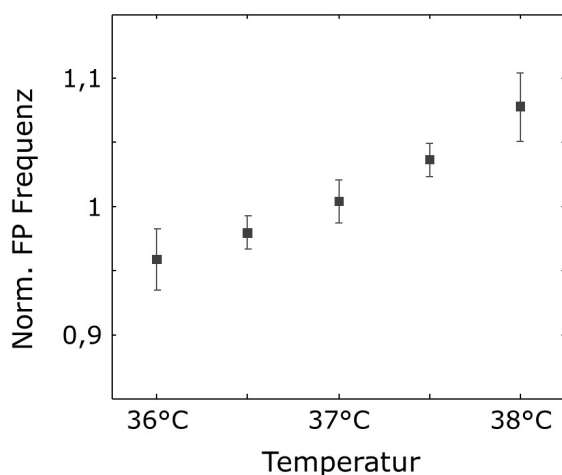


Abbildung 3.7: Modifizierung der Feldpotenzialfrequenz durch Änderung der Temperatur. Durch Variation der Probestemperatur in einem physiologisch relevanten Bereich war gegenüber des nativen Zustands (37,0 °C) eine Reduktion (36,0 °C und 36,5 °C) bzw. Steigerung (37,5 °C bzw. 38,0 °C) zu beobachten. Abbildung modifiziert nach [Daus et al., 2011b].

Die Voruntersuchungen zeigten, dass Sphäroide aus Kardiomyozyten sensitiv gegenüber Temperaturänderungen in physiologischen Dimensionen sind. Direkte thermische Effekte durch elektromagnetische Felder bedingen daher besondere Beachtung, um daraus resultierende sekundäre Mechanismen nicht als primäre athermische Zellreaktionen zu interpretieren. Um thermisch induzierte Artefakte ausschließen zu können, wurden die Proben während den Experimenten mit einer Temperaturregelung auf konstant 37,0 °C gehalten.

3.3.3 Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Probestemperatur

Der Einfluss applizierter Felder auf die Probestemperatur sowie die durch die Regelung erzielte Temperaturstabilität wurde vor Durchführung der Expositionsexperimente für die intendierten Feldstärken und Frequenzparameter untersucht. Dazu wurden die MEAs mit Zellkulturmedium gefüllt und bei inaktivierter bzw. aktivierter Temperaturregelung exponiert. Die Messung der Temperatur erfolgte mit einem faseroptischen Sensor (Opsens, Kanada), da konventionelle Verfahren mit metallischen Messfühlern zu deutlichen Inhomogenitäten im elektromagnetischen Feld führen können. Der verwendete Sensor bestand aus einer mit Teflon ummantelten und somit nicht-metallischen Glasfaser, an dessen Spitze ein GaAs Kristall angebracht war, und nutzte die temperaturabhängige Verschiebung der Bandlücke im Halbleiter.

Im ersten Experiment wurde der MEA mit einer kontinuierlichen Frequenz von 900 MHz und einem mittleren SAR-Wert von 1 W/kg im Zellkulturmedium bei inaktivierter Temperaturregelung exponiert. Während der Messdauer von 10 min zeigte sich eine deutliche und stetige Erwärmung der Probe um etwa $dT \approx 0,2$ K (siehe Abbildung 3.8, obere Kurve). Im zweiten Schritt wurden Experimente bei aktiver Temperaturregelung durchgeführt. Die Bedingungen entsprachen mit Feldern der Frequenz 900 MHz, die mit einer Pulsfrequenz von 8,3 Hz periodisch moduliert waren, sowie durchschnittlichen spezifischen Absorptions-

raten von 100 mW/kg bzw. 250 mW/kg, der Situation der Expositionsversuche. Für beide Parameter wurden minimale Temperaturänderungen festgestellt, die im Bereich $dT < 0,1$ K lagen (siehe Abbildung 3.8, untere Kurven).

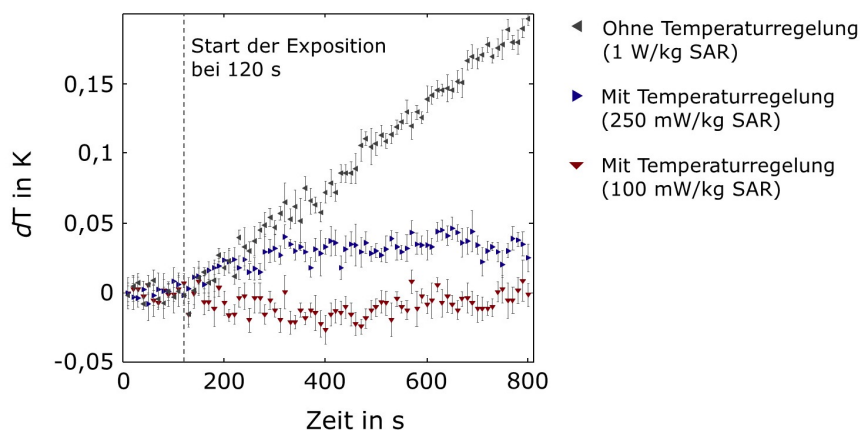


Abbildung 3.8: Untersuchung der Probestemperatur während der Exposition. Ohne Temperaturregelung ($T_0 =$ Raumtemperatur) war ein Anstieg der Temperatur zu beobachten (obere Kurve: 1 W/kg SAR im Zellkulturmedium). Bei aktivierter Temperaturregelung ($T_0 = 37,0$ °C) war $dT < 0,1$ K für die in den Expositionsexperimenten verwendeten Parameter (mittlere Kurve: 250 mW/kg SAR im Sphäroid; untere Kurve: 100 mW/kg SAR im Sphäroid). Die Exposition beginnt in der Darstellung jeweils nach 120 s (vertikale Linie). Abbildung modifiziert nach [Daus et al., 2011b].

3.3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen

Zur Bewertung elektrophysiologischer Primärreaktionen wurden Sphäroide aus Kardiomyozyten mit elektromagnetischen Feldern in der Stripline exponiert. Die verwendeten Feldstärken und Frequenzen waren entsprechend typischer Parameter des Mobilfunks determiniert. Das derzeit am weitesten verbreitete Mobilfunksystem GSM (Global System for Mobile Communications) bedient sich insbesondere Frequenzbänder im Bereich um 900 MHz. Für die Datenübertragung wird eine Kombination aus Frequenz- und Zeitmultiplex eingesetzt, was eine Reihe periodischer niederfrequenter Modulationen des elektromagnetischen Signals zur Folge hat. Daher wurden in den Experimenten unterschiedlich gepulste, hochfrequente Felder verwendet.

Die verwendeten SAR betragen 100 mW/kg bzw. 250 mW/kg, was regulären Werten des Mobilfunks entspricht. Die Angaben bezogen sich stets auf die mittlere SAR im Sphäroid und determinierten das Gewebe selbst als Bezugssystem. Die Einstellung des SAR-Wertes erfolgte über die HF Eingangsleistung der Stripline auf Basis der Simulationsergebnisse der Finiten Elemente Berechnung.

Postexpositionelle Effekte

Die Prüfung möglicher Signalmustermodifikationen nach einer elektromagnetischen Exposition erfolgte mit Feldern der Frequenz 900 MHz, die mit einem Puls von 8,3 MHz periodisch moduliert waren. Vor der Exposition wurde zunächst der native Zustand untersucht und die Parameter Feldpotenzialfrequenz, Feldpotenzialdauer sowie die Regelmäßigkeit des Signalmusters ermittelt. Anschließend wurden die Sphäroide für 60 s mit SAR-Werten von 100 mW/kg bzw. 250 mW/kg befeldet. Unmittelbar nach der Exposition erfolgte eine erneute Messung der Sphäroidaktivität sowie die Extraktion der entsprechenden Parameter. Die Kontrollexperimente wurden analog durchgeführt, jedoch war das Feld während der Expositionsperiode nicht aktiviert (Scheinexposition, Kontrolle = 0 W/kg).

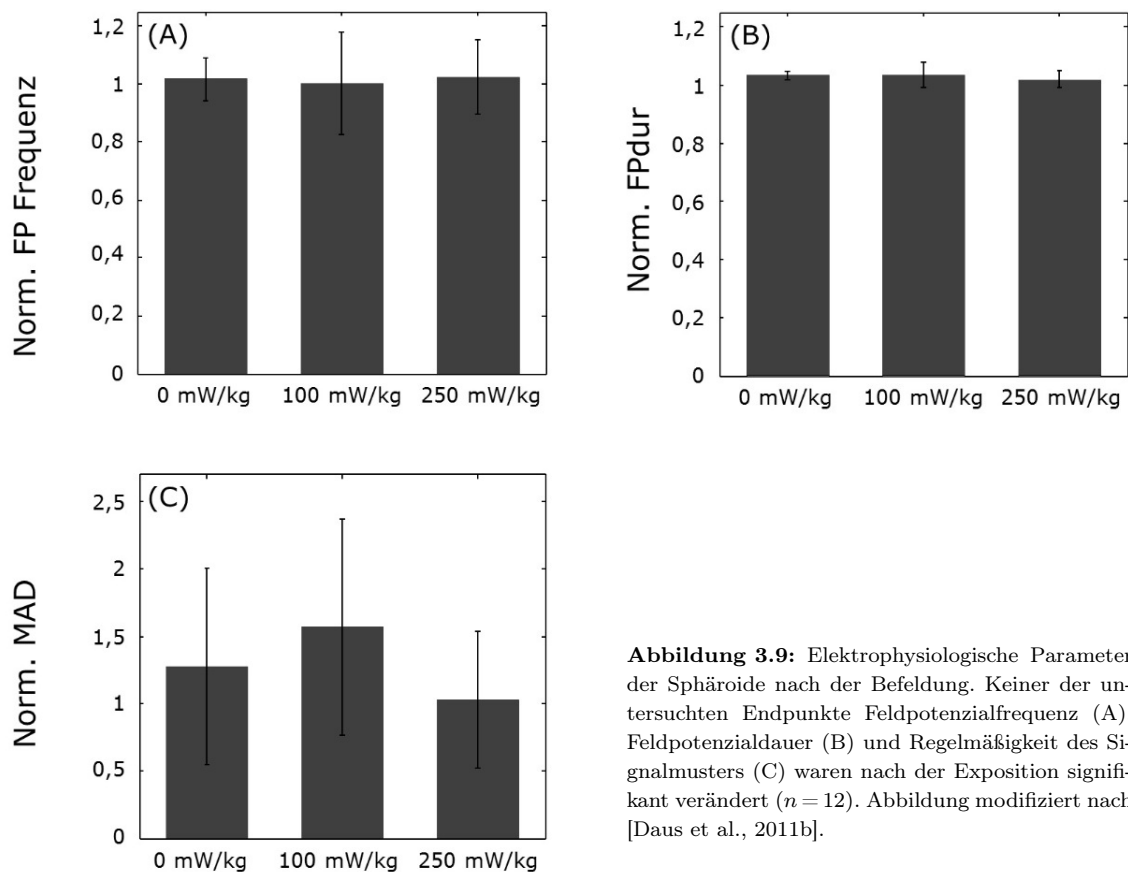


Abbildung 3.9: Elektrophysiologische Parameter der Sphäroide nach der Befeldung. Keiner der untersuchten Endpunkte Feldpotenzialfrequenz (A), Feldpotenzialdauer (B) und Regelmäßigkeit des Signalmusters (C) waren nach der Exposition signifikant verändert ($n = 12$). Abbildung modifiziert nach [Daus et al., 2011b].

In Abbildung 3.9 sind die auf den nativen Zustand normierten Parameter des Signalmusters nach der Exposition dargestellt. Die Feldpotenzialfrequenz war sowohl nach der Exposition als auch nach der Scheinexposition leicht erhöht. Sie betrug 1,017 im Kontrollexperiment bzw. 1,004 und 1,026 für die Befeldung mit 100 mW/kg und 250 mW/kg. Diese Erhöhung war jedoch nicht signifikant. Eine minimale, ebenfalls nicht signifikante Zunahme wurde daneben bei Untersuchung der Feldpotenzialdauer (FPdur) festgestellt. Im Kontroll experi-

ment betrug die normierte FPdur 1,034. Nach Exposition mit 100 mW/kg bzw. 250 mW/kg resultierte eine normierte FPdur von 1,035 bzw. 1,012. Als sensitiver Parameter zu Bewertung der Regelmäßigkeit des Signalmusters wurde die mittlere Abweichung des Medians (MAD) aller IFIs herangezogen. Nach Auswertung von $n = 12$ Experimenten konnte in keiner der verwendeten Feldstärken eine signifikante Änderung identifiziert werden.

Akute expositionsinduzierte Effekte

In einer Reihe weiterer Experimente wurde die elektrische Aktivität der Sphäroide während der Exposition mit 100 mW/kg SAR untersucht. Zunächst wurden die nativen Interfeldpotenzialintervalle und die daraus resultierende Feldpotenzialfrequenz des individuellen Sphäroids ermittelt und die Pulsfrequenz des elektromagnetischen Felds auf diesen Wert eingestellt. Durch Variation der Pulsfrequenz im Bereich $\pm 5 - 20\%$ wurden mögliche Modifikationen der intrinsischen, periodischen Sphäroidaktivität analysiert. In keinem der Experimente ($n = 12$) konnten signifikant veränderte Signalmuster, wie z. B. eine Synchronisierung der Feldpotenzialfrequenz des Sphäroids mit der Pulsfrequenz, beobachtet werden.

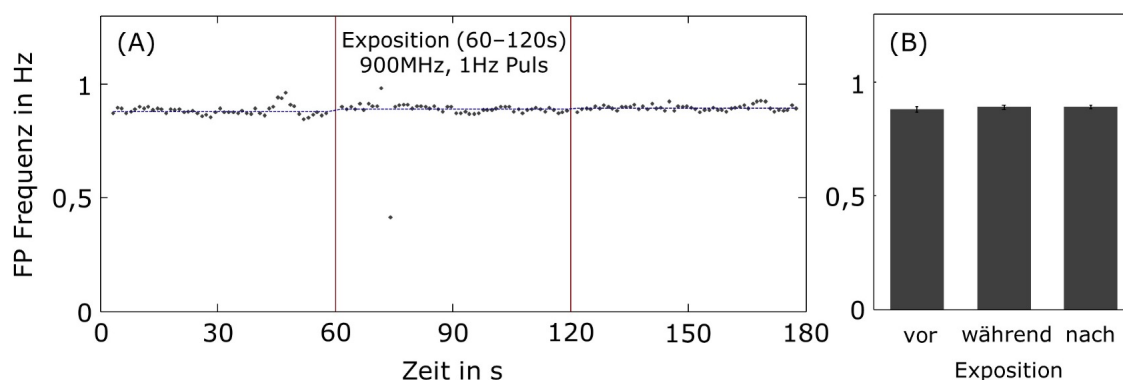


Abbildung 3.10: Feldpotenzialfrequenz eines Sphäroids vor, während und nach der Exposition. Eine Pulsfrequenz des elektromagnetischen Felds von etwa 13% über der nativen Feldpotenzialfrequenz des Sphäroids induzierte keine signifikante Signalmustermodifikation während bzw. nach der Befeldungsphase (60–120 s, begrenzt durch rote vertikale Linie). Der verwendete SAR-Wert betrug 100 mW/kg. Abbildung modifiziert nach [Daus et al., 2011b].

Abbildung 3.10 zeigt die Feldpotenzialfrequenz eines individuellen Sphäroids während der Untersuchung. Im nativen Zustand (0–60 s) betrug die mittlere Feldpotenzialfrequenz 0,88 Hz. Während der Expositionsperiode wurde die Pulsfrequenz auf 1,00 Hz eingestellt und der Sphäroid für 60 s befeldet. Ein verändertes Signalmuster konnte nicht identifiziert werden. Einzelne Artefakte (siehe Abbildung 3.10 A bei etwa 70 s) waren vorwiegend messtechnisch bedingt und wurden selten bei Exposition und Scheinexposition beobachtet.

3.4 Elektrophysiologische und morphologische Eigenschaften der Neuronen

Dissoziierte Neuronen reaggregierten in Rotationskultur analog der Kardiomyozyten zu dreidimensionalen *in vitro* Netzwerken. Nach 24 h hatten sich einige hundert individuelle Sphäroide mit einem Durchmesser von $125,4 \mu\text{m}$ (Mittelwert aus $m = 3$ Präparationen) gebildet. Abbildung 3.11 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen neuronaler Sphäroide.

Die Sphäroide waren morphologisch bzw. mechanisch stabil und konnten mit einer Pipette, deren Spitzenende vergrößert war, auf das Elektrodenfeld eines MEAs transferiert werden. Die Adhäsion wurde durch eine physikalische bzw. chemische Vorbehandlung der Chipoberfläche erreicht. Bei dem verwendeten Adhäsionspromotor Poly-D-Lysin handelt es sich um ein polykationisches Polymer, das die Zelladhäsion nicht über spezifische Rezeptor-Ligand-Interaktion, wie z. B. bei dem Extrazellulärmatrixprotein Fibronectin vermittelt, sondern über elektrostatische bzw. van-der-Waals Wechselwirkungen [Jungblut, 2006]. Daraus resultierte eine enge und robuste Kopplung von Zellen und Elektroden während der Messungen.

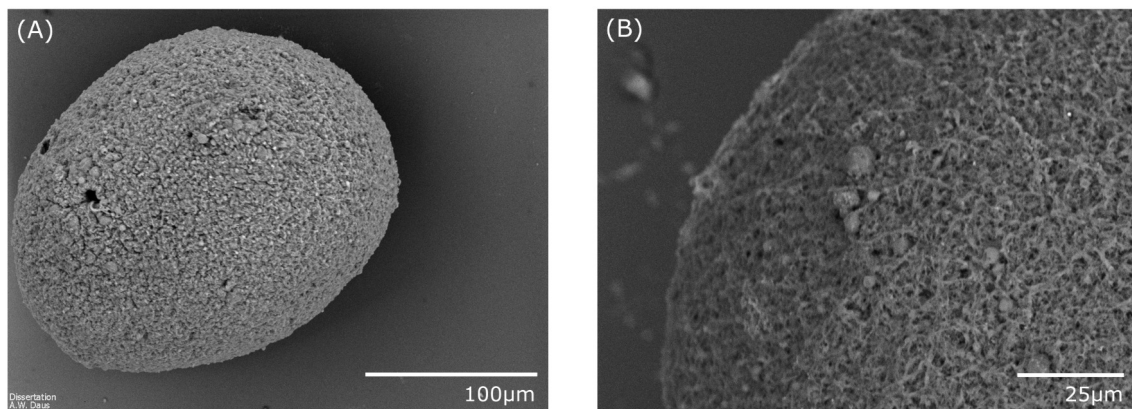


Abbildung 3.11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen neuronaler Sphäroide. (A) Dissoziierte Zellen reetablieren in Rotationskultur dreidimensionale, sphärische Netzwerke. (B) Detailaufnahme eines einzelnen Sphäroids.

Die sphärische, dreidimensionale Struktur der Reaggregate blieb nach Immobilisierung auf den MEAs über mehrere Tage erhalten. Nach 24 h waren erste Auswüchse von Neuriten bzw. distale Migration einzelner Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 3.12 A). Wurden mehrere Sphäroide in Standkultur im Abstand von wenigen Mikrometern immobilisiert, konnte auf diese Weise eine Verbindung entstehen. Um eine gegenseitige Beeinflussung individueller Netzwerke auszuschließen, wurden die Sphäroide isoliert bzw. mit hinreichender Distanz zueinander auf dem Elektrodenfeld kultiviert.

Erste elektrische Aktivität in Form einzelner, spontan auftretender Spikes wurde bei Sphäroiden des Stadiums 4 div beobachtet. Die extrazellulär abgeleiteten Signale erreichten typischerweise maximale Amplituden von 100–200 μV . In den Messungen zeigten sich jedoch auch Spikes, deren Amplituden weniger als 30 μV betragen und damit im Bereich des Rauschsignals lagen. Die Entwicklung neuronaler Aktivität war in den ersten zwei Wochen in Kultur durch eine Zunahme temporärer Perioden mit hochfrequenten Spikefolgen, sogenannten Bursts begleitet. Ein Burst bestand typischerweise aus 5–50 Spikes, die über die Dauer von 50–300 ms im Signalmuster auftraten. Die Spikefrequenz erreichte in diesen Burstperioden etwa 150 Hz.

Nach 14 Tagen in Rotationskultur hatten die Sphäroide einen Durchmesser von 244,65 μm (Mittelwert aus $m=3$ Präparationen) erreicht. Die elektrophysiologischen Ableitungen zeigten ein scheinbar stochastisches Muster aus Spikes und Bursts. Während des Zeitraums 14–24 div wurden die Sphäroide zu pharmakologischen Untersuchungen mit GABA und Bicucullin (siehe Kapitel 3.6) herangezogen. Insgesamt konnte elektrische Aktivität über mehrere Wochen bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (85 div) festgestellt werden.

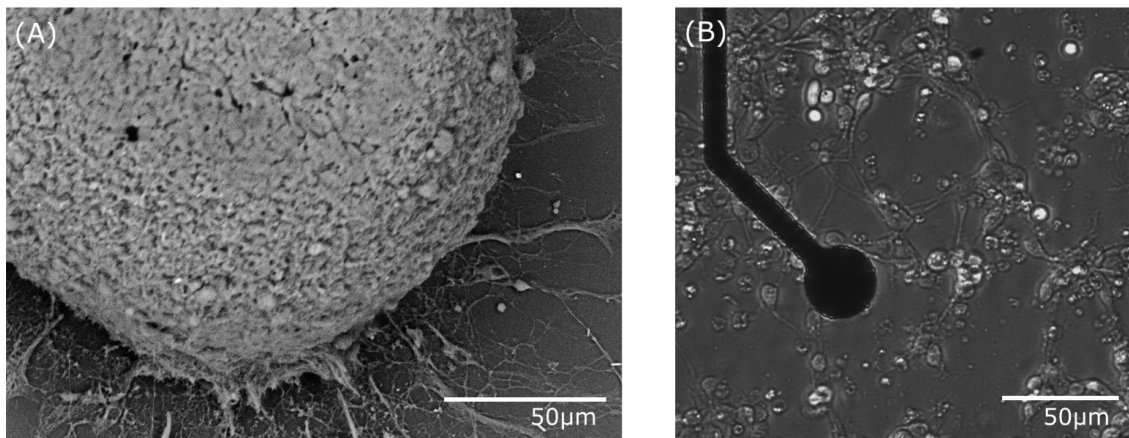


Abbildung 3.12: Ausbildung von Neuriten in dreidimensionalen bzw. zweidimensionalen Netzwerken. (A) Wurden Sphäroide in eine Standkultur überführt, konnten Auswüchse von Neuriten bzw. die Migration einzelner Zellen beobachtet werden. In der Abbildung ist ein neuronaler Sphäroid, der 48 h auf einem Glassubstrat kultiviert und anschließend fixiert, dehydriert und zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung herangezogen wurde, dargestellt. (B) Dissoziierte Zellen bildeten in Standkultur ein zweidimensionales Netzwerk auf den MEAs. Die Abbildung zeigt die durchlichtmikroskopische Aufnahme eines Netzwerkes 48 h nach der Zellaussaat.

