

Neuronale Netzwerke von kultivierten Uhrenzellen des hypothalamischen Suprachiasmatischen Nucleus als Modell für die intakte biologische Uhr

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von

Christopher Martin Klisch

aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2009

D 30

Danksagung

Ich möchte mich besonders bedanken bei Prof. Dr. Hilmar Meissl, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit durchgeführt wurde, für die hervorragende Betreuung.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinem anderen Betreuer Prof. Dr. Leo Peichl für seine Unterstützung in allen Fragen.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Heinz Wässle, nicht nur für die Möglichkeit am Max-Planck-Institut für Hirnforschung diese Arbeit anfertigen zu dürfen, sondern auch für die finanzielle Unterstützung.

Ebenfalls für die finanzielle Unterstützung möchte ich dem Graduiertenkolleg „Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen, Funktionen“ danken, sowie für die vielen Lehrgänge, an denen ich teilnehmen durfte.

Meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe, Diana Karnas, Jérôme Mordel, Alexey Inyushkin, Brigitte Sinke und Uschi Arbogast, möchte ich danken für die vielen kleinen und großen Hilfen, aber auch allen anderen aus der Abteilung Neuroanatomie, die mich immer nach Kräften unterstützt haben.

Ganz besonders dankbar bin ich meinen Eltern, ohne die ich es auf meinem Weg nie soweit gebracht hätte.

Nicht zuletzt schulde ich meiner geliebten Freundin Tine für ihre Geduld, Ausdauer und nie versiegende Unterstützung außerordentliche Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Die circadiane Uhr im suprachiasmatischen Nucleus.....	1
1.2 Efferenzen und Afferenzen des SCN	4
1.3 Methoden zur Untersuchung der Signale des SCN.....	7
1.4 Fragestellungen	9
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Kultivierung von Neuronen	11
2.1.1 Beschichtung	11
2.1.2 Präparation	11
2.1.3 Dissoziation.....	12
2.1.4 Kultivierung	12
2.1.4.1 Aussaat und Aufzucht.....	12
2.1.4.2 Dauerkultivierung.....	13
2.1.5 Medien	14
2.1.5.1 Neurobasal A (NBA)	14
2.1.5.2 DMEM:F12-B (DF12B) Brutschrank- / Kulturmedium	14
2.1.5.3 DMEM:F12-R (DF12R) Versuchsmedium.....	14
2.1.5.4 DMEM/F12-Rv (DF12Rv) Stamm-Medium.....	14
2.1.6 Lösungen	14
2.1.7 Silikonringe	15
2.2 MEA-System	16
2.2.1 MEA	16
2.2.2 Verstärker	17
2.2.3 Analog/Digital-Wandler	17
2.3 Medien- und Applikationssystem.....	17
2.3.1 Versuchsaufbau	18
2.3.1.1 Langzeitversuche.....	18
2.3.1.2 Kurzzeitversuche	18
2.3.2 Pumpen.....	19
2.3.3 Automatische Applikation von Substanzen	19
2.3.4 Makro-Perfusionskammer	19
2.3.5 Mikro-Perfusionskammer	20
2.3.5.1 Entwicklung.....	20
2.3.5.2 Endgültige Form.....	22
2.3.5.3 Herstellung.....	22
2.4 Programme und Skripte	23
2.4.1 MC_Rack	23
2.4.2 Spike2	24
2.4.2.1 Importscript mcd2smr	24
2.4.2.2 X3-Batch	25
2.4.2.3 xCorrMap	25
2.4.2.4 ReadOutBinary	26
2.4.2.5 XCM-Dateistruktur	27
2.4.3 SerialCosinor	28
2.4.4 Excel	29

Inhaltsverzeichnis

2.4.5 SigmaStat	29
2.4.6 SigmaPlot.....	29
2.4.7 Autostitch	30
2.4.8 Illustrator	30
2.4.9 Photoshop.....	30
2.5 Auswertung und Statistik.....	30
2.5.1 Rhythmik	30
2.5.2 Kurzeffekte	31
2.5.3 Korrelationen.....	32
2.5.3.1 Messungen der Korrelationen und ihrer Veränderungen	33
2.5.3.2 Latenzkarten	36
2.5.4 <i>Interspike</i> -Intervall-Histogramme (ISI).....	37
2.6 Bezugsquellen / Hersteller	38
2.6.1 Chemikalien	38
2.6.2 Verbrauchsmittel	39
2.6.3 Geräte	39
2.6.4 Software.....	40
3 Ergebnisse	41
3.1 Antwortmuster von kultivierten SCN-Neuronen.....	41
3.1.1 Unregelmäßige Muster.....	41
3.1.2 Metronomische Aktivität	41
3.1.3 <i>Burst</i> -artige Muster.....	43
3.1.4 Zelldichte und Kulturbedingungen.....	45
3.2 Circadiane Rhythmik in dissoziierten SCN-Kulturen	46
3.2.1 Charakteristika von Uhrenzellen	46
3.2.2 Synchronisation zwischen Uhrenzellen.....	48
3.3 Netzwerke in Zellkulturen	49
3.3.1 Entwicklung der Netzwerke und räumliche Ausdehnung	50
3.3.2 Rhythmen im Netzwerk.....	52
3.3.3 Veränderungen der Netzwerkaktivität durch Neuropeptide.....	55
3.3.3.1 Orexin A.....	56
3.3.3.2 Arginin-Vasopressin (AVP)	57
3.4 Phasenverschiebungen.....	57
3.4.1 Melatonin	57
3.4.2 Orexin	60
3.5 Wirkung von Neurotransmittern und Neuropeptiden auf die neuronale Aktivität im SCN	63
3.5.1 GABA	63
3.5.1.1 Muscimol.....	63
3.5.1.2 Baclofen.....	65
3.5.1.3 Bicucullin.....	66
3.5.2 Glutamat	66
3.5.2.1 Glutamat	66
3.5.2.2 Kainat.....	68
3.5.2.3 Quisqualat.....	70
3.5.2.4 AMPA.....	72
3.5.3 Orexin A	73
3.5.4 Orexin-Glutamat-Interaktion.....	75
3.5.4.1 Glutamat	75
3.5.4.2 Kainat.....	78
3.5.4.3 Quisqualat.....	84

Inhaltsverzeichnis

3.5.4.4 AMPA.....	88
4 Diskussion.....	89
4.1 Methodendiskussion.....	89
4.1.1 Kultivierung von SCN-Neuronen auf MEAs.....	90
4.1.2 Perfusions- /Applikationssystem	91
4.1.3 Netzwerkanalyse.....	93
4.2 Präzision der neuronalen Aktivität.....	93
4.2.1 Periode.....	94
4.2.2 Entladungsmuster der SCN-Neurone.....	97
4.3 Informationsverarbeitung im SCN	97
4.3.1 Kurzzeiteffekte von Glutamat und GABA	98
4.3.2 Orexin A und Glutamat.....	102
4.3.2.1 Präsynaptischer Orexin-Effekt	103
4.3.2.2 Orexin-Modulation der synaptischen Übertragung.....	103
4.3.2.3 Orexin Wirkung auf Kanäle und Transporter.....	105
4.3.3 Netzwerk	106
4.4 Phasenverschiebungen.....	108
5 Zusammenfassung.....	115
6 Literaturverzeichnis	117
7 Abkürzungsverzeichnis	132
8 Anhang.....	134
8.1 Perfusionskammern	134
8.2 Spike2 Skripte	135
8.2.1 xCorrMap	135
8.2.2 ReadOutBinary.....	146
8.2.3 mcd2smr	155
Veröffentlichungen	156
Lebenslauf.....	157

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Beispiel für Phasenverschiebung.....	2
Abb. 2 Lage des SCN, PVN, <i>N. arcuatus</i> und des lateralen Hypothalamus.....	3
Abb. 3 Übersicht über einige efferente Verbindungen des SCN.....	4
Abb. 4 MEA	8
Abb. 5 Elektrodenkonfiguration in einem MEA	16
Abb. 6 Versuchsanordnung für die Mikroperfusion.....	18
Abb. 7 Zwischenring.....	20
Abb. 8 Überwurfmutter	21
Abb. 9 Stempel: finale Version	22
Abb. 10 Randomisierte Daten <i>versus</i> Vehikel	32
Abb. 11 Beispiel für die Bestimmung von Kreuzkorrelationen und die Anwendung von verschiedenen FIR-Filtern	35
Abb. 12 Entladungsmuster eines circadian feuernden Neurons.....	42
Abb. 13 Entladungsmuster eines <i>burst</i> -artig feuernden Neurons.....	44
Abb. 14 SCN-Zellkultur mit niedriger Dichte	45
Abb. 15 Unabhängige circadiane Rhythmen	48
Abb. 16 Entwicklung einer SCN-Kultur.....	49

Inhaltsverzeichnis

Abb. 17 Latenzkarte einer SCN-Kultur (hohe Zelldichte).....	51
Abb. 18 Neuronale Aktivität von kultivierten SCN-Neuronen (hohe Zelldichte) 53	
Abb. 19 Latenzkarten einer SCN-Kultur (aufgenommen in 4 h Intervallen).....	54
Abb. 20 Veränderung der Netzwerkeigenschaften einer SCN-Kultur nach Applikation von 3,3 nM Orexin A.....	56
Abb. 21 Veränderung der Netzwerkeigenschaften einer SCN-Kultur nach Applikation von 100 nM AVP.....	57
Abb. 22 Phasenverschiebung durch 100 nM Melatonin.	58
Abb. 23 Phasenverschiebung der <i>Spikerate</i> einer Einzelzelle durch 100 nM Melatonin.	59
Abb. 24 Phasenantwortdiagramm für Melatonin.....	60
Abb. 25 Phasenverschiebung durch 3,3 nM Orexin A.....	61
Abb. 26 Phasenantwortdiagramm für 3,3 nM Orexin A	62
Abb. 27 Verteilung der Perioden von Einzelzellen.....	62
Abb. 28 Kurzzeiteffekte von Muscimol	64
Abb. 29 Änderung der <i>Spikerate</i> bei verschiedenen Muscimol-Konzentrationen.	65
Abb. 30 Änderung der <i>Spikerate</i> bei verschiedenen Baclofen-Konzentrationen	65
Abb. 31 Einfluss von Orexin A auf die Glutamat-Antwort	67
Abb. 32 Einfluss von Orexin A auf die Kainat-Antwort.....	68
Abb. 33 Einfluss von Orexin A auf die Kainat-Antwort.....	69
Abb. 34 Einfluss von Orexin auf die Quisqualat-Antwort	71
Abb. 35 Einfluss von Orexin A auf die AMPA-Antwort.....	72
Abb. 36 Veränderungen der <i>Spikerate</i> bei verschiedenen Orexin A Konzentrationen.....	73
Abb. 37 Kurzzeiteffekte von Orexin A.....	74
Abb. 38 Exzitatorische Wirkung von Orexin A	74
Abb. 39 Hemmung des Orexin-Effekts durch Glutamat.....	75
Abb. 40 Verstärkung des Glutamat-Effekts durch Orexin A	76
Abb. 41 Verstärkung des Kainat Effekts durch Orexin A	78
Abb. 42 Orexinerge Erregung und schwacher Kainateffekt.....	79
Abb. 43 Hemmung der Kainat-Effekte durch Orexin A	80
Abb. 44 Hemmung des Kainat-Effekts durch Orexin A.....	81
Abb. 45 Biphasischer Kainat-Effekt durch Orexin A	82
Abb. 46 Orexin verändert die Proportionen der Kainat-Antwort.....	83
Abb. 47 Verstärkung der Quisqualat-Antwort durch Orexin A	84
Abb. 48 Aufhebung der Quisqualat-Inhibition durch Orexin A	85
Abb. 49 Aufhebung der Quisqualat-Erregung durch Orexin A.....	86
Abb. 50 Orexin verändert die Proportionen der Quisqualat-Antwort.....	87
Abb. 51 Verstärkung der AMPA-Inhibition durch Orexin A	88
Abb. 52 Entwicklungsstufen der Mikro-Perfusionskammer	134

1 Einleitung

1.1 Die circadiane Uhr im suprachiasmatischen Nucleus

Allen Lebewesen ist gemein, dass sie sich an wechselnde Umweltbedingungen anpassen müssen, um zu überleben. Die am häufigsten regelmäßig auftretende Änderung ist der durch die Rotation der Erde verursachte Wechsel zwischen Tag und Nacht. Mit ihm ändern sich neben der Helligkeit auch andere Umweltparameter wie die Umgebungstemperatur. Der Organismus passt sich diesen Veränderungen nicht nur reflektorisch an, sondern ist in der Lage, derartige Veränderungen zu antizipieren und sich darauf vorzubereiten. Für diese Antizipation haben sich während der Evolution bei allen Lebewesen innere Uhren entwickelt. Sie ermöglichen eine Anpassung vieler Körperfunktionen wie Schlaf, Aktivitätszyklen, Körpertemperatur, Stoffwechselforgänge, Hormonausschüttung an den Tag- und Nachtzyklus (Hastings, 1991; Buijs *et al.*, 2006). Rhythmen, die eine solche 24-Stunden Tagesperiodik zeigen, nennt man circadian (übersetzt: ungefähr ein Tag). Circadiane Rhythmen sind endogen, werden aber durch exogene Einflüsse derart beeinflusst, dass zwar die 24-Stunden-Periodik erhalten bleibt, die Phase sich aber verschieben kann (Abb. 1). Ein derartiger Einfluss wird nach Aschoff (1951; 1954) als Zeitgeber bezeichnet, der die endogene circadiane Periodik mit exogenen Umweltfaktoren synchronisiert. Als Zeitgeber in der circadianen Rhythmik dienen vor allem der Licht-Dunkelwechsel, aber auch andere wechselnde Umweltbedingungen wie die Temperaturzyklen sowie soziale Faktoren (Aschoff, 1960). Fehlt ein exogener Zeitgeber, wie es beispielsweise unter konstanten Dunkelbedingungen der Fall ist, sind die Rhythmen freilaufend, also nicht mehr mit der Umwelt synchronisiert. Freilaufende Rhythmen haben eine Periode, die um einen konstanten Betrag von der 24 h-Periodik abweicht, aber dennoch sehr präzise ist (Aschoff, 1951). Wie alle Organismen unterliegt auch der Mensch einer endogenen Tagesperiodik (Aschoff und Wever, 1962).

In Säugetieren übernimmt der suprachiasmatische Nucleus (SCN) die Aufgaben der inneren Uhr. Der SCN ist ein Kerngebiet im vorderen Hypothalamus, welches direkt dorsal des optischen Chiasmas und bilateral vom dritten Ventrikel liegt (Abb. 2; Gurdjian, 1927; Krieg, 1932). Dieses bilaterale Kerngebiet besteht in der Ratte aus etwa 8 000 bis 11 000 Neuronen (van den

Pol, 1980; Moore *et al.*, 2002), die relativ klein, aber dicht gepackt sind (Pennartz *et al.*, 1998). Ohne dieses Kerngebiet geht jegliche circadiane Rhythmik verloren, wie Ablations-Experimente während der frühen 70er Jahre zeigten (Moore und Eichler, 1972; Stephan und Zucker, 1972a). Ebenfalls Anfang der 70er Jahre wurde eine direkte Innervation des SCN durch den retinohypothalamischen Trakt (RHT) nachgewiesen (Hendrickson *et al.*, 1972; Moore und Lenn, 1972). Der RHT besteht aus Axon-Kolateralen der Axone der optischen Nerven, die etwa am 4. postnatalen Tag aus dem optischen Chiasma in den ventralen Teil des SCN einwachsen. Ohne diese Verbindung geht bei den Tieren die Synchronisation zum täglichen Hell/Dunkel-Rhythmus verloren (Stephan und Zucker, 1972b). Durch diese Experimente konnten die zentrale circadiane Uhr und ihre Verknüpfung mit dem Licht anatomisch zugeordnet werden.

Nachdem die innere Uhr im SCN lokalisiert werden konnte, wurde in den SCN-Neuronen zunächst eine circadian oszillierende Stoffwechselftigkeit festgestellt (Schwartz und Gainer, 1977; Inouye und Kawamura, 1979; Schwartz *et al.*, 1980). Später konnten sowohl *in vivo* (Inouye und Kawamura, 1979) als auch *in vitro* im explantierten SCN autonome circadiane Oszillationen neuronaler Aktivität nachgewiesen werden (Green und Gillette, 1982; Groos und Hendriks, 1982; Shibata *et al.*, 1982). Den endgültigen Beweis für die Oszillatorfunktion des SCN lieferten dann Experimente, in denen der SCN in

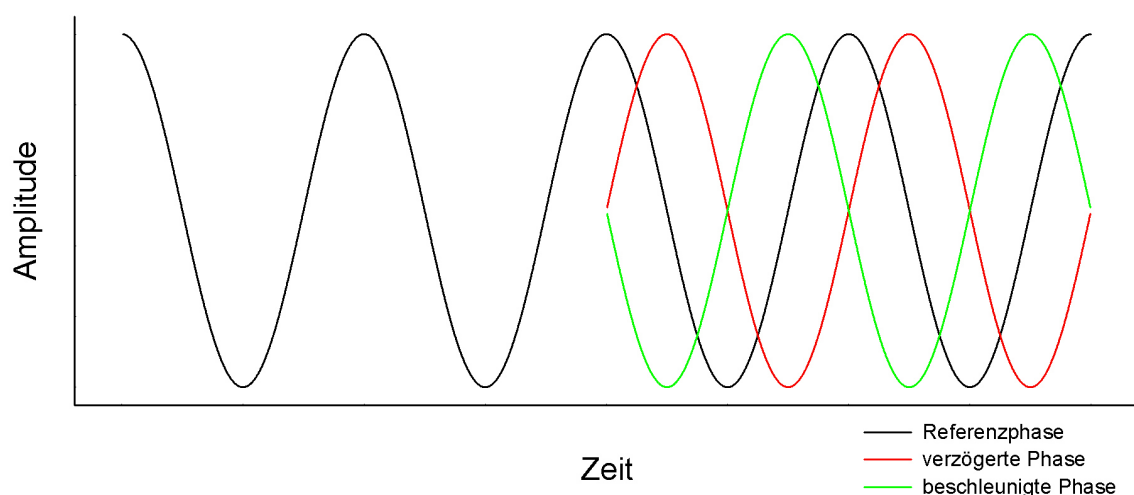


Abb. 1 Beispiel für Phasenverschiebung

Wird ein zyklisch auftretendes Phänomen (schwarz) entlang der Zeitachse verschoben, behält aber dabei seine Periode bei, so handelt es sich um eine Phasenverschiebung. Treten bestimmte Merkmale früher auf, als es relativ zur Referenzphase zu erwarten wäre, ist es eine Phasenbeschleunigung (grün), andernfalls eine Phasenverzögerung (rot).

Tiere transplantiert wurde, denen zuvor der SCN durch elektrolytische Läsionen zerstört wurde. Die Empfängertiere übernahmen daraufhin mit den transplantierten Nuclei auch den lokomotorischen Rhythmus der Spender (Sawaki *et al.*, 1984; Lehman *et al.*, 1987; Ralph *et al.*, 1990).

Erste Hinweise auf einen molekularen Mechanismus des intrinsischen Oszillatorsystems wurden bei mutierten Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) gefunden. Abhängig von ihrem Genotyp war die Periode ihrer lokomotorischen Aktivität verschieden lang oder gar nicht vorhanden (Konopka und Benzer, 1971). Homologe Gene (*Clock*) wurden später auch bei Säugern gefunden (Vitaterna *et al.*, 1994). Weitere Gene und Genprodukte wurden daraufhin entdeckt (Tei *et al.*, 1997; Honma *et al.*, 1998a; Kume *et al.*, 1999), deren circadiane Expression von phasenverschiebenden Stimuli verändert werden kann (Shearman *et al.*, 1997; Shigeyoshi *et al.*, 1997; Miyake *et al.*, 2000). Zusammen bilden diese Gene einen komplexen negativen

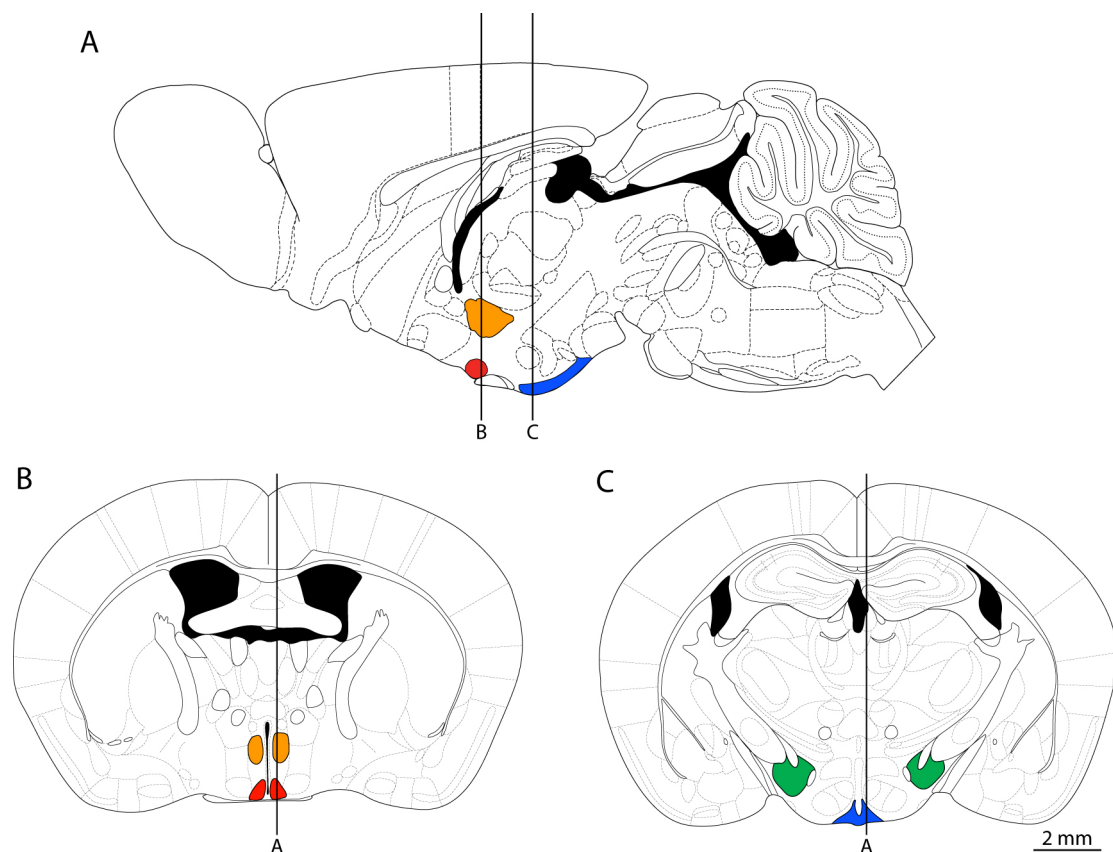


Abb. 2 Lage des SCN, PVN, N. arcuatus und des lateralen Hypothalamus
 Die schematische Darstellung markiert die Lage des SCN in rot, des PVN in orange, des *Nucleus arcuatus* in blau und den lateralen Hypothalamus in grün in verschiedenen Ebenen des Rattengehirns. Im Parasagittalschnitt **A** sind die Schnittebenen der Coronalchnitte **B** und **C** eingezeichnet, in denen wiederum ersterer verzeichnet ist. (Paxinos und Watson 1998 modifiziert)

Rückkopplungsmechanismus aus Transkription und Translation, der die Grundlage für die circadiane Oszillation auf Zellebene darstellt (Jin *et al.*, 1999; Shearman *et al.*, 2000).

Mittlerweile gilt der SCN als die zentrale circadiane Uhr der Säugetiere. Ohne äußere Einflüsse erhält er seine rhythmische Aktivität auch *in vitro* aufrecht. *In vivo* integriert der SCN exogene und endogene Signale, vor allem den Hell/Dunkel-Wechsel, und ermöglicht es so dem Tier, sich optimal auf die Umweltbedingungen vorzubereiten.

1.2 Efferenzen und Afferenzen des SCN

Der SCN besitzt eine Vielzahl afferenter und efferenter Verbindungen. Der wichtigste Faktor durch den der SCN mit der Umwelt synchronisiert wird, ist der tägliche Hell/Dunkelwechsel. Diese Lichtinformationen werden von Zapfen und Stäbchen (Aggelopoulos und Meissl, 2000) sowie von intrinsisch

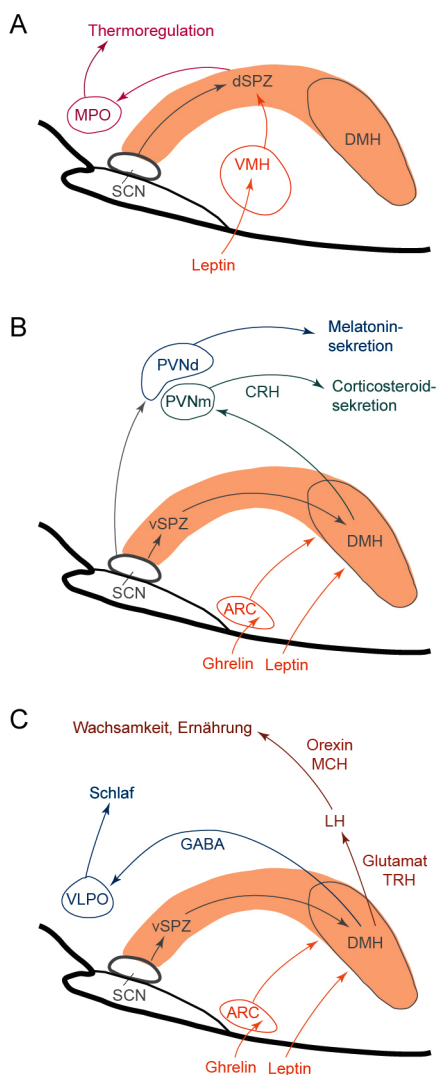


Abb. 3 Übersicht über einige efferente Verbindungen des SCN.

Ausgangs-Neurone des SCN projizieren zur subparaventriculären Zone (SPZ) des Hypothalamus, die genau ventral zum hypothalamischen *Nucleus paraventricularis* (PVH) liegt. Ein kleiner Teil dieser Neurone verlaufen von dort aus weiter zum dorsomedialen Nucleus des Hypothalamus (DMH), wo sie auch enden. Andere Verbindungen ziehen zur medialen präoptischen Region (MPO) und von dort zum PVH, bzw. vom SCN caudal zum ventromedialen Nucleus (VMH) oder auch zum *N. arcuatus* (ARC). Neurone der dorsalen SPZ spielen vermutlich eine Rolle in der circadianen Thermoregulation während die ventrale SPZ über ihre Verbindungen mit dem DMH eine Reihe von weiteren Funktionen wie die Corticosteroid-Sekretion, den Schlaf-Wach-Rhythmus, sowie die Nahrungsaufnahme reguliert. Alle diese Funktionen stehen unter einem starken circadianen Einfluss.

(verändert nach Saper *et al.*, 2005)

photosensitiven Ganglienzellen (Berson *et al.*, 2002; Rollag *et al.*, 2003) aufgenommen und über den RHT an den SCN weitergeleitet (Moore und Lenn, 1972). Der RHT projiziert hauptsächlich in den ventrolateralen Bereich (Johnson *et al.*, 1988b) und schüttet dort Glutamat (van den Pol, 1991; Castel *et al.*, 1993; de Vries *et al.*, 1993), aber auch *pituitary adenylate cyclase activating peptide* (PACAP) (Hannibal *et al.*, 1997) und Substanz P (SP) als Neurotransmitter aus (Takatsuji *et al.*, 1991; Takatsuji und Tohyama, 1993). Diese Innervation durch den RHT ist vor allem für die Synchronisation mit dem Hell/Dunkel-Rhythmus maßgeblich (Johnson *et al.*, 1988a). Indirekte Innervationen über die Raphe-Kerne (Ueda *et al.*, 1983; Bosler und Beaudet, 1985) und das *intergeniculate leaflet* (IGL) (Swanson *et al.*, 1974) tragen mit sogenannten nicht-photischen Informationen zur Synchronisation der SCN-Neurone bei (Pickard, 1989; Hastings *et al.*, 1996). Neben diesen drei afferenten Projektionen in den SCN projizieren noch eine Reihe von anderen Hirnregionen zum SCN, zum Beispiel Teile des Thalamus, des limbischen Systems und des Hypothalamus (Moga und Moore, 1997; Madeira *et al.*, 2004). Diese Projektionen sind allerdings bislang nur unzureichend charakterisiert.

Die efferenten Verbindungen des SCN zum Gehirn, die verantwortlich für die circadiane Steuerung vieler physiologischen und endokrinen Prozesse sind, projizieren direkt oder auch indirekt vor allem in weite Teile des Hypothalamus (Abb. 3), die an der Steuerung komplexer neuroendokriner Funktionen beteiligt sind (Swanson und Cowan, 1975; Abrahamson und Moore, 2001). Daneben gibt es direkte Projektionen des SCN in den Thalamus und das basale Vorderhirn (Leak und Moore, 2001). Über indirekte Projektionen wird eine Vielzahl von weiteren Gehirnregionen mit circadianen Steuersignalen versorgt. Eines der am besten untersuchten Beispiele ist die circadiane Kontrolle des Pinealorgans, dessen Hormonproduktion von endogenen, im SCN generierten Rhythmen und durch Licht reguliert wird (Wurtman *et al.*, 1963; Klein und Weller, 1970; Lynch, 1971; Moore und Klein, 1974). Diese Informationen werden im SCN generiert bzw. vermittelt und werden dann im dorsal liegenden paraventriculären Nucleus des Hypothalamus (PVN) umgeschaltet. Am Tag führt eine erhöhte GABA-Ausschüttung der Projektionsneurone zu einer Hemmung der PVN-Neurone (Roland und Sawchenko, 1993; Kalsbeek *et al.*, 1999; 2000) während der PVN in der Nacht durch Glutamat erregt wird

(Perreau-Lenz *et al.*, 2003). Vom PVN wird das Signal über die intermediolaterale Kolumne (IML) und das *Ganglion cervicale superius* (SCG) und eine sympathische Innervation zum Pinealorgan übertragen (Moore und Klein, 1974; Teclemariam-Mesbah *et al.*, 1999). Synthese und Ausschüttung des Pinealhormons Melatonin erfolgen mit einer hohen Rate in der Nacht und einer niedrigen Rate am Tag. Melatoninrezeptoren kommen in hoher Dichte im SCN vor (Vanecek *et al.*, 1987), sodass das Hormon direkt auf das circadiane System zurückkoppeln kann und dadurch die Aktivitätsphasen *in vivo* verschieben kann (Redman *et al.*, 1983; Cassone *et al.*, 1986; Lewy *et al.*, 1992). Eine direkte Wirkung von Melatonin auf die neuronale circadiane Aktivität im SCN konnte *in vitro* an isolierten Hirnschnitten bestätigt werden (Gillette und McArthur, 1995; Starkey *et al.*, 1995).

Eine weitere enge Verknüpfung besteht zwischen dem SCN und dem lateralem Hypothalamus (LH). Der LH ist ein wesentlicher Bestandteil der Kontrolle von Energie-Homöostase und Schlaf (Bernardis und Bellinger, 1993; 1996; Sakurai, 2007). Diese Funktionen haben eine starke circadiane Komponente und es konnten auch direkte Verbindungen zwischen SCN und LH (Watts *et al.*, 1987; Watts und Swanson, 1987), aber auch indirekte Verschaltungen über den dorsomedialen Hypothalamus (DMH), das mediale präoptische Areal (MPA) und die subparaventriculäre Zone (SPZ) nachgewiesen werden (Deurveilher und Semba, 2005). Eine eng umschriebene Neuronenpopulation im lateralen Hypothalamus bildet das Neuropeptid Orexin (Elias *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998), das bei der Appetitbildung und beim Schlaf/Wach-Rhythmus eine Rolle spielt. Gleichzeitig wurde dessen mRNA-Sequenz sowie das zugehörige Präpropeptid von einer anderen Forschergruppe entdeckt. Die vermeintlich daraus entstehenden Peptide wurden Hypocretin 1 und 2 genannt (de Lecea *et al.*, 1998). Diese unterscheiden sich jedoch in ihrer Struktur und Rezeptoraffinität von Orexin A und B (Smart *et al.*, 2000), trotzdem werden ihre Bezeichnungen häufig synonym gebraucht.

Orexinerge Fasern ziehen vom lateralen Hypothalamus in weite Teile des Gehirns. Einige Fasern ziehen auch in Richtung des SCN, wobei die meisten Fasern im Peri-SCN-Bereich enden (Cutler *et al.*, 1999; Date *et al.*, 1999; Nambu *et al.*, 1999). Vereinzelt können orexinerge Fasern im SCN selbst nachgewiesen werden und anscheinend wird Orexin auch im SCN freigesetzt

(Mondal *et al.*, 1999). Orexin-Rezeptoren vom OX₁-Typ sind im SCN verbreitet und können vor allem auf AVP und VIP (vasointestinales Polypeptid) exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Hervieu *et al.*, 2001; Bäckberg *et al.*, 2002). Fasern, die AVP und VIP enthalten, kontaktieren wiederum orexinerge Neurone im LH (Abrahamson und Moore, 2001; Abrahamson *et al.*, 2001). Diese enge morphologische Verknüpfung zwischen lateralen Hypothalamus und circadianen System lässt auf eine Rückkoppelung des LH auf die innere Uhr schließen. Dies lässt sich auch aufgrund eines über den Tagesverlauf schwankenden Orexin-Spiegels in der Cerebrospinalflüssigkeit vermuten (Fujiki *et al.*, 2001; Grady *et al.*, 2006). Bislang gibt es jedoch keine Untersuchungen zur Wirkung von Orexinen auf die circadiane Rhythmik.

1.3 Methoden zur Untersuchung der Signale des SCN

Zur Registrierung von circadianen Vorgängen stehen vielfältige Methoden zur Verfügung. Die einfachste und älteste Methode ist dabei das Verhaltensexperiment, da die lokomotorische Aktivität über lange Zeiträume registriert und die Einflüsse von bestimmten Zeitgebern untersucht werden können, ohne dass invasiv in den Organismus eingegriffen werden muss (Browman, 1943a; 1943b; Aschoff, 1951). Eine zweite Möglichkeit bietet die kontinuierliche Registrierung von Metaboliten bzw. humoralen Faktoren, die vom SCN-Gewebe *in vivo* und *in vitro* mit einem circadianen Rhythmus freigesetzt werden (Schwartz und Reppert, 1985; Shinohara *et al.*, 1998).

Solche Experimente lassen jedoch keine Einblicke in die Mechanismen auf Gewebe- und Zellebene zu. Die Registrierung detaillierter neuronaler Kommunikation innerhalb der circadianen Uhr benötigt elektrophysiologische Methoden, die jedoch über Zeiträume von Tagen statt von Minuten eingesetzt werden müssen.

Die ersten Aufnahmen der circadianen neuronalen Aktivität im SCN wurden mit extrazellulären Ableitungen an anästhesierten Tieren (Nishino *et al.*, 1976; Groos und Mason, 1978) erstellt, später auch *in vitro* an akuten Hirnschnitten (Green und Gillette, 1982; Groos und Hendriks, 1982; Gillette, 1986). Mit extrazellulären Mikroelektroden konnte die Entladungsrate von einzelnen Zellen oder von Zellgruppen über einen Zeitraum von etwa einen Tag aufgenommen werden. Intrazelluläre Ableitungen von akuten Hirnschnitten (z.B. *patch-clamp*-

Ableitungen) sind dagegen auf kürzere Zeitabschnitte im Minutenbereich beschränkt (Kim und Dudek, 1993). Unabhängig von der Ableitungsmethode können akute Hirnschnitte nur bis maximal zwei Tage nach der Präparation verwendet werden. *In vivo*-Versuche mit implantierten Elektroden lassen zwar etwas längere Aufnahmen zu, sogar an freilaufenden Tieren (Meijer *et al.*, 1996; Meijer *et al.*, 1997), aber die Untersuchung einzelner Zellen über mehrere Tage blieb unmöglich.

Einen Durchbruch hin zu extrazellulären Langzeitableitungen von neuronalem Gewebe stellte die Entwicklung von Multielektroden-Anordnungen (MEA/*multielectrode arrays*) dar, bei denen Gewebe direkt auf den Elektroden kultiviert wird. Die ersten Kulturschalen mit integrierten Elektroden boten bereits 30 Positionen zum gleichzeitigen Ableiten bioelektrischer Signale (Thomas *et al.*, 1972). Die Weiterentwicklung der substratintegrierten

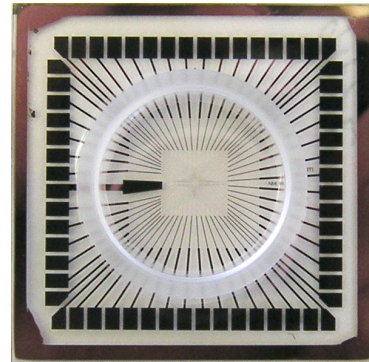


Abb. 4 MEA
MEA in Originalgröße

Elektroden (Gross *et al.*, 1977; Pine, 1980; Nisch *et al.*, 1994) ermöglichte es zusammen mit einer modernen Informationsverarbeitung, extrazelluläre Ableitungen von primären neuronalen Zellkulturen über Wochen hinweg durchzuführen (Welsh *et al.*, 1995). MEAs eignen sich aber nicht nur für kultivierte Neurone, sondern auch für akute und organotypische Hirnschnitte (Egert *et al.*, 1998; Tousson und Meissl, 2004). Die hohe Anzahl und Dichte der Neurone im Gewebsschnitt verhindert jedoch häufig, einzelne Signale zu diskriminieren und ihre neuronalen Verbindungen zu verfolgen. Das bieten bislang nur primäre Zellkulturen aus dissoziiertem neuronalem Gewebe.

Neben den in den letzten Jahren entwickelten MEA-Techniken wurden Methoden entwickelt, die auf bildgebenden Verfahren beruhen. Dazu zählt die Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentrationen (*calcium imaging*) mit Fluoreszenzfarbstoffen, die allerdings durch die hohe Phototoxizität die Untersuchung circadianer Prozesse verhindert (van den Pol *et al.*, 1992). Dies ermöglicht jedoch die Biolumineszenz-Methode. Bei dieser wird durch Kopplung des Luciferase-Gens an Promotoren der molekularen Uhr eine Analyse der Expression von Uhrengenen, beispielsweise *Per1*, auf zellulärer Ebene in Echtzeit ermöglicht. So lassen sich Phasen einzelner Zellen registrieren

(Yamaguchi *et al.*, 2000; 2001; 2003), aber die zelluläre Kommunikation der einzelnen Neurone untereinander und ihre Entladungsaktivität bleiben verborgen.

1.4 Fragestellungen

Der Nachweis der molekularen Mechanismen der biologischen Uhr im SCN war ein fundamentaler Durchbruch, führte aber zu einer ganzen Reihe von weiteren Fragestellungen. So ist beispielsweise unklar, ob es sich bei allen 20 000 SCN-Neuronen um Uhren-Neurone handelt, oder ob nur manche als sogenannte Haupt-Oszillatoren fungieren, die andere gedämpfte Oszillatoren antreiben. Zumindest wurde schon früh vermutet, dass die innere Uhr aus vielen gekoppelten Uhrenzellen besteht und die Kopplung vieler Oszillatoren die abweichenden Perioden einzelner Oszillatoren ausgleichen kann (Pittendrigh, 1961). Gleichzeitig soll gerade die Varianz der Perioden zu einem störungsresistenten, aber dennoch anpassungsfähigem Oszillatorsystem führen (Winfree, 1967; Enright, 1980; Matthews *et al.*, 1991). Das bedeutet, dass die Fähigkeit der Phasenverschiebung auf Ebene einzelner Zellen liegen muss, was bisher aber noch nicht nachgewiesen werden konnte. Es stellt sich vor allem die Frage, wie einzelne Zellen auf phasenverschiebende Stimuli reagieren und wie sich die Reaktionen auf zellulärer Ebene und im intakten Organismus unterscheiden. Ebenso sind die Hauptoszillatoren bislang nicht identifiziert und die neuronale Verschaltung innerhalb des SCN ist weitgehend ungeklärt.

Die Frage, ob die Phase eines einzelnen isolierten Neurons durch einen Stimulus verschoben werden kann, wurde am Beispiel von Melatonin untersucht. Melatonin bindet direkt an Melatoninrezeptoren im SCN und verschiebt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* im Hirnschnitt die neuronalen Aktivitätsphasen (Lewy *et al.*, 1992; Gillette und McArthur, 1995; Starkey *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1995b). Der SCN ist dabei vor allem während der Dämmerungsphasen für Melatonin empfindlich, während in den Zeiten, in denen die Melatonin-Ausschüttung des Pinealorgans hoch ist, keine phasenverschiebende Wirkung im SCN auftritt. Die Phasen-Antwortkurven sind sowohl *in situ* als auch für *in vitro* Versuche am Hirnschnitt gut untersucht und definiert. Daher bietet sich Melatonin für die Untersuchung der Phasenverschiebung auf

zellulärer Ebene an, da ein direkter Vergleich mit Versuchen am intakten Tier bzw. am Hirnschnitt möglich ist.

Ein weiteres Signal mit einer klar definierten Quelle ist Orexin A (de Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998). Dadurch, dass der SCN Orexin-Rezeptoren enthält sowie zwischen SCN und LH wechselseitige Projektionen bestehen, ist ein orexinerger Einfluss auf die innere Uhr zu vermuten. Obwohl der für das Orexin namensgebende Hunger deutlich auf die circadiane Aktivität wirkt (Challet *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 2005) und Orexin als verantwortlicher Transmitter dafür vermutet wurde (McGranaghan und Piggins, 2001), ist eine Wirkung des Orexins auf den SCN bislang nicht untersucht worden. Nur eine vorläufige Arbeit umriss die kurzfristigen Effekte von Orexin A im SCN (Farkas *et al.*, 2002). So galt es, kurzfristige Auswirkungen des Orexins auf die Entladungsrate einzelner Neurone zu untersuchen, ebenso wie langfristige Auswirkungen wie Phaseverschiebungen. Da in hippocampalen Neuronenkulturen eine Modulation der synaptischen Übertragung bereits nachgewiesen wurde (van den Pol *et al.*, 1998), war auch ein Effekt auf die Netzwerke im SCN möglich.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, waren neben der Etablierung von stabilen Zellkulturen auch auf technischer Seite Probleme zu lösen. Die Ableitungen mussten über Wochenzeiträume stabil bleiben und es musste ein steriler Mediumaustausch währenddessen gewährleistet sein. Die Applikation von Substanzen durfte dabei keine Artefakte verursachen oder die Sterilität gefährden. Da die MEA-Technik die Möglichkeit, bietet mehrere Neurone über lange Zeiträume simultan abzuleiten, sollte auch eine Methode gefunden werden die Aktivitäten im Netzwerk nachzuvollziehen.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung von Neuronen

Die Zellkulturen wurden aus isolierten SCN von zwei Tage alten Ratten gewonnen. Die Zellen wurden dissoziiert und anschließend auf beschichteten MEAs kultiviert. Die so gewonnen Zellkulturen wurden in sterilen Petrischalen bis zu ihrer weiteren Verwendung in einem Brutschrank bei 5 % CO₂/95% Luft und 37°C aufbewahrt.

2.1.1 Beschichtung

Zur besseren Anhaftung der Zellen wurden die zuvor gereinigten und mit Isopropanol (70 %) sterilisierten MEAs mit zwei Peptiden beschichtet. Zuerst wurde das Elektrodenfeld mit 10 µl wässriger Poly-D-Lysin-Lösung benetzt und 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die MEAs mit sterilem Wasser gespült und über Nacht in einer Sterilbank getrocknet.

Zwei Stunden vor der Ausplattierung wurde ein steriler Silikonring konzentrisch um das Elektrodenfeld aufgebracht. In die Aussparung des Rings wurden dann mindestens 10 µl in DMEM:F12-B-Medium gelöstes Laminin getropft. Bis zur Ausplattierung wurden die MEAs im Brutschrank aufbewahrt.

Direkt vor der Zellaussaat wurde die Laminin-Lösung abgesaugt.

2.1.2 Präparation

Für die Präparation wurden 8 - 16 neugeborene Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*) verwendet. Die Tiere wurden dekapitiert und die Oberflächen der Köpfe vor der weiteren Präparation kurz mit 70 % Isopropanol sterilisiert. Anschließend wurde die Kopfhaut entfernt und der Sehnerv mit einem Schnitt hinter das Auge durchtrennt. Der Schädel wurde vom *Foramen magnum* her mit drei Schnitten temporal und sagittal geöffnet. Das Gehirn wurde entnommen und mit der dorsalen Seite nach oben auf ein zuvor sterilisiertes Stück Parafilm gelegt. Die Sehnerven wurden dicht am optischen Chiasma mit einer Trabekularschere gekürzt. Mit einer mit EBSS benetzten Klinge wurde eine circa 500 µm dicke Scheibe coronal in Höhe des SCN herausgeschnitten. Eine autoklavierte rundgeschliffene Injektionskanüle wurde zum Herausstanzen der beiden Nuclei verwendet. Das Gewebe aller Tiere wurde mit eisgekühltem

EBSS-7 aus einer Einwegspritze in ein bis zwei auf Eis gelagerte 2 ml-Reaktionsgefäße gespült und bis zur Dissoziation aufbewahrt.

2.1.3 Dissoziation

Das ausgestanzte Gewebe wurde mit Hilfe eines „*Papain Dissociation Kits*“ (Worthington) dissoziiert. Alle Lösungen wurden gemäß der beiliegenden Anleitung angesetzt, vom Protokoll wurde in Details jedoch abgewichen.

Aus dem Reaktionsgefäß mit den Gewebestücken wurde der überstehende Puffer abgesaugt und 1,2 ml Papain-Lösung zugegeben. Die Gefäße wurden für 15 - 30 min mit einem Thermo-Schüttler bei 37°C mit hoher Frequenz (1200 U/min) bewegt. Die Suspension wurde dabei alle 5 min vorsichtig trituriert. Sobald keine Gewebestücke mehr sichtbar waren, wurde die Suspension bei 300 g für 6 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgezogen. Die übrig gebliebenen Zellen wurden in 400 µl leichter Inhibitorlösung resuspendiert. Die Suspension wurde in einem 1,7 ml-Reaktionsgefäß vorsichtig über 800 µl Ovomuroid-Lösung geschichtet, sodass ein möglichst scharfer diskontinuierlicher Gradient entstand. Die Gradientenlösung wurde danach bei 70 g für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in circa 100 µL DMEM:F12-B resuspendiert.

2.1.4 Kultivierung

2.1.4.1 Aussaat und Aufzucht

Die Menge an Zellen je Volumen Suspension wurde vor der Aussaat mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dafür wurden 2 µl Suspension mit 18 µl DMEM:F12-B verdünnt und davon je 10 µL auf die beiden Kammern verteilt. Die für die gewünschte Zelldichte erforderliche Menge an Suspension wurde dann in die Aussparung im Silikonring pipettiert. Wenn das erforderliche Volumen unter 12 µl lag, wurden bis zu 10 µl Medium vorgelegt. Zum Schutz vor Austrocknung wurden um den Silikonring herum 500 µl DMEM:F12-B verteilt.

Nach spätestens einer Stunde Standzeit im Brutschrank waren die Zellen sedimentiert und weitere 500 µl DMEM:F12-B wurden zugegeben, sodass der Flüssigkeitsspiegel im MEA kontinuierlich oberhalb des Silikonrings lag.

Nach weiteren 1,5 h wurde das Medium mit 1 ml Neurobasal A (NBA) aufgefüllt. NBA-Medium fördert das Wachstum der Neurone und hemmt gleichzeitig das Gliawachstum (Brewer, 1995). Das Medium wurde nach 24 h vollständig abgezogen und durch DMEM:F12-B ersetzt.

2.1.4.2 Dauerkultivierung

Das DMEM:F12-B-Medium der SCN-Kulturen wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht. Nach der ersten Woche in Kultur wurde anstatt Penicillin/Streptomycin als Antibiotikum Primocin eingesetzt. Die Kulturen wurden außerdem mindestens einmal wöchentlich auf pathogene Veränderungen hin kontrolliert.

2.1.5 Medien

2.1.5.1 Neurobasal A (NBA)

- 48 ml Neurobasal A
- 1 ml B27 Supplement
- 250 µl GlutaMax x100
- 500 µl Penicillin / Streptomycin

Aufbewahrung bei 4°C, vor Gebrauch auf 37°C erwärmt

2.1.5.2 DMEM:F12-B (DF12B) Brutschrank- / Kulturmedium

- 45 ml DMEM:F12
- 5 ml FBS
- 500 µl HEPES 1 M
- 500 µl GlutaMax x100
- 50 µl Ascorbinsäure
- 40 µl NaOH 5N
- 100 µl Primocin
- 500 µl Penicillin / Streptomycin (alternativ zu Primocin in der ersten Woche)

Aufbewahrung bei 4°C, vor Gebrauch auf 37°C erwärmt

2.1.5.3 DMEM:F12-R (DF12R) Versuchsmedium

- 45 ml DMEM:F12-Rv
- 5 ml FBS
- 100 µl GlutaMax x100
- 100 µl Primocin

Aufbewahrung bei 4°C

2.1.5.4 DMEM/F12-Rv (DF12Rv) Stamm-Medium

- 1 VE DMEM:F12 -NaHCO₃ Pulver
- 1,19 g HEPES
- 0,56 g NaHCO₃
- 1 l *Aqua bidest.*
- NaOH 5N

Der Ansatz wurde mindestens 30 min mittels eines Magnetrührers belüftet und dann mit NaOH 5N auf pH 7,3 - 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das Medium mit einem Vakuumfilter (PES, 0,22 µm Porenweite) sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt

2.1.6 Lösungen

Poly-D-Lysin-Stammlösung (1 mg/ml)

- 10 mg Poly-D-Lysinhydrobromid (30 – 70 kDa)
- 10 ml *Aqua bidest.* steril

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Poly-D-Lysin-Beschichtungslösung

10 µl Poly-D-Lysin-Stammlösung
140 µl *Aqua bidest.* steril

Laminin-Beschichtungslösung

7 µl Laminin in TBS-Puffer (1 mg/ml)
98 µl DMEM:F12-B

EBSS-7 (*Earl's Balanced Salt Solution* mit 7 g/l Glucose)

10 ml EBSS
100 µl HEPES 1M
112 µl Glucose 5M
8 µl NaOH 5N

Die Lösung wurde kräftig geschüttelt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

HEPES 1M

2,38 g N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure) "HEPES"
10 ml *Aqua bidest.*

Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert und aliquotiert bei 4°C gelagert.

Glucose 5M

9 g D-Glucose (wasserfrei)

Es wurde *Aqua bidest.* nachgefüllt, bis 10 ml Volumen erreicht wurden. Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert und aliquotiert bei 4°C gelagert.

Ascorbinsäure-Lösung

100 mg Ascorbinsäure
1 ml *Aqua bidest.*

Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert und aliquotiert bei 4°C gelagert.

NaOH 5N

20 g Natriumhydroxid (NaOH)

Es wurde steriles *Aqua bidest.* nachgefüllt, bis 100 ml Volumen dauerhaft erreicht wurden. Aliquots wurden bei 4°C gelagert.

2.1.7 Silikonringe

Die Silikonringe wurden aus Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt. Dafür wurde der Fertigsatz Sylgard 184 verwendet. Die Monomergrundsubstanz und der Katalysator wurden nach Anleitung gemischt und für 30 min in einem Exsikkator unter Vakuum entgast. Anschließend wurden jeweils 6 - 8 g Polymermasse in eine 100 mm-Petrischale gegossen. Die gefüllten Petrischalen wurden zum Abbinden für weitere 24 h unter Vakuum gestellt.

In die Silikonscheiben wurden mit zwei runden Hohlpunzen (Durchmesser 3 mm und 6 mm) konzentrische Schnitte gestanzt. Die entstandenen Ringe waren vollständig plan, sodass sie ohne Hilfsmittel an Glasoberflächen hafteten.

2.2 MEA-System

Im Zentrum des MEA-Systems stand die Multielektroden-Anordnung selbst. Das MEA wurde zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen und Evaporation mit einem Deckel verschlossen und in den Verstärker eingesetzt. Die verstärkten Potentiale wurden über SCSI-Kabel zu einer Analog-Digital-Wandlerkarte, die das Signal digitalisierte, in einem handelsüblichen PC geleitet. Die Software MC_Rack analysierte die Datenströme in Echtzeit und speicherte die herausgefilterten Daten auf der Festplatte.

2.2.1 MEA

Die verwendeten MEAs (Abb. 4) werden in einem photolithografischen Prozess kommerziell hergestellt (NMI, Reutlingen). Auf einem Glassubstrat werden in mehreren Schritten metallische Leiterbahnen aus einer Chrom-Gold-Legierung (alternativ Indium-Zinn-Oxid) und Titan abgeschieden. Eine Siliziumnitrid-Schicht schützt und isoliert die Leiterbahnen. Die Elektroden bestehen aus Titannitrid oder Iridium (Egert *et al.*, 1998). Auf die Glasplatte des MEA ist um das Elektrodenfeld herum ein Kunststoffring mit Innengewinde geklebt, der zusammen mit einem schützenden Deckel eine Zellkulturkammer bildet.

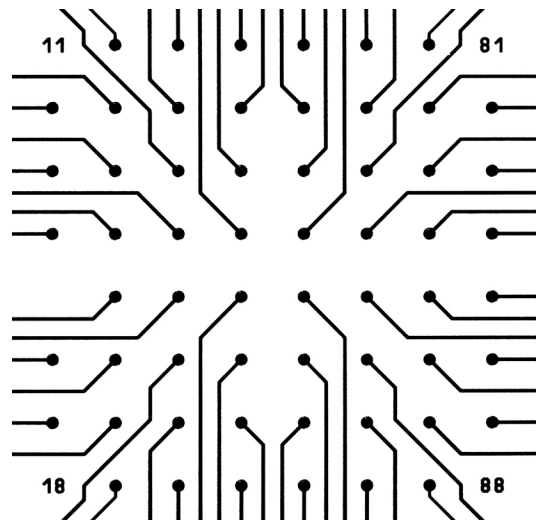


Abb. 5 Elektrodenkonfiguration in einem MEA

Die 59 Elektroden haben jeweils einen Durchmesser von 30 µm und ihre Zentren einen Abstand von 200 µm.

Die Multielektrodenplatten bestehen aus 59 Messelektroden und einer internen Referenzelektrode. Die Messelektroden sind quadratisch mit einem Abstand zwischen den Einzelelektroden von 200 µm angeordnet (Abb. 5). Der Durchmesser der Elektroden beträgt 30 µm. Durch die säulenförmige Struktur der Elektroden wird die Oberfläche allerdings erheblich vergrößert, was zu einer niedrigen Impedanz der Elektroden führt. Die Elektroden sind über Leiterbahnen mit Kontaktflächen am Rand verbunden, über die der Verstärker angebunden wird.

2.2.2 Verstärker

Der Mehrkanalverstärker vom Typ MEA1060up besteht aus einem oberen Teil mit 60 Einzelverstärkern und einem unteren Teil mit der Temperatureinheit. Der untere enthält einen Thermosensor und eine Heizfläche auf Transistorbasis, über die eine externe Kontrolleinheit die Temperatur regelt. Die Temperatur wurde bei allen Experimenten konstant auf 37°C gehalten. Das MEA wurde für den Versuch in die beiden Teile des Verstärkers eingespannt. Die Spannung wurde mit 60 vergoldeten Federkontakten von den Kontaktflächen des MEAs abgegriffen, die Signale um den Faktor 1200 verstärkt und an die Analog-Digital-Wandlerkarte ausgegeben.

2.2.3 Analog/Digital-Wandler

Die verstärkten analogen Signale wurden über ein SCSI-Kabel zur Wandlerkarte in einem Computer geführt. Es wurden zwei verschiedene Computer verwendet, die eine ME128 bzw. ME64-Karte enthielten. Die Signalqualität und Leistung der beiden Karten waren identisch; lediglich die Anzahl der Anschlüsse variierte. Zusätzlich zu den Kanälen für die MEA-Ableitung verfügten die Karten noch über drei weitere unabhängige analoge Eingänge und einen digitalen mit 16 Bit Breite. Wegen Besonderheiten des verwendeten Aufnahmeprogramms MC_Rack erwies sich der Analogeingang als weniger speicherintensiv und wurde daher für die Verarbeitung von TTL-Pulsen genutzt.

2.3 Medien- und Applikationssystem

Um die Zellkulturen während der Versuche mit Nährstoffen zu versorgen und gleichzeitig Metabolite abzutransportieren, wurden sie kontinuierlich mit frischem Medium versorgt. Dies bot auch die Möglichkeit für eine störungsfreie Applikation von Pharmaka. Der kontinuierliche Zu- und Abstrom des Mediums wurde durch eine Spritzenpumpe (WPI SP260pz) gewährleistet. Die Spritzen (50 ml) waren über sterile PEEK-Schläuche mit der Zellkulturkammer verbunden. Zwischen Pumpe und Kultur war ein Probengeber geschaltet, mit dem automatisch Pharmaka in den Mediumstrom unter vollkommen sterilen Bedingungen gegeben werden konnten. Da die Versuche nicht unter einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ durchgeführt werden konnten, wurde das Medium entsprechend modifiziert, sodass der pH-Wert auch unter Luft-Bedingungen stabil blieb.

2.3.1 Versuchsaufbau

2.3.1.1 Langzeitversuche

Sämtliche Experimente zur Phasenverschiebung erforderten stabile Bedingungen über lange Zeiträume. Für diese Versuche wurde eine Versuchskammer mit relativ großem Volumen von 1,5 ml gewählt (Makro-Perfusionskammer). Die Austauschrate bei diesen Versuchen betrug lediglich 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Unter diesen Bedingungen konnte die circadiane Aktivität der SCN-Neurone bei einem guten Präparat über mehrere Wochen registriert werden.

2.3.1.2 Kurzzeitversuche

Bei Kurzzeitversuchen sollte die Reaktion der Zellkulturen auf viele unterschiedliche Substanzen und Konzentrationen getestet werden. Daher war es wichtig, die Substanzen schnell in der gewünschten Konzentration an den Wirkungsort zu bringen, ohne dass langsame Konzentrationsgradienten die Analyse erschweren. Ebenso sollten die Substanzen schnell und zuverlässig wieder ausgewaschen werden, damit sich die Zellkultur wieder erholt. Für diesen Zweck wurde eigens eine Mikro-Perfusionskammer (Abb. 9) entwickelt, bei der das Kammervolumen deutlich verringert wurde und die Zellen direkt im Perfusionsstrom lagen. Die Kammerkonstruktion ermöglichte ein passives Auslaufen des verbrauchten Mediums. Die Austauschrate in diesen Versuchen betrug 25 $\mu\text{l}/\text{min}$.

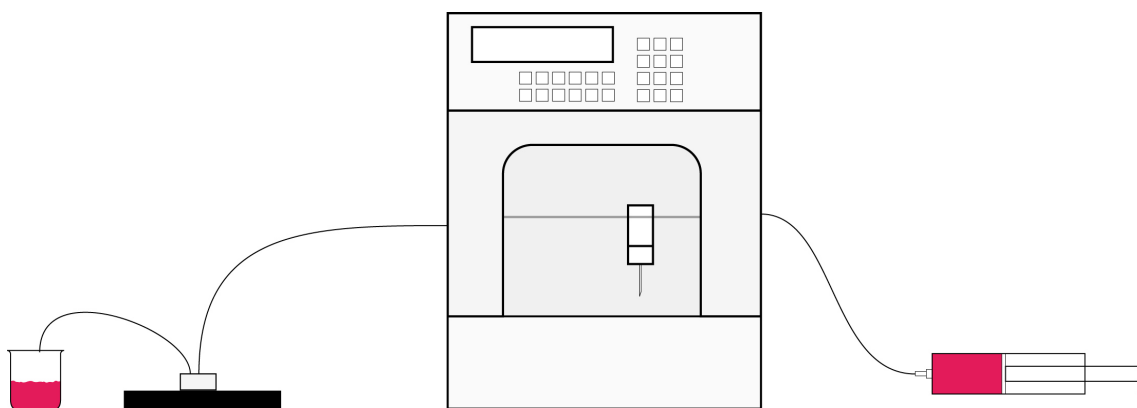


Abb. 6 Versuchsanordnung für die Mikroperfusion

Eine Spritzenpumpe befördert das Nährmedium gleichmäßig durch den Probengeber in die Mikro-Perfusionskammer. Das verbrauchte Medium wird durch einen schwachen Überdruck aus der Kammer in das Abfallgefäß geleitet.

2.3.2 Pumpen

Für alle Versuche wurden Spritzenpumpen des Typs SP260pz (so genannte *push-pull*-Pumpen) eingesetzt. Diese Pumpen haben den Vorteil, dass die Zufuhr des Mediums und das Absaugen mit hoher Präzision mechanisch gekoppelt waren und gleichzeitig erfolgten. Diese Anordnung verhinderte, dass Medium überlaufen und die Verstärker zerstören konnte. In die Pumpen wurden je Richtung zwei 50 ml-Spritzen, die jeweils miteinander verbunden waren, für die Flüssigkeitszufuhr sowie für das Absaugen eingesetzt. Die Mediumkapazität war ausreichend, um über 82 h lang eine Perfusionsrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufrechtzuerhalten.

2.3.3 Automatische Applikation von Substanzen

Bei der Applikation von Substanzen galt es, elektrische Artefakte und eine Kontamination der Kultur zu vermeiden. Die Verwendung eines Triathlon-Probengebers, der ursprünglich für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) konzipiert war, konnte diese Anforderungen erfüllen. Über den Probengeber konnten die Substanzen direkt in den Flüssigkeitsstrom injiziert werden, ohne dass die Flussgeschwindigkeit oder der Druck verändert wurden (Abb. 6). Die Lösungen wurden mit einer Nadel aus einem der Probengefäße entnommen und in eine Rohrschleife gepumpt. Die gefüllte Rohrschleife wurde zur Injektion dann in den Flüssigkeitsstrom geschaltet und die Probe kam als kompakter Bolus in der Perfusionskammer an. Die einzelnen Gefäße waren mit Septen verschlossen, um die Sterilität der Proben zu gewährleisten.

Der Probengeber war programmierbar und es konnten dadurch längere Konzentrationsreihen automatisch appliziert werden. Der Applikationszeitpunkt wurde über einen TTL-Rechteckpuls ausgegeben und an einen Analogeingang der A/D-Wandlerkarte in den PC eingelesen.

2.3.4 Makro-Perfusionskammer

Bei Langzeitexperimenten wurde die Makro-Perfusionskammer eingesetzt. Sie besteht aus dem unveränderten Standard-Zwischenring von Multichannel Systems und einem modifizierten Deckel. In den Deckel wurden zwei Kanülen für den Zu- und Ablauf des Mediums eingefügt. Die Kanülen waren so bemessen, dass die zuführende Kanüle immer unterhalb der absaugenden Kanüle endete. Beide Kanülen waren am unteren Ende leicht angeschrägt und

etwa 1,5 mm eingekerbt. Dadurch wurde verhindert, dass bei einem Flüssigkeitspegel unterhalb der Kanüle durch Oberflächenspannung noch weiter Medium abgesaugt werden konnte. Der Flüssigkeitsspiegel wurde zu Beginn eines Versuches auf etwa 1,5 ml eingestellt. Dieses Volumen blieb auch über wochenlange Zeiträume konstant. Aufgrund des relativ großen Flüssigkeitsvolumens in der Versuchskammer wurden die applizierten Substanzen um den Faktor 30 verdünnt, was bei der Probenaufgabe berücksichtigt wurde.

2.3.5 Mikro-Perfusionskammer

Bei der Durchführung von Konzentrationsreihen war es wichtig, die gewünschte effektive Konzentration möglichst schnell zu erreichen und die Substanzen schnell wieder auszuwaschen. Die Makro-Perfusionskammer war dafür ungeeignet, weil die Substanzen nur sehr langsam verdünnt wurden und auch wieder sehr langsam ausgewaschen wurden.