Wurden dissoziierte Neuronen in einer zweidimensionalen Architektur auf den MEAs kultiviert, konnten nach wenigen Stunden adhärenente Zellen und erste Auswüchse von Neuriten beobachtet werden. Nach 2 div war ein unspezifisches Neuritengeflecht existent, das auf eine kontinuierende Regenerierung eines neuronalen Netzwerkes schließen lässt (siehe Abbildung 3.12 B). Im Zeitraum 1–2 Wochen nach Kultivierung war jedoch die Bildung von Clustern aus wenigen Zellen bzw. die Ablösung von Zellen charakteristisch. Nach 21 div lagen größtenteils dünn besiedelte Strukturen vor.

3.5 Multivariate Spikedetektion mit dynamischen Thresholds

Die Analyse und Interpretation extrazellulär abgeleiteter Signale war aufgrund der dreidimensionalen Architektur von Sphäroiden mit neuen Herausforderungen konjugiert, die durch konventionelle Algorithmen nicht adressiert werden:

- Die im Detektionsradius der Messelektrode vorliegende höhere Zelldichte führt zur Partizipation mehrerer Neuronen am Messsignal. Potenziale der Zellen, die in zentralen Regionen des Sphäroids lokalisiert sind, können durch den vergrößerten Abstand zur Elektrode im Bereich des Rauschsignals liegen und nicht eindeutig identifiziert werden. Daher ist eine reine Diskriminierung über die Amplitude nicht möglich.
- Bursts treten spontan auf und implizieren niederfrequente Signalanteile. Diese Artefakte können durch geeignete Transformation, z. B. durch Hochpassfilterung eliminiert werden. Jedoch geht dies mit der Modifizierung des Gesamtsignals, einschließlich des Verlaufs einzelner Feldpotenziale bzw. Spikes, einher.

Daher wurde zur Analyse der neuronalen Sphäroidsignale ein neuer Algorithmus, basierend auf einer multivarianten Spikedetektion mit dynamischen Thresholds, entwickelt. Bei diesem Verfahren wurden Spikes nicht ausschließlich über die Amplitude, sondern über insgesamt 17 Attribute im Frequenz- bzw. Zeitbereich von Rauschartefakten diskriminiert.

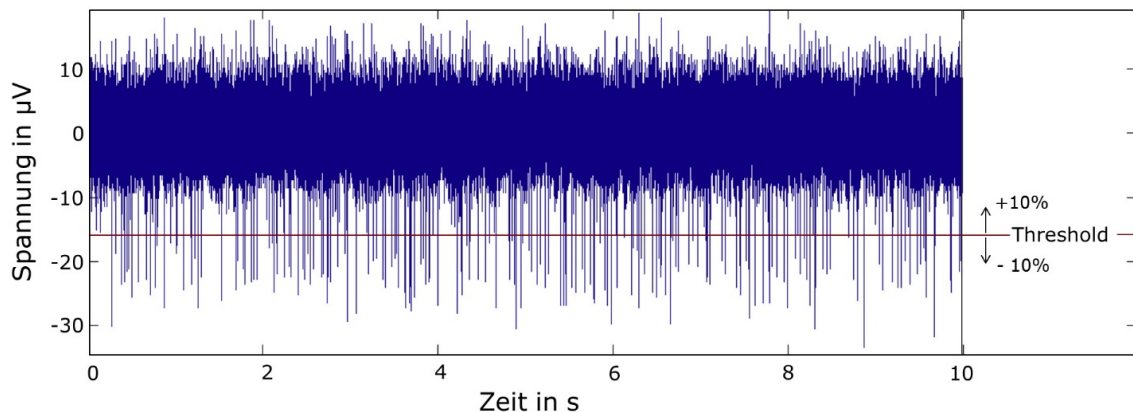


Abbildung 3.13: Extrazelluläre Ableitung neuronaler Sphäroide. Die zellulären Signale werden von Rauschartefakten mit Amplituden von etwa 10^{-6} V begleitet, die durch die Definition von Schwellwerten (hier statischer Threshold mit konstantem Wert, siehe rote Linie bei etwa $-18 \cdot 10^{-6}$ V) diskriminiert werden. Erfolgt die Separation rein über die Amplitude ist die Festlegung des Thresholds ein kritischer Faktor. Verschiebungen des Schwellwerts im Bereich $\pm 10\%$ führen zu deutlichen Abweichungen der detektierten Spikes (siehe Tabelle 3.1 oben).

Potenzielle Spikes wurden zunächst über einen Threshold isoliert. Der Threshold folgte dabei nicht einem statischen Wert, sondern berücksichtigte niederfrequente Artefakte, die insbesondere in Burstereignissen existent waren. Anschließend folgte eine multivari-

ante Bewertung und Diskriminierung von Spikes und Rauschartefakten. In einer Reihe von Testauswertungen wurden der neue Algorithmus auf seine Funktion untersucht und die Ergebnisse mit denen von konventionellen Ansätzen auf Basis statischer Thresholdmodelle verglichen. Dazu wurde zunächst ein nativer statischer Threshold ermittelt und zur Spikedetektion herangezogen. Anschließend wurde der Threshold um $+10\%$ bzw. -10% verschoben und eine erneute Detektion durchgeführt (siehe Abbildung 3.13).

Die Analyse der Sphäroidsignale mittels konventionellem Verfahren zeigte, dass die Anzahl detektierter Spikes wesentlich mit dem Wert des Thresholds korreliert und kleine Variationen des Schwellwerts zu deutlichen Unterschieden im Ergebnis führen können. Ausgehend vom statischen Thresholdwert, der analog konventioneller Verfahren als Vielfaches der Standardabweichung σ des Rauschens ($5 \cdot \sigma_R$) festgelegt wurde, führte die Verschiebung des Thresholds um $\pm 10\%$ zu einer Abweichung der detektierten Spikes von etwa $10-15\%$ (siehe Tabelle 3.1, Konventionelle Spikedetektion mit statischem Threshold). Damit ist die Schwellwertfestlegung ein kritischer Parameter bei der Analyse von Sphäroidsignalen. Ist der Schwellwert zu groß gewählt, werden Spikes mit niedriger Amplitude nicht erfasst und sind von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Wird der Threshold hingegen mit sehr kleinen Werten deklariert, werden potenziell Rauschartefakte als Spikes missinterpretiert. Die Detektion von Rauschartefakten ist bei Anwendung der multivarianten Spikedetektion hingegen zunächst unkritisch, da Zellsignale nicht ausschließlich über ihre Amplitude, sondern über mehrere spezifische Merkmale bewertet werden.

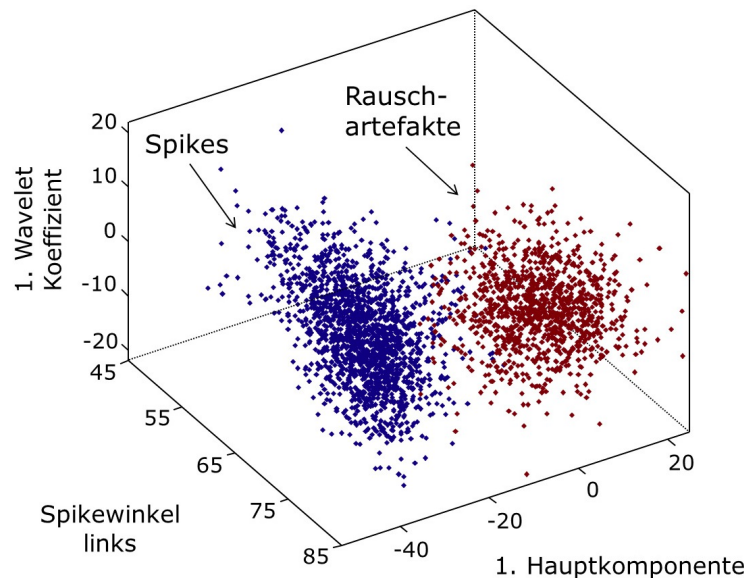


Abbildung 3.14: Ergebnis der multivarianten Spikeanalyse. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen potenziellen Spike, der sich durch n Attribute beschreiben lässt. Die Darstellung im dreidimensionalen Merkmalsraum lässt augenscheinlich zwei Objektgruppen, sogenannte Cluster, identifizieren. Durch weiche Clusteranalyse mit dem EM Algorithmus konnten die Datenpunkte zellulären Spikes (blau) oder Rauschartefakten (rot) zugeordnet werden.

Für jeden potenziellen Spike wurden individuell 17 geometrische, frequenz- bzw. vektorbasierte Attribute berechnet und auf ihre Verteilungsfunktion untersucht. Lag eine unimodale Verteilungsfunktion vor oder korrelierte das Attribut mit anderen Merkmalen, wurde es nicht zur Separation in Betracht gezogen. Aus den resultierenden Attributen wurden bis zu $n = 8$ ausgewählt, die aufgrund ihrer Häufigkeitsverteilung die höchste Trennschärfe zeigten. Diese wurden in einen n -dimensionalen Merkmalsraum überführt und auf Basis der Daten zelluläre Spikes mittels EM Clusteralgorithmus extrahiert (siehe Abbildung 3.14).

Tabelle 3.1: Vergleich der konventionellen und multivarianten Spikedetektion. Beide Verfahren wurden zur Analyse der in Abbildung 3.13 dargestellten Messung herangezogen. Zunächst wurde für beide Modelle ein nativer Threshold ermittelt und eine Spikedetektion durchgeführt. Anschließend wurde der Threshold um $\pm 10\%$ verschoben. Es zeigten sich deutliche Korrelationen des Schwellwerts und der detektierten Spikes, die jedoch im Falle der multivarianten Analyse kompensiert wurden (siehe Spalte Spikes nach Analyse). Das konventionelle Modell sieht lediglich eine Diskriminierung über die Amplitude und somit keine nachfolgende Analyse vor.

	Konventionelle Spikedetektion mit statischem Threshold		
	Detektierte Spikes	Spikes nach Analyse	Relative Abweichung
nativer Threshold	988	—	0,00 %
Verschiebung + 10 %	1105	—	11,84 %
Verschiebung - 10 %	831	—	15,89 %
	Multivariate Spikedetektion mit variablem Threshold		
	Detektierte Spikes	Spikes nach Analyse	Relative Abweichung
nativer Threshold	4836	1142	0,00 %
Verschiebung + 10 %	7984	1158	1,40 %
Verschiebung - 10 %	3006	1147	0,44 %

Auf Basis des dynamischen Thresholds entsprechend Kapitel 2.5.1 wurden in der in Abbildung 3.13 dargestellten Messung 4836 potenzielle Spikes in einer Minute detektiert. Nach Durchführung der multivarianten Spikeanalyse (siehe Abbildung 3.14) konnten 1142 zelluläre Spikes sowie 3694 durch Rauschen bedingte Artefakte identifiziert werden. Die Modifikation des Schwellwerts führte zunächst zu deutlichen Abweichungen bei der Spikedetektion. Die Anzahl potenzieller Spikes betrug 7984 für eine Verschiebung des Thresholds um + 10 % bzw. 3006 für eine Verschiebung des Thresholds um - 10 %. Nach multivarianter Analyse wurden diese Artefakte jedoch diskriminiert. Die resultierende relative Abweichung der Spikeanzahl für eine Veränderung des Schwellwerts im Bereich $\pm 10\%$ betrug weniger als 1,5 %. Damit konnte gezeigt werden, dass der Algorithmus robust gegenüber Variationen im Threshold ist. Daneben wurden Spikes detektiert, die mittels konventioneller Methoden nicht erfasst wurden (siehe Tabelle 3.1).

3.6 Pharmakologische Untersuchungen am ionotropen GABA_A-Rezeptor

Der entwickelte Algorithmus zur Analyse neuronaler Aktivität in dreidimensionalen Sphäroiden auf Mikroelektroden Arrays wurde herangezogen, um pharmakologische Untersuchungen mit Substanzen, die am ionotropen GABA_A-Rezeptor binden, durchzuführen. GABA_A-Rezeptoren sind Wirkort für eine Reihe bedeutender Neuropharmaka, wie beispielsweise Benzodiazepine und Barbiturate. Durch Modifikation der GABAergen Neurotransmission können diese Substanzen therapeutisch insbesondere als Antikonvulsivum bzw. Sedativum Anwendung finden. Daneben sind GABA_A-Rezeptoren Zielstruktur für Krampfgifte wie Bicucullin oder Picrotoxin [Frey & Althaus, 2009]. In den Experimenten kam GABA entsprechend seiner natürlichen Funktion als inhibitorischer Neurotransmitter sowie Bicucullin als kompetitiver GABA_A-Antagonist zum Einsatz.

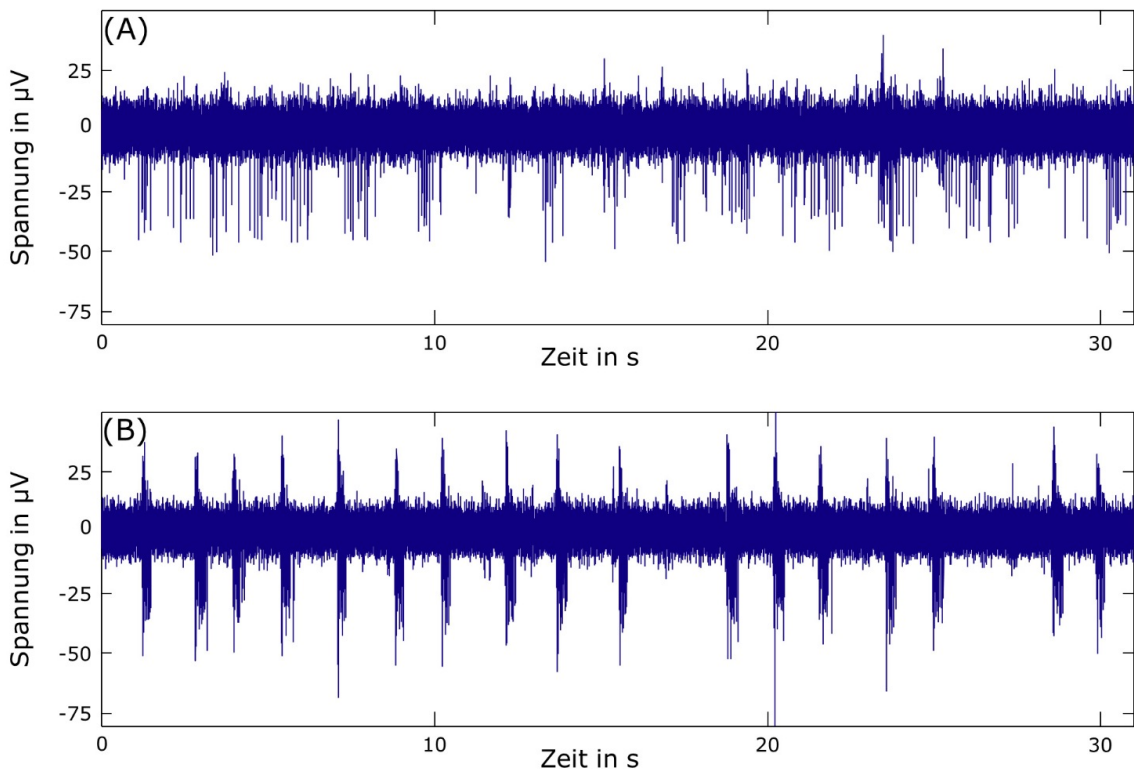


Abbildung 3.15: Modifikation des neuronalen Aktivitätsmusters durch Bicucullin. (A) Im nativen Zustand waren scheinbar stochastisch auftretende Spikes und Bursts zu beobachten. (B) Die Applikation von 10 µM führte zu einer Steigerung der Aktivität. Neben der Erhöhung von Spike- und Burstraten war eine zunehmende Organisation der Spikes in Burstereignisse zu beobachten.

Die dosisabhängige Wirkung der Substanzen auf die Aktivitätsmuster der Sphäroide wurde durch die Burst- und Spikerate bewertet, da diese konstitutive Merkmale neuronaler Signale darstellen. Bicucullin und GABA wurden in unterschiedlichen Konzentrationen an n Sphäroiden aus mehreren Präparationen getestet. Vor Applikation der Wirkstoffe wurde eine Messung zur Bestimmung der nativen Netzwerkaktivität durchgeführt. Die provozierten Änderungen im Signalmuster wurden zur quantitativen Analyse jeweils auf den Ausgangszustand normiert.

3.6.1 Bicucullin

Das Alkaloid Bicucullin stammt aus der Pflanze *Dicentra cucullaria* (früher: *Bicuculla cucullaria*), einem mehrjährigem Kraut aus der Familie der *Fumariaceae* (Erdrauchgewächse). Bicucullin besitzt keine direkte klinische Relevanz, dient jedoch insbesondere in der experimentellen Pharmakologie als etablierter kompetitiver Antagonist des hemmenden Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure am GABA_A-Rezeptor [Jungblut, 2006; Hänsel & Sticher, 2009].

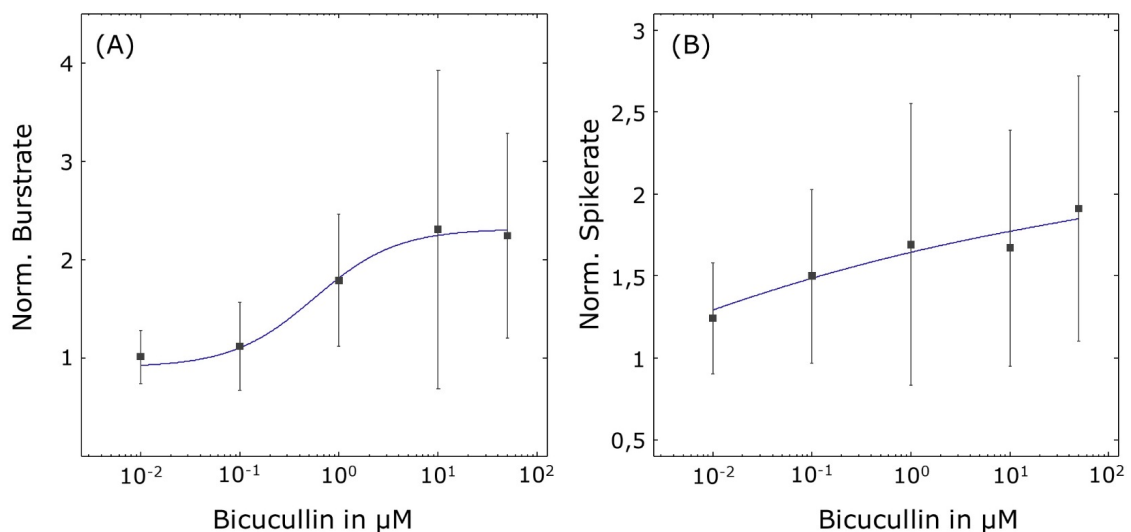


Abbildung 3.16: Dosis-Wirkungs-Beziehung für den kompetitiven GABA_A-Antagonisten Bicucullin in halblogarithmischer Darstellung. Das Additiv führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Burst- (A) und Spikerate (B). Die Halbwirksamkeitsdosis betrug für die Burst- $EC_{50} = 0,56 \mu\text{M}$.

Die Applikation von Bicucullin führte zu einer augenscheinlichen Veränderung des Signalmusters (siehe Abbildung 3.15). Nach Interaktion von Bicucullin mit dem Rezeptorkomplex werden Öffnungszeit und -wahrscheinlichkeit der Kanaleinheit reduziert, was zu einer abnehmenden Membranpermeabilität für Cl⁻-Ionen führt. Durch Konkurrenz des Additivs mit dem natürlichen Transmitter wird die inhibierende Funktion von GABA blockiert,

was in neuronalen Zellverbänden zu einer Enthemmung der Netzwerkaktivität führt [Jungblut, 2006; Hänsel & Sticher, 2009]. Während der native Zustand in den Experimenten von scheinbar stochastisch auftretenden Spikes und gelegentlichen Bursts geprägt war, zeigte sich nach Zugabe von 10 μM Bicucullin eine Erhöhung der Burstrate. Gleichzeitig konnte eine Abnahme isolierter Spikes identifiziert werden. Diese Beobachtungen spiegelten sich auch in der quantitativen Analyse wieder (siehe Abbildung 3.16).

Zur Entwicklung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurde Bicucullin in Konzentrationen von 0,01–50 μM untersucht. Der indirekte exzitatorische Effekt des Additivs wurde bei Betrachtung der Burstrate bestätigt. Es konnte eine dosisabhängige Steigerung bis zur Sättigung bei etwa 10 μM beobachtet werden. Die mittlere Burstrate war bei dieser Dosis gegenüber der nativen Netzwerkaktivität um den Faktor 2,3 erhöht. Die Approximation der normierten und gemittelten Datenpunkte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse nach Gleichung 2.6 in Kapitel 2.9 resultierte in halblogarithmischer Darstellung in einem charakteristischen Kurvenverlauf (siehe Abbildung 3.16 A). Aus der ermittelten Funktion konnte die Halbwirksamkeitsdosis $\text{EC}_{50} = 0,56 \mu\text{M}$ extrahiert werden. Die Spikerate war analog nach Zugabe von Bicucullin erhöht. Der maximale Effekt lag mit einer Steigerung um den Faktor 1,9 bei der Konzentration 50 μM vor (siehe Abbildung 3.16 B).