Dieses Problem wurde mit einer neu entwickelten Kulturkammer gelöst, die ein sehr niedriges Volumen bei einer hohen Austauschgeschwindigkeit aufwies. Das Medium strömt dabei weitgehend linear in der Endkonzentration über die Kultur und wurde kaum zusätzlich verdünnt. Strömungsartefakte wurden durch die Konstruktion weitgehend unterbunden. Die Strömungsgeschwindigkeit selbst hatte keinen Einfluss auf die neuronale Aktivität. Auch eine plötzliche Änderung der Perfusionsrate auf 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ wirkte sich nicht auf die Zellen aus, ebensowenig wie ein 10 min Stillstand der Perfusion.

2.3.5.1 Entwicklung

Die Entwicklung der Kulturkammern war einer der wichtigsten Faktoren für die pharmakologischen Versuche und wird daher hier kurz beschrieben (Abb. 52 auf Seite 134). Ein wesentlicher Faktor war dabei die Verringerung des Flüssigkeitsvolumens und die Lenkung des Mediumstromes. Dazu wurde besonders der Raum

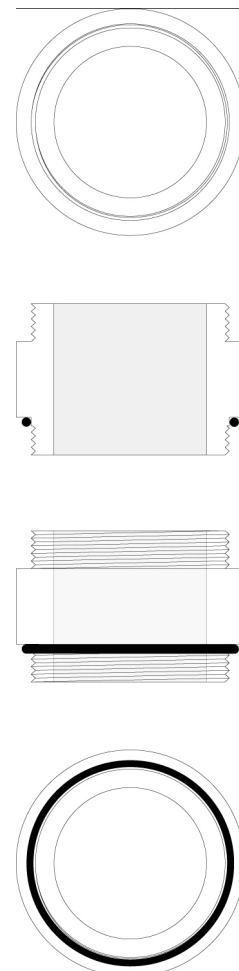


Abb. 7 Zwischenring
Maßstab 1:1

der Kulturkammer, der sich direkt über den Elektroden befand, neu gestaltet. Da Veränderungen am MEA selbst schwierig gewesen wären, wurde nur der Kulturaufsatz neu entwickelt.

Um einen dichten Abschluss zwischen Kammer und MEA zu gewährleisten, wurde die Kammer in einen Stempel gesetzt und von oben aufgedrückt. Der Stempel wurde von einem Zwischenring (Abb. 7) geführt, der in das Gewinde des MEAs geschraubt wurde. Der Anpressdruck wurde von einer Überwurfmutter (Abb. 8) stabil gehalten.

Die ersten Stempel waren aus Makrolon geätzt, einem klaren, harten und temperaturstabilen Polycarbonat. Bei den ersten Prototypen wurde versucht, das Medium dicht über die Kultur zu leiten.

Dafür wurden flache runde Aussparungen in die Stempel geätzt. Ein 2 mm-starker O-Ring um die Aussparung herum dichtete die Kammer ab. Am Rand der Aussparungen lagen sich Zu- und Abfluss gegenüber und der Coanda-Effekt sollte durch die Aufweitung des kreisförmigen Innenraums die Scherkräfte durch den Mediumstrom reduzieren. Das Problem dieser Konstruktion waren kleine Luftblasen, die innerhalb der Kammer an kleinsten Graten entstanden. Die Luftblasen riefen massive elektrische Störungen hervor, wenn sie in der Nähe der Elektroden auftraten. Sie konnten außerdem zum Austrocknen der Zellen führen, wenn sie sich direkt über der Kultur absetzten, oder sie konnten sogar den Zellfilm vollkommen von der MEA-Oberfläche abreißen. Eine engere Kammer mit einer größeren lichten Höhe konnte zwar das Problem festsitzender Luftblasen verbessern, jedoch entstanden weiterhin große Blasen, die zu erheblichen Störungen führten. Zwei seitliche Mediumzuführungen mit einem Abzugskamin über der Kultur konnten die Luftblasen besser von der Kultur fernhalten, aber die Zuführungen selbst verstopften sich durch Luftblasen.

Da die meisten Probleme der Mikro-Perfusionskammern auf der Bildung von Luftblasen an Graten beruhten, wurde versucht, diese zu glätten. Ein mechanisches Polieren war wegen der komplexen und kleinen Formen nur

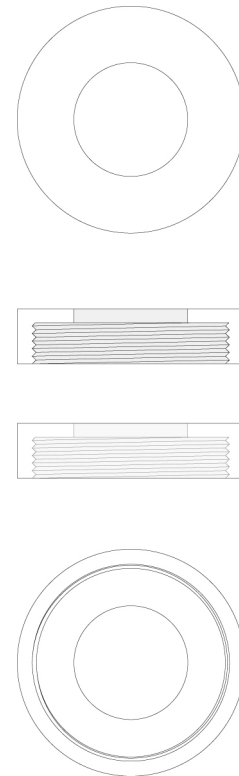


Abb. 8 Überwurfmutter
Maßstab 1:1

unzureichend möglich und auch eine Lackierung des Materials erwies sich als unmöglich. Erst durch die Verwendung von anderen Materialien und Fertigungstechniken, die eine sehr glatte Oberfläche bildeten, konnte die Blasenbildung unterdrückt werden. Die eigentliche Kammer wurde jetzt aus Polydimethylsiloxan (PDMS) in einen Stempel aus Polyethersulfon eingegossen. Ein weiterer Vorteil der Kammer aus PDMS zeigte sich darin, dass die Unterseite des Stempels selbstdichtend und dadurch den vorher verwendeten O-Ringen überlegen war.

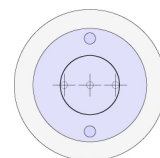
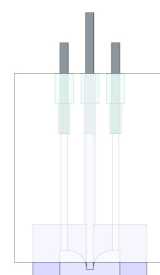
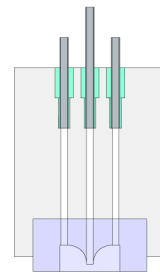
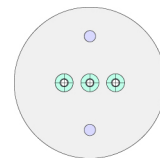
2.3.5.2 Endgültige Form

Als am wenigsten störungsanfällig offenbarte sich schließlich eine Kammerkonstruktion aus PDMS, die vor jedem Versuch neu in einen Stempel aus Polyethersulfon eingegossen wurde.

Folgende Bauform erwies sich schließlich als besonders geeignet. Sie war robust und schonend für die Zellkulturen und es trat kaum eine Blasenbildung auf (Abb. 9): Die runde Kammer hatte einen Innendurchmesser von 8 mm und eine lichte Höhe von 3,5 mm. Der Mediumestrom war zentral auf die Kultur gerichtet. Er wurde durch eine 1 mm weite Röhre geführt, die 1 mm über der Kultur endete. Die Begrenzung der Zuführung ragte in die Kammer hinein und verjüngte sich nach innen viertelkreisförmig (Radius = 2,5 mm). Zwei Abflüsse leiteten das Medium am oberen äußeren Rand aus der Kammer. Die Mediumleitungen führten durch den Polyethersulfon-Stempel, in den oben drei Kanülen eingeklebt waren, die später den Anschluss für die Schläuche bildeten. Alle drei Kanülen waren außerhalb leitend verbunden und über den Verstärker geerdet.

2.3.5.3 Herstellung

Die Stempel wurden aus massiven Polyethersulfon-Stangen gedreht. Die Gussnegative waren aus Delrin gefertigt und anschließend mit Polierscheiben geglättet. Aussparungen für die Zuleitungen wurden durch die Bohrer



**Abb. 9 Stempel:
finale Version**
Maßstab 1:1

freigehalten, mit denen zuvor die Leitungen durch den Stempel gebohrt wurden. Die Innenseite der Kammer wurde aus PDMS (Sylgard 184) gegossen. Dafür wurde das Negativ mit einer gesättigten Lösung aus Vaseline in Aceton als Trennschicht benetzt. Nach dem Abtrocknen des Acetons wurde das Negativ in den Stempel geführt und die beiden Teile an der Stoßfuge mit Klebeband abgedichtet. Eine frisch angesetzte Silikon-Katalysatormischung wurde 30 min im Exsikkator entgast und anschließend mit Einwegspritzen und -kanülen durch den Zuführkanal in die Kavität gepresst. Eventuelle Luftblasen wurden durch den Entlüftungskanal mit überschüssiger Silikonmasse herausgespült. Das Silikon wurde zum festeren Abbinden bei 60°C für mindestens 8 h in den Wärmeschrank gestellt. Das fertige Werkstück wurde nach der Entfernung von Negativ, Klebeband und eventuellen Graten gründlich mit Isopropanol gereinigt und sterilisiert.

2.4 Programme und Skripte

2.4.1 MC_Rack

Die Signalwandlerkarte wurde mit der Software MC_Rack angesteuert. Das Programm war so strukturiert, dass mit virtuellen Geräten komplexe Versuchsaufbauten aufgestellt werden konnten. Der Aufbau bestimmte, wie einzelne Datenströme weiterverarbeitet und gespeichert wurden. Kernstück eines jeden Versuchsaufbaus war die Wandlerkarte, an die dann weitere virtuelle Geräte angeschlossen wurden. Die Wandlerkarte war immer auf eine Aufnahmefrequenz von 32 kHz eingestellt und einen Eingangsbereich von 410 μ V. Die Auflösung war auf 16 Bit festgelegt. An die Karte war erst ein Tiefpassfilter (8 kHz) und dann ein Hochpassfilter (300 Hz) angeschlossen, beides Butterworth-Filter zweiter Ordnung. Die Filter bearbeiteten die Rohdaten der MEA-Elektroden und reichten sie an einen Signaldiskriminator (*spikesorter*) weiter. Der Diskriminator erkannte Potentialänderungen (*spikes*), die eine zuvor gewählte Schwelle überschritten. Die Schwelle wurde meist auf ein fünffaches der Signal-Standardabweichung gesetzt. Von jeder Schwellenüberschreitung wurden der Zeitpunkt sowie ein 3 ms-Ausschnitt des Signals gespeichert, der von 1 ms vor bis 2 ms nach der Auslösung reicht. An den Diskriminator war ein Analysator angeschlossen, der die Anzahl der Ereignisse je Zeitintervall (*Spikerate*) zählte. Standardmäßig wurde in 1 min oder 10 s-Intervallen die

Häufigkeit in Hertz gemessen. Die gemessenen Werte wurden an eine Anzeige (Display) weitergegeben, die die Überwachung während des Versuchs ermöglichte. Der Aufbau aus Diskriminator, Analysator und Anzeige wurde meist zweimal parallel an den gefilterten Datenstrom angeschlossen, je einmal für positive und negative *spikes*. Ein dritter Aufbau dieser Art registrierte die TTL-Pulse des automatisierten Probengebers.

Gespeichert wurden die einzelnen Ausschnitte mit ihren Zeitstempeln im proprietären Dateiformat MCD (*Multichannel Data*) in jeweils 4 h langen Segmenten. Die Daten der Analysatoren konnten erst nach Beendigung der Aufnahme aus der Anzeige heraus exportiert werden. Diese *Spikeraten* wurden im ASCII-Format in DAT-Dateien gespeichert.

2.4.2 Spike2

Für die nachträgliche Analyse der neuronalen Aktivität wurde das Programm Spike2 verwendet. Neben vielen bereits implementierten Funktionen konnte es auch durch eine eigene Skriptsprache erweitert und automatisiert werden. Die Skriptfähigkeit ermöglichte es, die große Datenmenge nach Abschluss der Versuche zu analysieren. Die selbst geschriebenen Skripte wurden hauptsächlich für den automatisierten Dateimport, nachträgliche Ermittlung der *Spikerate*, Kreuzkorrelationen und Korrelationskarten entwickelt.

2.4.2.1 Importscrip mcd2smr

Spike2 kann selbst nicht das originäre Dateiformat MCD bearbeiten, verfügt aber über eine Importbibliothek, die aus MCD-Dateien das eigene Format SMR erstellen kann. Abhängig von der Ereignisdichte ist dieser Prozess langwierig (teilweise ein Mehrfaches der Echtzeit). Da es keine Stapelverarbeitungsfunktion gab, musste diese entwickelt werden. In einer späteren Neuentwicklung wurde über eine Kontrollfunktion die gleichzeitige Bearbeitung eines einzelnen Dateiordners durch mehrere Prozesse bzw. Computer hinzugefügt.

Das Skript erfragte über die Benutzeroberfläche die Ordnerpfade für die einzulesenden MCD-Dateien und den zukünftigen Speicherort der SMR-Dateien. Der Hauptprozess enthielt zwei Funktionen in einer Schleife. Die erste Funktion verglich anhand der Dateinamen, welche Dateien noch nicht bearbeitet wurden und gab die alphanumerisch erste unbearbeitete Datei an die

Funktion zum Import weiter. Der Erfolg der Funktion wurde in der Log-Datei vermerkt. Die Schleife und das Skript endeten, wenn keine unbearbeitete Datei mehr gefunden wurde.

2.4.2.2 X3-Batch

Aus verschiedenen Vorstufen ist das X3-Batch-Skript hervorgegangen. Es war ursprünglich für die Stapelverarbeitung von Kreuzkorrelationen vorgesehen, wuchs aber zu einer Sammlung verschiedener teils experimenteller Funktionen an. Über eine Werkzeugleiste konnten die Parameter der verschiedenen Module eingestellt werden. Die wichtigste Funktion des Skripts war, die Kanalbezeichnungen zu editieren und zu vereinheitlichen. Nur Dateien mit den angepassten Kanalbezeichnungen konnten von den anderen Modulen und Skripten verwendet werden. Die Module zur Berechnung von Kreuzkorrelationen und Interspikeintervall-Histogrammen waren jedoch auf die Anwendung über die gesamte Dateilänge limitiert, was unter anderem zur Entwicklung des Nachfolgeskripts xCorrMap führte. Außerdem war ein Modul enthalten, um die *Spikerate* über alle Dateien hinweg zu ermitteln. Weitere Module enthielten Filter, Exportfunktionen und experimentelle Werkzeuge für die Schablonen-gestützte Sortierung von *spikes*, kontinuierliche Berechnung der Interspikeintervalle und ihres Variationskoeffizienten.

2.4.2.3 xCorrMap

Die Korrelationskarten wurden von einem eigenen Skript berechnet. Die Berechnung der Korrelationen war zeitaufwendig und ergab sehr große Datenmengen. Die Auswertung wurde daher in mehrere Schritte unterteilt. Die Visualisierung der Ergebnisse wurde in ein zweites Skript ‚ReadOutBinary‘ ausgelagert. Die wesentlichen Daten der Korrelationen wurden in einer selbst entwickelten Binärdatei gespeichert (XCM-Dateien siehe 2.4.2.5, Seite 27). Dadurch war es auch möglich, die großen Datenmengen aus dem RAM bzw. dem virtuellen Arbeitsspeicher schnell wieder zu entfernen.

Der Hauptprozess enthielt hauptsächlich einige Globalvariablen mit ihren Standardeinstellungen und einen Dialog, um diese einzustellen. Alle anderen Operationen waren modular in einzelne Funktionen unterteilt. Kern dieser Struktur war die Stapelverarbeitungsfunktion, die erst die Anzahl und Namen aller Kanäle, sowie die Aufnahmezeiträume der eingegebenen SMR-Dateien

auslas. Diese Informationen flossen dann in die Erstellung des Dateikopfes der XCM-Datei ein. Für jeden einzelnen untersuchten Zeitabschnitt wurde anschließend von einer Schleife die eigentliche Funktion zur Errechnung der Kreuzkorrelogramme aufgerufen. Diese Funktion führte Korrelogramm-Berechnungen für jede mögliche Kanalkombination einmal aus. Die Korrelogramme wurden an die Funktion zur Filterung weitergereicht, welche die Korrelogramme nichtkonservativ bearbeitete. Für jede Kombination aus Kanälen wurden in eigenen reellwertigen Matrices folgende Maße abgelegt: die Latenz, die Höhe der Spitze, der Mittelwert aller Intervalle des Korrelogramms und die Anzahl der Ereignisse. Anhand dieser Werte wurde gemäß der gesetzten Schwellenwerte ermittelt, ob eine zeitliche Abhängigkeit vorlag oder nicht, und das Ergebnis ebenfalls in einer Matrix gespeichert. Diese Matrices wurden zusammen mit dem Beginn der Korrelogramme (relativ zum Beginn des Versuchs in s) in die XCM-Datei geschrieben.

2.4.2.4 ReadOutBinary

Die XCM-Dateien, welche in binärer Form die einzelnen Aspekte der Latenzkarten (siehe 2.5.3.2, Seite 36) als Matrices enthielten, konnten mit dem Skript ReadOutBinary ausgelesen werden. Das Skript bestand im globalen Teil lediglich aus einem Dialogaufruf, über den die Exportfunktionen eingestellt wurden, und einer Stapelverarbeitungsfunktion, die die XCM-Datei auslas und blockweise exportierte. Dabei gab es die zwei Varianten, die einzelnen Karten zu exportieren oder ihre Veränderungen über die Zeit auszuwerten. Bei ersterer Variante wurden im Spike2-eigenen SXY-Format Symbole in verschiedenen zweidimensionalen Ebenen so angeordnet, dass Latenzkarten abgebildet wurden (siehe 2.5.3.2, Seite 36). Diese Karten konnten dann im SXY-Format gespeichert oder als Metadatei exportiert werden (EMF oder WMF). Weil die Anzahl gleichzeitig darstellbarer Farben in SXY-Dateien auf 64 begrenzt war, wurde eine Funktion geschrieben, die mehr Farbwerte zuließ. Diese Funktion speicherte die Informationen aus den Latenzkarten als ASCII-Text so ab, dass sie von SigmaPlot als 24 Bit-Farbe interpretiert werden konnten.

Die zweite Variante verfolgte die Veränderungen zwischen den einzelnen Karten und protokollierte sie ebenfalls im SXY-Format. Neben der sich ändernden Gesamtzahl von zeitlichen Abhängigkeiten wurden auch neu gebildete und abgebrochene Korrelationen gezählt. Dafür wurden Matrices aus

Wahrheitswerten, die die Signifikanz der Abhängigkeit während benachbarter Zeiträume enthielten, elementweise verglichen. Für Vorzeichenwechsel wurden die Matrices aus Latenzzeiten verglichen. Alle Werte konnten außer im SXY-Format auch als Metadatei oder ASCII-Tabelle gespeichert werden.

2.4.2.5 XCM-Dateistruktur

Die Struktur der XCM-Dateien gliederte sich in einen Dokumentkopf (Header) und einen repetitiven Teil (Sweep Block), der die Daten aller Messungen zu einem Zeitpunkt enthielt. Die Elemente wurden in den Tabellen mit ihren Namen im Skript benannt, um Unklarheiten zu vermeiden.

Der Dateikopf enthielt hauptsächlich Informationen über die Berechnungsparameter der ihm zu Grunde liegenden Korrelogramme und der einzelnen Elektroden, war aber auch notwendig, um die Positionen der einzelnen Blöcke zu errechnen. Zu den reinen Zusatzinformationen gehörten der erfasste Zeitrahmen der Korrelogramme (FrameSize), die Intervallweite der Korrelogramme (Binwidth) und der optionale Abstand zwischen einzelnen Zeitrahmen (IFI). Die Positionen der einzelnen Blöcke errechneten sich aus der Länge des Dateikopfes (HeadSize%) und der Anzahl an Kanälen (Channels%). Die Menge der folgenden Blöcke wurde in der Ganzzahl Sweeps% festgehalten. Der Vektor cNum%, der die Kanalnummern nach dem für Spike2 typischen Schema auflistet, hatte nur technische Bedeutung. Die Auflistung der Kanalnamen in einem Zeichen-Vektor (String-Vektor) war notwendig, um die Latenzkarten zu erstellen, da die Namen auch die Position der Elektroden kodierten.

Header

Element	Variablentyp	Größe	Startposition
Channels%	integral	4 B	0
HeadSize%	integral	4 B	4
Sweeps%	integral	4 B	8
FrameSize s	reell	8 B	12
Binwidth	reell	8 B	20
IFI	reell	8 B	28
cNum% [n+1]	integraler Vektor	$(n+1) * 4$ B	$36 + ((n+1)) * 4$
ChList\$ [n+1]	Zeichen-Vektor	$n * (4+1) + ?$ B	$36 + ((n+1)) * 4$ $+ n * (4+1) + ?$

n = Anzahl der Kanäle

Im Anschluss an den Dateikopf folgten die einzelnen Datenblöcke. Jeder Datenblock begann mit dem Startzeitpunkt des analysierten Zeitrahmens (FrameStart) und wurde von sechs reellwertigen Matrices gefolgt. Alle Matrices enthielten in den Vektoren [0][1:] und [1:][0] die zugehörige Kanalnummer, in [0][0] war nochmals die Anzahl aller Kanäle eingetragen. Die in den Korrelogrammen ermittelten Werte wurden wie in einer Tabelle in den Matrices gespeichert. Aus den Korrelogrammen wurden die Latenz (LatencyMap), die Anzahl an Ereignissen (AbundanceMap), der Mittelwert der Histogrammintervalle (MeanMap) sowie die Amplitude (PeakMap) gespeichert. Ein positiver Wert in der ViabilityMap bezeichnete, dass in dem Korrelogramm eine positive zeitliche Abhängigkeit gefunden wurde. Ein Wert unter null in dieser Matrix, sowie ein verzeichneter Tiefpunkt des Korrelogramms (TroughMap) sollten eine negative zeitliche Abhängigkeit abbilden. Diese Möglichkeit wurde vorbereitet, jedoch nicht implementiert.

Sweep Block

Element	Variablentyp	Größe
FrameStart	reell	8 B
LatencyMap [n+1] [n+1]	reelle Matrix	$8 * (n+1)^2$ B
AbundanceMap [n+1] [n+1]	reelle Matrix	$8 * (n+1)^2$ B
MeanMap [n+1] [n+1]	reelle Matrix	$8 * (n+1)^2$ B
PeakMap [n+1] [n+1]	reelle Matrix	$8 * (n+1)^2$ B
TroughMap [n+1] [n+1]	reelle Matrix	$8 * (n+1)^2$ B
ViabilityMap [n+1] [n+1]	reelle Matrix	$8 * (n+1)^2$ B

n = Anzahl der Kanäle

2.4.3 SerialCosinor

Das Programm SerialCosinor ist eine Spezialanwendung für statistische Analysen von periodischen Daten. Es wurde zur Bestimmung von Perioden und Phasen in den *Spikeraten* der einzelnen SCN-Zellen eingesetzt. Hauptsächlich wurde hierbei die Berechnung von Periodogrammen nach Lomb und Scargle (Lomb, 1976; Scargle, 1982) sowie die einfache Cosinus-Anpassung (Nelson *et al.*, 1979; Bingham *et al.*, 1982) genutzt.

Die Werte der Periodogramme waren die Grundlage für die Phasenbestimmung durch die einfache Cosinus-Anpassung. Die resultierende Cosinusfunktion wurde dann für die Berechnung der Phasenverschiebung genutzt.

Die Daten mussten in einzelnen ASCII-Tabellen importiert werden, die im Dokument bereits eine Angabe über die Messungen je Zyklus und die Zyklen selbst enthielten. Diese Tabellen wurden mit Hilfe einer Excel-Vorlage erstellt, die die Abschnitte aus den Rohdaten extrahierte und vorformatierte.

2.4.4 Excel

Für viele Berechnungen wurde vorzugsweise Excel verwendet, da es viele mathematische Funktionen bot, um tabellarische Daten zu bearbeiten. Hauptsächlich wurde es für die Berechnung von Kurzzeiteffekten und Phasenverschiebungen eingesetzt, sowie um Daten für den Import in SerialCosinor, SigmaStat und SigmaPlot vorzubereiten.

Die Kurzzeiteffekte wurden durch eine Verknüpfung von Datenbankfunktionen aus den tabellarischen *Spikeraten* ausgelesen. Einstellungen zu Messzeitraum, Applikationsdauer und -Latenz wurden dann in einer Maske eingetragen und konnten so flexibel angepasst werden. Die Resultate wurden dann automatisch auf eigenen Tabellenseiten zusammengefasst und waren damit fertig für den Export. Die Filterung der Daten anhand von Schwellenwerten (Mindestaktivität und Stärke der Veränderung) konnte mit einer weiteren Vorlage gelöst werden.

Für die Berechnung der Phasenverschiebungen wurde ähnlich vorgegangen. Durch Einstellungen in einer Maske wurden die zuvor ermittelten Parameter der Cosinusfunktionen, des untersuchten Kanals und des Zeitraums eingegeben. Anhand dessen errechneten sich der relative circadiane Zeitpunkt der Applikation und die Phasenverschiebung.

2.4.5 SigmaStat

Mit Ausnahme der statistischen Methoden zur Periodik-Berechnung wurden sämtliche anderen statistischen Methoden mit SigmaStat (Systat Software) durchgeführt. Die verwendeten Methoden waren namentlich Rangkorrelation nach Spearman, z-Test und Kruskal-Wallis-Test zusammen mit dem *post-hoc* Test nach Dunn.

2.4.6 SigmaPlot

Sämtliche Graphen, die abgebildet sind, wurden mit SigmaPlot (Systat Software) produziert. Die den Abbildungen zugrunde liegenden Daten wurden

aus anderen Anwendungen importiert und häufig in vorbereitete Vorlagen eingefügt. Die Graphen wurden im Regelfall als Rastergrafik (JPG) exportiert und mit Photoshop zugeschnitten. Sehr große zusammengesetzte Latenzkarten wurden in Vektorformaten (WMF, EMF) exportiert und mit Illustrator gesetzt.

2.4.7 Autostitch

Übersichtsbilder von Zellkulturen, die aus vielen einzelnen Aufnahmen bestanden, wurden mit Hilfe von Autostitch (University of British Columbia) zusammengefügt. Alle Einstellungen waren auf minimalen Qualitätsverlust hin optimiert. Der Zuschnitt der teilweise sehr großen Bilder erfolgte mit Photoshop.

2.4.8 Illustrator

Mit dem Vektorgrafikprogramm Illustrator (Adobe Systems) wurden alle Abbildungen erstellt, die viele oder komplexe Elemente enthielten. Darunter sind die Konstruktionszeichnungen und Schemata. Fertige Bilder wurden immer als Rasterbild exportiert und teilweise mit Photoshop zugeschnitten.

2.4.9 Photoshop

Rasterbilder wurden mit Photoshop (Adobe Systems) bearbeitet. Bei den hier gezeigten Abbildungen wurden Zuschnitt und Auflösung angepasst sowie teilweise Beschriftungen und Anordnungen gesetzt.

2.5 Auswertung und Statistik

2.5.1 Rhythmik

Um die Auswirkungen von Substanzen auf die circadiane Rhythmik zu überprüfen, mussten zuvor Periode und Phase festgestellt werden. Unter natürlichen Umständen sind circadiane Rhythmen am Tagesverlauf ausgerichtet und mit ihm synchronisiert. Das bedeutet, dass die Periode genau einen Tag lang ist. Da Licht der wichtigste Zeitgeber für die meisten Tiere ist, wird der Verlauf eines Tages hauptsächlich durch die Lichtverhältnisse synchronisiert (Aschoff, 1954). Die Zeitgeberzeit (ZT) definiert den Beginn des Tages (Licht an) als ZT 0 und die Länge des Tages (Periode) auf 24 h. Gibt es keinen festen Zeitgeber zur Synchronisation, sind die Rhythmen freilaufend. Das bedeutet auch, dass die Tagesperiodik in den meisten Fällen von den idealen 24 h abweicht (Aschoff, 1951). Bei einem fehlenden Bezugspunkt zur

Umwelt wird die individuelle Tageszeit als circadiane Zeit (CT) angegeben. Ein Zyklus ist dann auf 24 h normiert. Da die einzige messbare circadian abhängige Größe der SCN-Zellen ihre zyklische Änderung der Entladungsrate war, wurde sie zur Bestimmung der Applikationszeitpunkte in CT herangezogen. Das Maximum der Entladungsrate ist in intakten Tieren und akuten Gehirnschnitten *in vitro* zwischen ZT 6 und ZT 7 (entspricht 12:00 - 13:00) erreicht (Prosser und Gillette, 1989). Äquivalent dazu wurde der ermittelte Hochpunkt der Aktivität auf CT 6 festgelegt (Liu und Reppert, 2000).

Zur Berechnung von Phasenverschiebungen, wurden die *Spikeraten* über 72 h vor der Applikation und 24 h nach der Applikation über mindestens 48 h verwendet. Die Intervallweite der Datenreihen betrug 1 min. Mit einem Lomb & Scargle-Periodogramm (Lomb, 1976; Scargle, 1982) wurde die Periode der Aktivität bestimmt. Voraussetzung für eine weitere Verwendung war, dass das Periodogramm ein einziges Maximum zwischen 19 und 29 h aufwies mit einer Kraft von über 600. Außerdem musste sich der Hochpunkt über dem Signifikanzniveau von $P = 0,001$ befinden. Die so ermittelte Periode wurde als Grundlage für eine einfache Cosinus-Anpassung (Nelson *et al.*, 1979; Bingham *et al.*, 1982) genommen. Die Hochpunkte der resultierenden Cosinusfunktion wurden dann als CT 6 definiert. Die subjektive Applikationszeit errechnete sich aus dem Zeitpunkt der Injektion abzüglich des letzten Cosinus-Scheitelpunktes, multipliziert mit dem Quotienten aus Periode und 24 h, zuzüglich der Phasenkorrektur von 6 h. Die Phasenverschiebung ergab sich aus dem Abstand zwischen dem ersten Hochpunkt der Referenzkurve 24 h nach der Applikation und dem nächstgelegenen Hochpunkt der verschobenen Phase.

2.5.2 Kurzeffekte

Die Effekte von Kurzzeitversuchen wurden mit datenbankbasierten Funktionen in vorbereiteten Excel-Berechnungsvorlagen ausgewertet. Dafür wurden die *Spikeraten* in 10 s-Intervallen gemessen und als ASCII-Tabelle importiert. Um die Stärke des Effekts zu bestimmen, wurden die Mittelwerte der Entladungsrate eines 4 min-Zeitfensters nach der Applikation mit einem 5 min-Zeitfenster vor der Applikation verglichen. Ein Abstand von 3 min zwischen den beiden Zeitfenstern vermied die Einbeziehung von Übergangszuständen. Weil die Pharmaka über die Mediumzuleitung Bad-appliziert wurden, gab es eine technische Latenz zwischen der Injektion und der Ankunft der Substanz in der

Mikro-Perfusionskammer. Die Latenz betrug abhängig vom Volumen der Zuleitung 8-13 min. Die Berechnung wurde um die Latenz korrigiert.

In die weitere Verwertung gingen nur die Messungen ein, bei denen die *Spikerate* während der Applikation nicht einem Trend folgte, der schon zum Referenzzeitpunkt bestand. Des Weiteren wurden nur Messungen zugelassen, wenn die mittlere Entladungsrate zur Referenzzeit über 0,2 Hz lag. Veränderungen der *Spikerate* ab 20 % wurden als exzitatorisch bzw. inhibitorisch kategorisiert. Vergleiche zwischen Vehikel-Applikationen mit einer zufällig gesetzten Reihe von Messpunkten während eines applikationsfreien Zeitraums zeigten keinerlei signifikante Unterschiede (Abb. 10).

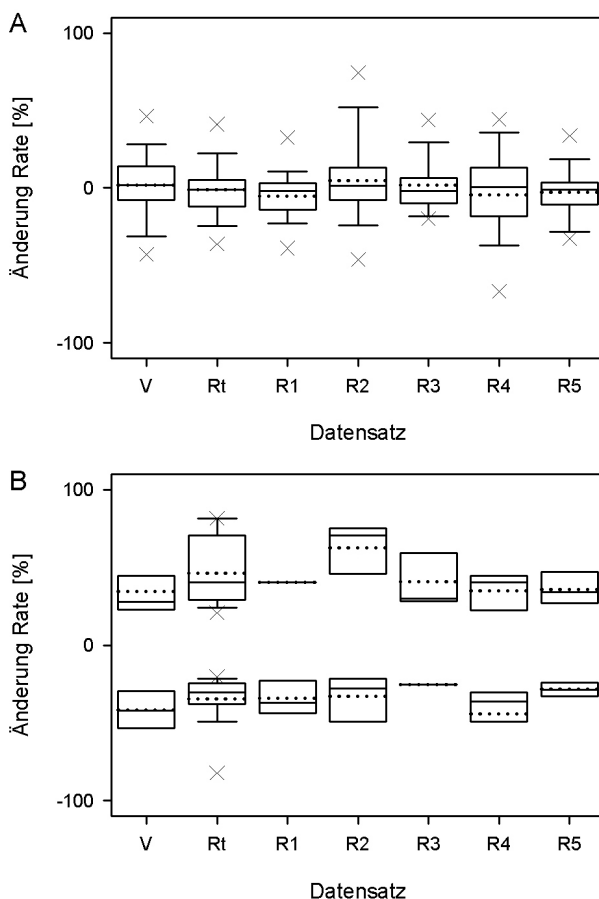


Abb. 10 Randomisierte Daten versus Vehikel

Die Effekte sind als Kastendiagramme dargestellt. Die Kästen geben den Interquartilsabstand wieder. Der Median ist als durchgezogene und der Mittelwert als gepunktete Linie dargestellt. Die Antennen bezeichnen die 0,1 und 0,9-Perzentile, die Kreuze die 0,05 und 0,95-Perzentile. In Abbildung **A** wurden alle SCN-Neurone in die Berechnung mit einbezogen; in **B** nur diejenigen Neurone, die mindestens eine 20-prozentiger Veränderung der *Spikerate* aufwiesen. Dabei wurden exzitatorische und inhibitorische Antworten getrennt voneinander betrachtet.

Echte Vehikel-Applikationen (V) wurden mit einer Pseudo-konzentrationsreihe (R1-5) verglichen. Diese Reihe wurde zu einem zufälligen Zeitpunkt in den Datensätzen simuliert. Vehikel, die Reihe sowie die Gesamtheit der randomisierten Daten (Rt) zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test).

2.5.3 Korrelationen

Neuronale Entladungen können in vielen Regionen des zentralen Nervensystems spontan entstehen oder durch Reizweiterleitung über chemische oder elektrische Synapsen von einem Neuron auf das andere übertragen werden. Ebenso kann durch inhibierende Synapsen die Entladung eines Neurons

vermindert oder vollständig verhindert werden. In beiden Fällen stehen die Aktionspotentiale in zeitlicher Abhängigkeit zueinander (Perkel *et al.*, 1967a). Ob zwei Neurone vermehrt in einem zeitlichen Zusammenhang oder unabhängig voneinander zufällig feuern, lässt sich mit einer Kreuzkorrelation überprüfen. Dabei werden alle zeitlichen Abstände von einem *spike* des Neurons A zu den *spikes* des Neurons B gemessen, die innerhalb eines festgelegten symmetrischen Zeitrahmens liegen. Diese Werte werden über den zu untersuchenden Zeitraum für alle *spikes* von Neuron A erhoben und in einem Histogramm aufgetragen. Positive Werte geben die Zeit für nachfolgende *spikes* des zweiten Neurons B an, negative den Abstand zu vorangegangenen *spikes*. Nimmt man Neuron B als Referenzneuron, ergibt sich die gleiche Verteilung mit umgedrehten Vorzeichen.

Ist die Verteilung der Ereignisse im Histogramm flach, so sind die Ereignisse zufällig verteilt und die Neurone entladen unabhängig voneinander. Ergeben sich jedoch Häufungen im positiven Bereich, feuert das zweite Neuron häufiger nach dem Referenzneuron; Häufungen im negativen Bereich zeugen von der umgedrehten Konstellation. In diesen Fällen ist eine exzitatorische Verbindung denkbar, aber nicht zwingend (Perkel *et al.*, 1967a). Neben einem direkten synaptischen Eingang kann auch ein indirekter über mehrere Zellen bestehen. Auch eine Erregung durch eine gemeinsam vorgeschaltete Neuronenpopulation ist möglich, *in vivo* auch ein gemeinsamer Umweltreiz. Sind deutliche Tiefen im Histogramm erkennbar, sind sie Zeichen für einen inhibierenden Einfluss.

Eine Besonderheit bilden Autokorrelogramme. Das Verfahren ist das gleiche wie bei den Kreuzkorrelogrammen, aber hierbei werden die Abstände der Aktionspotentiale des Referenzneurons zu sich selbst gemessen. Daher sind sie auch symmetrisch (Perkel *et al.*, 1967a).

2.5.3.1 Messungen der Korrelationen und ihrer Veränderungen

Sämtliche Berechnungen von Korrelationen wurden mit dem Programm Spike2 v6 durchgeführt. Da die Zahl der möglichen Korrelationen mit der Anzahl der Elektroden quadratisch steigt, wurden in den meisten Fällen Skripte zur Automatisierung verwendet. Anfänglich wurde das Skript X3-Batch (siehe Abschnitt 2.4.2.2, Seite 25) in seinen verschiedenen Entwicklungsstufen eingesetzt. Es berechnete alle möglichen Korrelogramme über die ganze Länge der eingelesenen Datei (in der Regel 4 h lang) und speicherte jene ab, die

bestimmte Kriterien erfüllten. Das war zum einen eine Mindestanzahl von Ereignissen je Korrelogramm (zumeist 500) und zum anderen ein Quotient aus Tief- und Hochpunkt (häufig unter 0,5). Jedoch überstieg selbst diese gefilterte Datenmenge die Grenze dessen, was manuell auszuwerten war. Daher wurde das Nachfolgeskript xCorrMap (siehe Abschnitt 2.4.2.3, Seite 25) entwickelt. Mit diesem Skript war es möglich, zeitliche und räumliche Veränderungen sämtlicher Korrelationen zusammenzufassen. Das Skript erstellte Korrelationen über kurze Zeiträume (jeweils 10 min bei 62,5 μ s Intervallweite und ± 200 ms Rahmenweite) und ermittelte bestimmte Kenngrößen aus den einzelnen Korrelogrammen und bewertete sie. Diese Kenngrößen waren die Latenz des Hochpunktes und seine Höhe, die Anzahl aller Ereignisse innerhalb des Messfensters und der Mittelwert aller Säulen. Eine zeitliche Abhängigkeit wurde von dem Skript festgestellt, wenn mindestens 600 *spikes* innerhalb des Rahmens lagen. Außerdem musste der höchste Punkt nach der Filterung den Mittelwert um das 1,5-fache überragen, mindestens den Wert 2 erreichen und maximal 110 ms vom Nullpunkt entfernt sein.

Die enge Intervallweite hatte den Vorteil hoher zeitlicher Auflösung, erschwerte aber die Ermittlung von Hoch- bzw. Schwerpunkten, weil häufiger verschiedene Intervalle gleiche Werte aufweisen konnten (Abb. 11A). Eine digitale Filterung der Korrelogramme löste das Problem. Es wurden verschiedene Formen von Filtern mit endlicher Impulsantwort (FIR-Filter, von *engl.* Finite Impuls Response Filter) ausprobiert, von denen sich die dreieckige Variante (Abb. 11B) als am Vorteilhaftesten erwies. Der Dreiecksfilter ähnelt einem gewichteten gleitenden Mittelwert mit dem Unterschied, dass er nicht nur rückwärts sondern auch vorwärts gewandt ist. Der rechteckige Filter (Abb. 11C) entspricht ebenfalls einem zweiseitigen gleitenden Mittelwert, enthält aber keine Gewichtung. Die rechteckige Variante bewirkte eine Verzögerung sowie eine zu starke Glättung und wurde nicht verwandt. Nicht ausreichend wiederum war die Glättung durch den quadratisch steigenden Filter (Abb. 11D). Hierbei stieg die Gewichtung des Filters bis zur Mitte an und fiel dann spiegelsymmetrisch ab. Für die Berechnung der Latenz wurden schließlich nur dreieckige Filter mit einer Weite von 111 Intervallen genutzt.

Die Speicherung aller ermittelten Kennzahlen der Korrelogramme ermöglichte nicht nur die Anzahl von zeitlichen Abhängigkeiten pro gemessenen Abschnitt zu verfolgen, sondern auch ihre Veränderung. Neu entstandene Abhängigkeiten, die im vorhergehenden Abschnitt noch nicht registriert wurden, konnten so gezählt werden, ebenso wie aufgelöste und im Vorzeichen geänderte Abhängigkeiten. Der Quotient aus neuen Korrelationen

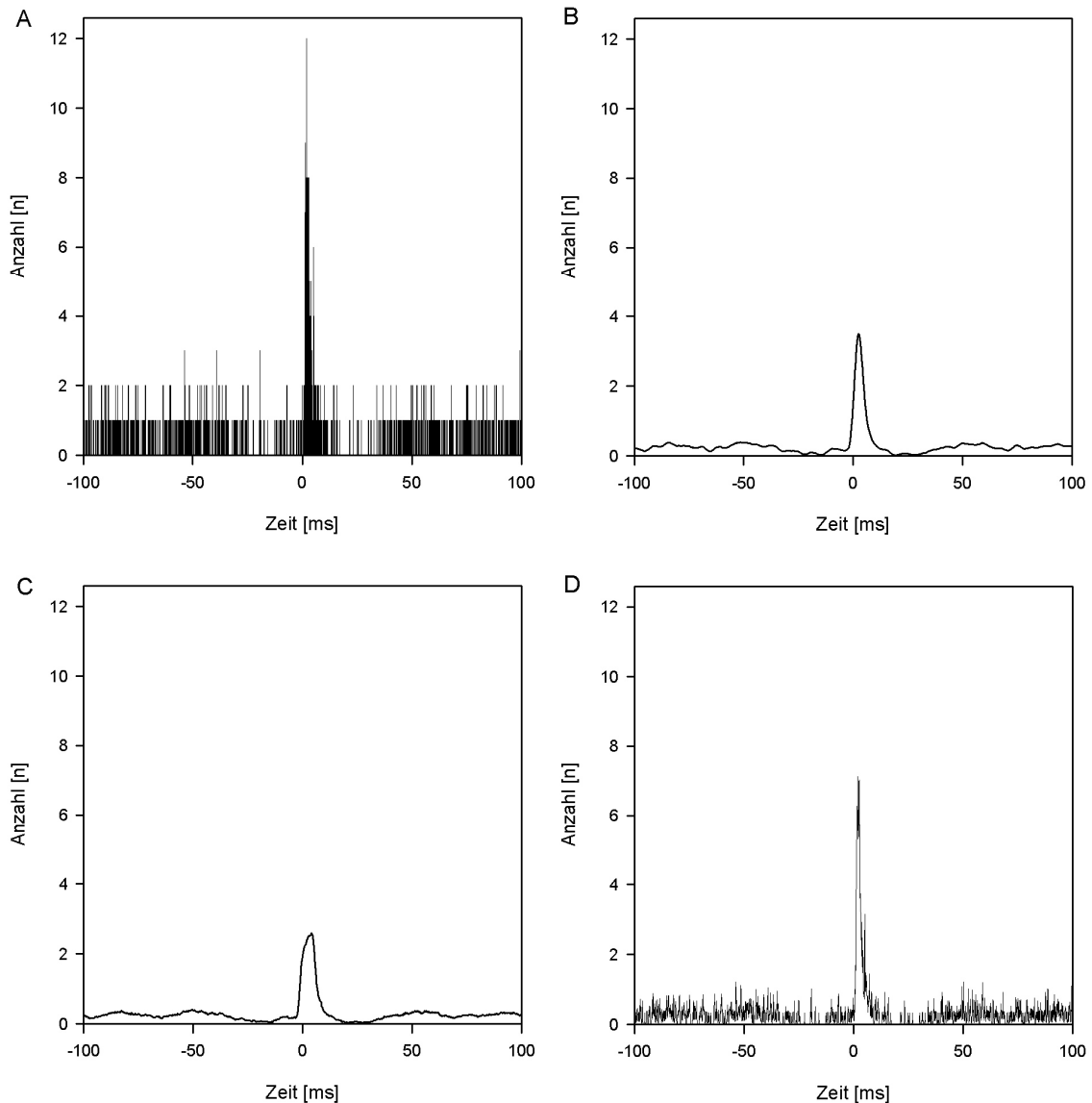


Abb. 11 Beispiel für die Bestimmung von Kreuzkorrelationen und die Anwendung von verschiedenen FIR-Filtern

Die Kreuzkorrelation über einen Zeitraum von 10 min mit einer Intervallweite von $62,5 \mu\text{s}$ (**A**) zeigt eine deutliche Häufung der Ereignisse nach dem Vergleichszeitpunkt ($t = 0$). Das in der Abbildung gezeigte Korrelogramm wurde mit verschiedenen FIR-Filtern geglättet, die jeweils 111 Intervalle breit waren. Der dreieckige Filter (**B**) arbeitet den Mittelpunkt der Häufung im Vergleich mit dem rechteckigen (**C**) und dem logarithmisch ansteigenden Filter (**D**) am Besten heraus.

und absoluter Anzahl wurde als von der mittleren *Spikerate* unabhängiger Indikator für die Veränderungen im Netzwerk genutzt.

Grundsätzlich ist für eine Korrelation eine Aktivität der beiden verglichenen Neurone eine Voraussetzung, da schließlich die Aktivität selbst Gegenstand der Messung ist. Daher ist es nicht überraschend, dass die Anzahl der gemessenen Korrelationen einer Kultur mit der über alle Elektroden gemittelten *Spikerate* assoziiert ist. Über alle getesteten Intervalle von 12 h Länge waren die Wertepaare aus Anzahl der Korrelationen und mittlerer *Spikerate* signifikant assoziiert (Spearman-Test, $P < 0,05$, $r_s > 0,3$). Der Quotient aus neuen Korrelationen und absoluter Anzahl war hingegen nicht mit der mittleren *Spikerate* (Spearman-Test, $P > 0,5$, $r_s < 0,1$) assoziiert. Auch zwischen dem Quotienten und der absoluten Anzahl an Korrelationen bestand keine Assoziation (Spearman-Test, $P > 0,2$, $r_s < 0,25$). Daher kann dieser Quotient als charakteristische dynamische Eigenschaft eines neuronalen Netzwerkes betrachtet werden.

2.5.3.2 Latenzkarten

Die Latenzkarten wurden entwickelt, um die große Zahl der möglichen Korrelationen zwischen allen Elektroden unter gleichzeitiger Beibehaltung ihrer Anordnung abzubilden. Die Elektroden werden hierbei durch große Quadrate repräsentiert, die in ihrer Anordnung der relativen Lage auf dem MEA entsprechen. Innerhalb dieser großen Quadrate werden die zeitlichen Beziehungen aller Elektroden mit der jeweiligen Referenz nochmals als kleine Quadrate innerhalb eines Rasters abgebildet. Die Farbe der kleinen Quadrate gibt die typische Latenz der Neurone auf der jeweiligen Elektrode gegenüber der Vergleichselektrode an. Eine weiße Färbung gibt an, dass keine Korrelation gefunden wurde. Grüne Färbungen bedeuten, dass im Korrelogramm eine deutliche Spitze im positiven Bereich gefunden wurde, d.h. das Neuron feuerte an der klein dargestellten Elektrode zeitlich nach dem Vergleichsneuron. Eine rote Färbung bedeutet das Gegenteil. Je dunkler die Farbe, umso größer ist der zeitliche Abstand zwischen den Ereignissen auf beiden Elektroden. Wurde in mindestens einem Korrelogramm der Vergleichselektrode eine zeitliche Abhängigkeit entdeckt, wurde ihre Repräsentation innerhalb des großen Quadrats gelb markiert.

Da Häufungen innerhalb der Korrelogramme erst dann als zeitliche Abhängigkeit gewertet wurden, wenn die Anzahl aller Ereignisse innerhalb des Zeitrahmens einen bestimmten Schwellenwert überschritt (600), wurde die Anzahl auch abgebildet. Der Rahmen der kleinen Quadrate gibt diese Zahl mit zunehmender Dunkelheit wieder. Dadurch lässt sich erkennen, ob eine Korrelation überhaupt möglich gewesen wäre.

2.5.4 Interspike-Intervall-Histogramme (ISI)

Ein weiteres Maß um das Verhalten von Neuronen zu beschreiben ist das *Interspike-Intervall-Histogramm* (ISI). In einem ISI-Histogramm werden die Abstände zwischen den einzelnen Entladungen nach ihrer Häufigkeit aufgetragen. Die Histogramme ähneln Autokorrelogrammen, jedoch werden nur die Abstände zum direkt folgenden Ereignis gewertet. Die Verteilung der Intervalllängen reflektiert das Entladungsmuster des Neurons. Zufällige Verteilungen der Abstände zeichnen sich durch eine mit der Länge logarithmisch abfallende Häufigkeit aus. Je regelmäßiger die Abstände sind, desto schmaler sind die Erhebungen im Histogramm (Perkel *et al.*, 1967b).

Die ISI-Histogramme wurden den Autokorrelogrammen analog über Zeiträume von 600 s und einer Intervallauflösung von 625 ms erstellt. Das Messfenster erstreckte sich über 1 s.

2.6 Bezugsquellen / Hersteller

2.6.1 Chemikalien

Substanz

2-Propanol
 Aceton
 AMPA
 Ascorbinsäure
 B27 Supplement
 Baclofen
 Bicucullin
 Delrin
 DMEM:F12 flüssig
 DMEM:F12 -NaHCO₃ Pulver
 Earl's Balanced Salt Solution
 Ethanol
 Fötales Kälber-Serum
 Glucose
 Glutamat
 GlutaMax x100
 Kainat
 Kohlendioxid
 Laminin in TBS
 Melatonin
 Muscimol
 N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
 Natriumhydrogencarbonat
 Natriumhydroxid
 Neurobasal A
 Orexin A
 Penicillin/Streptomycin
 Poly-D-Lysinhydrobromid (30 - 70 kDa)
 Polyethersulfon
 Primocin
 Quisqualat
 Sylgard 184
 Vaseline

Vertrieb

Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Tocris, Bristol UK
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Invitrogen, Karlsruhe DE
 Tocris, Bristol UK
 Tocris, Bristol UK
 RS Components, Mörfelden-Walldorf DE
 Invitrogen, Karlsruhe DE
 Invitrogen, Karlsruhe DE
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Invitrogen, Karlsruhe DE
 Merck, Darmstadt DE
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Invitrogen, Karlsruhe DE
 Tocris, Bristol UK
 Messer, Sulzbach DE
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Tocris, Bristol UK
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Invitrogen, Karlsruhe DE
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Invitrogen, Karlsruhe DE
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 Sigma-Aldrich Chemie, München DE
 RS Components, Mörfelden-Walldorf DE
 Invivogen, Toulouse FR
 Tocris, Bristol UK
 Dow Corning, Wiesbaden DE
 Bombastus, Freital DE

2.6.2 Verbrauchsmittel

Name	Vertrieb / Hersteller
Einwegspritzen (1 - 10 ml)	Becton Dickinson, Fraga ES
Einwegspritzen (50 ml)	B.Braun, Melsungen DE
Injektionskanülen	Terumo Europe, Eschborn DE
Klingen	Aesculap, Tuttlingen DE
MEA	Multichannel Systems, Reutlingen DE
Papain Dissociation System	CellSystems, St Katharinen DE
Parafilm	neoLab Migge, Heidelberg DE
Petrischalen	Corning, Schiphol-Rijk NL
Reaktionsgefäße	Corning, Schiphol-Rijk NL
Schläuche	B.Braun, Melsungen DE
Spritzenvorsatzfilter	Sartorius, Göttingen DE
Vakuumfilter	Corning, Schiphol-Rijk NL

2.6.3 Geräte

Gerät	Hersteller
A/D-Wandlerkarte ME128	Multichannel Systems, Reutlingen DE
A/D-Wandlerkarte ME64	Multichannel Systems, Reutlingen DE
Binokular	Olympus, Hamburg DE
Brutschrank	Nunc, Langenselbold DE
Probengeber Triathlon	Spark Holland, Emmen NL
Kamera	Olympus, Hamburg DE
Mikroskop	Olympus, Hamburg DE
Spritzenpumpen	WPI, Berlin DE
Sterilbank	Holten, Langenselbold DE
Temperaturregler TC02	Multichannel Systems, Reutlingen DE
Thermoschüttler	HLC BioTech, Bovenden DE
Verstärker MEA1060up	Multichannel Systems, Reutlingen DE
Zählkammer (Neubauer, verbessert)	Sigma-Aldrich Chemie, München DE
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg DE

2.6.4 Software

Software

autostitch
Illustrator CS
Microsoft Office Excel 2002
Microsoft Office Word 2002
Photoshop 7
SerialCosinor 6.2
SigmaPlot 10
SigmaStat 3.1
Spike2 v6
Windows XP professional
WinRAR

Verleger

University of British Columbia, Vancouver CA
Adobe Systems, München DE
Microsoft, Unterschleißheim DE
Microsoft, Unterschleißheim DE
Adobe Systems, München DE
Expert Soft Technologie, Esvres FR
Systat Software, Erkrath DE
Systat Software, Erkrath DE
CED, Cambridge UK
Microsoft, Unterschleißheim DE
ROG, Hirschhorn DE

3 Ergebnisse

3.1 Antwortmuster von kultivierten SCN-Neuronen

Primäre Zellkulturen von dissoziierten SCN-Zellen waren schon ab dem zweiten Tag *in vitro* spontanaktiv. Im Laufe von zwei Wochen wurden die Zellen aktiver und es bildete sich ein dichtes Netzwerk mit Fortsätzen aus. In intakten Zellkulturen konnten noch Monate nach der Ausplattierung Einzelzell-Antworten registriert werden. Sogar noch neun Monate nach der Kultivierung (längster Versuchszeitraum) wurden circadiane Entladungsmuster gemessen.

SCN-Neurone zeigten verschiedene Entladungsmuster, die sich im Wesentlichen in unregelmäßige, metronomische und *burst*-artige unterteilen ließen.

3.1.1 Unregelmäßige Muster

Die meisten SCN-Neurone, die keinen stabilen circadianen Rhythmus aufwiesen, feuerten in unregelmäßigen Mustern. Repetitive Motive waren nicht zu erkennen, ebenso keine *burst*-Entladungen.

3.1.2 Metronomische Aktivität

Neurone mit einem ausgeprägten circadianen Erregungsmuster generierten Aktionspotentiale während ihrer aktiven Phase ausnahmslos mit einem metronomischen Muster (Abb. 12). Als metronomisch werden Entladungsmuster bezeichnet, die über lange Zeiträume gleichmäßige Abstände zwischen den einzelnen Entladungen aufweisen (Abb. 12B₃₈ oben). Bei Oszillator-Neuronen waren die Inter-*Spike*-Intervalle (ISI) zum täglichen Hochpunkt ihrer Erregung am kürzesten und gleichmäßigsten, was an der geringen Streuung im ISI-Histogramm (Abb. 12C₃₈) erkennbar ist. Die engen harmonischen Wellen im Autokorrelogramm zeugen ebenfalls von präzisen Distanzen (Abb. 12B₃₈). Zu den Flanken der Erregung hin, wich das präzise Muster hingegen ab. Die Abstände zwischen den Entladungen variierten stärker, zeigten jedoch keine Anzeichen von *burst*-artigen Pulsen (Abb. 12B₃₄₋₃₆, B₄₀₋₄₂ oben). Die geringere Präzision spiegelte sich in einer Spreizung der ISI-Verteilung wieder (Abb. 12C₃₄₋₃₆, C₄₀₋₄₂). Die harmonischen Wellen der Autokorrelogramme waren dann ebenfalls flacher und weniger ausgeprägt (Abb. 12B₃₄₋₃₆, B₄₀₋₄₂ unten).

Ergebnisse

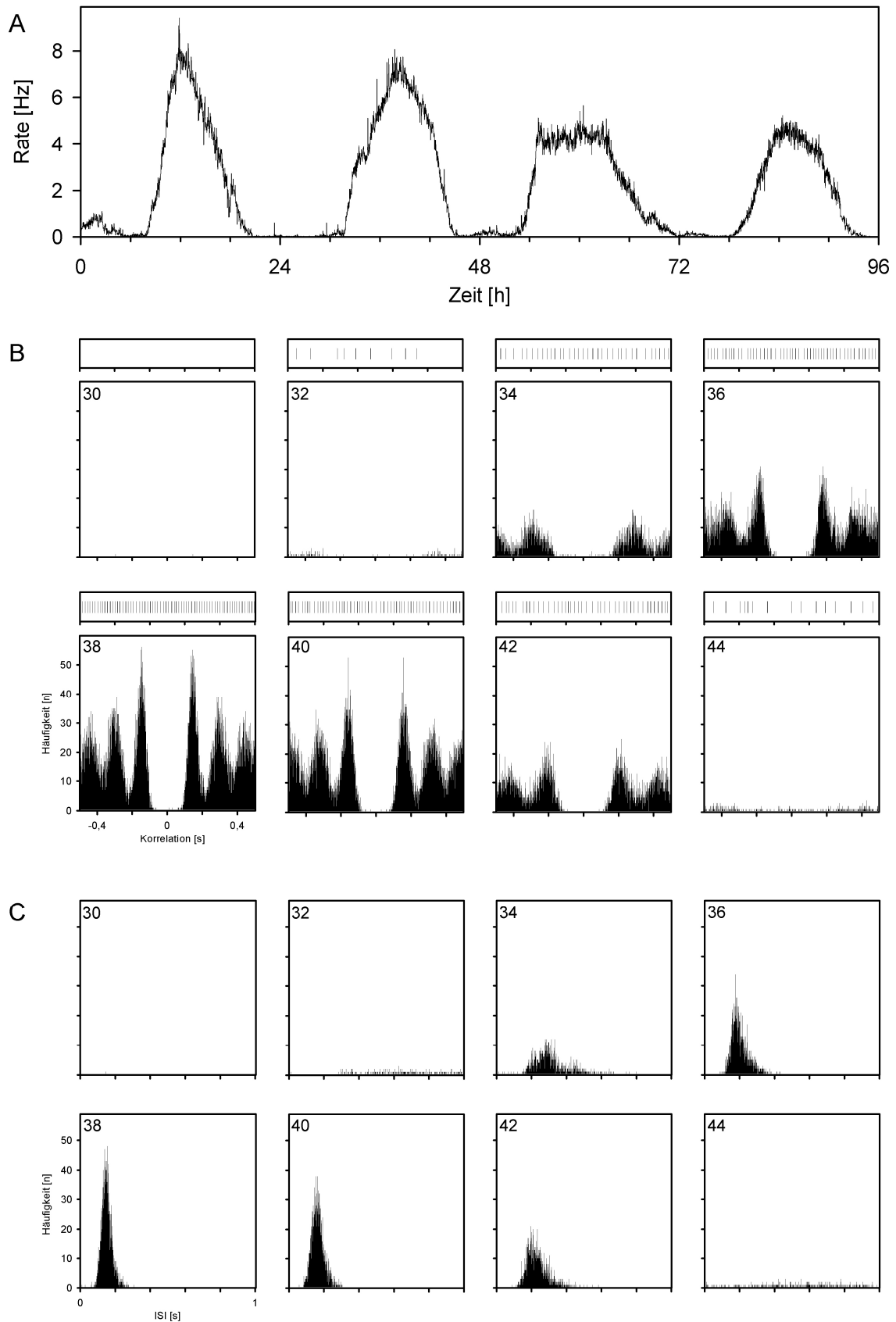


Abb. 12 Entladungsmuster eines circadian feuerenden Neurons

Die Spikerate eines stabil circadian oszillierenden Neurons ist in **A** dargestellt. Auto-korrelogramme (**B**) und ISI-Histogramme (**C**) wurden zu dem zweiten abgebildeten Zyklus aus **A** in zweistündigen Abständen (Zeitpunkt in Stunden links oben) ermittelt. Die Messzeiträume waren jeweils 600 s lang und der Messrahmen 1 s breit bei

0,625 ms Intervallbreite. Über den Autokorrelogrammen sind die Entladungen der jeweils ersten 10 s abgebildet.

Deutlich erkennbar ist ein klares metronomisches Muster während der hochaktiven Zeit (Stunde 38 - 40), welches sich durch schmale harmonische Wellen im Autokorrelogramm (**B**) auszeichnet. Die hohe Präzision des Musters ist wird durch die schmalen Spitzen mit kurzen Ausläufen in den ISI-Histogrammen (**C**) verdeutlicht. Die Abstände der metronomischen Entladungen sind während der Flanken länger und unpräziser, aber immer noch als solche erkennbar.

3.1.3 *Burst*-artige Muster

Eine seltene Variante der Entladungsmuster waren *burst*-förmige Entladungsserien. Diese traten immer nur bei Neuronen auf, die keinen circadianen Rhythmus in ihrer langfristigen *Spikerate* zeigten (Abb. 13A). Zwischen den einzelnen *bursts* gab es immer eine Grundaktivität. Die längeren *bursts* waren meist nicht scharf begrenzt. Die Autokorrelogramme dieser Zellen weisen eine gleichmäßige Verteilung auf, wobei eine Unterbrechung um den Nullpunkt flankiert von zwei scharf begrenzten Häufungen auffällt (Abb. 13B). Diese Spitzen bilden die kürzeste vom Neuron erreichbare Folge von Entladungen ab, die bei höchster Erregung zeitweise erreicht wird. Diese Refraktärzeit wird auch in den ISI-Histogrammen deutlich (Abb. 13C). Nach einer starken Häufung bei 50 ms flacht die Verteilung stark ab.

Ergebnisse

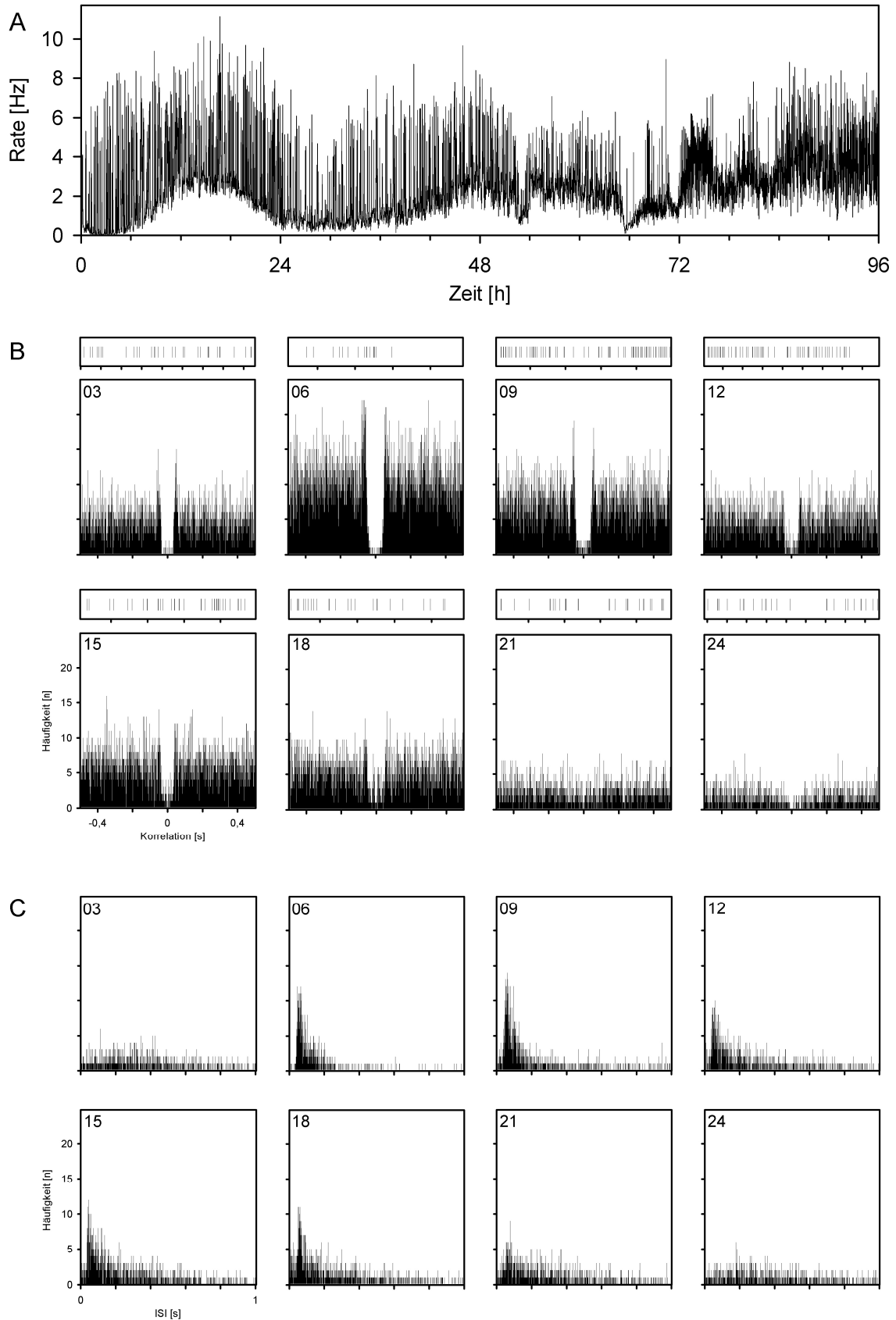


Abb. 13 Entladungsmuster eines *burst*-artig feuерnden Neurons

Die *Spikerate* eines nicht oszillierenden Neurons mit *burst*-artigem Entladungsmuster ist in **A** dargestellt. Autokorrelogramme (**B**) und ISI-Histogramme (**C**) wurden innerhalb des ersten Tages alle drei Stunden ermittelt (Details zur Darstellung siehe Abb. 12, Seite 42). Die Autokorrelogramme (**B**) zeigen eine gleichmäßige Verteilung mit einer

Unterbrechung um den Nullpunkt. Diese durch die Refraktärzeit bedingte Unterbrechung ist von scharfen Spitzen flankiert, die die schnellste mögliche *Spikerate* bei einer *burstartigen* Entladung reflektieren. Die ungleichmäßigen Abstände sind auch in den ISI-Histogrammen (C) als langsam auslaufender Abfall nach der ersten scharfen Spitze erkennbar.