3.6.2 GABA

Der Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure hemmt die zelluläre Erregbarkeit durch einen hyperpolarisierenden Ionenstrom nach dem Bindungsereignis am ionotropen Rezeptor.

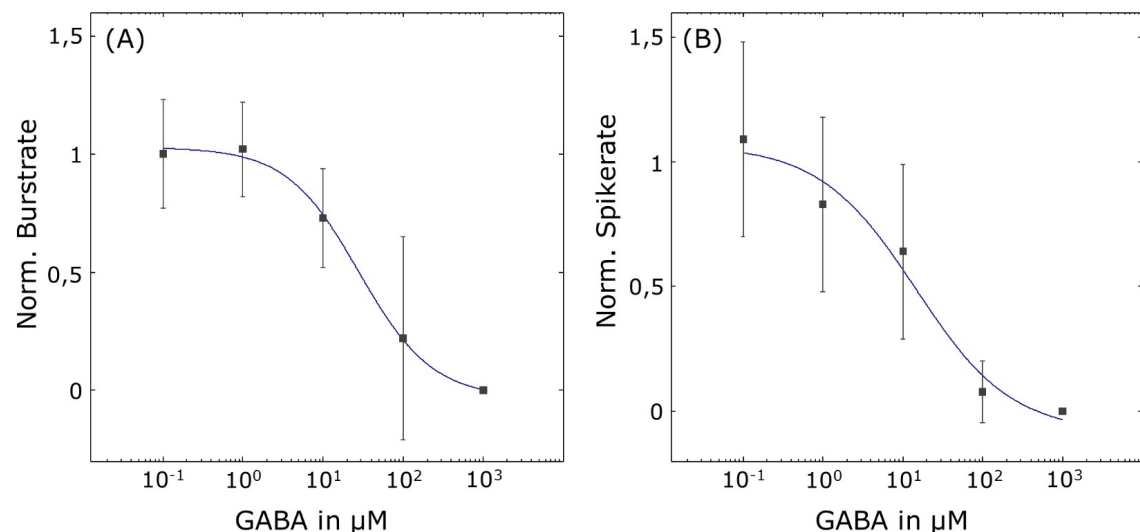


Abbildung 3.17: Dosis-Wirkungs-Beziehung für GABA. Nach externer Zugabe des Aminosäuretransmitters GABA waren Burstrate (A) und Spikerate (B) konzentrationsabhängig reduziert.

Funktional suffiziente GABAerge Mechanismen sind für das wechselseitige Gleichgewicht von Exzitation und Inhibition im Nervensystem essenziell. In den Experimenten wurde durch die externe Zugabe von GABA die neuronale Signaltransduktion manipuliert. Es zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der Netzwerkaktivität in den Sphäroiden.

Die normalisierte Burstrate nach Applikation von 10 μM bzw. 100 μM GABA betrug 73,0 % bzw. 21,7 %. Nach Zugabe von 1 mM konnten in $n = 5$ Experimenten keine Spikes oder Bursts identifiziert werden. Daher wurde bei dieser Dosis von einer Komplettinhibition der Netzwerkaktivität ausgegangen. Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht. Die Halbwirksamkeitsdosis in Bezug auf den Parameter Burstrate betrug $\text{IC}_{50} = 28 \mu\text{M}$.

4 Diskussion

4.1 Physiologische Relevanz zellulärer Modellsysteme

Mit der Entwicklung hybrider Strukturen aus Sphäroiden und Mikroelektroden Arrays wurde ein deskriptiver, funktionaler Ansatz der Biosensorik adressiert. Im Gegensatz zu biochemischen Sensoren, die eine rein analytische Information über die Interaktion von Analyten und Makromolekülen liefern, erlauben zellbasierte Biosensoren eine physiologische Beschreibung biologischer Systeme in nativen bzw. durch chemische und physikalische Provokation modifizierten Zuständen [Bousse, 1996; Keusgen, 2002; Wang et al., 2005]. Die Spezifität und Relevanz der physiologischen Information sind insbesondere durch die Wahl des *in vitro* Modells bestimmt.

Die Architektur zellulärer Netzwerke ist *in situ* dreidimensional angelegt. In lebendem Gewebe sind entsprechend Zell-Zell- bzw. Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktionen in einer räumlichen Konfiguration charakteristisch [Pampaloni et al., 2007]. Die Isolierung und Immobilisierung von Zellen an artifiziellen Oberflächen als zweidimensionale Systeme geht mit einer Depression der Netzwerkinteraktion und -kommunikation einher. Daher ist bei diesen *in vitro* Modellen vom Verlust nativer Homöostase und gewebespezifischer Eigenschaften auszugehen [Abbott, 2003; Zhang, 2004; Lin & Chang, 2008].

Interzelluläre Kommunikation ist grundsätzliche Prämisse und wesentliches Merkmal funktionalen elektrogenen Gewebes. Sowohl die synchronen Kontraktionen des Herzens als auch die Informationsverarbeitung in Nervensystemen unterliegen elektrischen Prinzipien und bedingen intakte Signaltransduktions- bzw. -propagationsprozesse, die im lebenden Organismus dreidimensional erfolgen können. Entsprechend können als Monolayer kultivierte *in vitro* Systeme, deren Ausbildung von Axone, Dendriten oder Synapsen nicht in einer 3D Architektur erfolgt, die zelluläre Kommunikation *in situ* nur bedingt nachbilden.

Individuelle physiologische Zellprozesse sind durch biochemische oder mechanische Interaktion mit dem zellulären Mikromilieu bestimmt und daher vom Organisationsgrad des Netzwerkes abhängig [Pampaloni et al., 2007; Rimann & Graf-Hausner, 2012]. Werden Zellen als planare Konfiguration immobilisiert, zeigen diese Differenzen beispielsweise hinsichtlich Proliferation [Willerth et al., 2006], Migration [Friedl et al., 1998], Genexpression

[Birgersdotter et al., 2005], Morphologie [Cukierman et al., 2001], Differenzierung [Willerth et al., 2006] oder elektrophysiologischer Eigenschaften [Bursac et al., 2003] gegenüber Zellen in 3D bzw. *in vivo* Systemen [Übersicht in Irons et al., 2008]. Daneben wurden in Abhängigkeit von dem Modellsystem Unterschiede in den Zellreaktionen auf pharmakologisch oder toxikologisch relevante Substanzen sowie Strahlenexpositionen identifiziert und die Aussagekraft von Monolayerexperimenten infrage gestellt [Sachs et al., 1973; Behravesch et al., 2005; Pampaloni & Stelzer, 2009; Zurich & Monnet-Tschudi, 2009]. *In vitro* Studien sind jedoch aufgrund experimenteller, ökonomischer und ethischer Aspekte integraler Bestandteil der Grundlagenforschung und angewandten Forschung. Daher wurden zur Vermeidung fehlerhafter Extrapolation und Interpretation – insbesondere bei der Untersuchung organspezifischer bzw. gewebespezifischer Wirkmechanismen – in den letzten Jahren zunehmend 3D Zellmodelle propagiert [z. B. Abbott, 2003; Zhang, 2004; Pampaloni et al., 2007; Jones, 2010; Rimann & Graf-Hausner, 2012].

4.2 Dreidimensionale Zellkultur

Zur Kultivierung zellulärer Netzwerke in einer 3D Architektur wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Verfahren entwickelt und vorgestellt. Durch geeignete Biomaterialien oder Polymere können Trägerstrukturen aufgebaut werden, die das Zellwachstum in einer Multi-Ebenen-Konfiguration ermöglichen [Zhang, 2004]. Je nach Geometrie kann das artifizielle Gerüst die *in situ* Mikroumgebung einer Zelle jedoch nur bedingt imitieren und Einfluss auf Migration, Kommunikation und Selbstorganisation des Netzwerks haben. Daneben stellen Reproduzierbarkeit und Standardisierung der Trägermaterialien besondere Herausforderungen dar [Lee et al., 2008].

Mit der Sphäroidtechnik wurde eine etablierte Methode zur 3D Kultivierung gewählt. Sphäroide nutzen die Fähigkeit isolierter Zellen, unter Mikrogravitation bzw. in nicht-adhäsiven Umgebungen, zur Aggregation und Organisation in gewebeähnliche Strukturen und verzichten somit auf exogene Trägermaterialien [Holtfreter, 1944; Moscona, 1952, 1961]. Für die Kultivierung dissoziierter Zellen als Sphäroide bietet sich eine Vielzahl unterschiedlicher Donatoren, darunter Retina [Layer et al., 1992], Herz [DeHaan & Sachs, 1972], Gehirn [Seeds, 1971], Lunge [Landry et al., 1985] und Tumorgewebe [Mueller-Klieser, 1997], an. Daneben können embryonale Stammzellen für die *in vitro* Differenzierung in sphärischen Aggregaten, sogenannten Embryoid Bodies, im Hanging-Drop-Verfahren kultiviert werden. Ähnlich der Differenzierungsprozesse der frühen Embryonalentwicklung bilden sich in den 3D Embryoid Bodies Derivate der drei Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm [Möbs, 2006]. Nach Überführung in eine adhärente Kulturumgebung kann durch Applikation spezifischer Faktoren die Differenzierung bestimmter Zelltypen, wie z. B. Kardiomyozyten [Hescheler et al., 1997] oder Neuronen [Strübing et al., 1995], evoziert werden.

Primäre Zellen aus funktionalem Gewebe bilden in Rotationskultur durch spezifische Zellsortierungsprozesse 3D Netzwerke und vermeiden gleichzeitig die Adhäsion auf und Interaktion mit artifiziellen Substraten [Layer & Willbold, 1993]. Die Werkstoffeigenschaften von Zellsubstraten können Einfluss auf die Struktur und Funktion von *in vitro* Kulturen, einschließlich Neuronen und Kardiomyozyten haben [Flanagan et al., 2002; Discher et al., 2005; Engler et al., 2008; Janmey et al., 2009; Bajaj et al., 2010]. Konventionelle Kultursubstrate wie Glas oder Polystyrol besitzen einen deutlich höheren Elastizitätsmodul als natives Nerven-, Muskel- oder Epithelgewebe, weshalb nicht von einer physiologisch repräsentativen Umgebung auszugehen ist. Zellen in Sphäroiden waren hingegen in eine 3D Matrix eingebettet, die mechanische Eigenschaften lebenden Gewebes besser imitiert.

Zell-Zell-Adhäsion und -Interaktion waren initiale, elementare Ereignisse der Sphäroidbildung. Die sukzessive Akkumulation einzelner Zellen führte über die Dauer weniger Stunden zur Bildung formvarianter Cluster, die an 1 div zu sphärischen Aggregaten konzentriert waren. In Rotationskultur unterliegt die Organisation von Primäraggregaten spezifischen Zellsortierungs- bzw. sorting-out-Phänomenen. Nach der Hypothese der Differenziellen Adhäsion beeinflusst die individuelle Kohäsion der Zellen, beispielsweise durch unterschiedliche Ausprägung der Cadherinexpression, die Strukturierung [Steinberg, 1962a,b,c; Steinberg & Takeichi, 1994]. Sphäroide stellen jedoch kein statisches System dar. Nach Aggregation der Zellen können diese durch Proliferation, Differenzierung und Migration vermittelte, selbstorganisierende Prozesse, histotypische Strukturen ausbilden [Layer & Willbold, 1993; Fox & Atterwill, 1999; Layer et al., 2002] und, in Präparationen aus elektrogenen Zellen, intrinsische Netzwerkaktivität entwickeln.

4.3 Extrazelluläre Ableitungen mit Mikroelektroden Arrays

Zur experimentellen Charakterisierung dreidimensionaler *in vitro* Systeme auf funktionaler Ebene wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Verfahren vorgeschlagen. Patch-Clamp Messungen an Neuronen, die als 3D Struktur in Matrigel kultiviert waren, konnten erstmals von Irons et al. durchgeführt werden [Irons et al., 2008]. Für die Impedanzspektroskopie wurden Mikrokavitäten mit vier lateral implementierten Elektroden entwickelt, die durch Modifikation der Peripherie zur extrazellulären Ableitung von Kardiomyozytsphäroiden geeignet sind [Kloss et al., 2008b,a]. In früheren Studien wurden daneben elektrogene Sphäroide mit Drahtelektroden oder Glaskapillaren kontaktiert und untersucht [Seaman & DeHaan, 1993; Clay et al., 1994]. Einschränkungen ergeben sich bei diesen Verfahren neben der invasiven Eigenschaften transmembraner Systeme durch die Limitierung der Ortsauflösung bei der Analyse der Netzwerkaktivität, insbesondere bei neuronalen Zellen. Bei der funktionalen Untersuchung dreidimensionaler Systeme ergeben sich weiterhin methodische

Herausforderungen, beispielsweise bei der Visualisierung [Keller et al., 2006; Pampaloni & Stelzer, 2009], Kontaktierung [Reininger-Mack et al., 2002; Irons et al., 2008] oder Analyse elektrophysiologischer Parameter.

Planare, substratintegrierte MEAs erlaubten die extrazelluläre Kontaktierung und Ableitung elektrogener Sphäroide. Systematische Untersuchungen konnten entsprechend nicht-invasiv und markerfrei erfolgen. Je nach Konfiguration des MEA-Chips war mit bis zu 20 aktiven Elektroden eine detaillierte Analyse räumlicher Aktivitätsmuster der Sphäroide möglich. Die lateralen Dimensionen der Elektroden lagen mit $30\ \mu\text{m}$ (Standard MEA) und $10\ \mu\text{m}$ (HD MEA) weitgehend im Größenbereich einzelner Zellen. Bedingt durch den Detektionsradius konventioneller Elektroden von etwa $10^1 - 10^2\ \mu\text{m}$ [Egert et al., 2002a] partizipieren mehrere Zellen am Messsignal. Bei Kardiomyozyten, die über Gap Junctions ein funktionales Synzytium bilden, führt dies zu synchronisierten additiven Feldpotenzialen. Neuronale Signale entsprechen einem scheinbar stochastischem Muster aus Spikes, die jeweils das extrazelluläre Abbild eines individuellen zellulären Aktionspotenzials darstellen. Entsprechend eignen sich MEAs insbesondere zur Analyse der Netzwerkaktivität *in vitro* kultivierter Systeme. Untersuchungen auf Einzelzellebene sind durch Spike-Sorting Algorithmen möglich, die Signale anhand ihrer individuellen Ausprägung klassifizieren und fiktiven Cluster repräsentativ für einzelne Zellen zuordnen [Kim & Kim, 2000; Takekawa et al., 2010; Bestel, Daus et al., 2012].

Die Kontaktierung einzelner Zellen und Kanäle ist Gegenstand des Patch-Clamp Verfahrens und erlaubt die Messung spezifischer Ionenströme [Neher & Sakmann, 1976]. MEAs detektieren die Verschiebung der Ladungsträger hingegen indirekt über die transiente Potenzialänderung im intra- und extrazellulären Raum während eines Aktionspotenzials. Die Aufzeichnung von mehreren 10^4 Potenzialwerten pro Sekunde und Elektrode ermöglicht insbesondere bei Kardiomyozyten eine profunde Rekonstruktion der Feldpotenziale. Durch Korrelation von Feld- und Aktionspotenzialen ist entsprechend eine Analyse der zugrunde liegenden Ionenströme möglich [Egert & Meyer, 2005].

Als Zielstruktur für eine Vielzahl von Arzneimittel sind Ionenkanäle in der pharmakologischen Wirkstoffsuche von besonderem Interesse [Graefe et al., 2011]. Durch Implementierung automatisierbarer, mikrofluidischer Komponenten könnten MEAs als Lab-on-Chip Systeme zur Analyse großer Substanzbibliotheken im High-Throughput-Screening herangezogen werden und einen Beitrag zur Ermittlung pharmakologisch-toxikologischer Profile in der Arzneimittelentwicklung leisten [Meyer et al., 2004b]. Daneben können MEAs für den Einsatz in der Umweltanalytik in portable Systeme überführt werden und beispielsweise zur sensitiven Detektion von Schadstoffen herangezogen werden [DeBusschere & Kovacs, 2001; Pancrazio et al., 2003; O'Shaughnessy et al., 2004].

4.4 Eigenschaften der Sphäroide aus Kardiomyozyten

Die Fähigkeit dissoziierter Zellen aus dem Herzen embryonaler Hühner zur Selbstorganisation zeigte sich durch die Reetablierung funktionaler Attribute wie der autorhythmischen Generierung von Aktionspotenzialen durch Schrittmacherzellen und der Signalleitung im Netzwerk über Gap Junctions. Die Expression der für physiologische Aktivität essenziellen Proteine, wie Cx43 und Desmin [Söhl & Willecke, 2004; Paulin & Li, 2004], wurde in früheren Studien mit Kardiomyozytsphäroiden bestätigt und korreliert mit suffizientem Herzgewebe [Bartholomä et al., 2005]. Nach 24 Stunden in Rotationskultur lagen kontraktile sphärische Reaggregate mit einem Durchmesser von etwa $120\ \mu\text{m}$ vor. Eine deutliche Zunahme der Sphäroidgröße konnte an 2–3 div, gefolgt von einem Übergang zur Sättigung bei 200–250 μm identifiziert werden. Analoge Wachstumscharakteristik wurde in ähnlichen Untersuchungen bei Verwendung sechs Tage alter Hühnerembryonen beobachtet [Bartholomä et al., 2005].

Das Sphäroidwachstum bis 72 Stunden in Kultur könnte durch temporär erhöhte Proliferationsraten begründet sein, da bedingt durch den täglichen Wechsel des Zellkulturmediums keine isolierten Zellen zur weiteren Akkumulation vorlagen. Bei der rasterelektronenmikroskopischen Analyse der Sphäroidoberfläche konnten Shimada et al. in ähnlichen Präparationen nur bis 1 div einzelne, sphärisch strukturierte Zellen beobachten und korrelierten dies mit der Aggregationsterminierung [Shimada et al., 1974]. Eine Abnahme der Proliferationsraten ergibt sich möglicherweise aus der 3D Strukturierung, jedoch könnte auch eine Komprimierung der Sphäroidstruktur durch homophile Cadherin-Cadherin Wechselwirkungen [vgl. Lin & Chang, 2008] indirekt für die reduzierte Größenzunahme ursächlich sein.

Autorhythmische Kontraktionen konnten in 98,4 % der Sphäroide an Tag 2 in Rotationskultur beobachtet werden. Der Anteil scheinbar inaktiver Netzwerke korrelierte in Langzeituntersuchungen mit der Kulturdauer, jedoch konnten kontraktile Sphäroide über mehrere Wochen, bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes, identifiziert werden. Dissoziierte Zellen, die als 2D Architektur auf MEAs oder Petrischalen kultiviert wurden, zeigten analog eine Abnahme kontraktiler Netzwerke über der Zeit. Vollständige Inaktivität lag hingegen bereits an 10 div vor, in Übereinstimmung mit publizierten Studien [Meyer et al., 2004a; Bartholomä et al., 2005]. Bedingt durch die artifizielle Mikroumgebung können zweidimensional kultivierte Zellen de-differenzieren oder veränderte Proliferationseigenschaften aufweisen [Bhadriraju & Chen, 2002; Pampaloni & Stelzer, 2009]. Ventrikuläre Zellen zeigten einen antiproportionalen Zusammenhang von Zelldichte und Proliferationsraten [Akins et al., 2010]. Entsprechend könnte die lokal höhere Zelldichte in Sphäroiden zu einer verminderten Proliferation beitragen und den vergleichsweise langen Zeitraum kontraktiler

Aktivität begründen. Es kann davon ausgegangen werden, dass proliferative Zellen wie Fibroblasten in zweidimensionalen Systemen mit zunehmender Kulturdauer zu einem Ungleichgewicht führen und kontraktile Kardiomyozyten substituieren. Damit stellen Sphäroide gegenüber Monolayer ein stabileres System sowohl für akute Untersuchungen als auch für Langzeitexperimente über mehrere Wochen dar.

4.5 Pharmakologische Untersuchungen an Kardiomyozyten

Die Experimente mit pharmakologisch wirksamen Substanzen konzentrierten sich auf die Untersuchung akuter Reaktionen. Ziel war die Bewertung hybrider Systeme aus Mikroelektroden Arrays und dreidimensionalen Sphäroiden als Biosensor zur nicht-invasiven Analyse kardiaaktiver Wirkstoffe auf funktionaler Ebene.

Autorhythmische, mechanische Kontraktionen stellen charakteristische Merkmale der Sphäroide aus Kardiomyozyten dar. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Kontraktionsfrequenz als physiologisches Basisattribut zur Analyse des pharmakologischen und toxikologischen Potenzials chemischer Substanzen herangezogen werden kann [Seaman et al., 1994; Toseland et al., 1996; Bartholomä, 2005]. Die Ermittlung der Kontraktionsfrequenz erfolgte hierbei rein visuell durch rechnergestützte oder manuelle Modi und erforderte keine Marker, wie beispielsweise spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoffe.

Mikroelektroden Arrays konnten durch präzise Detektion von Feldpotenzialen und deren Timestamps analog zur markerfreien Analyse der Kontraktionsfrequenz von Kardiomyozytsphäroiden herangezogen werden. Daneben war die Untersuchung einer Reihe weiterer elektrophysiologisch relevanter Parameter, wie der Netzwerksynchronizität, potenziell arrhythmische Zustände oder der Verlauf von Feldpotenzialen und der zugrunde liegenden Ionenströme, möglich. Optische Verfahren sind in ihrer zeitlichen Auflösung insbesondere durch die Bildrate der Mikroskopkameras, die konventionell $< 10^2$ fps (frames per second, Bilder pro Sekunde) beträgt, limitiert. Mikroelektroden Arrays erlaubten hingegen mit bis zu 10^5 Messpunkten pro Sekunde und einer Ortsauflösung von $30 \mu\text{m}$ bzw. $200 \mu\text{m}$ eine hoch präzise Erfassung der Netzwerkaktivität.