3.1.4 Zelldichte und Kulturbedingungen

Die Kulturbedingungen waren entscheidend für die Entwicklung der Zellkultur. Besonders die Zelldichte beim Ausplattieren beeinflusste stark das zukünftige Verhalten von Einzelzellen. Kulturen mit niedrigen Zelldichten (< 5000 Zellen je mm²) zeigten Neurone mit Fortsätzen, die anscheinend deutlich vernetzt waren (Abb. 14). War die Dichte wesentlich geringer, waren zwar in

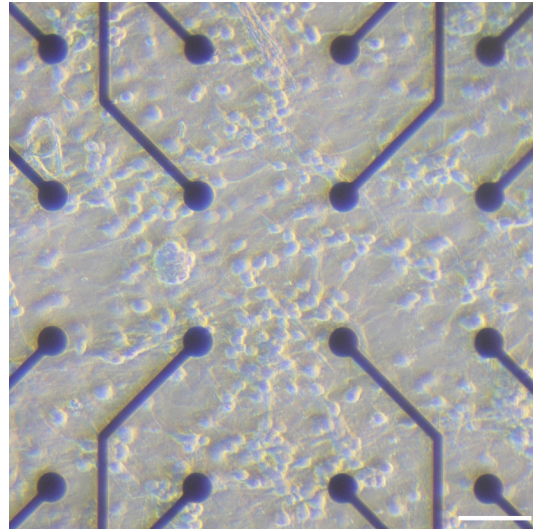


Abb. 14 SCN-Zellkultur mit niedriger Dichte

Deutlich sichtbar sind einzelne Neurone die einer flachen, einzelligen Gliaschicht aufliegen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 5000 Zellen je mm² ausplattiert. Der Maßstab beträgt 50 µm.

Elektrodennähe Neurone sichtbar, die aber nur noch selten spontanaktiv waren. Zusätzlich traten in diesen Kulturen Wanderungsbewegungen ein, die nach zwei Wochen *in vitro* geringer wurden, aber nicht vollständig zum Erliegen kamen (Abb. 16). In Folge dieser Bewegung zogen Neurone an Elektroden vorbei, bei denen dann kurzfristig Aktivität gemessen wurde.

Hohe Zelldichten verringern die Motilität der Neurone jedoch stark. Ab 10 - 15 000 Zellen je mm² berühren sich die Zellen schon beim Ausplattieren und innerhalb des ersten Tages wird die Kultur konfluent. Die Wanderung einzelner Zellen wird stark reduziert und kommt nach wenigen Tagen zum Erliegen. Die dichten Kulturen scheinen jedoch stärkere Kräfte auf die Oberflächenbeschichtung auszuüben und sie abzureißen (Slaughter *et al.*, 2004). Viele Kulturen neigen dazu, sich vom Rand her aufzurollen. Hat dieser Prozess einmal angefangen, schreitet er immer weiter voran, bis die Kultur sich auf einem Bruchteil ihrer ursprünglichen Fläche angesammelt hat und für elektro-physiologische Ableitungen unbrauchbar wird.

Insgesamt waren auf dichteren Kulturen deutlich mehr spontanaktive Zellen zu finden. Mit der Menge der spontanaktiven Zellen stieg die Zahl der Zellen mit

circadianen Rhythmen überproportional an. Wenn sich die Kultur nicht aufrollte, waren die circadiane Rhythmen auch stabiler.

Außer der Zelldichte war auch das Protokoll der Aussaat der Zellen wichtig für die Entwicklung der Kultur. Damit die ebenfalls dissoziierten Gliazellen sich nicht schneller als die Neurone verbreiten und gegebenenfalls die Elektroden isolierten, erwies sich die Zugabe von Neurobasal A-Medium in den ersten Tagen als hilfreich.

3.2 Circadiane Rhythmik in dissoziierten SCN-Kulturen

Dissoziierte SCN-Zellen waren wie erwartet spontanaktiv und ein Teil von ihnen zeigte circadiane Rhythmen in seiner Entladungsrate. Circadiane Zyklen konnten in einer Kultur aus embryonalem Gewebe zu einem Zeitpunkt abgeleitet werden, der dem ersten postnatalen Tag entsprechen würde (Abb. 16). Die typischerweise verwendeten Kulturen aus zwei Tage alten Jungtieren wurden normalerweise frühestens nach dem fünften Tag *in vitro* zum ersten Mal abgeleitet und zeigten dann auch rhythmische Aktivität. Im Allgemeinen fanden sich in mindestens zwei Wochen alten Kulturen mehr circadian feuernde Zellen als in jüngeren und in dichteren Kulturen mehr als in dünner besiedelten Kulturen. Besonders bei dünner besiedelten Kulturen konnte man beobachten, dass nicht immer, wenn mehrere Neurone um eine Elektrode gelagert waren, auch elektrische Aktivität gemessen wurde.

Die Länge der Perioden variierte um den Mittelwert von 24,15 h mit einer Standardabweichung von $\pm 1,5$ h (Abb. 27). Bemerkenswert ist, dass circadiane Entladungsmuster sich mit der Zeit aus unregelmäßigen Mustern entwickeln konnten. Es gab aber auch Neurone, bei denen sich ohne vorherige Aktivität ein Rhythmus entwickelte oder es vergingen bestehende Rhythmen ohne äußere Einflussnahme (Abb. 15).

3.2.1 Charakteristika von Uhrenzellen

Die Entladungsmuster der kultivierten SCN-Neurone sind vielfältig. Es gibt unrythmischen Neurone, die über Tage hinweg eine stabile Aktivität ohne starke Schwankungen zeigen, oder stark unregelmäßig feuernde Zellen. Der Anteil dieser Zellen sank mit steigender Zelldichte, war aber immer vertreten.

Die übrigen Neurone zeichnen sich durch eine charakteristische circadiane Änderung ihrer Entladungsfrequenz aus. Diese oszillierenden Zellen lassen sich

anhand ihres Entladungsmusters in mindestens drei verschiedene Gruppen differenzieren:

1. Neurone mit circadianen Entladungen, die instabil und unpräzise sind. Diese Neurone haben eine beständige Grundaktivität und sind auch während der Tiefphase nicht vollständig stumm.
2. Neurone mit einer klaren sinusförmigen circadianen Aktivität. Sie sind in den Tiefphasen häufig stumm. Diese Neurone zeigen in der Regel ein lang andauerndes und stabiles Antwortmuster.
3. Neurone mit einem steilen Aktivitätsanstieg und einem steilen Abfall am Ende der Aktivitätsphasen, was hier als blockförmiges Antwortmuster bezeichnet wird. Diese Neurone wurden sehr selten registriert, waren aber sehr stabil.

Alle diese Varianten konnten besonders bei dichten Kulturen gleichzeitig beobachtet werden (Abb. 18), daneben sind viele arrhythmischen Zellen zu sehen. Als schwach rhythmisch ist zum Beispiel die Aktivität auf Elektrode 76 (siebte von links, sechste von oben) anzusehen. Manche dieser schwachen Oszillatoren setzen auch einen (Elektrode 84) oder mehrere (Elektrode 65) Zyklen lang aus und setzen anschließend ihre rhythmische Aktivität fort. In der Abbildung 18 zeigen sich die Zellen mit blockartiger Aktivität (Elektrode 36) als stabil und ausdauernd. Von den 53 Elektroden, auf denen während der Tage 2 - 4 aktive Zellen lokalisiert waren, zeigten während dieses Zeitrahmens sechs rhythmische Aktivität, die den Kriterien für die Bestimmung von Phasenverschiebungen (siehe Abschnitt 2.5.1; Seite 30) genügten. Sechs weitere zeigten zwar rhythmische Aktivität mit einer Periode zwischen 19 und 29 h, aber deren Perioden hatten im Lomb & Scargle-Periodogramm eine Kraft unterhalb des geforderten Wertes von 600.

3.2.2 Synchronisation zwischen Uhrenzellen

Zwei Rhythmen sind synchron, wenn sie eine gemeinsame Periode aufweisen. Ihre Phasenbeziehung ist dabei unerheblich. Unter *in vivo*-Bedingungen scheint die Mehrzahl der Neurone im SCN synchronisiert zu sein, in dissoziierten Zellkulturen hingegen nicht. Bei den verschiedenen Ableitungen von dissoziierten Neuronen konnten zwar abschnittsweise gleichzeitige Erregungsmaxima festgestellt werden, jedoch hielt dieses Phänomen nicht über mehrere Zyklen an (Abb. 15). Die einzelnen Zellen wiesen unterschiedliche Perioden auf und ihre Maxima entfernten sich mit der Zeit immer weiter voneinander.

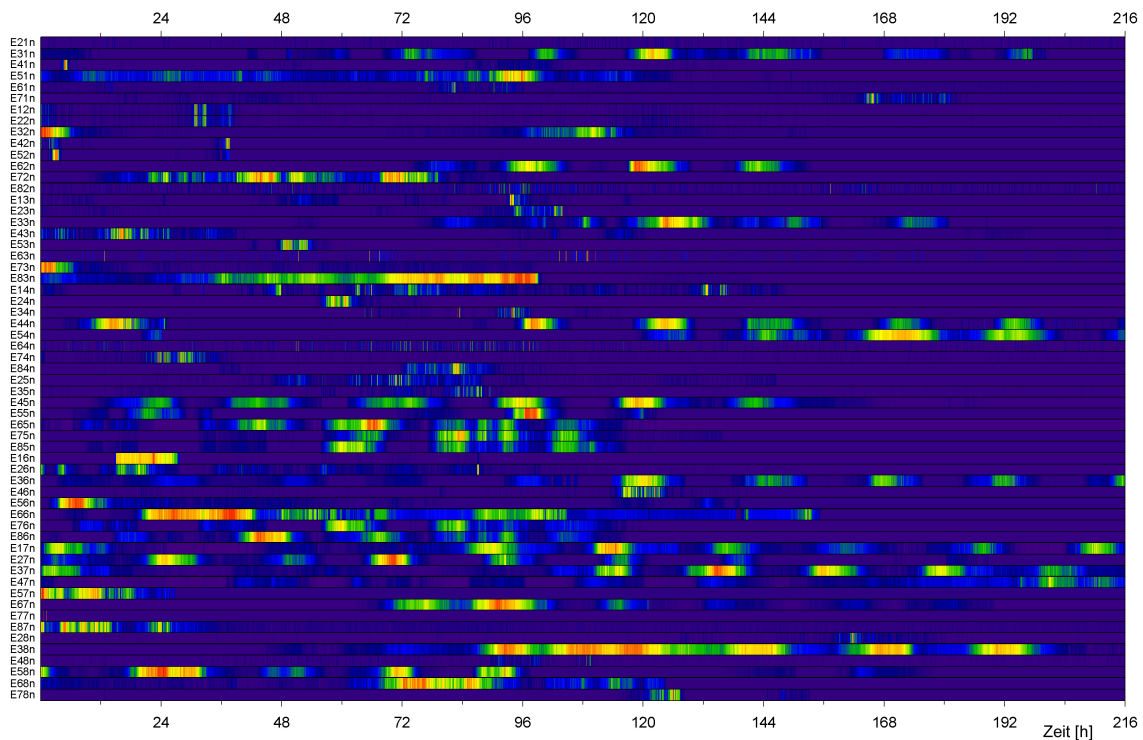


Abb. 15 Unabhängige circadiane Rhythmen

Die Stärke der Entladungsrate von Neuronen auf verschiedenen Elektroden ist farb-codiert aufgetragen. Keine Aktivität ist dunkelblau, durchschnittliche grün und die höchste Aktivität rot abgebildet. Die Skala ist der jeweiligen Elektrode angepasst.

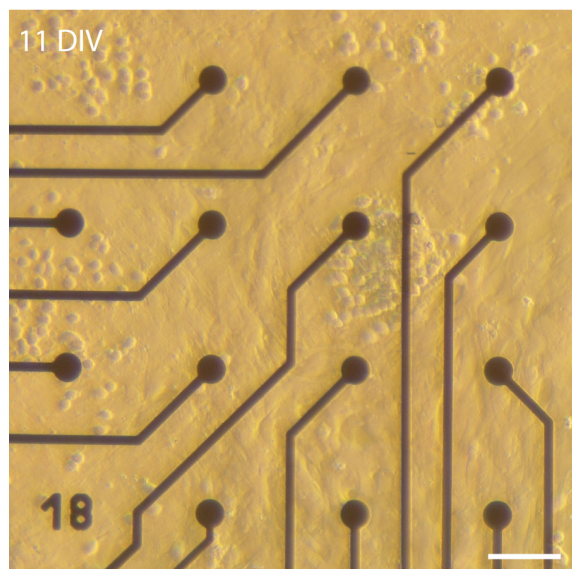
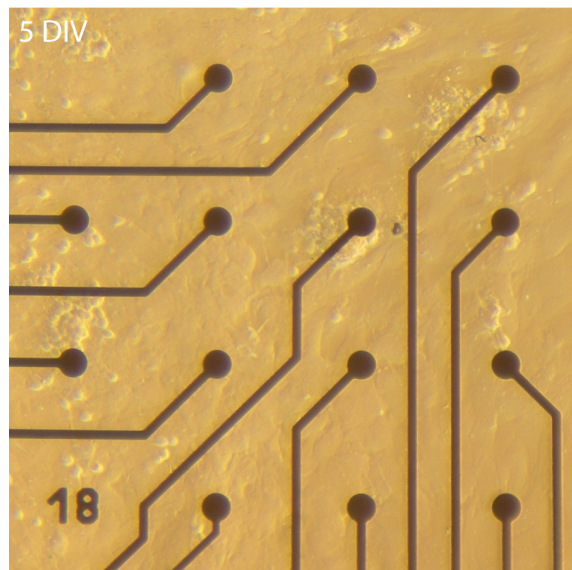
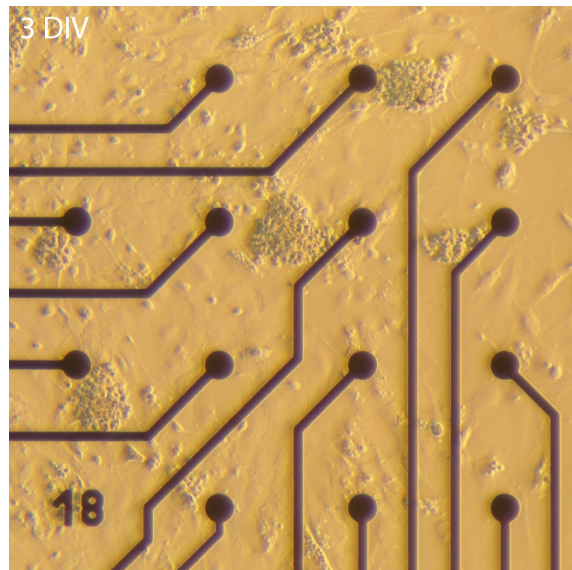
Viele Elektroden zeigten deutlich eine circadiane Aktivität. Obwohl manche circadiane Neurone gleichzeitig mit anderen in relativer Nähe ihren Aktivitätshöhepunkt hatten (z.B.: E17n & E37n zur Stunde 114), waren diese nicht synchron.

Des Weiteren ist zu beobachten, dass viele circadiane Rhythmen entstehen, aber auch nach einigen Tagen wieder verschwinden können.

3.3 Netzwerke in Zellkulturen

Eine Haupteigenschaft von Nervenzellen ist es, sich untereinander über Synapsen zu verbinden und so Netzwerke zu bilden, die zur Verarbeitung und Weiterleitung von Information dienen. Vom 18. pränatalen Tag an bilden sich die ersten Synapsen im SCN von Ratten. Ab dem zweiten postnatalen Tag steigt die Synapsenbildung im SCN langsam und ab dem vierten Tag sprunghaft bis zum zehnten Tag an (Moore, 1991). Am Tag P10 ist die synaptische Dichte etwa auf dem Wert, der bei adulten Tieren beobachtet wird. Daher ist zu erwarten, dass die vereinzelt Neurone gekappte Verbindungen wiederherstellen aber auch neue knüpfen. Dissoziierte Neurone bilden direkt nach der Ausplattierung wieder Neuriten aus, die sich mit denen von anderen Neuronen sichtbar verknüpfen

Abb. 16 Entwicklung einer SCN-Kultur
SCN-Zellen 3, 5 und 11 Tage nach ihrer Ausplattierung. Die Tiere wurden aus Embryonen (E18) gewonnen und ab dem dritten Tag *in vitro* (3. *dia in vitro* = 3. DIV; entsprechend P0) abgeleitet. Schon ab diesem Tag wurden erste Aktionspotentiale gemessen. Ab dem 4. DIV feuerten auch Zellen auf den Elektroden 36 (zweite Elektrode von rechts, zweite Reihe von oben) und 17 (oberhalb der „18“). Elektrode 48 (rechts unten) zeigte sogar circadiane Aktivität. Deutlich sichtbar ist eine leichte Wanderungsbewegung der Neurone auf der geschlossenen Gliazellschicht. Der Maßstab entspricht 100 µm.



(Abb. 16 oben). Wieweit die Synaptogenese in der Zellkultur den Verhältnissen *in vivo* entspricht, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden.

3.3.1 Entwicklung der Netzwerke und räumliche Ausdehnung

In Zellkulturen mit sehr geringer Dichte (< 5000 Zellen/mm²) konnte die Ausbildung von Neuriten gut beobachtet werden. Schon ab dem zweiten *DIV* waren durch ihre Fortsätze verbundene Zellen zu sehen. Durch die sich ausbreitende Gliazellschicht waren diese feinen Strukturen spätestens nach einer Woche *in vitro* unter dem Mikroskop kaum noch sichtbar. Bei einer Zelldichte von 5000 Zellen pro mm² lassen sich zwar noch größere Fortsätze erkennen, aber sie sind dann nicht mehr zuordenbar (Abb. 14). Bei höheren Zelldichten waren einzelne Verbindungen praktisch nicht mehr auflösbar, da Neurone selbst schon mit ihren Somata aneinander grenzten. Es ist aber davon auszugehen, dass sie sich mindestens ebenso stark vernetzen.

Um die Bedeutung der Verknüpfungen physiologisch zu untersuchen, wurden Kreuzkorrelationen zwischen den einzelnen Elektroden durchgeführt. Anfänglich wurde neben einer anschließenden manuellen Analyse das X3-Batch-Skript benutzt, um zeitliche Abhängigkeiten der Neurone untereinander aufzuspüren, die ein deutlicher Hinweis für eine funktionelle Verschaltung sind.

Dabei wurden viele Korrelogramme mit einer zeitlich abhängigen Erregung gefunden. Trotz der vielen GABAergen Neurone im SCN wurden in den Korrelogrammen kaum Hinweise auf hemmende Verknüpfungen gefunden. Im Allgemeinen zeigte sich deutlich, dass in Kulturen mit geringer Dichte sehr selten Korrelationen gefunden wurden. Ab 5000 Zellen pro mm² konnten bis zu zehn Korrelationen zwischen meist benachbarten Elektroden nachgewiesen werden. Ab einer Dichte von über 10 000 Zellen pro mm² wurden teilweise über 150 Korrelationen gleichzeitig gemessen. Diese Korrelationen erstreckten sich zum Teil auch über das gesamte Elektrodenfeld (Abb. 17A). Weil nur wenige eindeutige Inhibitionen gefunden wurden und sich die automatisierte Erkennung als schwierig erwies, wurde eine Implementierung in das Nachfolgeskript nicht erwogen.

Die Anzahl der Korrelationen hing neben der Dichte auch vom Alter der Kultur ab. Die Anzahl steigerte sich langsam mit der Kulturdauer und erreichte ihr Maximum ab einem Monat *in vitro*.

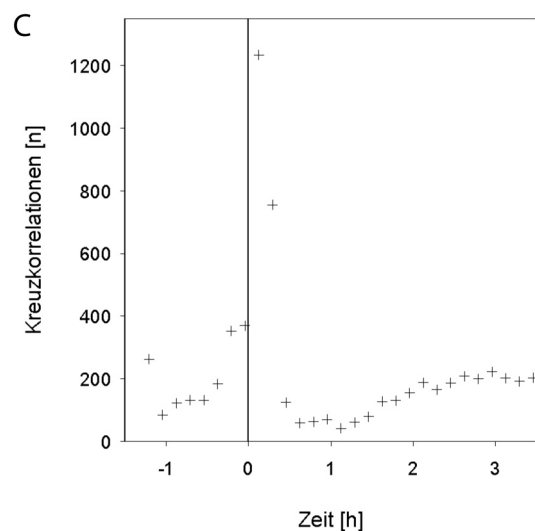
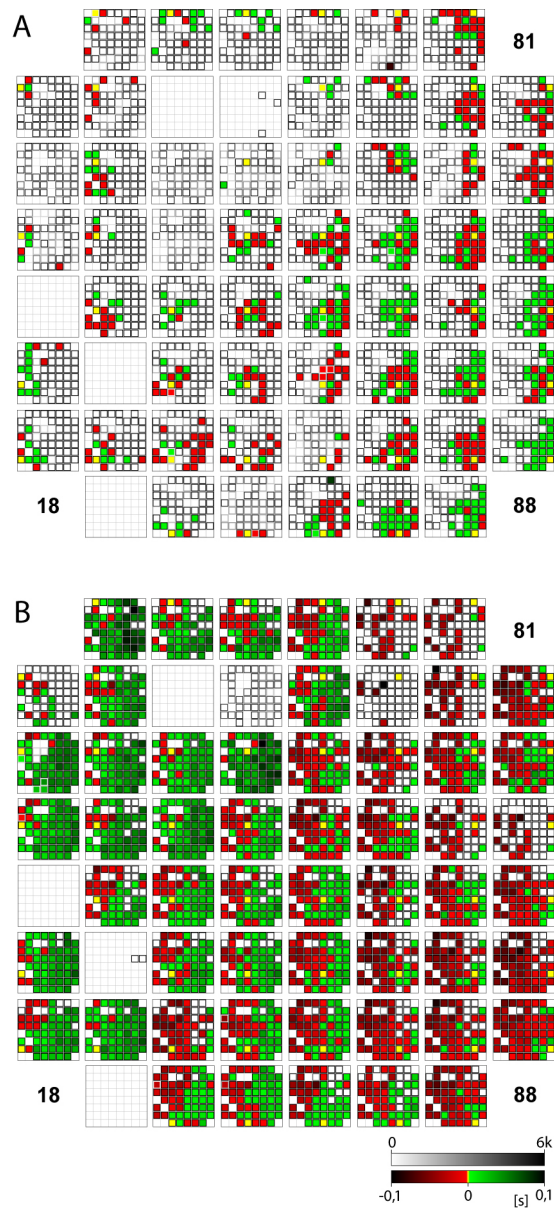
Mit Hilfe von Latenzkarten (siehe Abschnitt 2.5.3.2, Seite 36) ließ sich das zeitliche und räumliche Muster der neuronalen Entladungen innerhalb des Netzwerkes darstellen. Diese Karten decken räumlich zusammenhängende Gruppen mit korrelierter Aktivität auf (Abb. 19, 17A). Diese Gruppen sind teilweise über gemeinsame Mitglieder miteinander verbunden und so Teil eines umfassenderen Netzwerks. Anhand der Karten lassen sich auch Erregungsreihenfolgen nachvollziehen. Diese Ereignisketten sind daher auch geeignet, die ungefähre Lage eines Zentrums auszumachen, welches stets vor den anderen feuert (Abb. 17A: unten rechts). In den meisten Fällen weisen diese eine lokal begrenzte Gruppe von nachfolgenden Neuronen auf.

Abb. 17 Latenzkarte einer SCN-Kultur (hohe Zelldichte)

Die Latenzkarte in **A** zeigt die hohe Synchronisation einer älteren Zellkultur (48 DIV). Die Elektrode 87 im unteren rechten Bereich ist deutlich vor allen anderen Elektroden in ihrer Nachbarschaft aktiv. Nach der Zugabe von 20 μM Bicucullin (**B**) steigt die Anzahl der Kreuzkorrelationen drastisch an und erstreckt sich über fast alle Elektroden. Gleichzeitig veränderte sich das Entladungsmuster der abgeleiteten Zellen zu einem *burst*-artigen Muster, das sich über die gesamte Kultur ausbreitete. Dadurch wird die ansonsten durch inhibitorische Einflüsse maskierte Vernetzung der Neurone untereinander deutlich. Außerdem ändert sich das zeitliche Aktivitätsmuster drastisch.

Die absoluten Zahlen der Korrelationen zum jeweiligen Zeitpunkt sind in **C** aufgetragen. Die Bicucullin-Applikation erfolgte zum Zeitpunkt 0.

(ausführliche Beschreibung des Darstellungsprinzips unter Abschnitt 2.5.3.2, Seite 36)



Beispielsweise sind in Abbildung 19 während der Stunden 120 - 136 bei den Elektroden 44, 58 und 13 nur nachfolgende Korrelationen verzeichnet. Zu diesem Zeitraum nahmen diese Elektroden die zeitliche Führung ein. Das bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass sie eine dominante exzitatorische Rolle im Netzwerk einnehmen. Im späteren Verlauf (Stunde 140) haben auch sie zeitliche Vorläufer.

Über den Tag sind die zeitlichen Beziehungen untereinander relativ stabil (Abb. 19). Vorzeichenwechsel der zeitlichen Beziehungen sind selten, kommen aber vor. Die Gesamtzahl der Verbindungen konnte über längere Zeiträume (bis zu 48 h) schwanken. Eine circadiane Oszillation der Verbindungsanzahl konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Bei älteren Kulturen mit hoher Dichte fällt auf, dass sie trotz allgemeiner Aktivität nur wenige Korrelationen aufwiesen (Abb. 17A). Manche Bereiche schienen völlig isoliert zu sein. Obwohl sie sich inmitten einer dichten Neuronenpopulation befanden und selbst aktiv waren, wiesen sie keinerlei (Abb. 17A, Elektrode 13, 33, 34) oder wenig Korrelationen (Elektrode 12, 53, 51) mit anderen Neuronen auf. Durch die Applikation von 20 μ M Bicucullin, einem spezifischen GABA_A-Antagonisten, änderte sich das deutlich (Abb. 17B). Neben einer Steigerung der mittleren *Spikerate* wandelten sich die Entladungsmuster der auf allen Elektroden registrierten Aktivität zu lang anhaltenden (> 1 s) *bursts*. Diese *bursts* zogen wellenartig über die ganze Kultur und erstreckten sich auch über die Bereiche, die zuvor keine Korrelationen zeigten. Bei fast allen Elektroden wurden mehr Korrelationen gemessen. Insgesamt stieg die Anzahl der Korrelationen auf mehr als das Sechsfache des Durchschnitts der vorangegangenen Stunde an (Abb. 17C). Nachdem das Bicucullin ausgewaschen war, kehrte die Aktivität wieder zum Ursprungszustand zurück. Der Anstieg der korrelierten Aktivität durch Bicucullin verdeutlicht, dass das Netzwerk durch GABAerge Einflüsse gedämpft wird, die ansonsten nicht zu beobachten sind. Wird diese Hemmung durch den GABA-Antagonisten aufgehoben, wird die hohe Vernetzung der Kultur erst sichtbar.

3.3.2 Rhythmen im Netzwerk

Eine ungelöste Frage ist, wie im suprachiasmatischen Nucleus die einzelnen Uhrenzellen untereinander Zeitinformationen weitergeben und ihre Oszillation synchronisieren. Bei neuronalen Netzwerken liegt eine exzitatorische

Reizweiterleitung nahe, daher wurde versucht, die Interaktion zwischen Uhrzellen und anderen Neuronen per Korrelationsanalyse ausfindig zu machen.

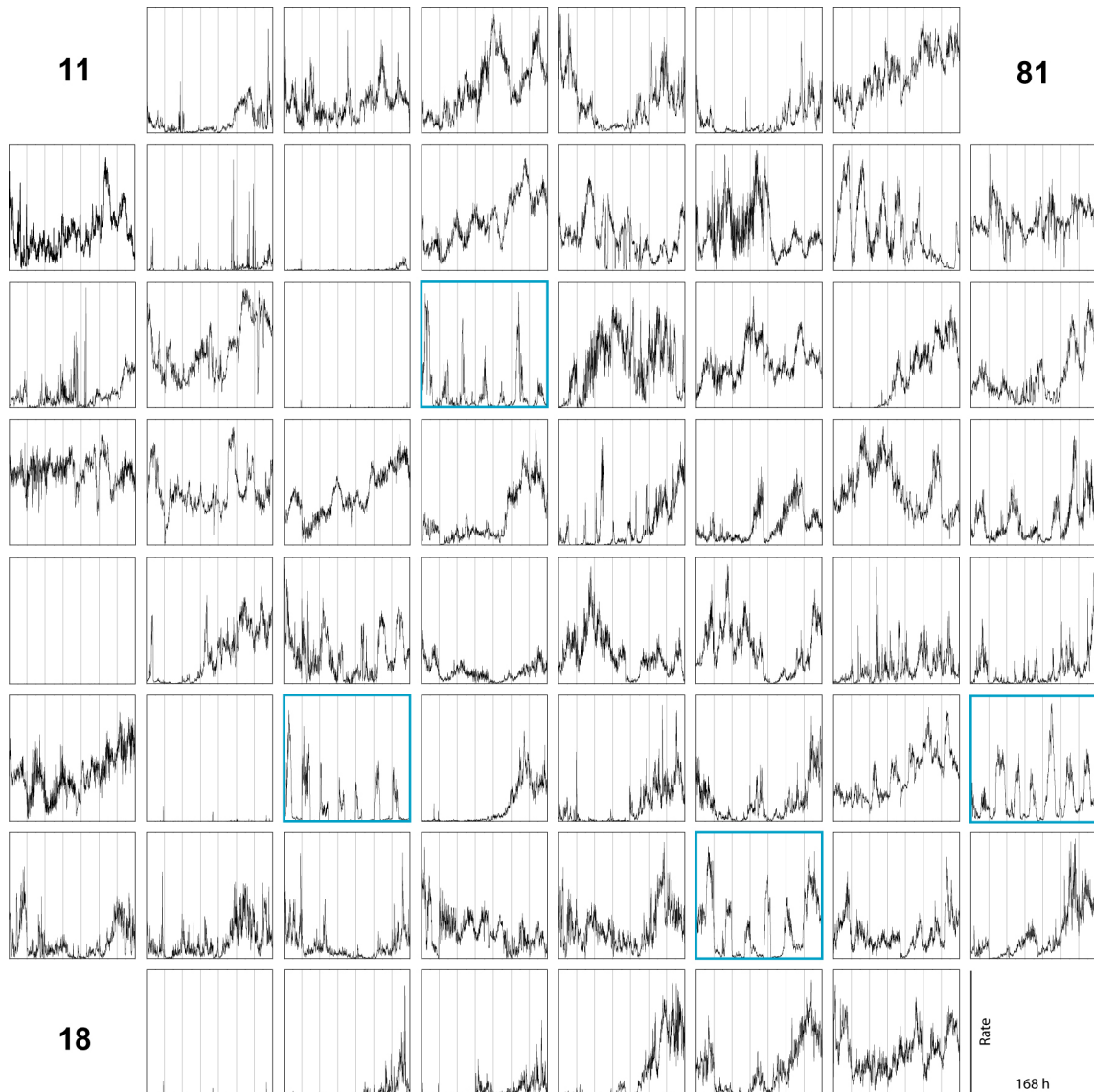


Abb. 18 Neuronale Aktivität von kultivierten SCN-Neuronen (hohe Zelldichte)

Die SCN-Neurone wurden in einer Zell-Dichte von $>10\,000$ Zellen/ mm^2 auf den MEAs ausplattiert. Jedes Kästchen repräsentiert die *Spikerate*, die auf der jeweiligen Elektrode über einen Zeitraum von 7 Tagen (168 h, eine Unterteilung entspricht 24 h) gemessen wurde. Die Aktivität kann dabei von einer oder auch von mehreren Zellen stammen. Die Y-Achse ist für jede Elektrode individuell skaliert (Minimalwert 1 Hz). Viele Elektroden zeigen rhythmische Aktivität, jedoch nur wenige einen stabilen und deutlichen circadianen Rhythmus (blauer Rahmen). Diese Zellen zeigen jedoch keine zeitliche Abhängigkeit zu anderen Zellen (siehe Abb. 19, Seite 54).

Ergebnisse

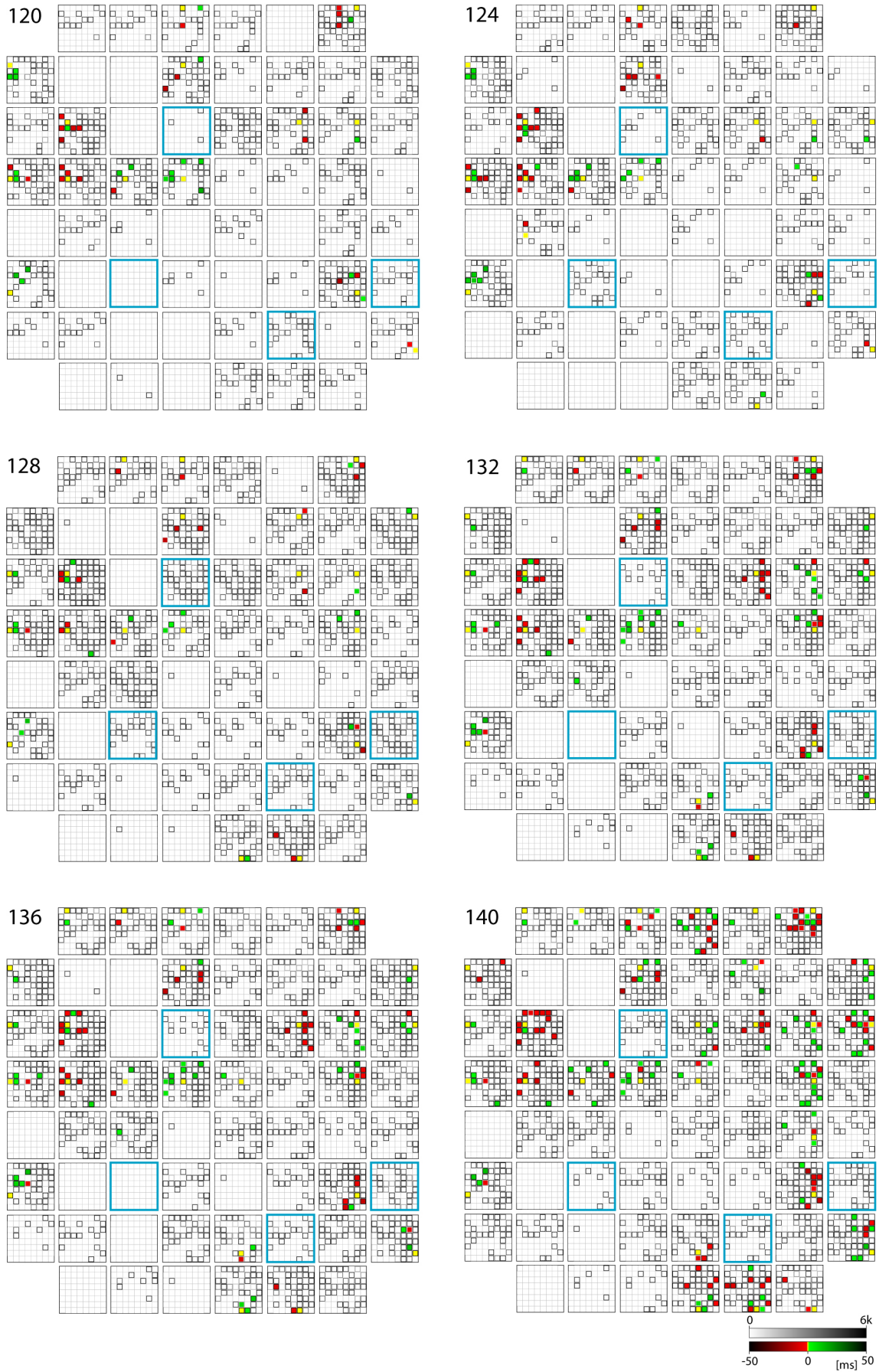


Abb. 19 Latenzkarten einer SCN-Kultur (aufgenommen in 4 h Intervallen)
 Die Latenzkarten bilden die zeitlichen Reihenfolgen von Neuronen auf einzelnen Elektroden untereinander ab. Die zugehörigen *Spikeraten* sind in Abb. 18 (Seite 53)

dargestellt. Links oben ist der entsprechende Zeitpunkt in Stunden angegeben. Neurone mit klaren circadianen Rhythmen (blauer Rahmen) sind nicht mit anderen Neuronen korreliert.

(ausführliche Beschreibung des Darstellungsprinzips unter Abschnitt 2.5.3.2, Seite 36)

Beim Vergleich von Entladungsmustern (Abb. 18) mit den dazu gehörigen Latenzkarten (Abb. 19) konnten verschiedene Beobachtungen gemacht werden. Im Zeitraum zwischen Stunde 120 und 144 (Abb. 18) sind mehrere Neurone mit einer deutlichen wenn auch nicht besonders stabilen Rhythmik abgebildet, unter anderem auf Elektrode 76 und 24. Beide haben eine Basisaktivität, der ein circadianes Muster aufgesetzt ist. Die *spikes* dieser Zellen sind zeitlich korreliert zur Aktivität auf benachbarten Elektroden. Bei Zellen mit stabilen blockartigen Rhythmen (Abb. 18 und 19: blaue Rahmen) war hingegen zu keinem Zeitpunkt eine zeitliche Abhängigkeit messbar, obwohl zumindest während ihrer aktiven Phase ausreichend Aktivität bestand. Zwar wurden in den Korrelogrammen keine Abhängigkeiten gefunden, aber in der Nachbarschaft von Zellen mit blockartigen Rhythmen fanden sich durchaus Zellen mit schwacher bzw. aufgesetzter Rhythmik. Die benachbarten Zellen hatten meist ihre Hochphasen im gleichen Zeitraum, dennoch waren weder ihre Perioden noch Phasenwinkel gleich. Bei Zellen mit robuster Rhythmik wurden niemals eine korrelierte Aktivität zu anderen Zelle gefunden. Auch bei sorgfältiger, manueller Suche über längere Zeiträume sind weder exzitatorische noch inhibitorische Korrelationen festgestellt worden.

3.3.3 Veränderungen der Netzwerkaktivität durch Neuropeptide

Bei der Applikation von neuroaktiven Substanzen sind die Veränderungen der Spikeraten eines der auffälligsten Phänomene. Die Informationsverarbeitung in neuronalen Systemen ist jedoch nicht auf die Aktivität einzelner Neurone beschränkt, sondern die Informationen werden in komplexen Netzwerken integriert und verarbeitet. Als Indikator für die Veränderung eines Netzwerkes wurde daher die Anzahl an gemessenen Korrelationen bzw. der Anteil von neu gebildeten Korrelationen an der Gesamtzahl verwendet.

3.3.3.1 Orexin A

Bei den Experimenten zur Phasenverschiebung wurden auch die zeitlichen Abhängigkeiten innerhalb der Kultur mit dem xCorrMap-Skript ausgewertet. Die Anzahl an Korrelationen ging durch die Applikation von 3,3 nM Orexin A zurück (Abb. 20). Vor allem die Varianz des Wertes verringerte sich durch die Applikation. Die Wirkung des Orexins war besonders deutlich am Anteil der neu gebildeten Korrelationen an der Gesamtzahl zu sehen. Der Quotient war immer signifikant kleiner als im vorhergehenden Zeitraum. Besonders auffällig war der lang anhaltende Effekt von Orexin A. Erst 12 h nach der Injektion erreichte der Anteil an neuen Verbindungen an der Gesamtzahl wieder seine ursprüngliche Höhe.

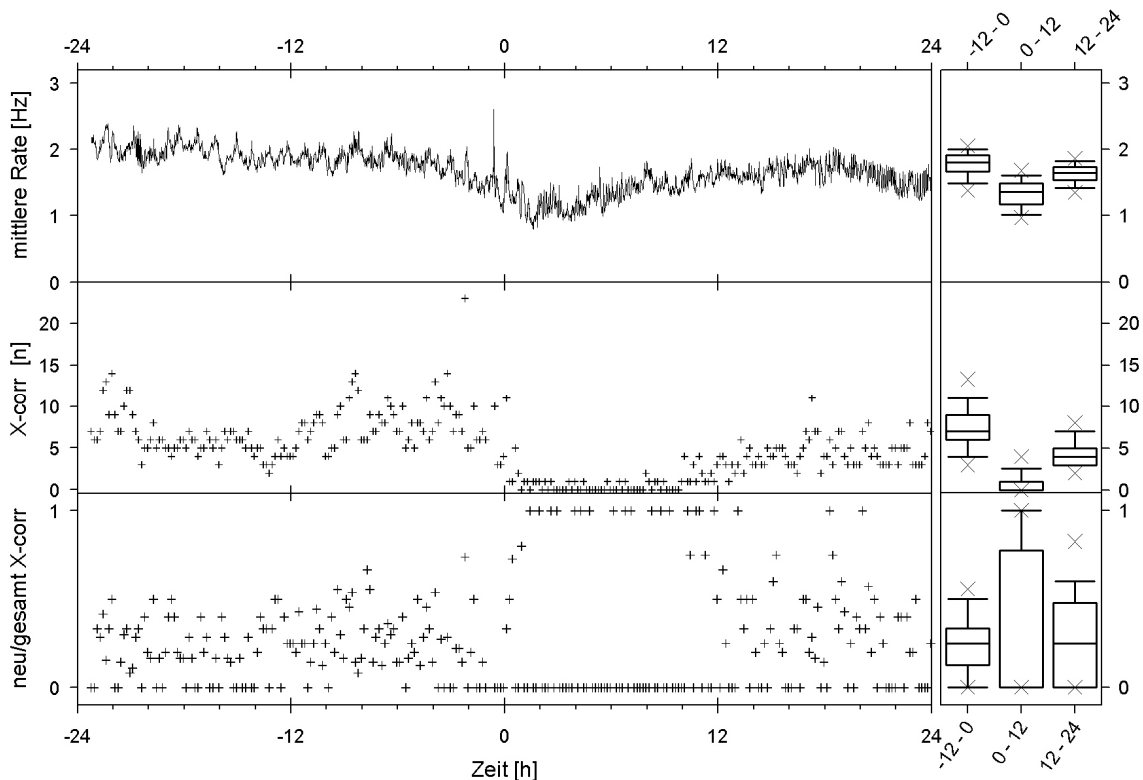


Abb. 20 Veränderung der Netzwerkeigenschaften einer SCN-Kultur nach Applikation von 3,3 nM Orexin A

In dem oberen Graph ist die gemittelte *Spikerate* aller Elektroden aufgetragen. Der mittlere Graph zeigt die Anzahl der Kreuzkorrelationen zwischen allen Elektroden, während der untere Graph den Anteil an neu gebildeten Korrelationen wiedergibt. Die Kastendiagramme auf der rechten Seite beschreiben die Verteilung zu verschiedenen Zeiträumen. Die ersten zwölf Stunden nach der Applikation (0 - 12) weichen dabei signifikant von den umgebenden Zeiträumen (-12 - 0 bzw. 12 - 24) ab.

3.3.3.2 Arginin-Vasopressin (AVP)

Die Wirkung des Neuropeptids Arginin-Vasopressin (AVP) unterschied sich deutlich von der Orexinwirkung, da die Aktivität der meisten Neurone deutlich gehemmt wurde (Abb. 21). Analog zur Spikerate verringerte sich auch die Anzahl der nachgewiesenen Korrelationen, während der Anteil an neu gebildeten Korrelationen an der Gesamtzahl unverändert blieb.

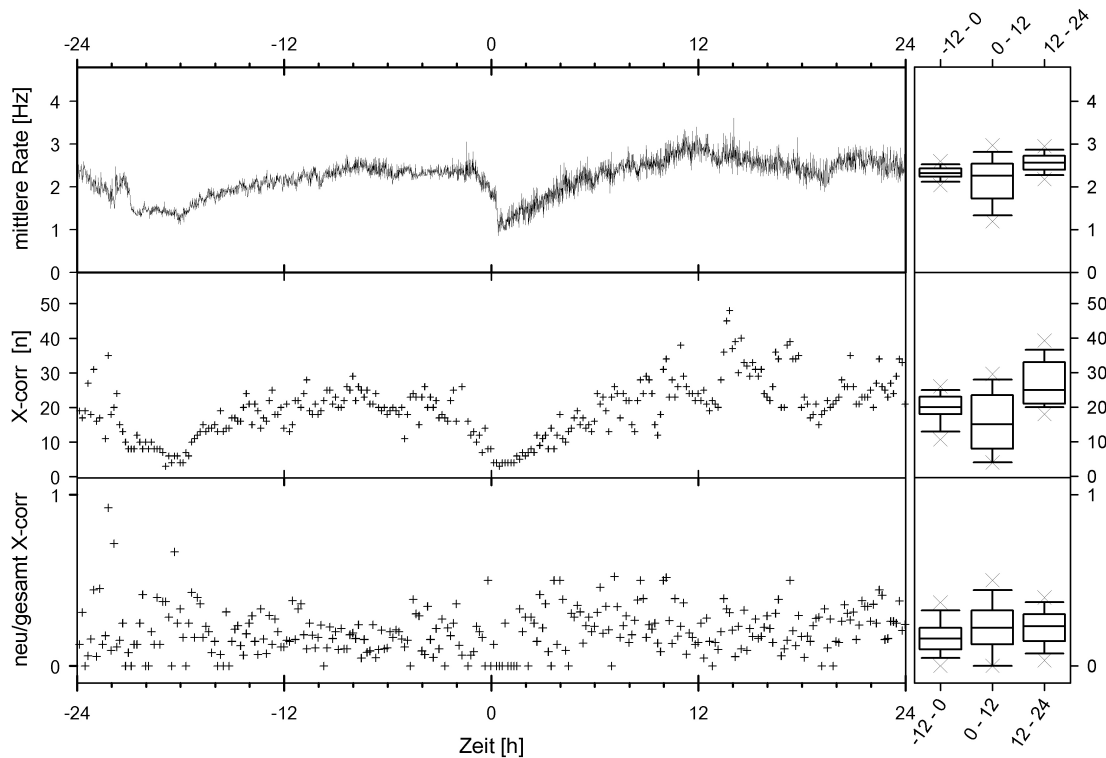


Abb. 21 Veränderung der Netzwerkeigenschaften einer SCN-Kultur nach Applikation von 100 nM AVP

In dem oberen Graph ist die gemittelte *Spikerate* aller Elektroden aufgetragen. Der mittlere Graph zeigt die Anzahl der Kreuzkorrelationen zwischen allen Elektroden, während der untere Graph den Anteil an neu gebildeten Korrelationen wiedergibt. Die Kastendiagramme auf der rechten Seite beschreiben die Verteilung zu verschiedenen Zeiträumen.

3.4 Phasenverschiebungen

3.4.1 Melatonin

In Säugetieren werden im suprachiasmatischen Nucleus beide Melatonin-Rezeptoren, MT_1 und MT_2 , exprimiert und es konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* an Hirnschnittpräparaten nachgewiesen werden, dass Melatonin den circadianen Schrittmacher im SCN direkt beeinflussen und seine Phasen verschieben kann. In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde der

Ergebnisse

Frage nachgegangen, ob diese Beeinflussung der circadianen Aktivität nur in einem intakten Netzwerk (*in vivo* bzw. im Hirnschnitt) beobachtet werden kann, oder auch schon auf der Ebene von einzelnen dissoziierten Zellen vorhanden ist, also unabhängig von der Netzwerkaktivität im SCN vonstatten geht. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde Melatonin, wie in Material und Methoden beschrieben, mit Hilfe eines Probengebers zu verschiedenen circadianen Zeiten appliziert und die Veränderungen der neuronalen Aktivität einzelner SCN-Zellen über mehrere Tage registriert. Um einen Vergleichspunkt für Applikationszeitpunkt und eventuelle Phasenverschiebungen der neuronalen Aktivität zu haben, wurde der Zeitpunkt, an dem die maximale *Spikeaktivität* erreicht wurde, als CT 6 definiert. Dies entspricht etwa dem Zeitpunkt (CT 6 -

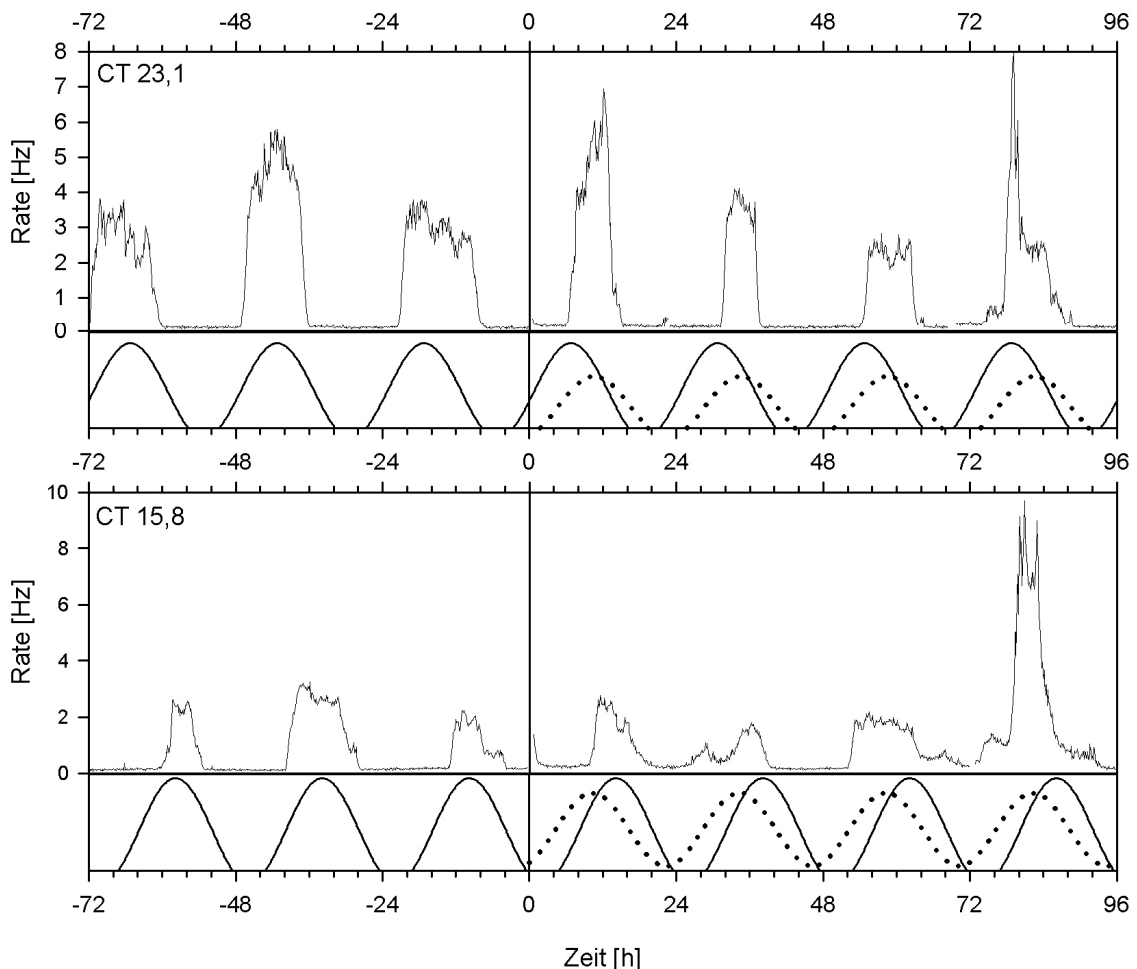


Abb. 22 Phasenverschiebung durch 100 nM Melatonin.

Zwei Beispiele für eine Phasenverschiebung der neuronalen Aktivität von Einzelzellen. Unterhalb des Histogramms sind die berechneten Cosinusfunktionen aufgetragen. Die durchgezogene Linie gibt die ursprüngliche Phase an, die punktierte Kurve verdeutlicht die Phase nach Melatonin-Applikation. Der relative Zeitpunkt der Applikation ist 0, das entspricht in der oberen Kurve CT 23,1 und in der unteren Kurve CT 15,8. Die obere Zelle zeigt eine Phasenverzögerung von 3,8 h, die untere eine Phasenbeschleunigung von 3,9 h.

CT 7), an dem im intakten Tier bzw. im Hirnschnitt die maximale *Spikerate* im SCN erreicht wird (siehe Einleitung; Gillette und Mitchell, 2002).

Melatonin wurde dem Medium zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugesetzt (siehe Abb. 24), da die exakte circadiane Zeit erst nach der Auswertung, die *offline* erfolgte, bestimmt werden konnte. Melatonin-Applikation (100 nM für 30 Minuten) hatte in allen Fällen einen deutlichen Einfluss auf den circadianen Rhythmus der *Spikeaktivität* der kultivierten SCN-Neurone (Abb. 22, 23). Die Aktivitätsrhythmen, der auf die Melatonin-Applikation folgenden Zyklen wurden entweder nach vorne (Phasen-Beschleunigung, Abb. 22 unten und Abb. 23) oder nach hinten (Phasen-Verzögerung, Abb. 22 oben) verschoben, d.h. die maximale *Spikeaktivität* trat entweder früher oder später auf. Phasen-Beschleunigungen und Phasen-Verzögerungen betragen bis zu 7 h. Interessanterweise konnte in zwei Versuchen bei Melatonin-Applikation zwischen CT 15 und CT 16 einmal eine Phasen-Beschleunigung von 7,1 Stunden (Abb. 24, 23), das andere Mal aber eine Phasen-Verzögerung von ca. 7 Stunden (Abb. 24) beobachtet werden. Bemerkenswert ist ebenso, dass sich Veränderungen in der rhythmischen *Spikeaktivität* teilweise erst nach Tagen manifestieren. Der erste Zyklus nach der Applikation war häufig unverändert, erst der zweite oder dritte Zyklus war dann von der Phasenverschiebung

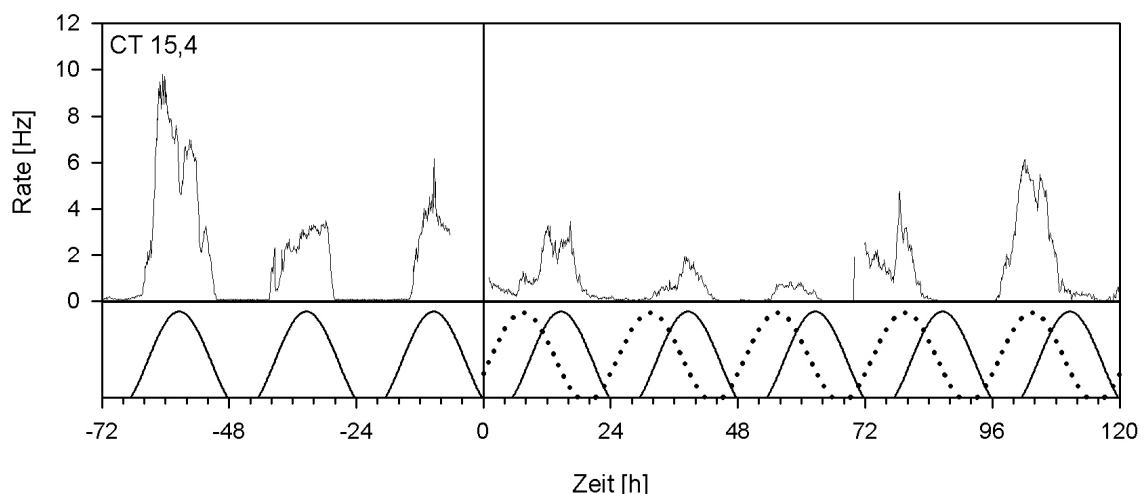


Abb. 23 Phasenverschiebung der *Spikerate* einer Einzelzelle durch 100 nM Melatonin.

Das SCN Neuron reagierte ähnlich wie das Neuron in Abb. 22 (unten) auf Melatonin-Applikation zum Zeitpunkt CT 15,4 mit einer Phasenbeschleunigung. Allerdings stellte sich erst nach 3 bis 4 Tagen ein stabiler, neuer Rhythmus ein, der um 7,1 Stunden nach vorne verschoben war. Die Kurven unterhalb des Histogramms zeigen die berechneten Cosinusfunktionen (durchgezogene Linie: vor Melatonin; gepunktete Linie: nach Melatonin).

betroffen (Abb. 22 oben, Abb. 23), In einem extremen Fall waren die ersten drei Zyklen nach der Applikation sehr variabel; erst ab dem vierten Zyklus stabilisierten sich die Rhythmen wieder mit einer Phasenverschiebung von 7,1 Stunden (Abb. 23).

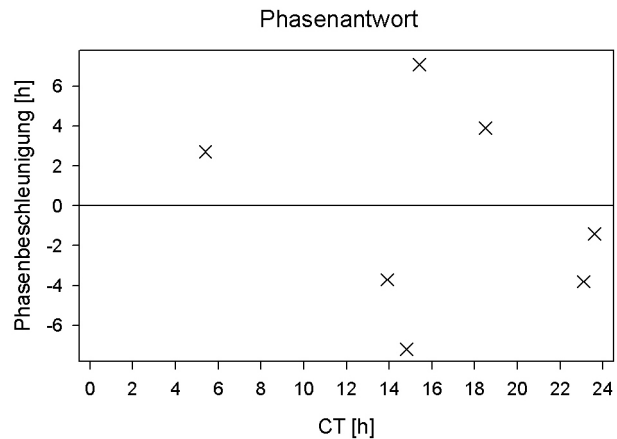


Abb. 24 Phasenantwortdiagramm für Melatonin

Die Phasenbeschleunigung ist aufgetragen gegen den Applikationszeitpunkt in CT.

Die Phasen-Antwort-Kurve, d.h. die Beziehung zwischen circadianer Zeit und Melatonin-Wirkung auf die Veränderungen (Beschleunigung oder Verzögerung) der einzelnen Phasen, ist in Abbildung 24 aufgetragen. Dieser Graph verdeutlicht, dass in isolierten Zellen die Antworten auf Melatonin-Applikationen sehr variabel sind und nicht mit der Phasen-Antwort-Beziehung der Melatonin-Wirkung am Hirnschnitt (Gillette und McArthur, 1995) vergleichbar sind. Es fällt besonders auf, dass in Zellkultur nicht nur Phasenbeschleunigungen sondern auch Phasenverzögerungen auftreten können. Ein Novum ist ebenso, dass Phasenverschiebungen erst mit langer Verzögerung von mehreren Tagen auftreten können. Dies ist bemerkenswert, da Langzeit-Ableitungen von isolierten Zellen sonst präzise und stabile Rhythmen aufweisen, wie in Kontrollversuchen mit Ableitungen über mehrere Wochen gezeigt werden konnte.

3.4.2 Orexin

Die Wirkung von Orexin A (3,3 nM) auf die rhythmische neuronale Aktivität von kultivierten SCN-Zellen ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Aktivitätsrhythmik wird durch Orexin A derart verschoben, dass die maximale Aktivität jeweils zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt auftrat. Die Phasenverschiebungen sind dabei, selbst wenn die Applikation etwa zu derselben circadianen Zeit erfolgte, sehr variabel. Abbildung 25 zeigt ein derartiges Beispiel mit einer Phasenbeschleunigung (oben), einer Phasenverzögerung (Mitte), bzw. einer weitgehend unveränderten Aktivitätsrhythmik bei Orexin-Applikation zu etwa derselben circadianen Zeit zwischen CT 8,1 und 8,5. Zur besseren Verdeutlichung der Effekte wurde die X-Achse in der

Ergebnisse

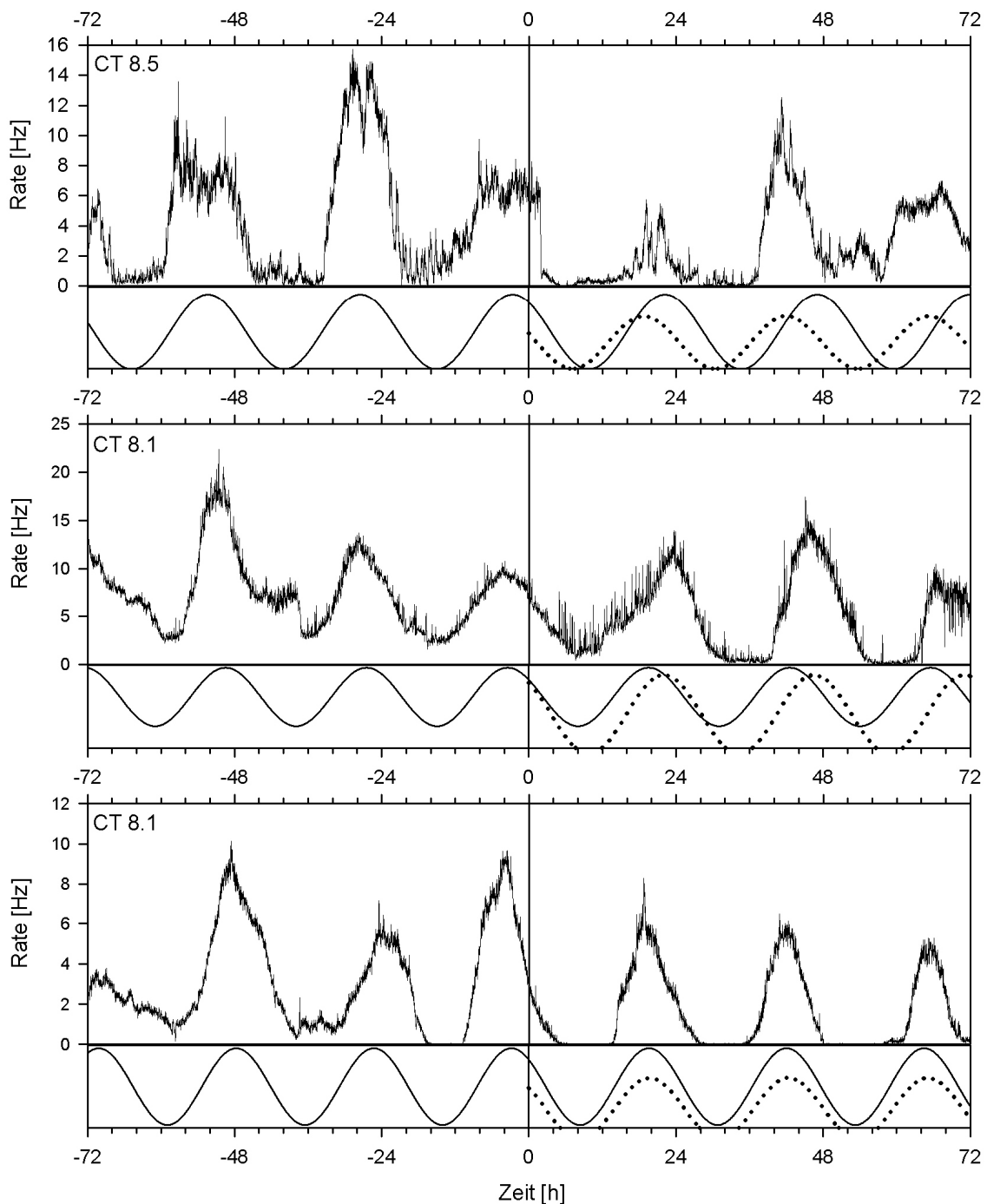


Abb. 25 Phasenverschiebung durch 3,3 nM Orexin A

Applikation von Orexin A (3,3 nM) zu etwa der gleichen circadianen Zeit (CT 8,1 bis 8,5) führt in einzelnen SCN-Zellen zu einer eindeutigen Phasenverschiebung der neuronalen Aktivität; diese Veränderungen sind allerdings variabel. Die obere Zelle zeigt eine Phasenbeschleunigung von 5,1 h, die mittlere eine Phasenverzögerung von 4,0 h und die untere eine rechnerische Verzögerung von 0,35 h. Die Kurven unterhalb der Histogramme zeigen die berechneten Cosinuskurven vor (durchgezogene Linie) und nach (gepunktete Linie) Orexin-Applikation. Zur besseren Verdeutlichung der Veränderungen wurde die Kontrollkurve (durchgezogene Linie) über den Applikationszeitpunkt (Zeit = 0) hinaus fortgesetzt.