Während des Untersuchungszeitraumes 3–10 div betrug der Anteil intrinsisch aktiver, kontraktile Sphäroide über 80%. Entsprechend resultierten aus jeder Präparation mehrere hundert funktionale Sphäroide, die jeweils ein autonomes Netzwerk darstellten und zu individuellen elektrophysiologischen Untersuchungen herangezogen werden konnten. Nach einem Experiment wurde der exponierte Sphäroid verworfen und nicht für die Analyse weiterer Wirkstoffe verwendet. Damit konnten Wechselwirkungen mit anderen Substanzen und potenziell konjugierte Pathomechanismen ausgeschlossen werden.

4.5.1 Isoproterenol

Die Feldpotenzialfrequenz variierte im nativen Zustand abhängig vom individuellen Sphäroid und erreichte bis zu 1,5 Hz. Die Sensitivität und Relevanz des Parameters zur Beurteilung funktionaler Effekte durch chemische Stimulation wurde durch Applikation des β -adrenozeptor Agonisten Isoproterenol untersucht. Isoproterenol ist beispielsweise bei Asthma bzw. Bronchokonstriktion indiziert, da die Stimulation des β_2 -adrenergen Rezeptors zur Relaxation der bronchialen Muskulatur führt [Golan et al., 2011].

Der Wirkstoff Isoproterenol stellt jedoch einen unselektiven β -adrenozeptor Agonisten dar und aktiviert daneben β_1 -adrenerge Rezeptoren. Damit sind potenziell inotrope bzw. chronotrope Effekte und kardiospezifische Nebenwirkungen existent [Golan et al., 2011]. Nach Interaktion des Wirkstoffs mit dem Rezeptor wird durch eine G-Protein vermittelte Aktivierung von Adenylylcyclase die Synthese von Zyklischem Adenosinmonophosphat stimuliert. Das Enzym Proteinkinase A wird aktiviert, was zur Öffnung der L-Typ Kalziumkanäle führt [Aravanis et al., 2001]. Der chronotrope Effekt unterliegt damit einer erhöhten Konzentration von Ca^{2+} -Ionen im intrazellulären Raum.

Die Sphäroide zeigten nach Applikation von 1,25 nM bzw. 125 nM Isoproterenol einen Anstieg der Feldpotenzialfrequenz. Die Erhöhung der Substanzkonzentration auf 1,25 μM induzierte keine weitere Steigerung, was eine Sättigung des Effekts bei etwa 150 % der nativen Feldpotenzialfrequenz vermuten lässt. Chronotrope Effekte konnten auch in früheren Studien an Kardiomyozyten, die aus embryonalen Stammzellen differenziert waren [Liu et al., 2007; Brito-Martins et al., 2008], und primären Kardiomyozyten im Monolayer [Pottek et al., 2006; Sörensen, 2007] identifiziert werden. Daneben wurde *in vitro* die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Isoproterenol an Kardiomyozyten von Rattenembryonen nachgewiesen [Ingebrandt et al., 2001].

4.5.2 Lidocain

Die Depolarisierung des Membranpotenzials während der Exzitation folgt einem charakteristischen, formkonstanten Verlauf und unterliegt der transienten Änderung der Membranpermeabilität für bestimmte Ionenarten. Durch extrazelluläre Kontaktierung konnte die Verschiebung von Ladungsträgern während der Aktionspotenziale indirekt als lokale Feldpotenziale gemessen werden. Die Ausprägung der Feldpotenziale variierte je nach Zell-Elektroden-Konfiguration individueller Messungen, jedoch konnten charakteristische, repetitive Elemente identifiziert werden.

Die initiale Phase eines Aktionspotenzials resultiert aus der autoregenerativen Öffnung spannungsgesteuerter Natriumkanäle und wurde im Feldpotenzial offensichtlich durch einen schnellen Spannungsabfall zur maximalen negativen Amplitude reflektiert. Natriumkanäle

sind die Zielstruktur für eine Reihe von Lokalanästhetika und Antiarrhythmika [Yagiela, 1991; Vedantham & Cannon, 1999]. Lidocain ist Prototyp der Klasse Ib Antiarrhythmika und interagiert mit dem Rezeptor bevorzugt im inaktivierten Kanalzustand [Estler & Schmidt, 2007]. Die Synchronisierung untergeordneter Erregungszentren und entsprechend antiarrhythmische Wirkung im Herzen resultiert aus der Inhibition des Natriumeinstromes durch Blockierung der Ionenkanäle [Kretz & Teufel, 2006].

Die Wirkung von Lidocain auf Sphäroide wurde im Konzentrationsbereich von $10\ \mu\text{m}$ – $10\ \text{mM}$ untersucht. Nach Applikation konnte eine dosisabhängige Änderung der initialen Feldpotenzialphase identifiziert werden. Statistische Signifikanz wurde durch Extraktion der maximalen negativen Amplitude sowie der Dauer des schnellen Spannungsabfalls RSdur geprüft, da diese Parameter präzise quantifizierbar und sensitiv für Veränderungen im Signalelement waren. Signifikante Änderungen lagen bei einer Konzentration von $1\ \text{mM}$ Lidocain sowohl bei der Amplitude als auch der RSdur vor, der maximale Effekt wurde mit $5\ \text{mM}$ des Wirkstoffs erreicht.

Nach Applikation von $10\ \text{mM}$ Lidocain zeigten $81\ \%$ der Sphäroide keine elektrische Aktivität. Dies könnte von messtechnischer Seite mit deutlich reduzierten Amplituden, die keine Diskriminierung vom Signalrauschen zulassen, begründet sein. Daneben wäre aus physiologischer Sicht eine vollständige Inhibition von Aktionspotenzialgenese und Reizpropagation, ähnlich der Wirkmechanismen von Lokalanästhetika, durch die Blockierung der Natriumkanäle möglich.

Frühere Studien untersuchten die physiologische Reaktion von Kardiomyozytsphäroiden auf die Applikation von Tetrodotoxin (TTX), einem potenten Nervengift, das spannungsaktivierte Natriumkanäle blockiert. Durch rein visuelle Analyse der Kontraktionen konnte eine dosisabhängige Abnahme mechanischer Aktivität festgestellt werden [McDonald et al., 1972]. Eine nähere Betrachtung der elektrophysiologischen Eigenschaften war durch die Kontaktierung einzelner Zellen mit Mikropipetten möglich. Clay et al. identifizierten hierbei eine Korrelation von Wirkstoffkonzentration und Geschwindigkeit der schnellen initialen Spannungsänderung [Clay et al., 1994].

Im Gegensatz zu TTX erreicht Lidocain den Wirkort von intrazellulärer Seite. Die Substanz liegt bei physiologischen pH-Werten in lipophiler Form vor und kann durch die Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran diffundieren. Niedrige pH-Werte führen hingegen zur Protonierung des Moleküls und inhibieren die Diffusion zum Zytosol. Entsprechend zeigt Lidocain in entzündetem Gewebe nur bedingt Wirkung [Frese, 2006].

4.5.3 Diltiazem

Im Feldpotenzial der Sphäroide war nach dem schnellen Spannungsabfall zur maximalen negativen Amplitude – in Übereinstimmung mit dem charakteristischen intrazellulären Potenzialverlauf – ein Plateau-ähnliches Element der Dauer 100–200 ms zu beobachten. Bei kontraktiven Kardiomyozyten resultiert diese Phase aus der kompensierenden Überlagerung von Kalium- und Kalziumströmen. Kardioaktive Substanzen, die Kalziumkanäle blockieren und den Influx hemmen, werden als Kalziumantagonisten bezeichnet und sind nach ihrem Wirkmechanismus den Klasse IV Antiarrhythmika zugeordnet. Sie führen zu einer Verkürzung der Plateauphase und entsprechend Reduzierung des QT-Intervalls im EKG-Signal [Thompson & Balsler, 2004; Graefe et al., 2011].

Das Benzothiazepinderivat Diltiazem ist ein Kalziumantagonist, der den Ionenstrom in die Zelle durch Blockierung spannungsabhängiger L-Typ Kalziumkanäle inhibiert [Herdegen, 2010]. Die Sphäroide zeigten nach Applikation von Diltiazem eine Verkürzung der Plateauphase respektive Feldpotenzialdauer FPdur. Eine signifikante Detektion der Substanz erfolgte bei einer Konzentration von 10 μM . Der maximale Effekt wurde bei 100 μM Diltiazem mit einer Reduzierung von FPdur um 22,78 % identifiziert. Entsprechend kann von einer dosisspezifischen Korrelation von L-Typ Kanal inhibition und FPdur der Sphäroide ausgegangen werden.

Zweidimensionale Systeme zeigten nach Stimulation mit Verapamil, einem Kalziumantagonisten vom Phenylalkylamin-Typ, hingegen keine ausgeprägte Änderung in der Dauer der Feldpotenziale [Meyer et al., 2004b]. Dies resultiert aus der Konkurrenz zweier Wirkmechanismen: Mit ähnlichen IC_{50} von etwa 150 nM blockiert Verapamil neben Kalziumkanälen auch schnell repolarisierende Kaliumkanäle und induziert somit eine Überlagerung von Verkürzung und Verlängerung der Plateauphase [Meyer et al., 2004a,b].

Diltiazem zeigt im Vergleich zu Verapamil sehr geringe Affinität zum entsprechenden Kaliumkanal [Zhang et al., 1999]. Dennoch ist eine Koexistenz konkurrierender Wirkmechanismen möglich, die durch extrazelluläre Ableitungen mit MEAs nur bedingt auf der Ebene spezifischer Ionenströme aufgelöst wird. MEAs stellen zelluläre Effekte auf funktionaler Ebene, beispielsweise durch Quantifizierung der FPdur *in vitro* als repräsentatives Attribut des QT-Intervalls *in vivo*, dar. Im speziellen Fall des Verapamils könnten molekulare *in vitro* Untersuchungen, die auf einer isolierten Betrachtung des Kaliumkanals basieren, zur Falsch-Positiv-Klassifizierung führen, da die Rezeptor-Ligand-Interaktion und das Potenzial zur QT-Verlängerung zwar identifiziert, der physiologische Effekt auf zellulärer Ebene jedoch nicht beschrieben werden kann [Meyer et al., 2004b, 2007].

4.5.4 4-Aminopyridin

Neben einer Reihe von Antiarrhythmika existieren Wirkstoffe mit nicht-kardiovaskulärer Indikation, die im therapeutischen Maßstab durch Inhibition transmembraner Kaliumströme eine Verzögerung der Repolarisierung im myokardialen Aktionspotenzial induzieren können [Seel, 2011]. Diese, provozierte Dysfunktion der Ionenkanäle kann entsprechend dem Long QT Syndrom zu pathologisch verlängerten Plateauphasen im Aktionspotenzial respektive QT-Intervallen im EKG führen. In der Arzneimittelentwicklung ist das QT-Intervall von besonderem Interesse, da verzögerte Repolarisationen mit der Ausbildung potenziell letaler ventrikulärer Tachykardien bzw. Arrhythmien, wie beispielsweise Torsade de Pointes, assoziiert wurden [Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006; Thomas et al., 2010].

Zulassungsbehörden wie die EMA (European Medicines Agency) oder FDA (U.S. Food and Drug Administration) fordern daher eine Bewertung von Wirkstoffen hinsichtlich der Mechanismen, die zu einer Verlängerung des QT-Intervalls führen [EMA, 1997]. Die ICH (International Conference on Harmonisation) ist eine kooperative Initiative zur Regulierung und Harmonisierung der Arzneimittelzulassung in Europa, Japan und den USA. Zur Beurteilung des repolarisationsverzögernden Potenzials entwickelte die ICH Richtlinien für präklinische (ICH S 7 B) und klinische (ICH E 14) Studien [ICH, 2005b,a]. Die S 7 B Richtlinie sieht hierbei neben Untersuchungen im Tierversuch komplementäre Experimente an isolierten Zellen *in vitro* vor.

4-Aminopyridin ist ein Kaliumkanalblocker mit dem Potenzial zur Verlängerung der Plateauphase im Aktionspotenzial von Kardiomyozyten [Thomas et al., 2010]. In der Vergangenheit wurde 4-Aminopyridin als möglicher Wirkstoff zur Therapie Multipler Sklerose, einer autoimmun vermittelten, demyelinisierenden Erkrankung des Zentralnervensystems, identifiziert [Goodman et al., 2009]. Nach Abwägung von Risiken und potenziellem Nutzen wurde die Substanz unter dem Namen Fampyra, nach Empfehlung des CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use) der EMA eine Zulassung unter Auflagen erteilt [EMA, 2011].

Die Sphäroide zeigten nach Inhibition der transienten Kaliumströme durch 4-Aminopyridin eine dosisabhängige Erhöhung der Feldpotenzialdauer in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen an anderen Modellsystemen [Sridhar et al., 2007; Thomas et al., 2010]. Der maximale Effekt konnte bei der Konzentration 2,5 mM mit einer Verlängerung der FPdur etwa um den Faktor 1,5 beobachtet werden. Eine Erhöhung der Dosis auf 10 mM 4-Aminopyridin führte zur vollständigen Inhibition der Signale. Eine Regenerierung der Aktivität konnte durch mehrfachen Austausch des Mediums erreicht werden, was eine Reversibilität des Effektes vermuten lässt.

4.6 Elektromagnetische Exposition

4.6.1 Versuchsumgebung

Die experimentelle Betrachtung biologischer Primärreaktionen auf elektromagnetische Felder bedingt exakt definierte und reproduzierbare Feldparameter. Der Mobilfunk bedient sich spezifischer Frequenzen und Intensitäten, die im Laborversuch durch geeignete Systeme simuliert werden können [Übersicht u. A. in Paffi et al., 2011]. Für eine Reihe von *in vitro* Studien wurde die experimentelle Felderzeugung durch Rechteckhohlleiter für die Frequenzen 900 MHz [Schuderer et al., 2004a], 1,8 GHz [Schuderer et al., 2004b] und 1,9–2,2 GHz [Koester et al., 2007] realisiert. Bei diesen Systemen wird die elektromagnetische Energie in einer hohlzylindrischen Struktur je nach Konfiguration im Lauf- oder Stehwellenmodus übertragen. Im Expositionsraum führt dies zu lokalen Intensitätsmaxima und -minima. Entsprechend bieten Hohlleiter keine homogene Feldverteilung und sind in Bezug auf Frequenz und Proben dimension nicht adaptiv.

Die Felderzeugung in den Expositionsexperimenten wurde mit einem offenen, transversal elektromagnetischen (TEM) Wellenleiter, einer sogenannten Stripline realisiert. Die Stripline bestand aus zwei Metallelementen in planparalleler Konfiguration. Durch Zuführung der elektromagnetischen Energie bildete sich zwischen den Elementen ein homogenes elektromagnetisches Feld aus. Die elektrische Feldkomponente war dabei stets vertikal polarisiert und stand zum magnetischen Vektor orthogonal. Da dieses System nicht auf stehenden Wellen basierte, lag eine weitgehend flexible Festlegung von Frequenzparameter, Proben dimension und Probenpositionierung vor.

Zur Vermeidung höherer Schwingungsmoden sollte die verwendete Wellenlänge maximal der doppelten Höhe der Stripline entsprechen [Goldhammer, 2008]. Mit einem Septum-Masse-Abstand von 50 mm besaß der Aufbau eine Grenzfrequenz von etwa 3 GHz und deckte die im Mobilfunk relevanten Standards wie GSM und UMTS ab. Weiterhin könnten Untersuchungen im Niederfrequenzbereich (ELF, extremely low frequencies) durchgeführt werden. Mögliche Wechselwirkungen von elektromagnetischen Feldern im ELF Bereich und biologischem Gewebe wurden in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Umfassend akzeptierte Mechanismen liegen jedoch nicht vor [Foster, 2003; Santini et al., 2009].

Für *in vivo* Studien können klassische Antennen als Feldquellen zum Einsatz kommen, da je nach Experiment die Exposition hoher Raumvolumina erforderlich ist. Die Dosimetrie stellt jedoch eine besondere Herausforderung dar, da eine lokale Fixierung der Untersuchungsobjekte insbesondere bei Langzeit-, aber auch bei Kurzzeitversuchen nicht sinnvoll ist [Paffi et al., 2011]. Im nicht-fixierten Zustand ist von einer dynamischen Feldsituation auszugehen und Parameter wie beispielsweise die SAR lassen sich nur bedingt bestimmen und reproduzieren.

Hybride Systeme aus Sphäroiden und MEAs stellen in Bezug auf die Exposition eine weitgehend statische Situation dar und relevante Feldparameter konnten durch Finite Elemente Simulation berechnet werden. Aus der HF Eingangsleistung von 1 W resultierte ein homogenes Feld von etwa 140 V/m zwischen Septum und Massefläche der Stripline. Für dielektrische Komponenten, wie Zellkulturmedium und Sphäroid, war eine besondere Betrachtung der Dosimetrie erforderlich, da SAR-Wert und Feldstärke materialspezifischen Eigenschaften, wie der Leitfähigkeit, Dichte und Permittivität des Dielektrikums, unterliegen [EN50361, 2002]. Bei der Eingangsleistung von 1 W wurde auf Basis der Finite Elemente Simulation ein SAR-Wert von 32 mW/kg im Sphäroid und 87 mW/kg im umgebenden Zellkulturmedium identifiziert.

Um eine allgemeine Bewertung und Reproduzierbarkeit von Expositionsstudien sicherzustellen, ist daher eine präzise Angabe der Dosimetrie und des Bezugssystems essenziell. Einschlägige Prüfvorschriften [EN50361, 2002] und Grenzwertbestimmungen [ICNIRP, 1998] orientieren sich stets am Energieeintrag in das Gewebe. In den Experimenten dieser Arbeit stellten Sphäroide das exponierte Gewebe dar und wurden entsprechend der Normen als Bezugssystem für SAR Deklarationen gewählt. Studien mit Zellen, die isoliert oder in zweidimensionaler Netzwerkarchitektur vorliegen, bieten nur bedingt präzise Methoden zur Berechnung oder experimentellen Bestimmung der SAR im Gewebe, und das umgebende Zellkulturmedium wird als Bezugssystem definiert [z. B. Schuderer et al., 2004a; Gaber et al., 2005]. Dieser Wert kann jedoch ein Vielfaches des eigentlichen Energieeintrages in das Gewebe betragen und bedarf in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Bewertung von Studien einer differenzierten Betrachtung.

Zur Untersuchung elektrophysiologischer Primärreaktionen auf hochfrequente Felder wurden Sphäroide an MEAs gekoppelt und extrazellulär abgeleitet. Dieses Verfahren erlaubte eine kontinuierliche Aufzeichnung der elektrischen Aktivität vor, während und nach der Exposition. In der Vergangenheit fand die MEA-Technologie in Expositionsexperimenten kaum Beachtung und wurde lediglich in wenigen Studien zur Analyse zweidimensionaler kultivierter Neuronen vorgeschlagen [Koester et al., 2007; Merla et al., 2011]. Die *in vitro* Untersuchungen von Kardiomyozyten erfolgten primär durch Glaskapillaren, die mit einem Elektrolyt gefüllt waren, oder Drahtelektroden [Yee et al., 1984; Seaman & DeHaan, 1993; Abbate et al., 1996]. Elektrische Leiter führen je nach Orientierung und Aspektverhältnis zu deutlichen Inhomogenitäten in elektromagnetischen Feldern [Oster, 2012]. Durch die resultierende Intensivierung des Feldes am Zell-Elektroden-Übergang ist daher eine nur schwer quantifizierbare Situation existent, die realen Bedingungen nicht entspricht, und kausale Betrachtungen zellulärer Effekte auf Basis der Dosimetrie sind nicht sinnvoll.

Durch die planare Konfiguration war an substratintegrierten Ableitelektroden der MEA-Chips von weniger Inhomogenitäten auszugehen. Eine konträre Aussage lieferten Merla et al., die umfassende Finite Elemente Berechnungen zu MEAs in elektrischen Feldern

publizierten. Im Elektrodenbereich erreichten die SAR-Werte ein Vielfaches der nativen Umgebung [Merla et al., 2011]. Jedoch waren in den Simulationen die Elektroden mit einer Schichtdicke von $200\ \mu\text{m}$ und einem Durchmesser von $40\ \mu\text{m}$ für Prozesse der Halbleitertechnologie unkonventionell dimensioniert und das Aspektverhältnis von 1:5 könnte ähnlich der Glaskapillaren und Drahtelektroden für die Feldintensivierung ursächlich sein.

Die Sphäroidsignale wurden mit planaren Elektroden des Durchmessers $30\ \mu\text{m}$ extrazellulär abgeleitet. Aus der Schichtdicke von $1\ \mu\text{m}$ [Egert et al., 1998] ergab sich ein Aspektverhältnis von 1:30 und Inhomogenitäten waren nur minimal existent. Die mittlere Feldstärke im Sphäroid betrug $5,9\ \text{V/m}$ und erreichte im Bereich der Zell-Elektroden-Kopplung maximal $7,3\ \text{V/m}$. Wegen der dreidimensionalen Sphäroidarchitektur war die durch Elektroden induzierte Intensivierung des Feldes in Bezug auf das gesamte Kultursystem unwesentlich. Entsprechend bietet die Kombination aus MEA-Technologie, Sphäroid und Stripline eine qualifizierte Versuchsumgebung für Expositionsstudien.

4.6.2 Thermische Effekte

Elektromagnetische Felder können durch die Anregung von Dipolmolekülen oder Ionenströmen eine Erhöhung der kinetischen Energie in biologischen Systemen induzieren. Diese thermischen Effekte sind in ihrer Intensität insbesondere durch die Feldstärke bestimmt und können beispielsweise zur Beschleunigung metabolischer Prozesse oder Denaturierung von Proteinen führen [Gimsa, 2006]. Elektrogenes Gewebe, wie 2D kultivierte Kardiomyozyten, zeigten in Abhängigkeit der Erwärmung eine erhöhte Spontanaktivität [Rothermel et al., 2005]. Die thermische Provokation von Sphäroiden aus Kardiomyozyten führte in Vorexperimenten zu einer veränderten Feldpotenzialfrequenz. Durch Interpolation wurde für den physiologisch relevanten Bereich von $36,0\ ^\circ\text{C}$ – $38,0\ ^\circ\text{C}$ eine Steigerung der Aktivität um $5,89\%$ pro Kelvin ermittelt. Entsprechend sind Sphäroide sensitiv gegenüber Temperaturänderungen und thermische Effekte besitzen in Expositionsstudien besondere Relevanz, da resultierende Sekundärmechanismen als primäre athermische Zellreaktionen missinterpretiert werden könnten.