Ergebnisse

Abbildung derart verschoben, dass die Applikation immer zum Zeitpunkt 0 durchgeführt wurde. In der oberen Registrierung ist die Spikeaktivität am ersten

Tag nach der Orexin-Behandlung deutlich vermindert und die maximale Entladungsrate wird ca. 5 Stunden früher beobachtet. Die Rhythmik stabilisierte sich dann am zweiten Tag nach der Applikation. In der mittleren Registrierung zeigt sich eine deutliche Phasenverzögerung von 4 Stunden, während in der unteren

Abbildung ein sehr stabiler circadianer Rhythmus mit einer nur schwachen Phasenverzögerung von etwa 20 Minuten zu sehen ist. Sämtliche Effekte von Orexin auf die circadiane neuronale Aktivität waren ausgesprochen variabel.

Die Aktivitätsrhythmen konnten sich bei Applikation zum selben circadianen Zeitpunkt um bis zu 6 Stunden in beide Richtungen, d.h. im Sinne einer Phasenbeschleunigung bzw. Verzögerung, verschieben, oder auch vollkommen unbeeinflusst bleiben (Abb. 26).

Rhythmisch feuernende Neurone zeigten nie eine Veränderung ihrer Entladungsrate durch die Applikation von 3,3 nM Orexin A.

Trigonometrische Regressionen ersten bis dritten Grades lassen keinen Zusammenhang zwischen

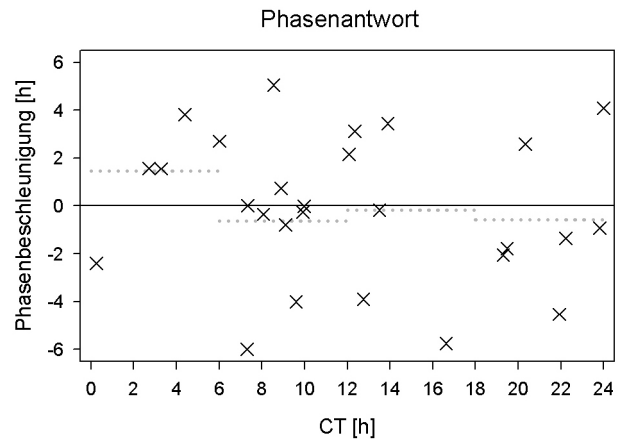


Abb. 26 Phasenantwortdiagramm für 3,3 nM Orexin A

Die Phasenbeschleunigung ist gegen den Applikationszeitpunkt (CT) aufgetragen. Jedes X markiert die Phasenantwort einer Einzelzelle. Die gepunkteten Linien geben den Mittelwert für sechsstündige Intervalle an. Die Reaktionen sind sehr variabel und weisen nur im Bereich zwischen CT 0 und CT 6 eine Tendenz zur Phasenbeschleunigung auf.

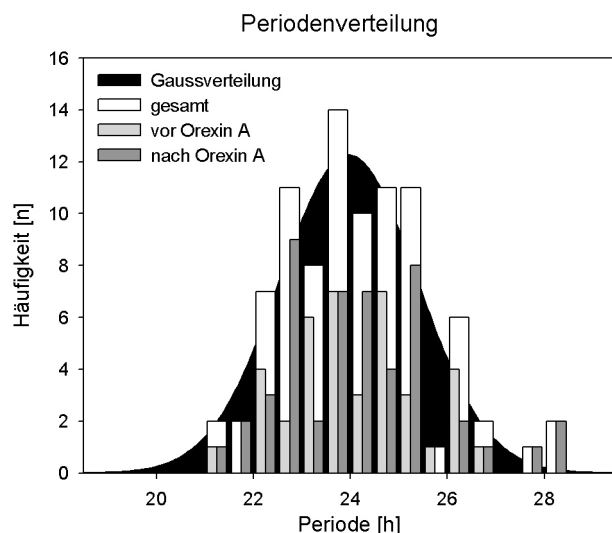


Abb. 27 Verteilung der Perioden von Einzelzellen

Die Perioden einzelner SCN-Neurone sind normalverteilt mit einem Mittelwert von $24,15 \text{ h} \pm 1,5 \text{ h}$ ($n = 88$). Die Applikation von 3,3 nM Orexin A hat keinen Einfluss auf die Periode (hellgraue Balken: vor, dunkelgraue Balken: nach der Applikation; weiße Balken: die Summe aus allen Datenpunkten).

Phase und Phasenbeschleunigung erkennen. Lediglich in der Zeit zwischen CT 0 und CT 6 ist eine Tendenz zur Phasenbeschleunigung zu sehen.

Die Mittelwerte aller untersuchten Perioden vor (24,14 h) und nach (24,16 h) der Gabe von Orexin A sind dabei normalverteilt und zeigen auch innerhalb der Untergruppen keine Unterschiede in ihrer Verteilung (Abb. 27).

3.5 Wirkung von Neurotransmittern und Neuropeptiden auf die neuronale Aktivität im SCN

Die in Kapitel 3.4 beschriebenen Phasenverschiebungen in der neuronalen Aktivität der SCN-Neurone werden vermutlich durch Veränderungen der Aktivität einzelner Neurone, der synaptischen Aktivität sowie durch zelluläre Interaktionen hervorgerufen und manifestieren sich dann in einem veränderten circadianen Ausgangssignal. Um zu überprüfen, ob die untersuchten Neurotransmitter und Neuropeptide neben langfristigen, circadianen Effekten auch kurzzeitige Veränderungen der *Spikerate* einzelner Neurone hervorrufen können, wurden mit Hilfe einer eigens entwickelten Mikro-Perfusionskammer Kurzeiteffekte der Substanzen auf die *Spikerate* ermittelt. Diese Kammer ermöglichte eine hohe Austauschrate des Mediums und eine gleichmäßige Verteilung, ohne dass es zu einer starken Verdünnung der Test-Substanzen in der Versuchskammer kam.

3.5.1 GABA

GABA als dominierender inhibitorische Neurotransmitter im SCN wird von der Mehrheit der SCN-Neurone exprimiert und ausgeschüttet. Dies drückt sich auch darin aus, dass die Mehrzahl der SCN-Neurone empfindlich für GABA oder GABA-Agonisten ist.

3.5.1.1 Muscimol

Nahezu alle Neurone werden durch den GABA_A-Agonisten Muscimol in ihrer Aktivität gehemmt (Abb. 28A, C). Die Anzahl der beeinflussten Neurone, sowie Stärke und Dauer der Hemmung steigen dabei mit der Konzentration deutlich an. Bei einer Konzentration von 50 µM Muscimol werden sämtliche SCN-Neurone vollständig gehemmt (Abb. 29). Die minimale Muscimol-Konzentration, die für eine Hemmung erforderlich ist, liegt unterhalb von 0,1 µM. Dies ist die niedrigste Konzentration, die getestet wurde, und ihr Effekt ist bereits signifikant

Ergebnisse

verschieden von der des Vehikels (Kruskal-Wallis-Test; $P < 0,01$). Hierbei werden schon 42 % aller Neurone schwach gehemmt. Der Anteil der reagierenden Neurone steigt auf 72 % bei 10 μM und schließlich bis auf 100 % bei 50 μM Muscimol. Die Dosis-abhängige Hemmung der Neurone durch Muscimol ist hochsignifikant (Spearman-Test; $P < 0,001$, $r_s = -0,415$; Abb. 29A; $P < 0,001$, $r_s = -0,247$; Abb. 29B).

Interessanterweise wird ein Teil der Neurone (etwa 12 %) durch niedrige Muscimol-Konzentrationen (0,1 μM bis 0,5 μM) eindeutig erregt (Abb. 28B, D); bei höheren Konzentrationen wandelt sich dieses monophasische Antwort dann in ein biphasisches Antwortmuster um, bei der der initialen kurzzeitigen Erregung immer eine deutliche Hemmung folgt.

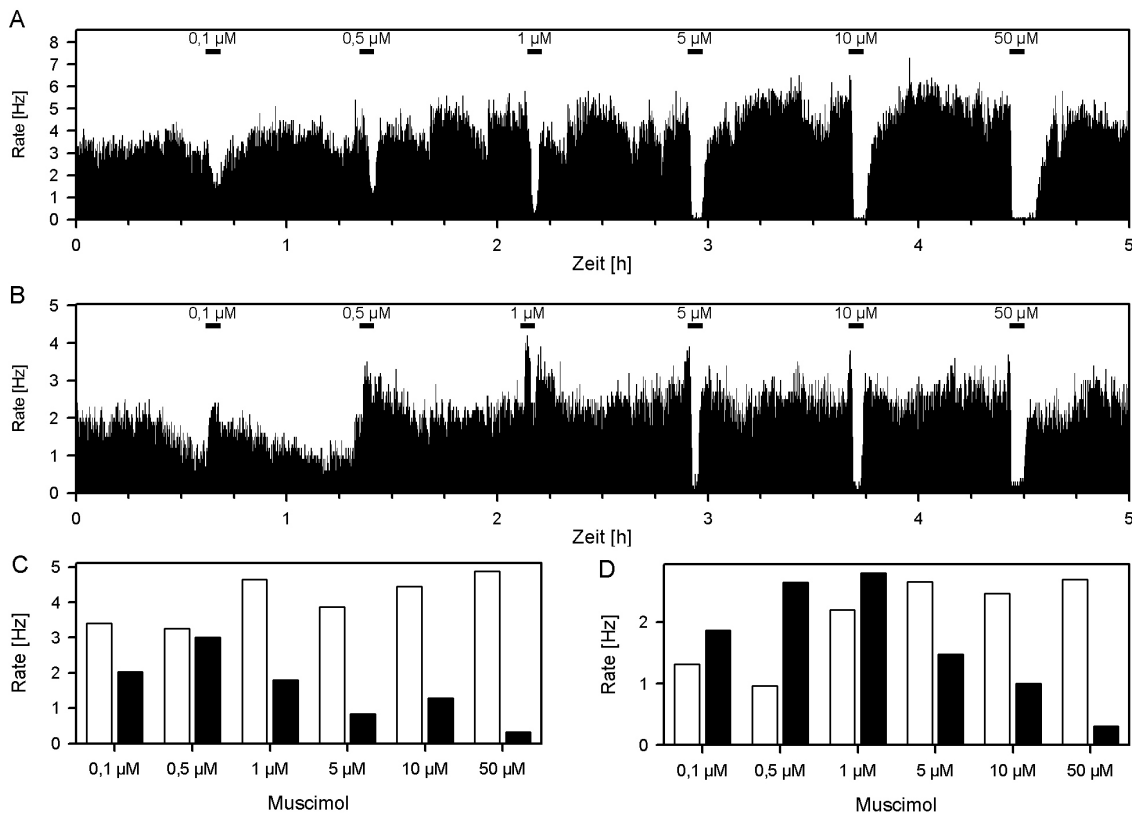


Abb. 28 Kurzzeiteffekte von Muscimol

Muscimol verursacht dosisabhängige Veränderungen der *Spikerate*. Die Originalregistrierungen der *Spikerate* in **A** und **B** (Binbreite = 10 s) verdeutlichen, dass die Effekte hauptsächlich inhibitorisch (**A**) sind. In Einzelfällen (Abb. **B**) werden bei niedrigen Muscimol-Konzentrationen jedoch auch exzitatorische Antworten beobachtet, die bei höheren Konzentrationen (ab etwa 1 μM) von einer deutlichen Hemmung gefolgt sind. Abbildungen **C** und **D** zeigen die gemittelten *Spikeraten* vor (weiße Balken; Zeitraum 5 min) und während der Muscimol-Applikation (schwarze Balken; Zeitraum 4 min).

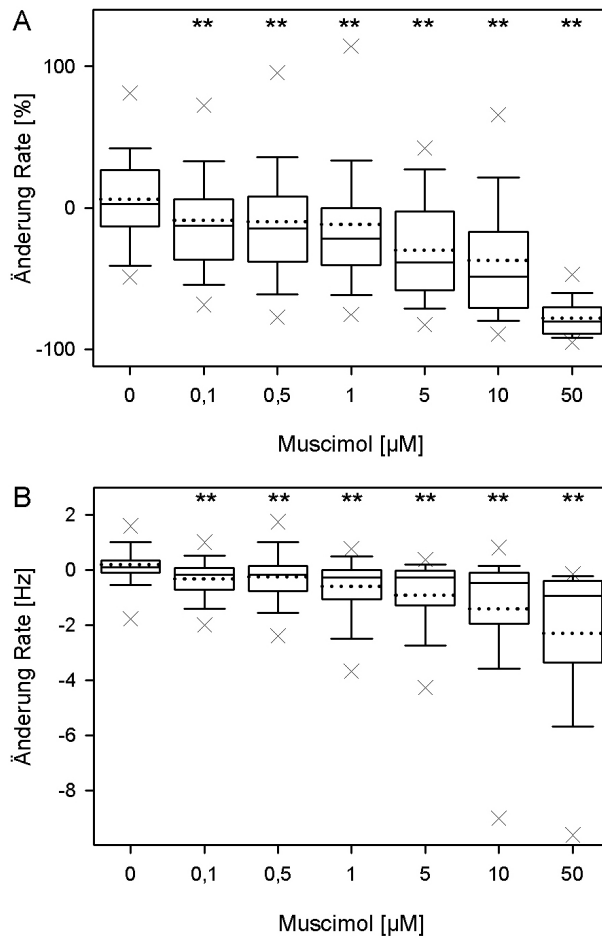


Abb. 29 Änderung der Spikerate bei verschiedenen Muscimol-Konzentrationen.

Die Reaktionen sind als Kasten-diagramme zusammengefasst (zur weiteren Erläuterung der Diagramme siehe Abb. 10 Seite 32). In beide Abbildungen wurden dieselben SCN-Neurone in die Berechnung mit einbezogen; in **A** sind die Veränderungen relativ, in **B** absolut dargestellt. Die Reaktionen aller getesteten Konzentrationen unterscheiden sich signifikant (Kruskal-Wallis-Test; Dunn-Test $P < 0,01$) vom Vehikel ($0 \mu\text{M}$). Die relativen Effekte weisen eine signifikante Dosisabhängigkeit nach Spearman auf ($P < 0,001$; $r_s = -0,415$), ebenso die absoluten ($P < 0,001$; $r_s = -0,247$).

3.5.1.2 Baclofen

Der GABA_B -Agonist Baclofen hatte eine wesentlich schwächere Wirkung als Muscimol. Die meisten Neurone, die Muscimol-empfindlich waren, reagierten allerdings nicht auf Baclofen-Applikation in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 nM und $20 \mu\text{M}$ (Abb. 30). In einem Fall wurde ein Neuron eindeutig konzentrations-abhängig durch Baclofen gehemmt.

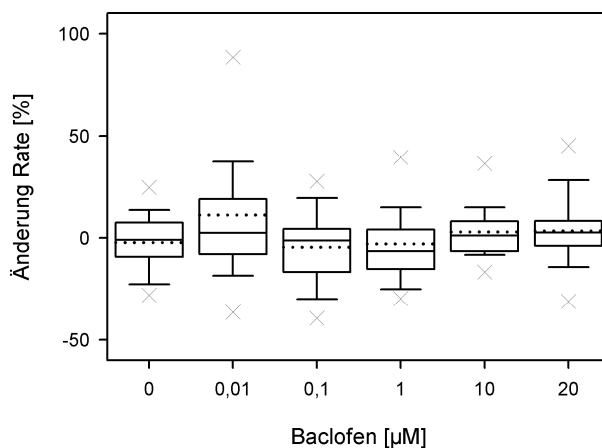


Abb. 30 Änderung der Spikerate bei verschiedenen Baclofen-Konzentrationen

Die Reaktionen sind als Kasten-diagramme zusammengefasst (zur weiteren Erläuterung der Diagramme siehe Abb. 10 Seite 32). Konzentrationen von 10 nM bis $20 \mu\text{M}$ Baclofen haben keinen signifikanten Einfluss auf die Entladungsrate von kultivierten SCN-Neuronen (Kruskal-Wallis-Test).

3.5.1.3 Bicucullin

Die Applikation des GABA_A-Antagonisten Bicucullin bewirkte eine starke Erregung der Zellkulturen. Konzentrationen von 20 µM Bicucullin steigerten nicht nur die allgemeine neuronale Aktivität, sondern bewirkten, dass sich *burst*-artige *Spikemuster* über die ganze Kultur ausbreiteten. Die *bursts* zogen in Wellen über das Elektrodenfeld und dominierten sämtliche Aktivität (Abb. 17). Das Phänomen bildete sich mit sinkender Konzentration zurück. Bei niedrigen Zelldichten waren die Steigerung der Entladungsrate und *bursts* weniger stark ausgeprägt.

3.5.2 Glutamat

3.5.2.1 Glutamat

Glutamat, einer der bedeutendsten exzitatorischen Neurotransmitter im ZNS, spielt im SCN vor allem bei der Übermittlung von Lichtinformationen von der Retina zum SCN sowie als Ausgangssignal der Projektionsneurone des SCN eine Rolle (siehe Einleitung; Ebling, 1996). In unserem MEA-Kultursystem bewirkte die kurzzeitige Applikation von Glutamat allerdings nicht nur eine Erregung, sondern ein fast gleich großer Anteil von Zellen wurde auch gehemmt (Abb. 31A). Daher blieb auch der Mittelwert aller Zellen unverändert, lediglich die Streuung stieg mit der Dosis. Werden exzitatorische und inhibitorische Antworten getrennt, so werden dosisabhängige Steigerungen der Effekte sichtbar (Abb. 31B).

Ergebnisse

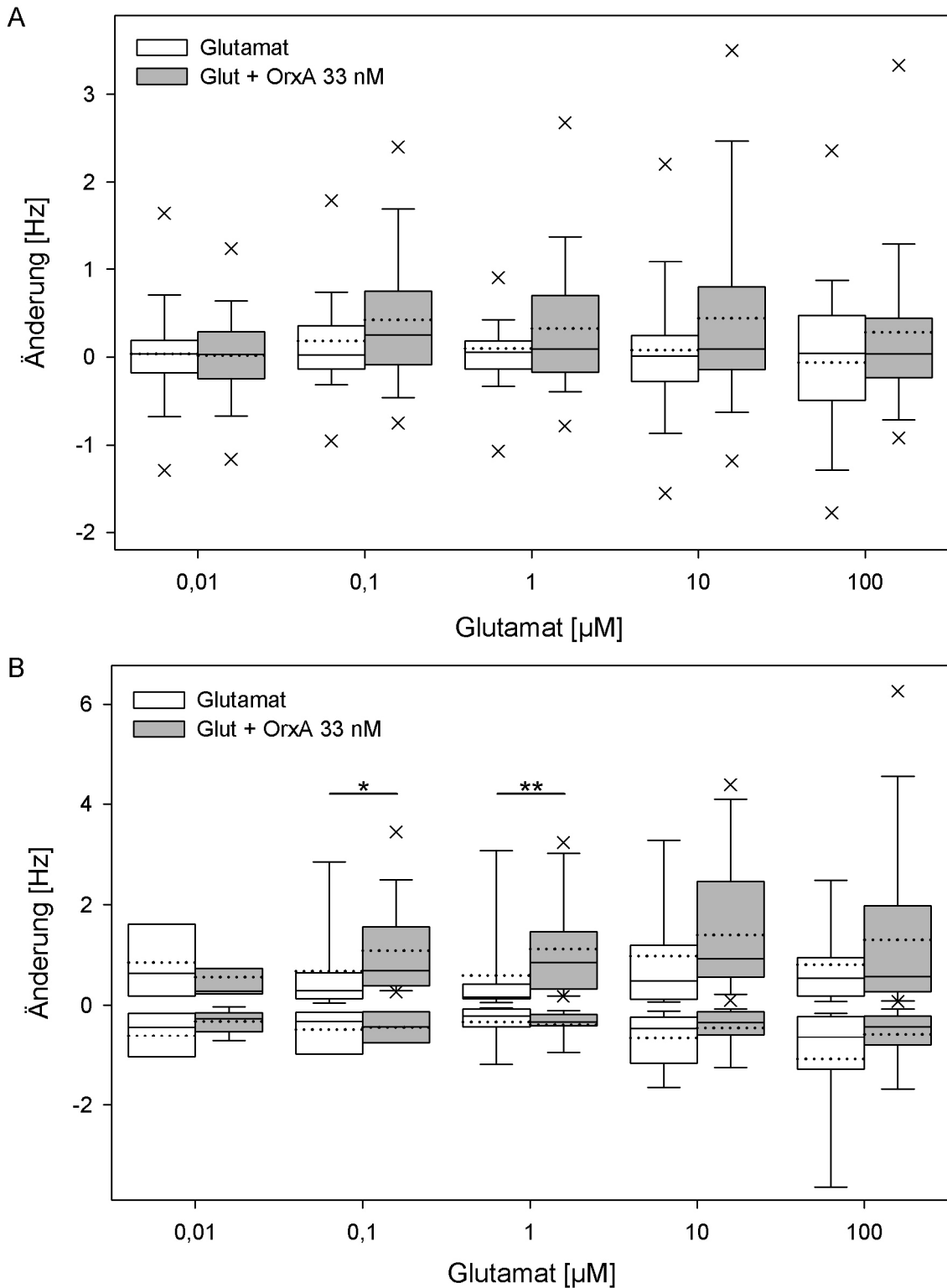


Abb. 31 Einfluss von Orexin A auf die Glutamat-Antwort

Die Diagramme vergleichen die Veränderung der *Spikerate* nach Applikation von Glutamat (weiß) mit derjenigen nach gleichzeitiger Gabe von Orexin A (33 nM) und Glutamat (zur weiteren Erläuterung der Diagramme siehe Abb. 36). **A:** Reines Glutamat verändert nicht die mittlere *Spikerate* der gesamten Kultur, lediglich die Streuung steigt. Zusammen mit Orexin A weicht der Mittelwert von 0 in den exzitatorischen Bereich ab. **B:** Trennt man exzitatorische von inhibitorischen Antworten, so wird der verstärkende Einfluss von Orexin A auf die Erregung signifikant deutlich. (Mann-Whitney Rang-Summen-Test, * $\equiv P < 0,05$; ** $\equiv P < 0,01$) Als Kriterium für eine Antwort wurden Veränderungen der *Spikerate* von mehr als 20 % genommen.

3.5.2.2 Kainat

Der Glutamat-Agonist Kainat ist spezifisch für zwei nach ihm benannte Gruppen (2 und 3) von ionotropen Glutamatrezeptoren. Kainat-Applikation führte interessanterweise nicht nur zu einer Erregung (Abb. 44), wie man es für einen Agonisten des Glutamat-Rezeptors erwarten sollte, sondern häufiger zu einer deutlichen Verminderung der *Spikeaktivität* (Abb. 43, 41, 45) oder zu biphasischen Effekten (Abb. 44). Die hemmende Wirkung von Kainat war dosisabhängig, wobei die Schwellenkonzentration in den durchgeführten Versuchen unter 10 nM (niedrigste getestete Kainat-Konzentration) lag. Bei einer Konzentration von etwa 10 μM wurde die *Spikeaktivität* einiger Neurone komplett gehemmt; bei noch höheren Konzentrationen verlängerte sich die Zeitdauer der Hemmung und die *Spikerate* erreichte nur sehr langsam ihren ursprünglichen Wert zurück. Trotz der zumeist hemmenden Wirkung von Kainat scheint aber die Grundaktivität mancher Neurone zuzunehmen (Abb. 43). Betrug die Basisaktivität vor der ersten Kainat-Applikation etwa 3,5 Hz, stieg die

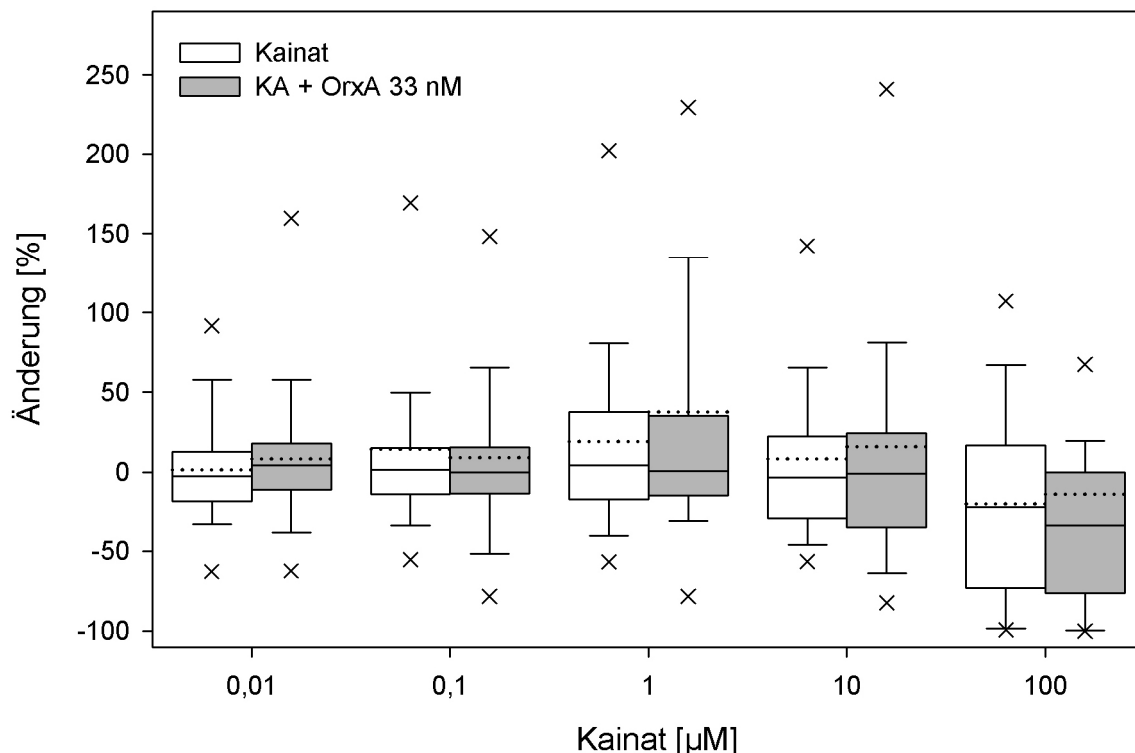


Abb. 32 Einfluss von Orexin A auf die Kainat-Antwort

Das Diagramm vergleicht die Veränderung der *Spikeraten* nach Applikation von Kainat (weiß) mit derjenigen nach gleichzeitiger Gabe von 33 nM Orexin A und Kainat (grau). Die gepunkteten Linien markieren die Mittelwerte, die durchgezogene horizontale Linie die Medianwerte. Geringe Dosen Kainat bewirken im Mittel eine Erregung der Neurone, ab 10 μM Kainat wird auch ein inhibitorischer Effekt bemerkbar, der bei 100 μM Kainat dominiert, jedoch von Orexin A gemildert wird.

Ergebnisse

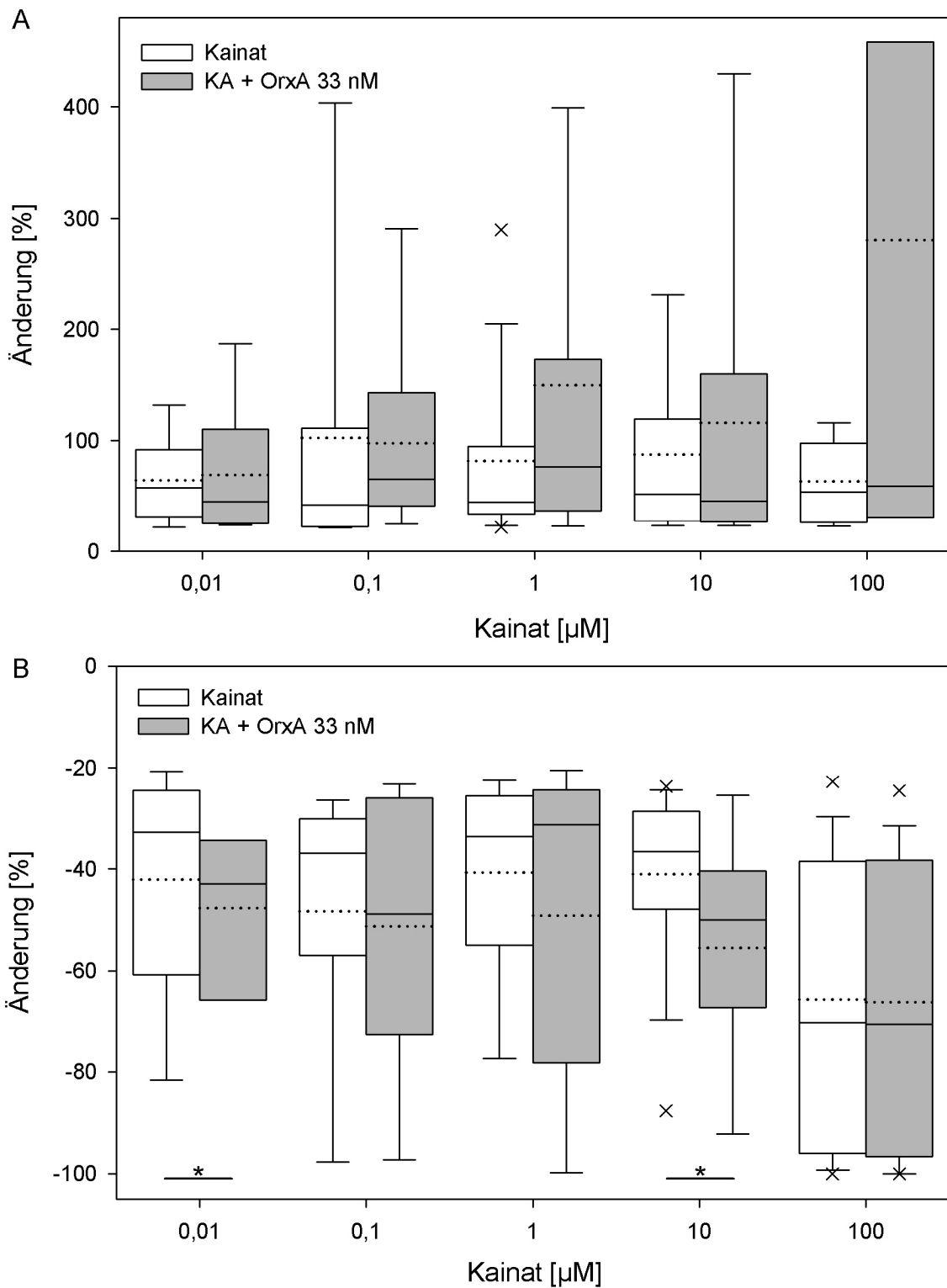


Abb. 33 Einfluss von Orexin A auf die Kainat-Antwort

Das Diagramm vergleicht die Veränderung der *Spikeraten* nach Applikation von Kainat (weiß) mit derjenigen nach 33 nM Orexin A und Kainat (grau). Die gepunkteten Linien markieren die Mittelwerte, die durchgezogenen die Mediane für jeweils die exzitatorischen (**A**) und die inhibitorischen Antworten (**B**). Als Kriterium für eine Antwort wurden Veränderungen der *Spikerate* von mehr als 20 % genommen.

Spikerate im Verlauf des Versuches bis auf ca. 8 Hz an. Die erregende Wirkung von Kainat war wesentlich weniger deutlich ausgeprägt (Abb. 44). Schon die niedrigste Konzentration (100 nM) führte zu einer starken Erregung, die mit steigenden Konzentrationen schwächer wurde und bei der höchsten Konzentration (100 nM) sogar nach einer initialen Erregung in eine Hemmung umschlug. Auch einige Neurone, die auf niedrige Konzentrationen nicht reagierten, wurden durch 100 μ M Kainat komplett gehemmt (Abb. 42).