Zur isolierten Betrachtung möglicher athermischer Effekte wurde die Proben temperatur während der Experimente durch eine externe Temperaturregelung auf $37,0\ ^\circ\text{C}$ gehalten. Die Stabilität der Temperatur im Zellkulturmedium wurde in einem zweiten Vorexperiment mit einem faseroptischen Sensor für die SAR-Werte $100\ \text{mW/kg}$ und $250\ \text{mW/kg}$ untersucht. Für beide Parameter wurden während der Exposition minimale Temperaturänderungen im Bereich $dT < 0,1\ \text{K}$ festgestellt. Entsprechend waren gängige Anforderungen hinsichtlich Temperaturstabilität erfüllt [Schuderer et al., 2004b] und thermische Wirkmechanismen der Exposition diskriminiert.

4.6.3 Elektrophysiologische Primärreaktionen

Thermische Wirkmechanismen bilden die Basis für die gesetzlich festgelegten Grenzwerte. Unter Berücksichtigung endogener Thermoregulationsprozesse sind bei spezifischen Absorptionsraten unter 0,08 W/kg bei Ganzkörper- bzw. 2 W/kg bei Teilkörperexposition keine gesundheitsschädlichen Konsequenzen durch die dielektrische Erwärmung des Gewebes zu erwarten [ICNIRP, 1998]. Kontrovers bleibt die Existenz biophysikalischer Mechanismen, die bei Einhaltung der Grenzwerte zu athermischen Effekten führen. Als athermisch sind in diesem Zusammenhang Primärprozesse anzusehen, die nicht Folge einer Temperaturerhöhung sind. Die experimentelle Untersuchung athermischer Effekte bedingt Systeme oder Prozesse, die den thermischen Energieeintrag kompensieren.

Auf subzellulärer Ebene wurden in der Vergangenheit verschiedene Ansätze athermischer Wirkmechanismen diskutiert, die sich ausgehend vom elektrischen oder magnetischen Vektor an der Induzierung gerichteter Ionenströme und elektrischer Potenzialdifferenzen, der Konformationsänderung von Makromolekülen oder der Modifizierung chemischer und biochemischer Reaktionswege orientieren [siehe Übersicht in Gimsa, 2006]. Bei elektrogenen Zellen ist die Zellmembran relevante Zielstruktur experimenteller Untersuchungen, da die Potenzialdifferenz des intra- und extrazellulären Milieus und deren transiente Änderung während eines Aktionspotenzials Grundlage neuronaler und kardialer Kommunikation ist [Linz et al., 1999; Gaber et al., 2005]. In früheren Studien wurden Effekte elektromagnetischer Felder auf die Kalziumhomöostase von Neuronen [Bawin et al., 1975; Blackman et al., 1980] und Kardiomyozyten [Schwartz et al., 1990] identifiziert. In anderen Arbeiten konnten diese Effekte jedoch nicht reproduziert werden [Wolke et al., 1996; Obo et al., 2002; Green et al., 2005].

Die potenziellen Wirkmechanismen an Sphäroiden aus Kardiomyozyten wurden auf funktionaler Ebene untersucht. Intrinsisch generierte Aktionspotenziale wurden dazu nach der Exposition extrazellulär abgeleitet und die Endpunkte Feldpotenzialfrequenz, -regelmäßigkeit und -dauer in Bezug auf die native Situation analysiert. Die Exposition erfolgte mit elektromagnetischen Feldern der Frequenz 900 MHz, die periodisch mit einem niederfrequenten Puls von 8,3 Hz moduliert waren. Die spezifischen Absorptionsraten betragen 100 mW/kg und 250 mW/kg. Entsprechend waren die Feldparameter in guter Übereinstimmung mit konventionellen Werten des Mobilfunks determiniert. Signifikante Änderungen im Aktivitätsmuster der Sphäroide konnten nach der Exposition nicht identifiziert werden. Die Untersuchung akuter expositionsinduzierter Effekte erfolgte mit einer auf die Sphäroide individuell angepassten Pulsfrequenz, die im Bereich $\pm 5 - 20\%$ der nativen Feldpotenzialfrequenz variiert wurde. Ein direkter Effekt, wie beispielsweise eine Synchronisierung der Kontraktionen mit der Pulsfrequenz oder feldinduzierte Arrhythmien, konnte nicht nachgewiesen werden.

Konträre Aussagen zu diesen Ergebnissen liefern frühere *in vitro* Studien an isoliertem Herzgewebe. Die Schlagrate embryonaler Hühnerherzen folgte der Modulationsfrequenz gepulster Mikrowellen [Caddemi et al., 1986]. Arrhythmische Kontraktionen konnten durch spezifische Pulsfrequenzen in periodische Muster überführt werden. Die experimentellen Beobachtungen der Synchronisierung wurden dabei durch numerische Simulationen gestützt und kausal mit Kalziumströmen assoziiert [Tamburello et al., 1993]. Bradykardie infolge der Exposition wurde an isolierten Herzen von Fröschen durch Yee et al. beobachtet. Die Verwendung von Glaskapillaren oder Drahtelektroden kann jedoch zur lokalen Intensivierung des Feldes führen und für die elektrophysiologischen Effekte ursächlich sein [Yee et al., 1984]. Eine Erhöhung der Schlagfrequenz wurde hingegen von Seaman und DeHaan durch die Befeldung von Kardiomyozyten mit einer Frequenz von 2,45 GHz über die Dauer von 190 s identifiziert [Seaman & DeHaan, 1993]. Die Autoren verwendeten bei ihren Experimenten hohe SAR-Werte von bis zu 86,9 W/kg. Entsprechend könnten neben den Intensivierungseffekten durch die zur Messung verwendeten Glaskapillaren auch thermische Effekte für die Studienergebnisse verantwortlich sein.

4.7 Eigenschaften neuronaler Sphäroide

Sphäroide aus isolierten Zellen des Mesencephalons embryonaler Hühner dienten als neuronales Modellsystem. In der Vergangenheit wurde die Fähigkeit dreidimensional kultivierter Neuronen zur Ausbildung von Synapsen [Seeds & Vatter, 1971] und Entwicklung spontaner Netzwerkaktivität [Stafstrom et al., 1980] gezeigt und Sphäroide für Anwendungen der Neuropharmakologie, -pathologie und -toxikologie vorgeschlagen [Wyle-Gyurech & Reinhardt, 1991; Fox & Atterwill, 1999; Sales et al., 2000, 2004; van Vliet et al., 2008].

Die Reaggregation der Neuronen erfolgte entsprechend der Kardiomyozyten durch kontinuierliche orbitale Rotation. Ausgehend von dissoziierten Zellen bildeten sich innerhalb der ersten 24 h morphologisch stabile Sphäroide mit einem mittleren Durchmesser von 125,4 μm . Eine Zunahme der Größe wurde im frühen Kulturstadium in guter Übereinstimmung mit Sales et al. beobachtet, die in ihrer Studie signifikantes Wachstum bis 9 div mit folgendem Übergang in einen Sättigungsbereich identifizierten [Sales et al., 2004]. Die Wachstumscharakteristik könnte entsprechend Kapitel 4.4 durch eine zunehmende Hemmung der Proliferation bedingt sein und aus der 3D Architektur der Sphäroide ein stabiles Verhältnis von Neuronen zu proliferativen Gliazellen resultieren. Auf die Verwendung serumfreier Zellkulturmedien oder antimittotischer Additive, die in 2D Systemen zur Verhinderung des Überwachsens von Neuronen durch Gliazellen herangezogen werden [Brewer et al., 1993; Kingston et al., 1997], wurde in diesem Zusammenhang verzichtet.

Nach 14 Tagen in Rotationskultur erreichten die Sphäroide eine Größe von etwa 250 μm . Im Vergleich zu konventionellen Explantatmodellen oder akuten Gewebeschnitten, mit ty-

pischen Dimensionen im Bereich einiger Millimeter, ist von einer besseren Nährstoffversorgung, insbesondere zu zentralen Bereichen, sowie einer höheren Viabilität der Sphäroide auszugehen [Fox & Atterwill, 1999; Lin & Chang, 2008]. Damit ist neben der Möglichkeit akuter Experimente auch eine Voraussetzung für Langzeituntersuchungen gegeben.

Spontane elektrische Aktivität wurde zunächst in Form einzelner Spikes nach 4 div und anschließend durch die sukzessive Zunahme von Bursts registriert. Es ist davon auszugehen, dass die neuronale Aktivität mit der Neuriten- und Synapsenbildung korreliert. Frühere Studien zeigten, dass die ansteigende Synapsendichte die Signalweiterleitung in kortikalen Netzwerken gewährleistet und Entwicklung hochfrequenter Spikefolgen ermöglicht [Jungblut, 2006; Jungblut et al., 2009]. Die Reetablierung funktionaler Attribute unterliegt selbstorganisierenden Prozessen. Eine Modifikation der Entwicklung neuronaler Aktivität in Sphäroiden kann beispielsweise durch elektrische Stimulation erreicht werden [Uroukov & Bull, 2008].

Erfolgte die Kultivierung der dissoziierten Neuronen in zweidimensionaler Architektur, konnte die intrinsische Reetablierung von Netzwerkstrukturen nach 2 div morphologisch durch die Ausbildung eines unspezifischen Neuritengeflechts bewertet werden. Im Zeitraum 1–2 Wochen nach Kultivierung war jedoch die Aggregation weniger Zellen zu isolierten Cluster sowie das Ablösen von Zellen, entsprechend vergangener Studien [Wyle-Gyurech & Reinhardt, 1991], charakteristisch. Das zweidimensionale System wurde als instabiles Modell bewertet und daher nicht zu pharmakologischen Untersuchungen herangezogen.

4.8 Multivariante Spikeanalyse

Neuronale Signale waren in den Ableitungen von Rauschanteilen begleitet und mussten durch geeignete Algorithmen isoliert werden. Zur Analyse zweidimensionaler *in vitro* Systeme werden in konventionellen Verfahren spezifische Schwellspannungen (Thresholds) als Vielfaches der Standardabweichung individuellen Signalrauschens definiert [z. B. Wagenaar et al., 2005; Chiappalone et al., 2005; Kujawski, 2005; Wagenaar et al., 2006; Horton et al., 2007]. Beim Überschreiten des Thresholds wird das Minimum des Messsignals ermittelt und als Timestamp eines Spikes registriert. Damit erfolgt die Diskriminierung zellulärer Signale ausschließlich auf Basis ihrer maximalen negativen Amplitude. Die Algorithmen sind echtzeitfähig und können entsprechend auch zur online-Analyse herangezogen werden [Pancrazio et al., 2003; Bestel, 2010]. Präzisere Verfahren bedienen sich eines zweiten, positiven Thresholds und erlauben die Bewertung einer Peak-Peak-Differenz [z. B. Grattarola et al., 2001; Sato et al., 2007]. Die Refraktärzeit als physiologisch relevanter Parameter konnte von Jungblut et al. nach Analyse der Interspikeintervalle berücksichtigt werden. Durch Definition einer Totzeit von 2 ms nach jedem Ereignis wurde eine irrtümliche Spikedetektion ausgeschlossen [Jungblut, 2006; Jungblut et al., 2009].

Während thresholdbasierte Methoden zur Untersuchung zweidimensionaler Netzwerke weitgehend etabliert sind, war eine robuste Analyse neuronaler Sphäroidsignale mit diesen Algorithmen nicht gewährleistet. Bedingt durch die dreidimensionale Architektur lag im Bereich der Sphäroid-Elektroden-Kopplung eine höhere Zelldichte und Partizipation mehrerer Neuronen am Messsignal vor. Die Amplituden der Spikes waren höchst variabel und nicht augenscheinlich vom Rauschen zu diskriminieren. Die Analyse der Sphäroidsignale mit einem statischen Thresholdmodell zeigte, dass die Anzahl der detektierten Spikes wesentlich mit dem Wert des Thresholds korrelierte. Weiterhin waren niederfrequente Signalanteile während eines Bursts existent, die deutliche Artefakte induzierten.

Mit dem multivarianten Ansatz erfolgte die Detektion der Sphäroidsignale nicht ausschließlich durch Bewertung der Amplitude, sondern durch Analyse von 17 geometrischen, frequenz- und vektorbasierten Attributen. Die konstruktive Information der Merkmale war von der individuellen Messung abhängig. Daher wurde eine Evaluation der Verteilungsfunktion durchgeführt und bis zu $n = 8$ potente Attribute mit der höchsten Trennschärfe ausgewählt [Bestel, 2011]. Diese wurden in einen n -dimensionalen Merkmalsraum überführt und zelluläre Spikes mittels EM Clusteralgorithmus extrahiert [Bestel, Daus et al., 2012]. Damit war der Algorithmus robust gegenüber Variationen der Signalamplituden und erlaubte die verlässliche Analyse extrazellulär abgeleiteter Aktionspotenziale der Sphäroide.

In Bezug auf zweidimensionale Systeme könnte der multivariante Ansatz eine Präzisierung bestehender, thresholdbasierter Methoden bieten. In konventionellen Untersuchungen partizipieren etwa 3–10 Neuronen am Messsignal [Potter et al., 2006]. Aufgrund der individuellen Zell-Elektroden-Konfiguration lassen sich spezifische Spikeformen durch ihre Hauptkomponenten [Egert et al., 2002b; Zhang et al., 2004] oder Waveletkoeffizienten [Hulata et al., 2002; Takekawa et al., 2010] isolieren und einzelnen Neuronen bzw. fiktiven Cluster zuordnen. Verfahren auf Basis spezifischer Attribute sind bei der Analyse jedoch nicht adaptiv. Der multivariante Ansatz erlaubt eine flexible Evaluation der Merkmale individueller Messungen und entsprechend differenzierte Spike Sorting Algorithmen [Bestel, 2011, Bestel, Daus et al., 2012].

4.9 Pharmakologische Untersuchungen an neuronalen Sphäroiden

Mikroelektroden Arrays wurden bereits in vergangenen Studien zur sensitiven Klassifikation neuroaktiver Substanzen herangezogen und als valide Testsysteme für die pharmakologische Wirkstoffsuche vorgeschlagen [Gross et al., 1995; Keefer et al., 2001; O’Shaughnessy et al., 2003; Martinoia et al., 2005; Xiang et al., 2007]. Jungblut et al. fokussierten ihre Untersuchungen auf den GABA_A-Rezeptorkomplex. Dieser besitzt als Zielstruktur für

eine Reihe von Neuropharmaka, wie Antikonvulsiva oder Sedativa, besondere klinische Relevanz und stellt einen geeigneten Kandidaten zur Bewertung hybrider Testsysteme aus MEAs und neuronalen Netzwerken dar [Jungblut, 2006; Jungblut et al., 2009]. Umfassende systematische Studien mit physiologisch relevanten, dreidimensionalen *in vitro* Systemen existieren in diesem Zusammenhang jedoch nicht.

Werden Neuronen in einer zweidimensionalen Architektur auf den MEAs immobilisiert, liegt je nach Präparation nach etwa drei Wochen ein morphologisch und funktional stabiles Netzwerk vor [Morefield et al., 2000; Jungblut, 2006]. Während der Reorganisation sind Zellen und Chip entsprechend konjugiert. Sphäroide reaggregierten hingegen durch kontinuierliche, horizontale orbitale Rotation in Suspension und wurden unmittelbar vor den Messungen an MEAs gekoppelt. Nach der Bewertung akuter Effekte einer Substanz wurde der Sphäroid verworfen und für nachfolgende Experimente durch einen neuen ersetzt. Damit waren mögliche Wechselwirkungen mit bzw. chronische Effekte durch bereits untersuchte Substanzen ausgeschlossen und unter methodischen Aspekten keine erneute Reetablierungsphase erforderlich.

In den pharmakologischen Untersuchungen wurde GABA entsprechend seiner natürlichen Funktion als inhibitorischer Neurotransmitter sowie der kompetitive GABA_A-Antagonist Bicucullin in Nano- und Mikromolarkonzentrationen appliziert und elektrophysiologische Reaktionen der Sphäroide analysiert. Für beide Substanzen war eine augenscheinliche Modifikation des Signalmusters charakteristisch. Zur Quantifizierung der Effekte wurden die Parameter Spike- und Burstrate herangezogen, da diese in Studien an 2D Systemen bereits erfolgreich zur Klassifikation neuroaktiver Substanzen eingesetzt wurden [Morefield et al., 2000; Keefer et al., 2001; Martinoia et al., 2005]. Die Spikerate entspricht der Anzahl der pro Zeiteinheit im Detektionsradius der Mikroelektrode erfassten Aktionspotenziale und kann im Falle der Sphäroide durch die multivariante Analyse des Messsignals verlässlich ermittelt werden. Bursts stellen im Allgemeinen einzelne, hochfrequente Folgen von Spikes, die durch niederfrequente Spikeperioden isoliert sind, dar [Cocatre-Zilgien & Delcomyn, 1992]. Die Detektion der Bursts erfolgte nach der Methode der maximalen Intervalle [Tam, 2002; Jungblut et al., 2009] durch Analyse des Spiketrains.

4.9.1 Bicucullin

Bicucullin beansprucht keine direkte therapeutische Relevanz, ist als etablierter kompetitiver GABA_A-Antagonist jedoch in der experimentellen Pharmakologie von besonderer Bedeutung [Hänsel & Sticher, 2009]. Das Alkaloid bindet postsynaptisch an eine extrazelluläre Domäne zwischen der α und β Untereinheit des Rezeptors und inhibiert die Entstehung hyperpolarisierender Potenziale [Graefe et al., 2011]. Entsprechend sind die modifizierte Spike- und Burstrate der Sphäroide nach Applikation von Bicucullin über ei-

ne Disinhibition neuronaler Netzwerkaktivität erklärbar. Für beide Parameter konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung durch das Additiv induziert werden.

Die Spikerate war in Bezug auf die Burstrate weniger sensitiv und mit einer erhöhten Standardabweichung respektive Streuung der Messwerte assoziiert. Dies könnte durch eine mit der Dosis zunehmenden Implementierung isolierter Spikes in Bursts begründet sein. Entsprechend ist zur Klassifikation neuroaktiver Substanzen primär die Burstrate als robuster und sensitiver Parameter indiziert. Frühere Studien zeigten in guter Übereinstimmung eine Zunahme der Netzwerkaktivität und Oszillation in hippocampalen [Arnold et al., 2005], kortikalen [Xiang et al., 2007; Jungblut, 2006], striatalen [Fleischer, 2006] und spinalen [Keefer et al., 2001] Neuronen, die als Monolayer auf MEA-Chips kultiviert waren, nach Zugabe von Bicucullin. Divergente qualitative Ergebnisse könnten durch eine unterschiedliche Sensitivität der exponierten Zelltypen bzw. durch die Wahl des Kulturmodells begründet sein. Daneben könnten zytotoxische Mechanismen bei hohen Konzentrationen synaptischen Effekten überlagert sein.

4.9.2 GABA

GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Nervensystem. Nach Interaktion mit dem Rezeptorkomplex führt die Erhöhung der Membranpermeabilität für Cl⁻-Ionen zu hyperpolarisierenden Potenzialen in postsynaptischen Neuronen [Silverthorn, 2009; Fiedlerling, 2010]. Entsprechend ist die Suffizienz GABAerger Mechanismen für das wechselseitige Gleichgewicht von Exzitation und Inhibition essenziell. Dysfunktionen lassen sich mit der Epileptogenese assoziieren und beanspruchen somit besonderes klinisches Interesse [Czuczwar & Patsalos, 2001].

Durch externe Zugabe von GABA waren Spike- und Burstrate der Sphäroide dosisabhängig reduziert. Die Halbwirksamkeitsdosis der Burstrate betrug $IC_{50} = 28 \mu\text{M}$ und war damit höher als bei vergleichbaren Experimenten auf der Basis zweidimensional kultivierter Säugerneuronen [Keefer et al., 2001; Jungblut, 2006; Xiang et al., 2007]. In Übereinstimmung mit dem Alkaloid Bicucullin könnte neben des Zelltyps auch die Architektur des *in vitro* Systems für die geringere Sensitivität der Sphäroide in Bezug auf das Additiv ursächlich sein.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Entwicklung hybrider Strukturen aus Mikroelektroden Arrays und dreidimensionalen Sphäroiden wurde in dieser Arbeit ein funktionaler, deskriptiver Ansatz der Biosensorik adressiert. Während biochemische Sensoren ausschließlich analytische Informationen über die Wechselwirkung von Liganden und Rezeptoren liefern, erlauben zellbasierte Biosensoren eine physiologische Beschreibung biologischer Systeme in nativen bzw. chemisch oder physikalisch provozierten Zuständen. Dies impliziert für Anwendungen der Pharmakologie, Toxikologie und Grundlagenforschung hohes Potenzial, evoziert jedoch eine multidisziplinäre Aufgabe. Es werden zum einen *in vitro* Systeme benötigt, die den Ansprüchen eines physiologisch repräsentativen Abbilds eines Organismus genügen. Zum anderen sind technische Systeme erforderlich, die Zellreaktionen qualitativ und quantitativ verwertbar machen.

Die Spezifität und Relevanz der physiologischen Information eines Biosensors sind durch die *in vitro* Komponente bestimmt. In dieser Arbeit wurden Sphäroide als Modellsystem herangezogen, da diese – in Übereinstimmung mit dem Gewebe in einem Organismus – in einer dreidimensionalen Architektur organisiert sind. Ausgehend von dissoziierten Neuronen und Kardiomyozyten erfolgte die Reaggregation des Netzwerks durch orbitale Rotation in Suspension. Entsprechend war bei der Organisation zu dreidimensionalen Strukturen die Adhäsion auf sowie die Interaktion mit artifiziellen Substraten nicht gegeben. Die Fähigkeit isolierter Zellen zur Selbstorganisation zeigte sich durch die Reetablierung funktionaler Attribute, wie der intrinsischen Generierung von Aktionspotenzialen durch Schrittmacherzellen und der Signalpropagation bzw. -transduktion im Netzwerk über chemische und elektrische Synapsen. Diese Prozesse der interzellulären Kommunikation sind grundsätzliche Prämisse und wesentliches Merkmal funktionalen elektrogenen Gewebes: Sowohl die synchronen Kontraktionen des Herzens als auch die Informationsverarbeitung in Nervensystemen basieren auf elektrischen Prinzipien und können *in vivo* dreidimensional erfolgen. Daher können als Monolayer kultivierte *in vitro* Systeme, deren Ausbildung von Axone, Dendriten oder Synapsen nicht in einer dreidimensionalen Architektur erfolgt, die zelluläre Kommunikation *in situ* nur bedingt nachbilden. In vergleichenden Experimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass Sphäroide gegenüber Monolayerkulturen das elektrophysiologisch und morphologisch stabilere Modell darstellen.

Mit der MEA Technologie wurde eine etablierte Methode zur markerfreien Untersuchung der Sphäroide gewählt. Durch multiparallele extrazelluläre Ableitung und präziser Diskretisierung der Aktionspotenziale erlaubte der Biosensor eine detaillierte Analyse zeitlicher und räumlicher Aktivitätsmuster der dreidimensionalen Netzwerke. Die Untersuchung transien-ter Potenzialänderungen erfolgte indirekt durch Detektion der Ladungsträgerverschiebun-gen im intra- bzw. extrazellulären Raum. Im Gegensatz zu konventionellen intrazellulären Verfahren war damit eine eindeutig nicht-invasive und langzeitfähige Messmethodik sowohl für Neuronen als auch Kardiomyozyten gegeben. Die Analyse der Messdaten bedingte eine differenzierte Betrachtung. Extrazellulär abgeleitete Signale von neuronalen Zellen waren durch scheinbar stochastische Muster aus Spikes und Bursts geprägt, die mit konventionel-len, thresholdbasierten Verfahren nicht quantifiziert werden konnten. Auf Basis elaborierter Verfahren wurde daher ein neuer Algorithmus zur robusten Klassifizierung und Interpre-tation neuronaler Sphäroidsignale entwickelt und verifiziert. Bei Sphäroiden aus Kardiomyozyten waren regelmäßige, netzwerksynchrone Feldpotenziale zu beobachten, die durch Bewertung der Amplitude vom Rauschen diskriminiert werden konnten. Zur Bewertung der Signalmuster konnten mehrere Parameter hinsichtlich Kontraktionsfrequenz, Rhyth-mik, Synchronizität und Potenzialverlauf definiert und in den Versuchen rechnergestützt ausgewertet werden.

Die experimentelle Untersuchung pharmakologischer Wirkstoffe auf funktionaler Ebene stellt eine konstitutive Komponente der Arzneimittelentwicklung dar. In einem iterativen Prozess stehen dabei große Substanzbibliotheken dem Anspruch valider, wirtschaftlicher und ethisch vertretbarer Analysemethoden gegenüber. In dieser Arbeit konnte gezeigt wer-den, dass der Biosensor aus Sphäroid und MEA Wirkmechanismen auf funktionaler Ebene bewertet und damit wertvolle Informationen bei der sensitiven Klassifizierung neuro- und kardioaktiver Additive liefert. Die physiologische Information setzte sich aus einer Reihe spezifischer Merkmale des Signalmusters zusammen, deren Relevanz durch geeignete Re-ferenzsubstanzen bestätigt wurde. Im industriellen Maßstab könnte das hybride System aus MEA und Sphäroid somit einen wichtigen Beitrag zur Ermittlung pharmakologisch-toxikologischer Profile der Wirkstoffkandidaten vor dem Übergang zur klinischen Phase leisten.

Durch Implementierung des Biosensors in eine Stripline war eine qualifizierte Umgebung zur Untersuchung biologischer Primärreaktionen auf elektromagnetische Felder gegeben. Den Ansprüchen hinsichtlich Temperaturstabilität und Feldhomogenität entsprechend wurde die Versuchsumgebung zur Exposition kardialer Sphäroide mit schwachen Wechselfel-dern, deren Frequenzparameter analog des Mobilfunks determiniert waren, herangezogen. Die Dosimetrie konnte durch Finite Elemente Simulationen präzise charakterisiert und ge-mäß relevanter Feldstärken respektive SAR-Werte eingestellt werden. Einen Hinweis auf die Existenz signifikanter, athermischer Wirkmechanismen konnte in den Experimenten nicht identifiziert werden.

In den Expositionsexperimenten erfolgte entsprechend der Untersuchungen pharmakologischer Wirkstoffe eine Betrachtung direkter bzw. akuter Zellreaktionen. Daneben wäre die Adressierung latenter Effekte durch chemische und physikalische Stimulation in Langzeitstudien realisierbar. Sphäroide stellen ein stabiles, über mehrere Wochen kultivierbares System dar, das durch Kopplung an Mikroelektroden Arrays nicht-invasiv abgeleitet werden kann. Die Versuchsumgebung könnte in diesem Zusammenhang beispielsweise durch Implementierung des Aufbaus in einen Inkubator angepasst werden. Weiterhin könnten mikrofluidische Komponenten integriert und somit automatisierbare Lab-on-Chip Systeme zur Analyse großer Substanzbibliotheken im High-Throughput-Screening aufgebaut werden. Eine Ausweitung des physiologischen Informationsumfangs wäre durch Kombination weiterer mikro- bzw. nanoskaliger Sensoren auf dem Chip möglich. Diese multiparallele Applikation differenzierter Wandlerprinzipien könnte in den Experimenten auch Aussagen über Metabolismus oder Morphologie der Sphäroide zulassen.

Bei der Untersuchung elektrogenen Gewebes stehen jedoch primär elektrophysiologische Fragestellungen im Fokus, da die Mechanismen zellulärer Erregbarkeit für ein Verständnis von Pathogenese sowie für die Entwicklung und Validierung neuer therapeutischer Ansätze von besonderer Bedeutung sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Biosensor diese Fragestellungen auf funktionaler Ebene adressiert und systematisch zwischen biochemischen Verfahren und Tierversuchen einen wichtigen Beitrag zur Klassifizierung und physiologischen Beschreibung chemischer bzw. physikalischer Faktoren leisten kann.

Literaturverzeichnis

- Abbate, M., Tink, G., & Zanforlin, L. (1996). Evaluation of pulsed microwave influence on isolated hearts. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 44(10), 1935–1941.
- Abbott, A. (2003). Cell culture: biology's new dimension. *Nature*, 424(6951), 870–872.
- Akins, R. E., Rockwood, D., Robinson, K. G., Sandusky, D., Rabolt, J., & Pizarro, C. (2010). Three-dimensional culture alters primary cardiac cell phenotype. *Tissue Engineering Part A*, 16(2), 629–641.
- Alger, B. & Möhler, H. (2001). *Pharmacology of Gaba and Glycine Neurotransmission*. Springer.
- Antonopoulos, A. (2003). *Einfluß elektromagnetischer Felder auf menschliche Lymphozyten*. Dissertation, Universität Duisburg-Essen.
- Aravanis, A. M., DeBusschere, B. D., Chruscinski, A. J., Gilchrist, K. H., Kobilka, B. K., & Kovacs, G. T. (2001). A genetically engineered cell-based biosensor for functional classification of agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(7-8), 571–577.
- Arndt, S., Seebach, J., Psathaki, K., Galla, H.-J., & Wegener, J. (2004). Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6), 583–594.
- Arnold, F., Hofmann, F., Bengtson, C., Wittmann, M., Vanhoutte, P., & Bading, H. (2005). Microelectrode array recordings of cultured hippocampal networks reveal a simple model for transcription and protein synthesis-dependent plasticity. *The Journal of Physiology*, 564(1), 3–19.
- Bajaj, P., Tang, X., Saif, T. A., & Bashir, R. (2010). Stiffness of the substrate influences the phenotype of embryonic chicken cardiac myocytes. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(4), 1261–1269.
- Bakker, R., Schubert, D., Levels, K., Bezgin, G., Bojak, I., & Kötter, R. (2009). Classification of cortical microcircuits based on micro-electrode-array data from slices of rat barrel cortex. *Neural Networks*, 22(8), 1159–1168.

- Bartholomä, P. (2005). *Entwicklung, Etablierung und Modifikation von 3-dimensionalen Gewebekulturen als In-vitro-Modelle für die biomedizinische Forschung*. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Bartholomä, P., Gorjup, E., Monz, D., Reininger-Mack, A., Thielecke, H., & Robitzki, A. (2005). Three-dimensional in vitro reagggregates of embryonic cardiomyocytes: a potential model system for monitoring effects of bioactive agents. *Journal of Biomolecular Screening*, 10(8), 814–822.
- Bawin, S. M., Kaczmarek, L. K., & Adey, W. R. (1975). Effects of modulated vhf fields on the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 247, 74–81.
- Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 451–465.
- Behravesch, E., Emami, K., Wu, H., & Gonda, S. (2005). Comparison of genotoxic damage in monolayer cell cultures and three-dimensional tissue-like cell assemblies. *Advances in Space Research*, 35(2), 260–267.
- Bestel, R. (2010). *Signalverarbeitung für zellbasierte Biosensoren*. Bachelorthesis, Hochschule Aschaffenburg.
- Bestel, R. (2011). *Implementierung elaborierter Algorithmen zur neuronalen Signalverarbeitung*. Masterthesis, Hochschule Aschaffenburg.
- Bestel, R., Daus, A. W., & Thielemann, C. (2012). A novel automated spike sorting algorithm with adaptable feature extraction. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(1), 168–178.
- Bhadriraju, K. & Chen, C. S. (2002). Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discovery Today*, 7(11), 612–620.
- Biel, M., Wahl-Schott, C., Michalakis, S., & Zong, X. (2009). Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiological Reviews*, 89(3), 847–885.
- Birgersdotter, A., Sandberg, R., & Ernberg, I. (2005). Gene expression perturbation in vitro – a growing case for three-dimensional (3d) culture systems. *Seminars in Cancer Biology*, 15(5), 405–412.
- Blackman, C. F., Benane, S. G., Elder, J. A., House, D. E., Lampe, J. A., & Faulk, J. M. (1980). Induction of calcium-ion efflux from brain tissue by radiofrequency radiation: effect of sample number and modulation frequency on the power-density window. *Bioelectromagnetics*, 1(1), 35–43.
- Borkholder, D. A. (1998). *Cell based biosensors using microelectrodes*. Dissertation, Stanford University.

- Bousse, L. (1996). Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators B*, 34, 270–275.
- Bove, M., Grattarola, M., Martinoia, S., & Verreschi, G. (1995). Interfacing cultured neurons to planar substrate microelectrodes: characterization of the neuron-to-microelectrode junction. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38(2), 255–265.
- Brady, S., Colamn, D. R., & Brophy, P. (2009). *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience*, chapter 2: Subcellular Organization of the Nervous System: Organelles and their Functions, (pp. 19–48). Academic Press/ Elsevier.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., & Price, P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in b27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research*, 35(5), 567–576.
- Brink, P., Cronin, K., & Ramanan, S. (1996). Gap junctions in excitable cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 28(4), 351–358.
- Brito-Martins, M., Harding, S. E., & Ali, N. N. (2008). beta(1)- and beta(2)-adrenoceptor responses in cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells: comparison with failing and non-failing adult human heart. *British Journal of Pharmacology*, 153(4), 751–759.
- Bursac, N., Papadaki, M., White, J. A., Eisenberg, S. R., Vunjak-Novakovic, G., & Freed, L. E. (2003). Cultivation in rotating bioreactors promotes maintenance of cardiac myocyte electrophysiology and molecular properties. *Tissue Engineering*, 9(6), 1243–1253.
- Bussek, A., Wettwer, E., Christ, T., Lohmann, H., Camelliti, P., & Ravens, U. (2009). Tissue slices from adult mammalian hearts as a model for pharmacological drug testing. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 24(5-6), 527–536.
- Byfield, M. P. & Abuknesha, R. A. (1994). Biochemical aspects of biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 9(4-5), 373–400.
- Caddemi, A., Tamburello, C. C., Zanforlin, L., & Torregrossa, M. V. (1986). Microwave effects on isolated chick embryo hearts. *Bioelectromagnetics*, 7(4), 359–367.
- Chang, Y., Wang, R., Barot, S., & Weiss, D. (1996). Stoichiometry of a recombinant gabaa receptor. *The Journal of Neuroscience*, 16(17), 5415–5424.
- Chiappalone, M., Novellino, A., Vajda, I., Vato, A., Martinoia, S., & van Pelt, J. (2005). Burst detection algorithms for the analysis of spatio-temporal patterns in cortical networks of neurons. *Neurocomputing*, 65, 653–662.
- Chiappalone, M., Vato, A., Tedesco, M., Marcoli, M., Davide, F., & Martinoia, S. (2003). Networks of neurons coupled to microelectrode arrays: a neuronal sensory system for pharmacological applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(5), 627–634.

- Clay, J. R., Kristof, A. S., Shenasa, J., Brochu, R. M., & Shrier, A. (1994). A review of the effects of three cardioactive agents on the electrical activity from embryonic chick heart cell aggregates: Ttx, ach, and e-4031. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 62(3), 185–202.
- Cocatre-Zilgien, J. & Delcomyn, F. (1992). Identification of bursts in spike trains. *Journal of Neuroscience Methods*, 41(1), 19–30.
- Connolly, P., Clark, P., Curtis, A. S., Dow, J. A., & Wilkinson, C. D. (1990). An extracellular microelectrode array for monitoring electrogenic cells in culture. *Biosensors and Bioelectronics*, 5(3), 223–234.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., & Yamada, K. M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294(5547), 1708–1712.
- Czuczwar, S. & Patsalos, P. (2001). The new generation of gaba enhancers: potential in the treatment of epilepsy. *CNS drugs*, 15(5), 339–350.
- D’Andrea, J. A., Chou, C. K., Johnston, S. A., & Adair, E. R. (2003). Microwave effects on the nervous system. *Bioelectromagnetics*, Suppl 6, S107–S147.
- Daus, A. W., Bestel, R., & Thielemann, C. (2011a). Spike detection, refinement and interpretation of recordings in three-dimensional in vitro systems. In *Proceedings of RMSC 2011* Beijing, China.
- Daus, A. W., Goldhammer, M., Bochtler, U., & Thielemann, C. (2010a). A new approach to investigate long-term effects of rf radiation on cells. In *Progress in Electromagnetics Research Symposium (PIERS)* Cambridge, USA.
- Daus, A. W., Goldhammer, M., Layer, P. G., & Thielemann, C. (2011b). Electromagnetic exposure of scaffold-free three-dimensional cell culture systems. *Bioelectromagnetics*, 32(5), 351–359.
- Daus, A. W., Goldhammer, M., & Thielemann, C. (2009). Novel 3d cell culture systems for electromagnetic exposure studies. In *BioEM 2009 Abstract Collection* (pp. 110–111). Davos, Switzerland.
- Daus, A. W., Goldhammer, M., & Thielemann, C. (2010b). Using three-dimensional cell culture systems on microelectrode arrays for biosensing applications. In *Proceedings MEA Meeting 2010* (pp. 314–315). Reutlingen, Germany.
- Daus, A. W., Layer, P. G., & Thielemann, C. (2012). A spheroid-based biosensor for the label-free detection of drug-induced field potential alterations. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 165(1), 53–58.

- Daus, A. W. & Thielemann, C. (2010). Spheroids on microelectrode arrays: A highly sensitive system for biosensing applications. In *European Journal of Cell Biology*, volume 89S1 (pp. 67–68). Regensburg, Germany.
- DeBusschere, B. D. & Kovacs, G. T. (2001). Portable cell-based biosensor system using integrated cmos cell-cartridges. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(7-8), 543–556.
- DeHaan, R. L. & Sachs, H. G. (1972). Cell coupling in developing systems: the heart-cell paradigm. *Current Topics in Developmental Biology*, 7, 193–228.
- Dempster, A., Laird, N., & Rubin, D. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the em algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society*, 39(1), 1–38.
- Demtröder, W. (2008). *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*. Springer.
- DiFrancesco, D. (1981). A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf purkinje fibres. *The Journal of Physiology*, 314(1), 377–393.
- Discher, D. E., Janmey, P., & Wang, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751), 1139–1143.
- Dunlop, J., Bowlby, M., Peri, R., Vasilyev, D., & Arias, R. (2008). High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(4), 358–368.
- Dössel, O. (1999). *Bildgebende Verfahren in Der Medizin: Von Der Technik Zur Medizinischen Anwendung*. Springer.
- Egert, U., Banach, K., & Meyer, T. (2006). *Advances in network electrophysiology using multi-electrode arrays*, chapter 11: Analysis of cardiac myocyte activity dynamics with micro-electrode arrays, (pp. 274–190). Springer.
- Egert, U., Heck, D., & Aertsen, A. (2002a). Two-dimensional monitoring of spiking networks in acute brain slices. *Experimental Brain Research*, 142(2), 268–274.
- Egert, U., Knott, T., Schwarz, C., Nawrot, M., Brandt, A., Rotter, S., & Diesmann, M. (2002b). Mea-tools: an open source toolbox for the analysis of multi-electrode data with matlab. *Journal of Neuroscience Methods*, 117(1), 33–42.
- Egert, U. & Meyer, T. (2005). *Practical Methods in Cardiovascular Research*, chapter 3.10: Heart on a Chip – Extracellular Multielectrode Recordings from Cardiac Myocytes in Vitro, (pp. 432–453). Springer.
- 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), 229–242.

- Elsdale, T. & Bard, J. (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *The Journal of Cell Biology*, 54(3), 626–637.
- EMA (1997). Points to consider on the assessment of the potential for qt interval prolongation by non-cardiovascular medicinal products. European Medicines Agency.
- EMA (2011). *EPAR summary for the public - Famprya*. Technical report, European Medicines Agency.
- EN50361 (2002). Basic standard for the measurement of specific absorption rate related to human exposure to electromagnetic fields from mobile phones (300mhz – 3ghz). EN50361, FNA EMV.
- Engler, A. J., Carag-Krieger, C., Johnson, C. P., Raab, M., Tang, H.-Y., Speicher, D. W., Sanger, J. W., Sanger, J. M., & Discher, D. E. (2008). Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 22), 3794–3802.
- Estler, C. & Schmidt, H. (2007). *Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis*. Schattauer.
- Evans, W. & Martin, P. (2002). Gap junctions: structure and function (review). *Molecular Membrane Biology*, 19(2), 121–136.
- Fejtl, M., Stett, A., Nisch, W., Boven, K.-H., & Möller, A. (2006). *Advances in Network Electrophysiology*, chapter 2: On micro-electrode array revival: its development, sophistication of recording, and stimulation, (pp. 24–37). Springer.
- Fernandez-Chacon, R., Königstorfer, A., Gerber, S., García, J., Matos, M., Stevens, C., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C., & Südhof, T. (2001). Synaptotagmin i functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 410(6824), 41–49.
- Fiederling, A. C. (2010). *Analyse der Rolle von E-Cadherin für die Funktion GABAerger Synapsen mit Hilfe eines konditionalen Knockouts in kultivierten kortikalen Neuronen*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Flanagan, L., Ju, Y., Marg, B., Osterfield, M., & Janmey, P. (2002). Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport*, 13(18), 2411.
- Fleischer, W. (2006). *Entwicklung von striatalen Neuronen zu funktionellen Netzwerken in vitro*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Foster, K. R. (2003). Mechanisms of interaction of extremely low frequency electric fields and biological systems. *Radiation Protection Dosimetry*, 106(4), 301–310.
- Fox, R. & Atterwill, C. (1999). *The neuron in tissue culture*, chapter 21: Use of spheroid reaggregate cultures for in vitro study of brain pathogenesis, (pp. 295–309). Wiley.

- Freissmuth, M., Böhm, S., & Offermanns, S. (2012). *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Springer.
- Frese, J. (2006). *Molekulare Interaktion von Lidocain mit dem isolierten tetrodotoxinresistenten Natriumkanal vom Typ NaV1.8 exprimiert in humanen embryonalen Nierenstammzellen HEK293*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Frey, H. & Althaus, F. (2009). *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke.
- Friedl, P., Zänker, K. S., & Bröcker, E. B. (1998). Cell migration strategies in 3-d extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microscopy Research and Technique*, 43(5), 369–378.
- Fromherz, P., Offenhäusser, A., Vetter, T., & Weis, J. (1991). A neuron-silicon junction: a retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science*, 252(5010), 1290–1293.
- Gaber, M., Halim, N., & Khalil, W. (2005). Effect of microwave radiation on the biophysical properties of liposomes. *Bioelectromagnetics*, 26(3), 194–200.
- Galarreta, M. & Hestrin, S. (2001). Electrical synapses between gaba-releasing interneurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6), 425–433.
- Gimsa, U. (2006). *Effekte hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf zellulärer Ebene: Eine Literaturstudie*. Shaker.
- Glaser, R. (2009). Biophysikalische primärreaktionen hochfrequenter elektromagnetischer felder. In *Gepulste Felder*. Forschungsgemeinschaft Funk.
- Glaser, R. & Haberland, L. (2009). Welche demodulationsmechanismen hochfrequenter felder in biologischen systemen sind bekannt? In *Gepulste Felder*. Forschungsgemeinschaft Funk.
- Gleixner, R. J. (2004). *Fluoreszenzspektroskopische Messung des spezifischen Elektrolytwiderstands in der Adhäsionsregion des Neuron-Silizium-Kontakts*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Golan, D., Tashjian, A., Armstrong, E., & Armstrong, A. (2011). *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. Wolters Kluwer Health.
- Goldhammer, M. (2008). *Messplatz zur elektromagnetischen Befeldung von Zellkulturen*. Diplomarbeit, Hochschule Aschaffenburg.
- Goldhammer, M. (2009). *Elektromagnetische Befeldung neuronaler Zellen*. Masterthesis, Hochschule Aschaffenburg.

- Goldhammer, M., Daus, A. W., Thielemann, C., & Bochtler, U. (2009). Flexible measurement setup for electromagnetic exposition of biological samples. In *BioEM 2009 Abstract Collection Davos, Switzerland*.
- Goldman, D. E. (1943). Potential, impedance, and rectification in membranes. *The Journal of General Physiology*, 27(1), 37–60.
- Goodman, A. D., Brown, T. R., Krupp, L. B., Schapiro, R. T., Schwid, S. R., Cohen, R., Marinucci, L. N., Blight, A. R., & Investigators, F. M.-F. (2009). Sustained-release oral fampridine in multiple sclerosis: a randomised, double-blind, controlled trial. *The Lancet*, 373(9665), 732–738.
- Graefe, K., Bönisch, H., & Lutz, W. (2011). *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme.
- Grattarola, M., Chiappalone, M., Davide, F., Martinoia, S., Tedesco, M., Rosso, N., & Vato, A. (2001). Burst analysis of chemically stimulated spinal cord neuronal networks cultured on microelectrode arrays. In *Proceedings of the 23rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, volume 1 (pp. 729–732).
- Green, A. C., Scott, I. R., Gwyther, R. J., Peyman, A., Chadwick, P., Chen, X., Alfadhil, Y., & Tattersall, J. E. H. (2005). An investigation of the effects of tetra rf fields on intracellular calcium in neurones and cardiac myocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 81(12), 869–885.
- Gross, G. W., Rhoades, B. K., Azzazy, H. M., & Wu, M. C. (1995). The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(6-7), 553–567.
- Gründler, P. (2004). *Chemische Sensoren: Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure*. Springer.
- Hamburger, V. & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88(4), 49–92.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 391(2), 85–100.
- Hentze, M., Kulozik, A., Bartram, C., & Hagemeyer, C. (2000). *Molekulare Medizin: Grundlagen, Pathomechanismen, Klinik*. De Gruyter.
- Herdegen, T. (2010). *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme.

- Hescheler, J., Fleischmann, B., Lentini, S., Maltsev, V., Rohwedel, J., Wobus, A., & Ad-dicks, K. (1997). Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovascular Research*, 36(2), 149–162.
- Heuschkel, M., Wirth, C., Steidl, E., & Buisson, B. (2006). *Advances in Network Electro-physiology*, chapter 4: Development of 3-D Multi-Electrode Arrays for Use with Acute Tissue Slices, (pp. 69–111). Springer.
- Heynick, L. N., Johnston, S. A., & Mason, P. A. (2003). Radio frequency electromagnetic fields: cancer, mutagenesis, and genotoxicity. *Bioelectromagnetics*, Suppl 6, S74–100.
- Hierlemann, A., Frey, U., Hafizovic, S., & Heer, F. (2011). Growing cells atop microelectronic chips: Interfacing electrogenic cells in vitro with cmos-based microelectrode arrays. *Proceedings of the IEEE*, 99(2), 1–33.
- Hindie, M., Vayssade, M., Dufresne, M., Queant, S., Warocquier-Clérout, R., Legeay, G., Vigneron, P., Olivier, V., Duval, J., & Nagel, M. (2006). Interactions of b16f10 melanoma cells aggregated on a cellulose substrate. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(1), 96–104.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952a). The components of membrane conductance in the giant axon of loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4), 473–496.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4), 449–472.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4), 497–506.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952d). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4), 500–544.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., & Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4), 424–448.
- Hodgkin, A. L. & Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *The Journal of Physiology*, 108(1), 37–77.
- Hoffman, R. (1991). Three-dimensional histoculture: origins and applications in cancer research. *Cancer Cells*, 3(3), 86–92.
- Holtfreter, J. (1944). A study of the mechanics of gastrulation. *Journal of Experimental Zoology*, 95(2), 171–212.
- Horton, P., Nicol, A., Kendrick, K., & Feng, J. (2007). Spike sorting based upon machine learning algorithms (soma). *Journal of Neuroscience Methods*, 160(1), 52–68.

- Huber, P. (1981). *Robust Statistics*. Wiley.
- Hulata, E., Segev, R., & Ben-Jacob, E. (2002). A method for spike sorting and detection based on wavelet packets and shannon's mutual information. *Journal of Neuroscience Methods*, 117(1), 1–12.
- Huppelsberg, J. & Walter, K. (2011). *Kurzlehrbuch Physiologie*. Thieme.
- Hänsel, R. & Sticher, O. (2009). *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Springer.
- ICH (2005a). E14 clinical evaluation of qt/qt_c interval prolongation and proarrhythmic potential for non-antiarrhythmic drugs. International Conference on Harmonisation.
- ICH (2005b). S7b: The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (qt interval prolongation) by human pharmaceuticals. International Conference on Harmonisation.
- ICNIRP (1998). Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 ghz) – international commission on non-ionizing radiation protection. *Health Physics*, 74(4), 494–522.
- Igelmund, P., Fleischmann, B. K., Fischer, I. R., Soest, J., Gryshchenko, O., Böhm-Pinger, M. M., Sauer, H., Liu, Q., & Hescheler, J. (1999). Action potential propagation failures in long-term recordings from embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in tissue culture. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 437(5), 669–679.
- Ingebrandt, S., Yeung, C. K., Krause, M., & Offenhäusser, A. (2001). Cardiomyocyte-transistor-hybrids for sensor application. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(7-8), 565–570.
- Irons, H. R., Cullen, D. K., Shapiro, N. P., Lambert, N. A., Lee, R. H., & Laplaca, M. C. (2008). Three-dimensional neural constructs: a novel platform for neurophysiological investigation. *Journal of Neural Engineering*, 5(3), 333–341.
- Izhikevich, E. M., Desai, N. S., Walcott, E. C., & Hoppensteadt, F. C. (2003). Bursts as a unit of neural information: selective communication via resonance. *Trends in Neurosciences*, 26(3), 161–167.
- Jahn, R. & Scheller, R. (2006). Snares – engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 631–643.
- Janmey, P. A., Winer, J. P., Murray, M. E., & Wen, Q. (2009). The hard life of soft cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(8), 597–605.
- Jiao, Z., Jesús, V. R. D., Iravanian, S., Campbell, D. P., Xu, J., Vitali, J. A., Banach, K., Fahrenbach, J., & Dudley, S. C. (2006). A possible mechanism of halocarbon-induced

- cardiac sensitization arrhythmias. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41(4), 698–705.
- 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), 331–350.
- Jolliffe, I. (2002). *Principal component analysis*, volume 2. Wiley Online Library.
- Jones, G. E. (2010). Moving into the third dimension. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 231.
- Jones, N., Hill, A., Smith, I., Bevan, S., Williams, C., Whalley, B., & Stephens, G. (2010). Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(2), 569–577.
- Jungblut, M. (2006). *Detektion neuroaktiver Substanzen durch Modifikation des Aktivitätsmusters neokortikaler Netzwerke auf Multielektrodenarrays - Charakterisierung und Optimierung eines neuronalen Biosensors*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Jungblut, M., Knoll, W., Thielemann, C., & Pottek, M. (2009). Triangular neuronal networks on microelectrode arrays: an approach to improve the properties of low-density networks for extracellular recording. *Biomedical Microdevices*, 11(6), 1269–1278.
- Juutilainen, J., Höytö, A., Kumlin, T., & Naarala, J. (2011). Review of possible modulation-dependent biological effects of radiofrequency fields. *Bioelectromagnetics*, 32(7), 511–534.
- Kaiser, J. (1990). On a simple algorithm to calculate the energy of a signal. In *IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing* (pp. 381–384).
- Kandel, E., Schwartz, J., & Jessell, T. (2000). *Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag.
- 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), 513–525.
- Keller, P., Pampaloni, F., & Stelzer, E. (2006). Life sciences require the third dimension. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(1), 117–124.
- Kelm, J., Timmins, N., Brown, C., Fussenegger, M., & Nielsen, L. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2), 173–180.

- Keusgen, M. (2002). Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften*, 89(10), 433–444.
- Kim, K. & Kim, S. (2000). Neural spike sorting under nearly 0-db signal-to-noise ratio using nonlinear energy operator and artificial neural-network classifier. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 47(10), 1406–1411.
- Kingston, S. T., Xu, J., Sales, K. M., Speight, S. J., Atterwill, C. K., & Purcell, W. M. (1997). Optimisation of a serum-free medium for the culture of hen embryo brain spheroid cultures. *Human and Experimental Toxicology*, 16(7), 381.
- Kistner, K. (2009). *Schmerzhafte Anästhesie – Wirkstoffe reagieren auch mit TRPV1- und TRPA1-Rezeptoren*. Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- Kloss, D., Fischer, M., Rothermel, A., Simon, J., & Robitzki, A. (2008a). Drug testing on 3d in vitro tissues trapped on a microcavity chip. *Lab on a Chip*, 8(6), 879–884.
- Kloss, D., Kurz, R., Jahnke, H. G., Fischer, M., Rothermel, A., Anderegg, U., Simon, J. C., & Robitzki, A. A. (2008b). Microcavity array (mca)-based biosensor chip for functional drug screening of 3d tissue models. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(10), 1473–1480.
- Koch, H. J. (2004). 4-aminopyridine and 3,4-diaminopyridine: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic use. *European Journal of Geriatrics*, 6(4), 2004–204.
- Koester, P., Sakowski, J., Baumann, W., Glock, H.-W., & Gimsa, J. (2007). A new exposure system for the in vitro detection of ghz field effects on neuronal networks. *Bioelectrochemistry*, 70(1), 104–114.
- Kole, M. H. P., Ilschner, S. U., Kampa, B. M., Williams, S. R., Ruben, P. C., & Stuart, G. J. (2008). Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nature Neuroscience*, 11(2), 178–186.
- Krahe, R. & Gabbiani, F. (2004). Burst firing in sensory systems. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(1), 13–23.
- Kretz, F. & Teufel, F. (2006). *Anästhesie und Intensivmedizin*. Springer.
- Kujawski, P. (2005). *Klassifikation neuronaler Netzwerkaktivität kortikaler Kulturen auf Mikroelektrodenarrays mithilfe von Hidden-Markov-Modellen*. Masterthesis, Fachhochschule Darmstadt.
- Kundi, M. (2009). The controversy about a possible relationship between mobile phone use and cancer. *Environmental Health Perspectives*, 117(3), 316.
- Kunz-Schughart, L. A., Kreutz, M., & Knuechel, R. (1998). Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *International Journal of Experimental Pathology*, 79(1), 1–23.

- Lampe, P. & Lau, A. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(7), 1171–1186.
- Landisman, C., Long, M., Beierlein, M., Deans, M., Paul, D., & Connors, B. (2002). Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 1002–1009.
- Landry, J., Bernier, D., Ouellet, C., Goyette, R., & Marceau, N. (1985). Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *The Journal of Cell Biology*, 101(3), 914–923.
- Layer, P. G., Robitzki, A., Rothermel, A., & Willbold, E. (2002). Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering. *Trends in Neurosciences*, 25(3), 131–134.
- Layer, P. G., Rothermel, A., & Willbold, E. (2001). From stem cells towards neural layers: a lesson from re-aggregated embryonic retinal cells. *Neuroreport*, 12(7), A39–A46.
- Layer, P. G., Weikert, T., & Willbold, E. (1992). Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and by butyrylcholinesterase activity. *Cell and Tissue Research*, 268(3), 409–418.
- Layer, P. G. & Willbold, E. (1993). Histogenesis of the avian retina in reaggregation culture: from dissociated cells to laminar neuronal networks. *International Review of Cytology*, 146, 1–47.
- Lee, J., Cuddihy, M., & Kotov, N. (2008). Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(1), 61–86.
- Lehmann, M., Baumann, W., Brischwein, M., Gahle, H., Freund, I., Ehret, R., Drechsler, S., Palzer, H., Kleintges, M., Sieben, U., & Wolf, B. (2001). Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single cmos isfet. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(3), 195–203.
- Leszczynski, D. & Xu, Z. (2010). Mobile phone radiation health risk controversy: the reliability and sufficiency of science behind the safety standards. *Health Research Policy and Systems*, 8(q), 1–10.
- Lin, R.-Z. & Chang, H.-Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, 3(9-10), 1172–1184.
- Linz, K. W., von Westphalen, C., Streckert, J., Hansen, V., & Meyer, R. (1999). Membrane potential and currents of isolated heart muscle cells exposed to pulsed radio frequency fields. *Bioelectromagnetics*, 20(8), 497–511.
- Lisman, J. E. (1997). Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends in Neurosciences*, 20(1), 38–43.

- Liu, Q., Huang, H., Cai, H., Xu, Y., Li, Y., Li, R., & Wang, P. (2007). Embryonic stem cells as a novel cell source of cell-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(6), 810–815.
- Lüllmann, H., Mohr, K., & Hein, L. (2010). *Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme.
- Magee, J. C. (2000). Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), 181–190.
- Mapelli, J. & D'Angelo, E. (2007). The spatial organization of long-term synaptic plasticity at the input stage of cerebellum. *The Journal of Neuroscience*, 27(6), 1285–1296.
- Maragos, P., Kaiser, J., & Quatieri, T. (1993). On amplitude and frequency demodulation using energy operators. *IEEE Transactions on Signal Processing*, 41(4), 1532–1550.
- Martinoia, S., Bonzano, L., Chiappalone, M., Tedesco, M., Marcoli, M., & Maura, G. (2005). In vitro cortical neuronal networks as a new high-sensitive system for biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(10), 2071–2078.
- Martinoia, S., Massobrio, P., Bove, M., & Massobrio, G. (2004). Cultured neurons coupled to microelectrode arrays: circuit models, simulations and experimental data. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 51(5), 859–864.
- McCormick, D. A. & Contreras, D. (2001). On the cellular and network bases of epileptic seizures. *Annual Review of Physiology*, 63, 815–846.
- McDonald, T. F., Sachs, H. G., & DeHaan, R. L. (1972). Development of sensitivity to tetrodotoxin in beating chick embryo hearts, single cells, and aggregates. *Science*, 176(40), 1248–1250.
- Mennerick, S., Chisari, M., Shu, H.-J., Taylor, A., Vasek, M., Eisenman, L. N., & Zorumski, C. F. (2010). Diverse voltage-sensitive dyes modulate gabaa receptor function. *The Journal of Neuroscience*, 30(8), 2871–2879.
- Merla, C., Ticaud, N., Arnaud-Cormos, D., Veyret, B., & Leveque, P. (2011). Real-time rf exposure setup based on a multiple electrode array (mea) for electrophysiological recording of neuronal networks. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 59(3), 755–762.
- Meyer, T., Boven, K.-H., Günther, E., & Fejtl, M. (2004a). Micro-electrode arrays in cardiac safety pharmacology: a novel tool to study qt interval prolongation. *Drug Safety*, 27(11), 763–772.
- Meyer, T., Leisgen, C., Gonser, B., & Günther, E. (2004b). Qt-screen: high-throughput cardiac safety pharmacology by extracellular electrophysiology on primary cardiac myocytes. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(5), 507–514.

- Meyer, T., Sartipy, P., Blind, F., Leisgen, C., & Guenther, E. (2007). New cell models and assays in cardiac safety profiling. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 3(4), 507–517.
- Michels, G. & Moss, S. (2007). Gabaa receptors: properties and trafficking. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(1), 3–14.
- Morefield, S., Keefer, E., Chapman, K., & Gross, G. (2000). Drug evaluations using neuronal networks cultured on microelectrode arrays. *Biosensors and Bioelectronics*, 15(7), 383–396.
- Moscona, A. (1952). Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Experimental Cell Research*, 3(3), 535–539.
- Moscona, A. (1961). Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. a quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Experimental Cell Research*, 22, 455–475.
- Moyes, C. & Schulte, P. (2007). *Tierphysiologie*. Pearson Studium.
- Mueller-Klieser, W. (1997). Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal of Physiology*, 273(4 Pt 1), C1109–C1123.
- Mukhopadhyay, S. & Ray, G. (1998). A new interpretation of nonlinear energy operator and its efficacy in spike detection. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 45(2), 180–187.
- Möbs, M. (2006). *Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus zu Hepatozyten - Etablierung eines in vitro-Systems zur Analyse des Differenzierungsprozesses auf der Basis transgener Reporterzelllinien*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Müller, W. & Hassel, M. (2005). *Entwicklungsbiologie*. Springer.
- Natarajan, A., Molnar, P., Sieverdes, K., Jamshidi, A., & Hickman, J. J. (2006). Micro-electrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity. *Toxicology in Vitro*, 20(3), 375–381.
- Neher, E. & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), 799–802.
- Neumann, T., Ziegler, C., & Blau, A. (2008). Multielectrode array recordings reveal physiological diversity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the chick embryo. *Brain Research*, 1207, 120–127.
- Nick, C., Daus, A. W., Bestel, R., Goldhammer, M., Steger, F., & Thielemann, C. (2013). Drcell – a software tool for the analysis of cell signals recorded with extracellular micro-electrodes. submitted to Transactions on Biomedical Engineering.

- Obo, M., Konishi, S., Otaka, Y., & Kitamura, S. (2002). Effect of magnetic field exposure on calcium channel currents using patch clamp technique. *Bioelectromagnetics*, 23(4), 306–314.
- Offenhäusser, A. & Knoll, W. (2001). Cell-transistor hybrid systems and their potential applications. *Trends in Biotechnology*, 19(2), 62–66.
- Okahata, Y., Matsunobu, Y., Ijio, K., Mukae, M., Murakami, A., & Makino, K. (1992). Hybridization of nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance. *Journal of the American Chemical Society*, 114(21), 8299–8300.
- O’Shaughnessy, T. J., Gray, S. A., & Pancrazio, J. J. (2004). Cultured neuronal networks as environmental biosensors. *Journal of Applied Toxicology*, 24(5), 379–385.
- O’Shaughnessy, T. J., Zim, B., Ma, W., Shaffer, K. M., Stenger, D. A., Zamani, K., Gross, G. W., & Pancrazio, J. J. (2003). Acute neuropharmacologic action of chloroquine on cortical neurons in vitro. *Brain Research*, 959(2), 280–286.
- Oster, S. (2012). *Charakterisierung eines Messplatzes zur elektromagnetischen Befeldung von neuronalen Zellen*. Bachelorlorthesis, Hochschule Aschaffenburg.
- Owen, A. B. (2010). *Empirical Likelihood*. CRC Press.
- Paffi, A., Apollonio, F., Lovisolo, G., Marino, C., & Liberti, M. (2011). Exposure systems for bioelectromagnetic investigations in the radiofrequency range: classification and emerging trends. In *IEEE Proceedings of the 5th European Conference on Antennas and Propagation (EUCAP)* (pp. 3159–3163).
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 839–845.
- Pampaloni, F. & Stelzer, E. H. K. (2009). Three-dimensional cell cultures in toxicology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 26, 129–150.
- Pancrazio, J. J., Gray, S. A., Shubin, Y. S., Kulagina, N., Cuttino, D. S., Shaffer, K. M., Eisemann, K., Curran, A., Zim, B., Gross, G. W., & O’Shaughnessy, T. J. (2003). A portable microelectrode array recording system incorporating cultured neuronal networks for neurotoxin detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(11), 1339–1347.
- Pancrazio, J. J., Whelan, J. P., Borkholder, D. A., Ma, W., & Stenger, D. A. (1999). Development and application of cell-based biosensors. *Annals of Biomedical Engineering*, 27(6), 697–711.
- Paulin, D. & Li, Z. (2004). Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research*, 301(1), 1–7.

- Phillips, J., Ivaschuk, O., Ishida-Jones, T., Jones, R., Campbell-Beachler, M., & Haggren, W. (1998). Dna damage in molt-4 t-lymphoblastoid cells exposed to cellular telephone radiofrequency fields in vitro. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 45(1), 103–110.
- Phillips, J., Singh, N., & Lai, H. (2009). Electromagnetic fields and dna damage. *Pathophysiology*, 16(2-3), 79–88.
- Pike, F. G., Meredith, R. M., Olding, A. W., & Paulsen, O. (1999). Rapid report: postsynaptic bursting is essential for 'hebbian' induction of associative long-term potentiation at excitatory synapses in rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 518(Pt 2), 571–576.
- Piunno, P. A., Krull, U. J., Hudson, R. H., Damha, M. J., & Cohen, H. (1995). Fiber-optic dna sensor for fluorometric nucleic acid determination. *Analytical Chemistry*, 67(15), 2635–2643.
- Pottek, M., Soerensen, P., Knoll, W., Howitz, S., & Thielemann, C. (2006). A cell-based microfluidic system for drug screening applications. *MSTnews*, 1, 39–40.
- Potter, S. & DeMarse, T. (2001). A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of Neuroscience Methods*, 110(1-2), 17–24.
- Potter, S. M., Wagenaar, D. A., & DeMarse, T. B. (2006). *Advances in Network Electrophysiology*, chapter 9: Closing the loop: stimulation feedback systems for embodied MEA cultures, (pp. 215–242). Springer.
- Rahman, A. R. A., Register, J., Vuppala, G., & Bhansali, S. (2008). Cell culture monitoring by impedance mapping using a multielectrode scanning impedance spectroscopy system (cellmap). *Physiological Measurement*, 29(6), S227–S239.
- Ramanathan, K. & Danielsson, B. (2001). Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), 417–423.
- Regehr, W. G., Pine, J., Cohan, C. S., Mischke, M. D., & Tank, D. W. (1989). Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording. *Journal of Neuroscience Methods*, 30(2), 91–106.
- Reichert, H. (2000). *Neurobiologie*. Thieme.
- Reininger-Mack, A., Thielecke, H., & Robitzki, A. (2002). 3d-biohybrid systems: applications in drug screening. *Trends in Biotechnology*, 20(2), 56–61.
- Rieke, M., Gottwald, E., Weibezahn, K.-F., & Layer, P. G. (2008). Tissue reconstruction in 3d-spheroids from rodent retina in a motion-free, bioreactor-based microstructure. *Lab on a Chip*, 8(12), 2206–2213.
- Rimann, M. & Graf-Hausner, U. (2012). Synthetic 3d multicellular systems for drug development. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(5), 803–809.

- Robitzki, A., Thielecke, H., & Reininger-Mack, A. (2002). Development of a novel microcapillary array: characterization of in vitro 3d tissue models by bioimpedance spectroscopy. In *Proceedings of the IEEE-EMBS Conference on Molecular, Cellular and Tissue Engineering* (pp. 52–53).
- Rothermel, A., Kurz, R., Ruffer, M., Weigel, W., Jahnke, H.-G., Sedello, A. K., Stepan, H., Faber, R., Schulze-Forster, K., & Robitzki, A. A. (2005). Cells on a chip – the use of electric properties for highly sensitive monitoring of blood-derived factors involved in angiotensin ii type 1 receptor signalling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 16(1-3), 51–58.
- Sachs, H. G., McDonald, T. F., & DeHaan, R. L. (1973). Tetrodotoxin sensitivity of cultured embryonic heart cells depends on cell interactions. *The Journal of Cell Biology*, 56(1), 255–258.
- Sales, K. M., Kingston, S. T., Atterwill, C. K., & Purcell, W. M. (2000). Avian whole-brain spheroid cultures: applications in pesticide toxicity. *Pest Management Science*, 56(9), 825–827.
- Sales, K. M., Kingston, S. T., Doyle, K. M., & Purcell, W. M. (2004). Preliminary characterisation of an in vitro paradigm for the study of the delayed effects of organophosphorus compounds: hen embryo brain spheroids. *Toxicology*, 195(2-3), 187–202.
- Sanguinetti, M. C. & Tristani-Firouzi, M. (2006). Herg potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*, 440(7083), 463–469.
- Santini, M. T., Rainaldi, G., & Indovina, P. L. (2009). Cellular effects of extremely low frequency (elf) electromagnetic fields. *International Journal of Radiation Biology*, 85(4), 294–313.
- Sato, T., Suzuki, T., & Mabuchi, K. (2007). Fast automatic template matching for spike sorting based on davies-bouldin validation indices. In *29th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* (pp. 3200–3203).
- Savitzky, A. & Golay, M. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8), 1627–1639.
- Schendera, C. (2004). *Datenmanagement und Datenanalyse mit dem SAS-System*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag.
- Schenkel, J. (2006). *Transgene Tiere*. Springer.
- Schmidt, R., Lang, F., & Thews, G. (2005). *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*. Springer.
- Schuderer, J., Oesch, W., Felber, N., Spät, D., & Kuster, N. (2004a). In vitro exposure apparatus for elf magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 25(8), 582–591.

- Schuderer, J., Samaras, T., Oesch, W., Spät, D., & Kuster, N. (2004b). High peak sar exposure unit with tight exposure and environmental control for in vitro experiments at 1800 mhz. *IEEE Transactions on microwave theory and techniques*, 52(8), 2057–2066.
- Schwartz, J. L., House, D. E., & Mealing, G. A. (1990). Exposure of frog hearts to cw or amplitude-modulated vhf fields: selective efflux of calcium ions at 16 hz. *Bioelectromagnetics*, 11(4), 349–358.
- Seaman, C. W., Toseland, C. D., Maile, P. A., Francis, I., & White, D. J. (1994). Study of the cardiotoxic potential of pharmaceutical compounds in chick myocardial myocyte reaggregate cultures. *Toxicology In Vitro*, 8(4), 543–544.
- Seaman, R. L. & DeHaan, R. L. (1993). Inter-beat intervals of cardiac-cell aggregates during exposure to 2.45 ghz cw, pulsed, and square-wave-modulated microwaves. *Bioelectromagnetics*, 14(1), 41–55.
- Seeds, N. & Vatter, A. (1971). Synaptogenesis in reaggregating brain cell culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(12), 3219–3222.
- Seeds, N. W. (1971). Biochemical differentiation in reaggregating brain cell culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(8), 1858–1861.
- Seel, D. (2011). *Torsade de Pointes: Prävalenz von Risikofaktoren*. Dissertation, Universitätsmedizin Berlin.
- Shimada, Y., Moscona, A. A., & Fischman, D. A. (1974). Scanning electron microscopy of cell aggregation: cardiac and mixed retina-cardiac cell suspensions. *Developmental Biology*, 36(2), 428–446.
- Sieghart, W. (2006). Structure, pharmacology, and function of gabaa receptor subtypes. *Advances in Pharmacology*, 54, 231–263.
- Silverthorn, D. (2009). *Physiologie*. Pearson Studium.
- Soussou, W., Gholmieh, G., Han, M., Ahuja, A., Song, D., Hsiao, M., Wang, Z., Tanguay, A., & Berger, T. (2006). *Advances in Network Electrophysiology*, chapter 2: Mapping Spatio-Temporal Electrophysiological Activity in Hippocampal Slices with Conformal Planar Multi-Electrode Arrays, (pp. 127–152). Springer.
- Sperelakis, N. (1978). Cultured heart cell reaggregate model for studying cardiac toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 26, 243–267.
- Sridhar, A., da Cunha, D. N. Q., Lacombe, V. A., Zhou, Q., Fox, J. J., Hamlin, R. L., & Carnes, C. A. (2007). The plateau outward current in canine ventricle, sensitive to 4-aminopyridine, is a constitutive contributor to ventricular repolarization. *British Journal of Pharmacology*, 152(6), 870–879.

- Stafstrom, C. E., Johnston, D., Wehner, J. M., & Sheppard, J. R. (1980). Spontaneous neural activity in fetal brain reaggregate cultures. *Neuroscience*, 5(10), 1681–1689.
- Stark, H. (2005). *Wavelets and signal processing: an application-based introduction*. Springer.
- Stein, B. (2004). *Entwicklung von Potentialsensoren für die Zell-Halbleiter-Kopplung*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Steinberg, M. (1962a). Mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. ii. time-course of events. *Science*, 137(3532), 762.
- Steinberg, M. (1962b). On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells, i. population kinetics, differential adhesiveness, and the absence of directed migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(9), 1577.
- Steinberg, M. (1962c). On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells, iii. free energy relations and the reorganization of fused, heteronomic tissue fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(10), 1769.
- Steinberg, M. S. & Takeichi, M. (1994). Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 206–209.
- Steininger, J. (2005). *Signalverarbeitung für zellbasierte Biosensoren*. Diplomarbeit, Hochschule Aschaffenburg.
- Stett, A., Egert, U., Guenther, E., Hofmann, F., Meyer, T., Nisch, W., & Haemmerle, H. (2003). Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3), 486–495.
- Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Löster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F., & Ludwig, A. (2003). The hyperpolarization-activated channel hcn4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15235.
- Strübing, C., Ahnert-Hilger, G., Shan, J., Wiedenmann, B., Hescheler, J., & Wobus, A. (1995). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mechanisms of Development*, 53(2), 275–287.
- Söhl, G., Maxeiner, S., & Willecke, K. (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(3), 191–200.

- Söhl, G. & Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*, 62(2), 228–232.
- Sörensen, S. P. (2007). *Development of a Cell-Based Drug Screening Platform - Extracellular Recording and Electrochemical Impedance Spectroscopy on Microelectrode Array Chips*. Dissertation, University of Bath.
- Takekawa, T., Isomura, Y., & Fukai, T. (2010). Accurate spike sorting for multi-unit recordings. *European Journal of Neuroscience*, 31(2), 263–272.
- Tam, D. (2002). An alternate burst analysis for detecting intra-burst firings based on inter-burst periods. *Neurocomputing*, 44, 1155–1159.
- Tamburello, C. C., Tine, G., & Zanforlin, L. (1993). Analysis of microwave effects on isolated hearts. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 30, 303–311.
- Tattersall, J. E., Scott, I. R., Wood, S. J., Nettell, J. J., Bevir, M. K., Wang, Z., Somasiri, N. P., & Chen, X. (2001). Effects of low intensity radiofrequency electromagnetic fields on electrical activity in rat hippocampal slices. *Brain Research*, 904(1), 43–53.
- Thielemann, C., Daus, A. W., Heselich, A., Layer, P., & Ritter, S. (2012). Cellular effects of space radiation with relevance to cardiovascular diseases. In *Life in Space for Life on Earth* Aberdeen, UK.
- Thomas, 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), 61–66.
- Thomas, G., Klatt, B., & Blight, A. (2010). Effect of 4-aminopyridine on action potential parameters in isolated dog purkinje fibers. *Archives of Drug Information*, 3(1), 19–25.
- Thompson, A. & Balsler, J. R. (2004). Perioperative cardiac arrhythmias. *British Journal of Anaesthesia*, 93(1), 86–94.
- Tortora, G. & Grabowski, S. (2003). *Principles of Anatomy and Physiology*. Wiley.
- Toseland, C. D., Seaman, C. W., Francis, I., White, D. J., & Earl, L. K. (1996). Study of the effects of cardiovascular drugs in heart cell cultures. *Toxicology In Vitro*, 10(6), 765–773.
- Uroukov, I. S. & Bull, L. B. (2008). On the effect of long-term electrical stimulation on three-dimensional cell cultures: Hen embryo brain spheroids. *Medical Devices: Evidence and Research*, 1, 1–12.
- van Vliet, E., Morath, S., Eskes, C., Linge, J., Rappsilber, J., Honegger, P., Hartung, T., & Coecke, S. (2008). A novel in vitro metabolomics approach for neurotoxicity testing, proof of principle for methyl mercury chloride and caffeine. *Neurotoxicology*, 29(1), 1–12.

- Vedantham, V. & Cannon, S. C. (1999). The position of the fast-inactivation gate during lidocaine block of voltage-gated Na^+ channels. *The Journal of General Physiology*, 113(1), 7–16.
- Vollmer, G. & Layer, P. G. (1986). An in vitro model of proliferation and differentiation of the chick retina: coaggregates of retinal and pigment epithelial cells. *The Journal of Neuroscience*, 6(7), 1885–1896.
- Vrljic, M., Strop, P., Ernst, J., Sutton, R., Chu, S., & Brunger, A. (2010). Molecular mechanism of the synaptotagmin-snare interaction in Ca^{2+} -triggered vesicle fusion. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(3), 325–331.
- Wagenaar, D., DeMarse, T., & Potter, S. (2005). Meabench: A toolset for multi-electrode data acquisition and on-line analysis. In *2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering* (pp. 518–521).
- Wagenaar, D. A., Pine, J., & Potter, S. M. (2006). An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neuroscience*, 7, 11.
- Wang, J. (2002). Electrochemical nucleic acid biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 469(1), 63–71.
- Wang, P. (2010). *Cell-Based Biosensors*, chapter 1: Principles and Applications, (pp. 1–11). Artech House Boston.
- Wang, P., Xu, G., Qin, L., Xu, Y., Li, Y., & Li, R. (2005). Cell-based biosensors and its application in biomedicine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108(1), 576–584.
- Weaver, V. M., Petersen, O. W., Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C., & Bissell, M. J. (1997). Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *The Journal of Cell Biology*, 137(1), 231–245.
- Willerth, S. M., Arendas, K. J., Gottlieb, D. I., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2006). Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. *Biomaterials*, 27(36), 5990–6003.
- Wolke, S., Neibig, U., Elsner, R., Gollnick, F., & Meyer, R. (1996). Calcium homeostasis of isolated heart muscle cells exposed to pulsed high-frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 17(2), 144–153.
- Wyle-Gyurech, G. & Reinhardt, C. A. (1991). Differentiation of embryonic chick brain cells in monolayer and reaggregate cultures: a potential model in vitro for neurotoxicity. *Toxicology In Vitro*, 5(5), 419–425.

- Xiang, G., Pan, L., Huang, L., Yu, Z., Song, X., Cheng, J., & Xing, W. (2007). Microelectrode array-based system for neuropharmacological applications with cortical neurons cultured in vitro. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11), 2478–2484.
- Xie, C., Lin, Z., Hanson, L., Cui, Y., & Cui, B. (2012). Intracellular recording of action potentials by nanopillar electroporation. *Nature Nanotechnology*, 7(3), 185–190.
- Yagiela, J. A. (1991). Local anesthetics. *Anesthesia Progress*, 38(4-5), 128–141.
- Yee, K. C., Chou, C. K., & Guy, A. W. (1984). Effect of microwave radiation on the beating rate of isolated frog hearts. *Bioelectromagnetics*, 5(2), 263–270.
- Yoshinobu, T., Iwasaki, H., Ui, Y., Furuichi, K., Ermolenko, Y., Mourzina, Y., Wagner, T., Näther, N., & Schöning, M. J. (2005). The light-addressable potentiometric sensor for multi-ion sensing and imaging. *Methods*, 37(1), 94–102.
- Yotter, R. & Wilson, D. (2004). Sensor technologies for monitoring metabolic activity in single cells-part ii: nonoptical methods and applications. *IEEE Sensors Journal*, 4(4), 412–429.
- Yuhas, J., Li, A., Martinez, A., & Ladman, A. (1977). A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Research*, 37(10), 3639–3643.
- Zhang, P., Wu, J., Zhou, Y., Liang, P., & Yuan, J. (2004). Spike sorting based on automatic template reconstruction with a partial solution to the overlapping problem. *Journal of Neuroscience Methods*, 135(1), 55–65.
- Zhang, S. (2004). Beyond the petri dish. *Nature Biotechnology*, 22(2), 151–152.
- Zhang, S., Zhou, Z., Gong, Q., Makielski, J. C., & January, C. T. (1999). Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to hERG potassium channels. *Circulation Research*, 84(9), 989–998.
- Zurich, M. G. & Monnet-Tschudi, F. (2009). Contribution of in vitro neurotoxicology studies to the elucidation of neurodegenerative processes. *Brain Research Bulletin*, 80(4-5), 211–216.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Signalübertragung an elektrischen und chemischen Synapsen	7
1.2	Aktionspotenziale ventrikulärer und sinoatrialer Kardiomyozyten	9
1.3	Extrazelluläre Ableitung mit Mikroelektroden Arrays	10
1.4	Prinzip der extrazellulären Ableitung mit MEAs	11
1.5	Methoden zur Reaggregation dissoziierter Zellen zu 3D Sphäroiden	13
2.1	Analyse zeitlicher und räumlicher Aktivitätsmuster mit HD MEAs	21
2.2	Kriterien zur Analyse elektrophysiologischer Eigenschaften	23
2.3	Potenzialverlauf während eines Bursts	25
2.4	Multivariate Spikedetektion	26
2.5	Ergebnis der multivarianten Spikeanalyse	28
2.6	Erzeugung transversal elektromagnetischer Felder mittels Stripline	30
3.1	Reaggregation dissoziierter Zellen aus dem Herzgewebe zu Sphäroiden	33
3.2	Intrinsische Kontraktionen 3D und 2D kultivierter Kardiomyozyten	34
3.3	Extrazelluläre Potenziale von Sphäroiden aus Kardiomyozyten	36
3.4	Inhibition der Natriumpermeabilität durch Lidocain	37
3.5	Modifikation der Feldpotenzialdauer durch Diltiazem und 4-Aminopyridin	39
3.6	Ergebnisse der Finiten Elemente Simulationen	40
3.7	Modifizierung der Feldpotenzialfrequenz durch Änderung der Temperatur	42
3.8	Untersuchung der Proben temperatur während der Exposition	43
3.9	Elektrophysiologische Parameter der Sphäroide nach der Befeldung	44
3.10	Feldpotenzialfrequenz eines Sphäroids vor, während und nach der Exposition	45
3.11	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen neuronaler Sphäroide	46
3.12	Ausbildung von Neuriten in 3D bzw. 2D Netzwerken	47
3.13	Extrazelluläre Ableitung neuronaler Sphäroide	48
3.14	Ergebnis der multivarianten Spikeanalyse	49
3.15	Modifikation des neuronalen Aktivitätsmusters durch Bicucullin	51
3.16	Dosis-Wirkungs-Beziehung für Bicucullin	52
3.17	Dosis-Wirkungs-Beziehung für GABA	53

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AP	Aktionspotenzial
ATP	Adenosintriphosphat
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CS	Chicken Serum
div	days in vitro, Tage in Kultur
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEG	Elektroenzephalografie
EKG	Elektrokardiografie
ELF	extremely low frequencies, Niederfrequenzbereich
EM	Expectation Maximization
EMA	European Medicines Agency
EMF	elektromagnetische Felder
EMG	Elektromyografie
et al.	et alii
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
FEM	Finite Elemente Simulation
FP Frequenz	Feldpotenzialfrequenz
FPdur	Fieldpotentialduration, Feldpotenzialdauer

fps	frames per second, Bilder pro Sekunde
GABA	γ -Aminobuttersäure
GSM	Global System for Mobile Communications
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCN	hyperpolarization activated and cyclic nucleotide gated
HH	Hamburger Hamilton Stadium
HMDS	Hexamethyldisilazan
HP	Hochpass
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICH	International Conference on Harmonisation
IFI	Interfeldpotenzial Intervall
ISFET	Ionensensitiver Feldeffekttransistor
ISI	Interspike Intervall
LAPS	Lichtadressierbarer Potenziometrischer Sensor
MEA	Mikroelektroden Array
NEO	nichtlinearer Energieoperator
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
rms	root mean square, Effektivwert
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
SAR	spezifische Absorptionsrate
SNARE	soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
SNR	signal-to-noise-ratio, Signal-Rausch-Verhältnis
TEM	transversal elektromagnetisch
TiN	Titannitrid
TTX	Tetrodotoxin
WPT	Wavelet-Paket-Transformation

Verzeichnis fachspezifischer Anglizismen

Folgende Anglizismen sind in diesem Fachgebiet gebräuchlich bzw. wurden in dieser Arbeit eingeführt und in ihrer originären Form verwendet:

Burst	tetanische Folge einzelner Aktionspotenziale
Cluster (Signalverarbeitung)	statistisch abgrenzbare, ungeordnete Menge von Datenpunkten mit gleichen oder ähnlichen Eigenschaften
Cluster (Zellkultur)	individuelles Netzwerk, bestehend aus wenigen Zellen
Embryoid Bodies	sphärische Aggregate zur <i>in vitro</i> Differenzierung embryonaler Stammzellen
Gap Junctions	membrandurchspannende, kanalbildende Proteinkomplexe
Hanging Drop	Methode zur Kultivierung von Zellen in einem an Substraten hängenden Mediumstropfen
High-Throughput-Screening	Analyse großer Substanzbibliotheken im Hochdurchsatzverfahren
Monolayer	Zellsystem in zweidimensionaler Architektur
Peak	Scheitelwert im Verlauf des Messsignals
Sorting-Out	spezifische Zellsortierungsprozesse während der Sphäroidbildung
Spike	extrazellulär abgeleitetes Aktionspotenzial eines Neurons
Spike Sorting	zellspezifische Zuordnung isolierter Spikes
Stripline	transversal elektromagnetischer Wellenleiter
Threshold	Schwellwert
Timestamp	Zeitstempel, der das Auftreten eines Aktionspotenzials markiert
Wavelet	Basisfunktion für eine Zeit-Frequenz-Transformation

Lebenslauf

Andreas Wolfgang Daus

geboren am 3. Mai 1982 in Miltenberg

Familienstand: Verheiratet, 1 Kind

Seit 07/2008	Doktorand, Technische Universität Darmstadt
Seit 03/2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Dozent, Hochschule Aschaffenburg
10/2001–03/2008	Studium des Wirtschaftsingenieurwesens und der Elektrotechnik, Hochschule Aschaffenburg
08/2000–06/2001	Zivildienst, Lebenshilfe e. V. Elsenfeld
07/2000	Fachabitur, Staatliche Fachoberschule Obernburg

Veröffentlichungen/Konferenzbeiträge:

Daus, A. W., Layer, P. G., Thielemann, C. (2012). A spheroid-based biosensor for the label-free detection of drug-induced field potential alterations. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 165(1), 53–58.

Daus, A. W., Goldhammer, M., Layer, P. G., Thielemann, C. (2011). Electromagnetic exposure of scaffold-free three-dimensional cell culture systems. *Bioelectromagnetics*, 32(5), 351–359.

Bestel, R., Daus, A. W., Thielemann, C. (2012). A novel automated spike sorting algorithm with adaptable feature extraction. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(1), 168–178.

Nick, C., Daus, A. W., Bestel, R., Goldhammer, M., Steger, F., Thielemann, C. (2013). DrCell – A software tool for the analysis of cell signals recorded with extracellular microelectrodes. Submitted to *Transactions on Biomedical Engineering*.

Daus, A. W., Goldhammer, M., Bochtler, U., Thielemann, C. (2010). A new approach to investigate long-term effects of rf radiation on cells. In Progress in Electromagnetics Research Symposium (PIERS). Cambridge, USA.

Daus, A. W., Goldhammer, M., Thielemann, C. (2009). Novel 3d cell culture systems for electromagnetic exposure studies. In BioEM 2009 Abstract Collection. Davos, Switzerland.

Daus, A. W., Bestel, R., Thielemann, C. (2011). Spike detection, refinement and interpretation of recordings in three-dimensional in vitro systems. In Proceedings of RMSC 2011 Beijing, China.

Daus, A. W., Goldhammer, M., Thielemann, C. (2010). Using three-dimensional cell culture systems on microelectrode arrays for biosensing applications. In Proceedings MEA Meeting 2010. Reutlingen, Germany.

Daus, A. W., Thielemann, C. (2010). Spheroids on microelectrode arrays: A highly sensitive system for biosensing applications. In European Journal of Cell Biology, volume 89S1. Regensburg, Germany.

Thielemann, C., Daus, A. W., Heselich, A., Layer, P., Ritter, S. (2012). Cellular effects of space radiation with relevance to cardiovascular diseases. In Life in Space for Life on Earth Aberdeen, UK.

Goldhammer, M., Daus, A. W., Thielemann, C., Bochtler, U. (2009). Flexible measurement setup for electromagnetic exposition of biological samples. In BioEM 2009 Abstract Collection Davos, Switzerland.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 12. März 2013
Andreas Wolfgang Daus