3.5.2.3 Quisqualat

Eine zweite Untergruppe der ionotropen Glutamat-Rezeptoren wurde früher nach dem Agonisten Quisqualat benannt. Später fand man heraus, dass Quisqualat nicht nur auf den ionotropen Rezeptor vom AMPA-Typ wirkt, sondern auch auf metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe 1.

Kurzzeitapplikationen von Quisqualat konnten exzitatorisch (Abb. 47, 49) aber auch inhibitorisch (Abb. 48) im SCN wirken. Viele exzitatorisch antwortenden Neurone wurden außerdem durch hohe Konzentrationen von Quisqualat (100 μ M) gehemmt (Abb. 49). Einige der Quisqualat-sensiblen Zellen zeigten bis zu einer Stunde nach der Applikation noch eine verminderte Aktivität (Abb. 48, 49).

Kurzzeitapplikationen von 100 μ M Quisqualat hatten bei $\frac{3}{4}$ aller Zellen Veränderungen der *Spikerate* von über 20 % zur Folge (Abb. 50). Über die Hälfte aller Zellen reagierte inhibitorisch, nur ein viertel exzitatorisch. Erstaunlicherweise blieben Median und Mittelwert aller Antworten quasi konstant bei null, lediglich die Streuung stieg (Abb. 34A). Trennt man die exzitatorischen von den inhibitorischen Antworten (Abb. 34B), wird eine signifikante Steigerung der Reaktionen mit der Konzentration sichtbar (exzitatorisch: $r_S = 0,354$; $P < 0,01$; inhibitorisch: $r_S = -0,427$; $P < 0,01$).

Ergebnisse

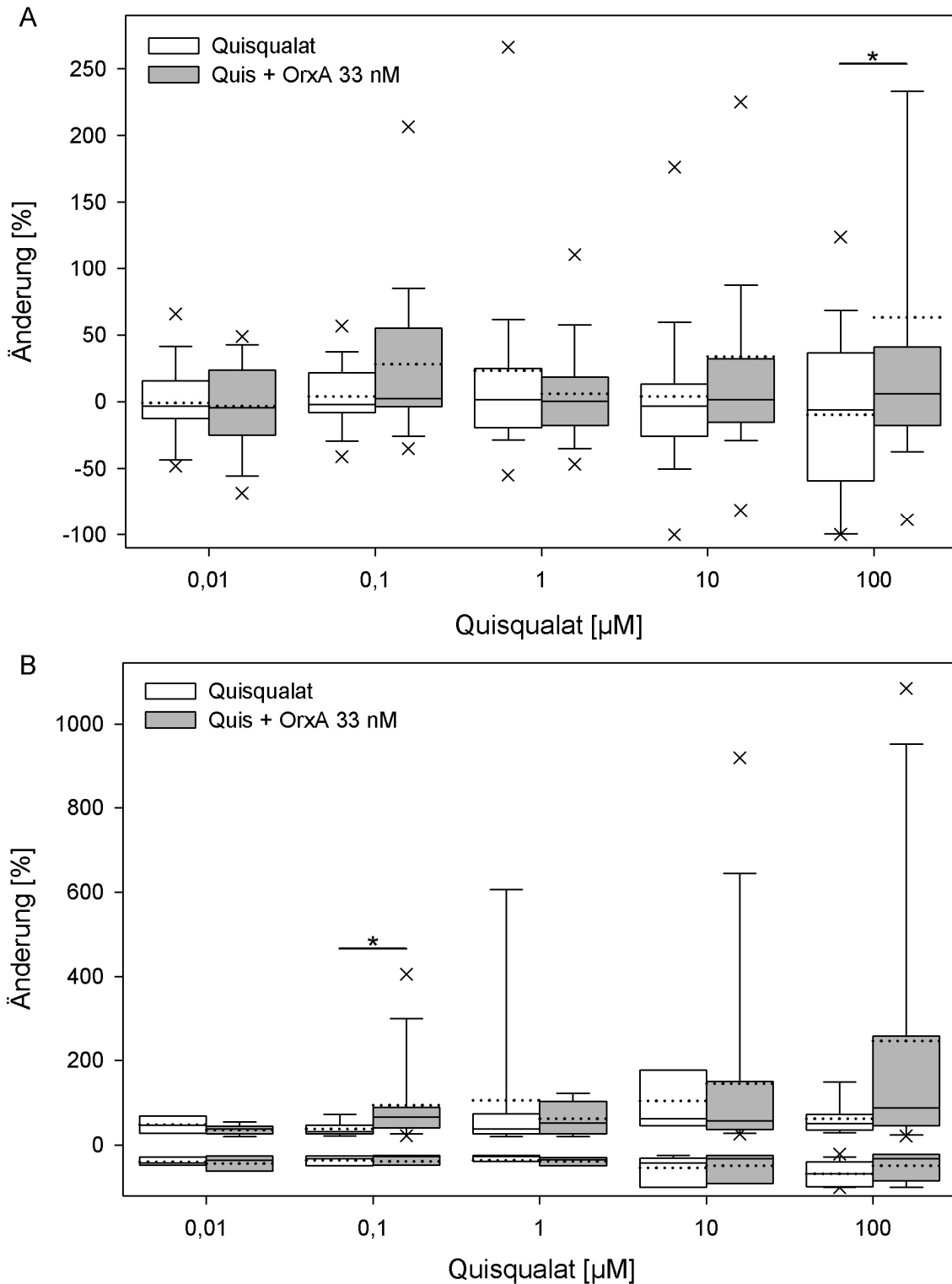


Abb. 34 Einfluss von Orexin auf die Quisqualat-Antwort

Die Diagramme vergleichen die Veränderung der *Spikeraten* nach Applikation von Quisqualat (weiß) mit derjenigen nach gleichzeitiger Gabe von 33 nM Orexin A (grau) und Quisqualat (zur weiteren Erläuterung der Diagramme siehe Abb. 36). **A:** Quisqualat verändert kaum die mittlere *Spikerate* der abgeleiteten Zellen, lediglich die Streuung steigt. Bei Co-Applikation von Orexin A steigen die Mittelwerte deutlich an, allerdings bleiben die Medianwerte, mit Ausnahme der höchsten Konzentration relativ konstant. Die Verteilung bekommt ab 10 µM Quisqualat eine deutliche Schiefe. Ab 100 µM ist der Unterschied signifikant. **B:** Trennt man exzitatorische von inhibitorischen Antworten, so wird die Konzentrationsabhängigkeit der Effekte wesentlich deutlicher:

Quisqualat exzitatorisch: $r_s = 0,354$; $P < 0,01$; Quisqualat inhibitorisch: $r_s = -0,427$; $P < 0,01$; Quisqualat + Orexin exzitatorisch: $r_s = 0,341$; $P < 0,05$ (Spearman-Test).

3.5.2.4 AMPA

Die α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure, AMPA, ist ein Agonist für die erste Gruppe der ionotropen Glutamaterezeptoren. Diese homogene Familie schneller Rezeptorkanäle wurde nach diesem bekanntesten Agonisten benannt.

Die Gabe von AMPA bewirkte in den meisten Fällen keine Veränderung der *Spikerate*. Die wenigen Neurone die eindeutig reagierten, zeigten eine leichte Erregung oder alternativ bei einer Konzentration von 100 μM AMPA eine deutliche Hemmung (Abb. 51). Die Gesamtheit aller gemessenen Zellen tendierte mit zunehmender Konzentration zu einer Verringerung der mittleren *Spikerate*. Die Verteilung bekam durch die wenigen reaktiven Neurone eine deutliche Schiefe. Diese wenigen Antworten reichten jedoch nicht aus, um eine signifikante Dosisabhängigkeit oder einen Unterschied gegenüber dem Vehikel nachzuweisen (Abb. 35).

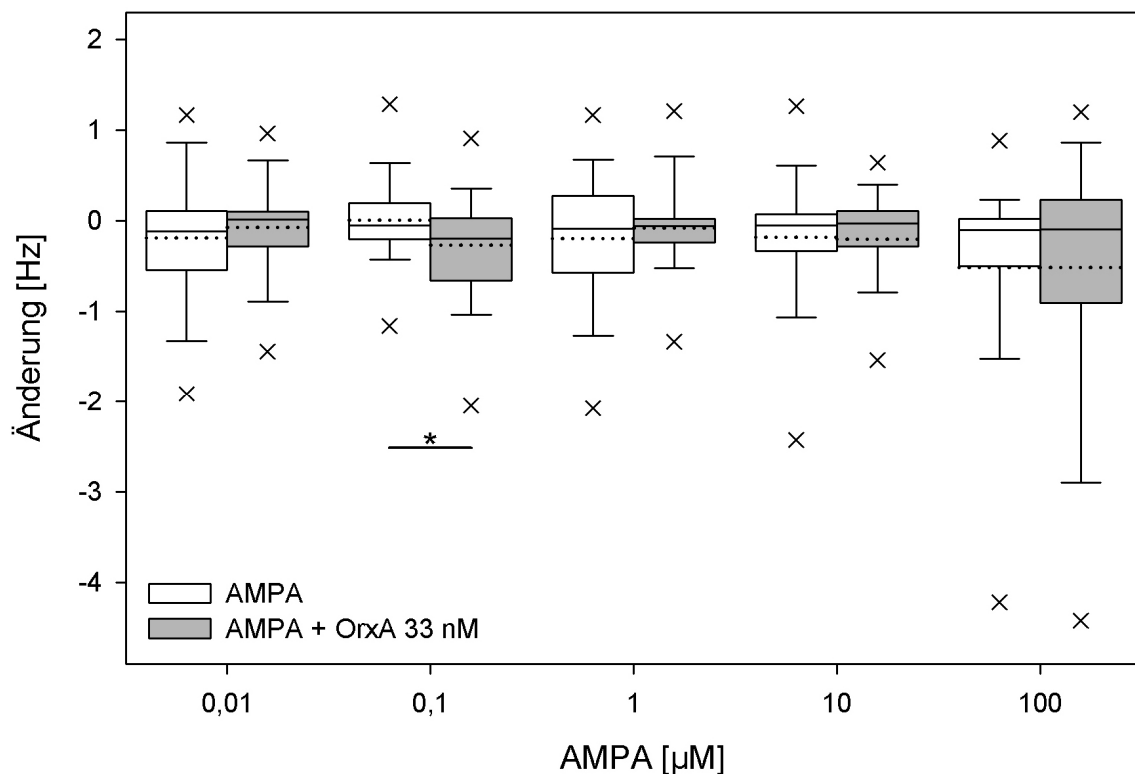


Abb. 35 Einfluss von Orexin A auf die AMPA-Antwort

Das Diagramm vergleicht die Veränderung der *Spikeraten* nach Applikation von AMPA (weiß) mit derjenigen nach gleichzeitiger Gabe von 33 nM Orexin A und AMPA (grau). Die gepunkteten Linien markieren die Mittelwerte. Hohe AMPA-Dosen (100 μM) senken die mittlere Entladungsrate. Zusätzliche Gaben von 33 nM Orexin A bewirken bei 0,1 μM AMPA bereits eine Inhibierung.

(zur weiteren Erläuterung der Diagramme siehe Abb. 36)

3.5.3 Orexin A

Orexin A wurde in Konzentrationen von 0,33 nM bis zu 100 nM mit Hilfe eines Autosamplers appliziert. Bei der höchsten Orexin A-Konzentration (100 nM) reagierten zwei Drittel aller abgeleiteten Zellen mit einer Änderung der *Spikerate* (Abb. 37); ein Drittel wurde in der Aktivität erregt, ein Drittel gehemmt. Biphasische Antworten, d.h. Erregung gefolgt von einer Hemmung bzw. Hemmung gefolgt von einer Erregung, traten nur sehr selten auf. Betrachtet man die Änderungen der *Spikerate* bei sämtlichen angewandten Konzentrationen dann überwogen exzitatorische (38 %) über die inhibitorischen (28 %) Effekte. Die Stärke der erregenden Orexin-Wirkung war eindeutig Dosisabhängig ($P < 0,01$; $r_s = 0,327$) (Abb. 36) und ab 10 nM auch signifikant verschieden vom Vehikel (10 & 33 nM: $P < 0,05$; 100 nM: $P < 0,01$). Im Allgemeinen waren die Veränderungen der *Spikerate* sowohl für die exzitatorische als auch für die inhibitorische Antwort nicht besonders stark ausgeprägt und überstiegen selten mehr als 30 % der ursprünglichen Aktivität. Manche Zellen zeigten lang anhaltende Effekte von Orexin, die weit über den Applikationszeitraum hinausgingen (Abb. 38).

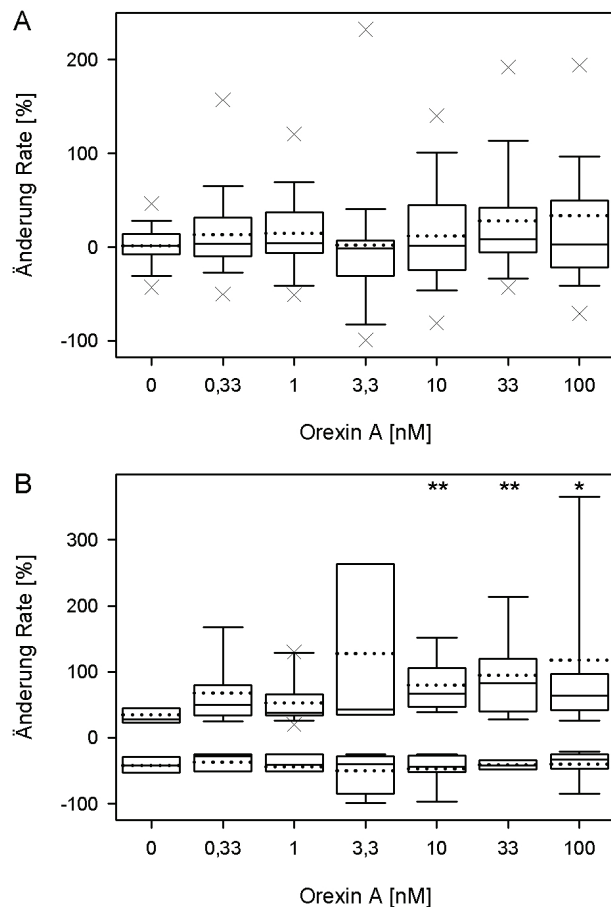


Abb. 36 Veränderungen der *Spikerate* bei verschiedenen Orexin A Konzentrationen.

Die Reaktionen sind als Kastendiagramme zusammengefasst (zur weiteren Erläuterung der Diagramme siehe Abb. 10 Seite 32). In Abbildung **A** wurden alle SCN-Neurone in die Berechnung mit einbezogen; in **B** nur diejenigen Neurone, die mindestens eine 20-prozentige Veränderung der *Spikerate* aufwiesen. Dabei wurden exzitatorische und inhibitorische Antworten getrennt voneinander betrachtet. Alle Antworten zusammengekommen (**A**) zeigen eine tendenzielle Dosisabhängigkeit nach Pearson ($r_P = 0,131$; $P < 0,05$). Diese Abhängigkeit geht auf die exzitatorischen Antworten (**B**) zurück ($r_S = 0,327$; $P < 0,01$). Die Änderung der Rate bei den Konzentrationen von 10 - 100 nM gegenüber dem Vehikel ist signifikant (Kruskal-Wallis-Test, * $\equiv P < 0,05$; * $\equiv P < 0,01$)

Ergebnisse

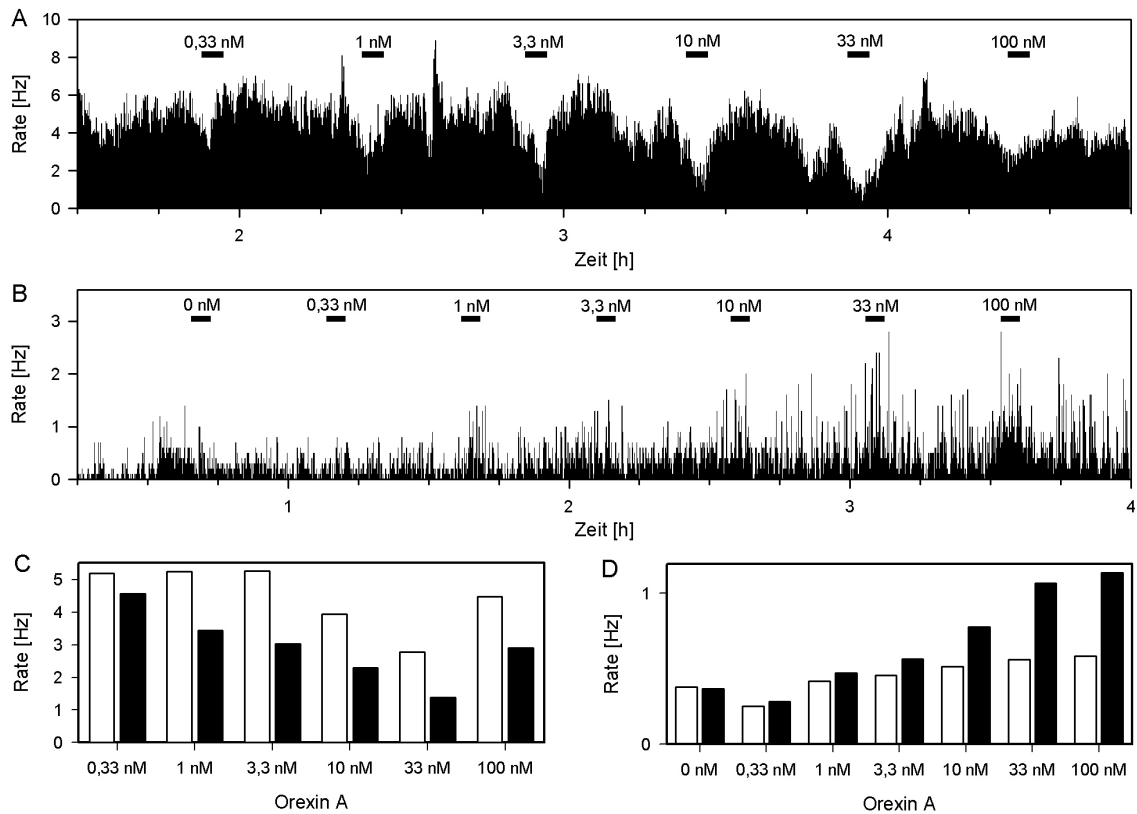


Abb. 37 Kurzzeiteffekte von Orexin A

Orexin A verursacht dosisabhängige Veränderungen der *Spikerate*. Die Originalregistrierungen der *Spikerate* in **A** und **B** (Säulenbreite = 10 s) verdeutlichen, dass die Effekte sowohl inhibitorisch (**A**) als auch exzitatorisch (**B**) ausfallen können. Deutliche inhibitorische Effekte treten ab etwa 1 nM auf, exzitatorische Effekte ab 10 nM. Abbildungen **C** und **D** zeigen die gemittelten *Spikeraten* vor (weiße Balken; Zeitraum 5 min) und während der Orexin-Applikation (schwarze Balken; Zeitraum 4 min).

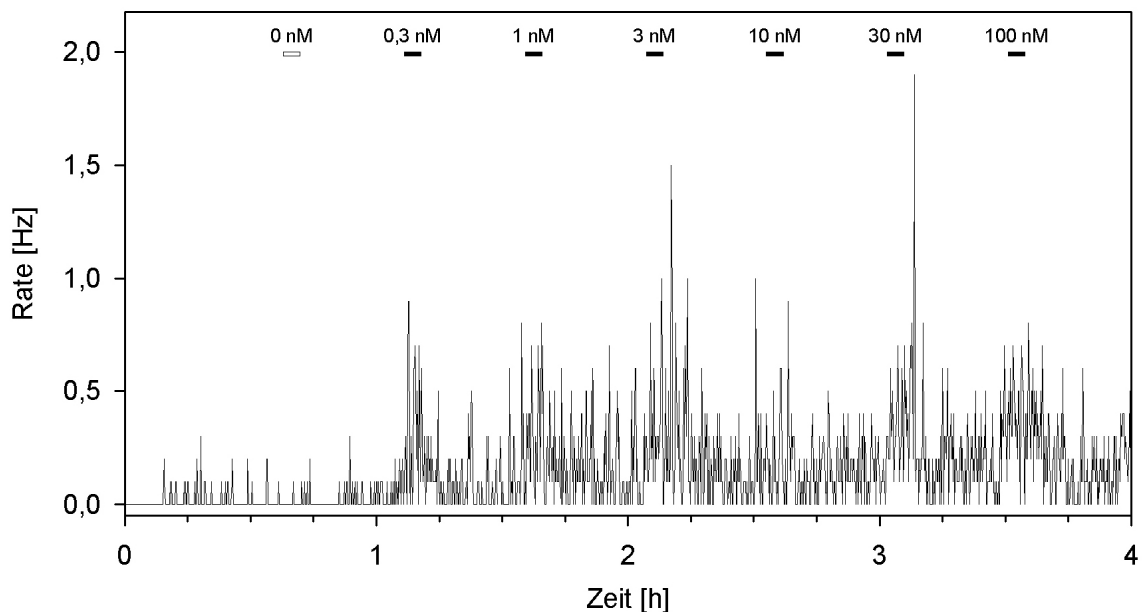


Abb. 38 Exzitatorische Wirkung von Orexin A

Dieses Neuron wurde durch Orexin-Applikationen erregt. Die Schwellenkonzentration lag dabei unter 0,3 nM (niedrigste applizierte Konzentration). Die Wirkung hielt teilweise über den Applikationszeitraum hinaus an. Das Neuron war ebenfalls Glutamatempfindlich (siehe Abb. 40 auf Seite 76).

3.5.4 Orexin-Glutamat-Interaktion

3.5.4.1 Glutamat

Applikation von Orexin A (33 nM) verstärkte die erregende Wirkung von Glutamat im SCN (Abb. 31B, 40). Diese Effekte waren im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 μM ($P < 0,05$) und 1 μM ($P < 0,01$) signifikant. Die Kombination beider Substanzen scheint stärker zu sein, als man es aus der Summe der Einzelwirkungen erwarten könnte (Abb. 38, 40).

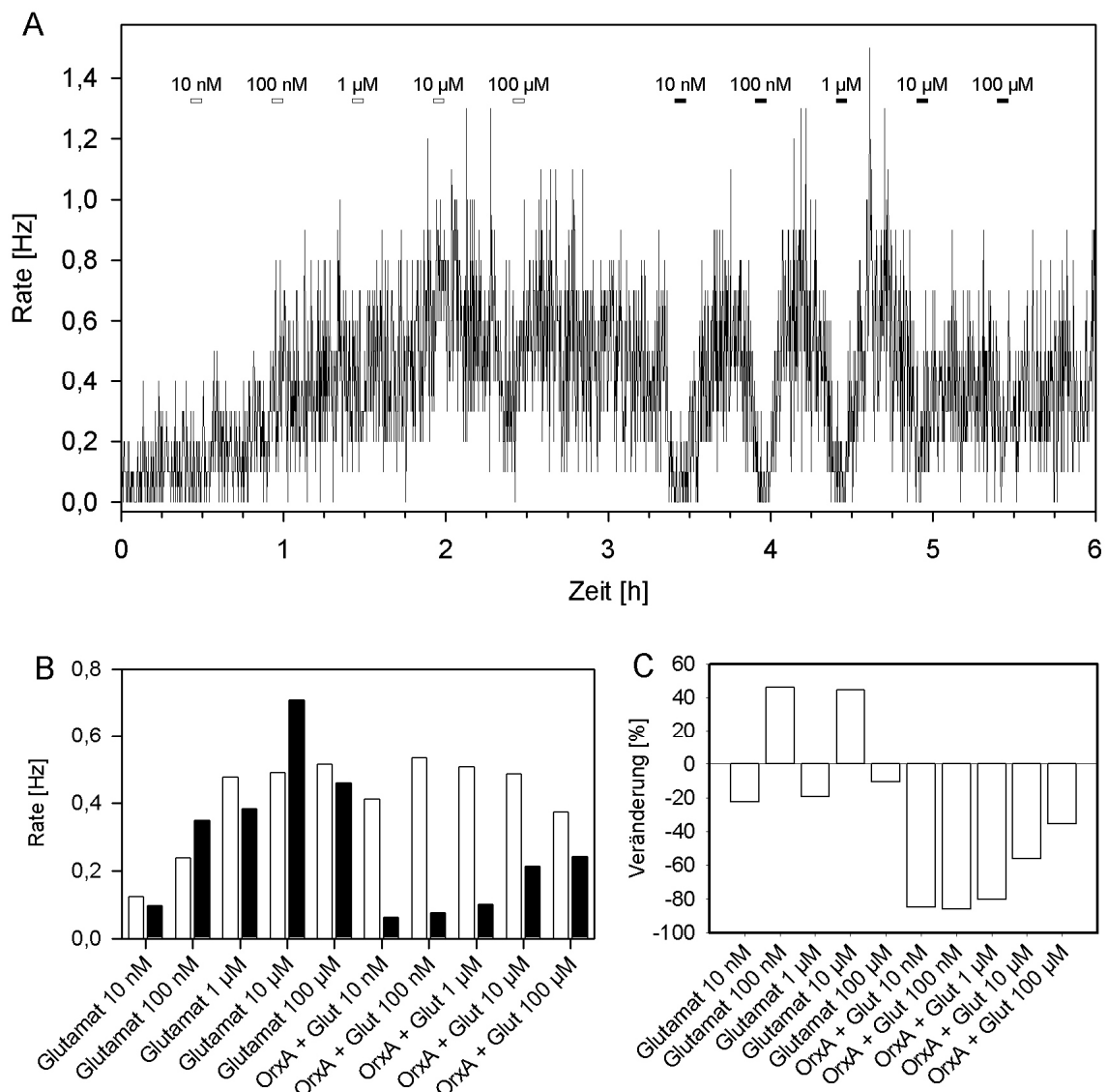


Abb. 39 Hemmung des Orexin-Effekts durch Glutamat

Die in Diagramm **A** dargestellte Entladungsrates eines Neurons zeigt sich unbeeinflusst durch die Gabe von Glutamat (weiße Balken). Wurde gleichzeitig mit Glutamat auch 33 nM Orexin A appliziert (schwarze Balken), wurde eine durch Orexin induzierte Hemmung durch steigende Glutamat-Konzentrationen aufgehoben. **B**, weiße Balken: vor Applikation; schwarze Balken: während der Applikation. **C**, Veränderungen bei beiden Applikationsarten.

Ergebnisse

Abbildung 39 zeigt ein Experiment in dem Glutamat, wenn es alleine appliziert wurde, anscheinend keine Wirkung hatte. In Kombination mit Orexin A (33 nM) trat allerdings eine Hemmung auf. Dieser hemmende Effekt verringerte sich mit zunehmender Glutamat-Konzentration, was ein Hinweis auf antagonistische Effekte zwischen Orexin und Glutamat sein könnte. Messdaten für die alleinige Orexin-Applikation fehlen, da das Neuron zum Applikationszeitpunkt vollkommen stumm war und nicht durch Orexin erregt oder gehemmt werden konnte.

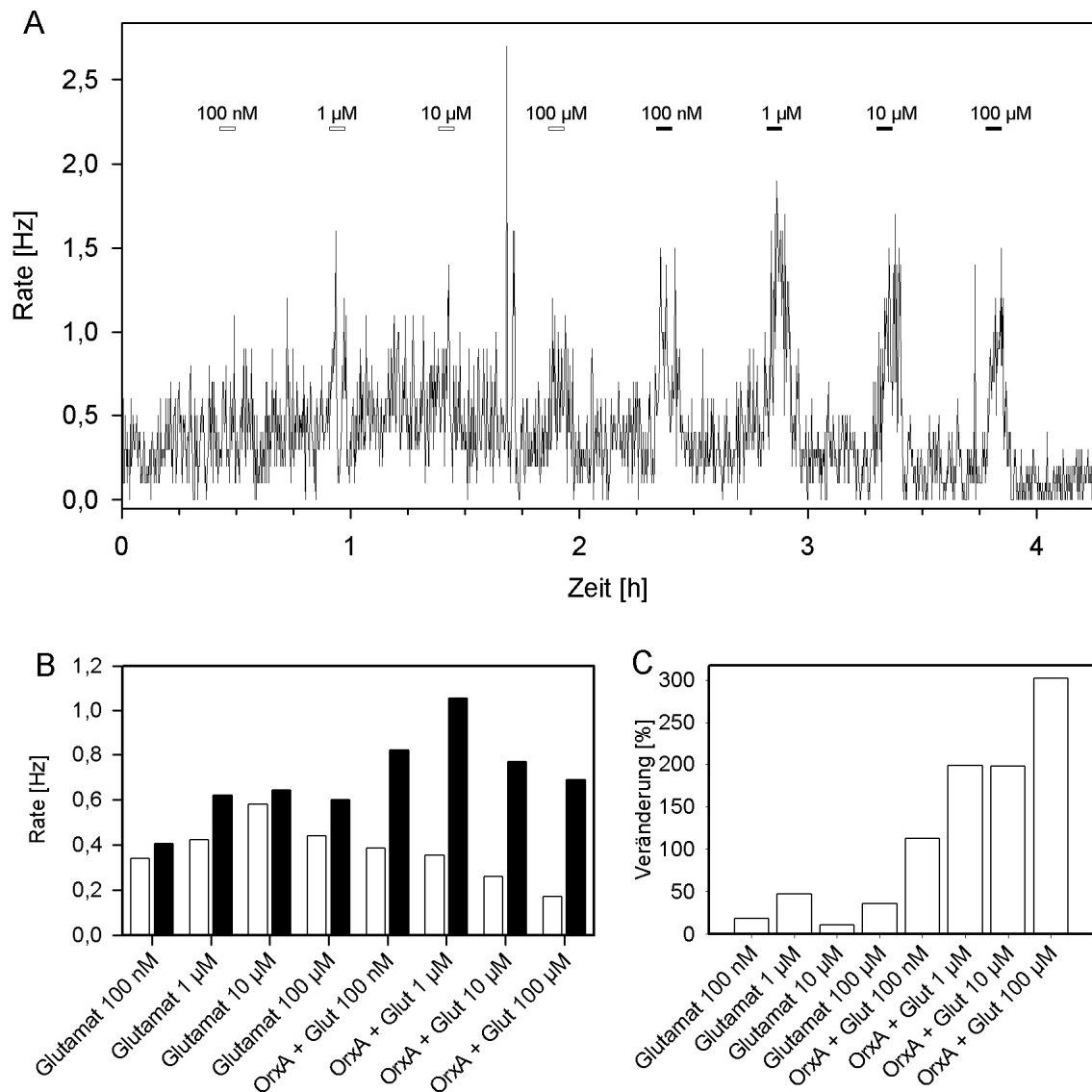


Abb. 40 Verstärkung des Glutamat-Effekts durch Orexin A

Die im Diagramm **A** dargestellte *Spikerate* eines Neurons zeigt eine Steigerung der Aktivität durch Glutamat (weiße Balken). Wird gleichzeitig mit Glutamat auch 33 nM Orexin A appliziert (schwarze Balken), wird die Erregung mehr verstärkt, als nur durch die Summe bei der Substanzen zu erwarten gewesen wäre (vergleiche Abb. 38, Seite 74). **B**, weiße Balken: vor Applikation; schwarze Balken: während der Applikation. **C**, Veränderungen bei beiden Applikationsarten.

Ergebnisse

In Neuronen, die durch Glutamat gehemmt wurden, wurde die Hemmung durch gleichzeitige Orexin-Applikation leicht vermindert und die Antworten wiesen eine geringere Streuung auf (Abb. 31B, unten). Diese Effekte waren allerdings nicht signifikant. Die Anteile an inhibitorischen und exzitatorischen Effekten veränderten sich durch die Orexingabe nicht. Für die Gesamtheit aller getesteten Zellen verschob die zusätzliche Gabe von Orexin A nicht den Median der Reaktionen, jedoch steigerten die stärker erregten Neurone den Mittelwert um 0,5 Hz (Abb. 31A).

3.5.4.2 Kainat

Die oben beschriebenen möglichen Interaktionen zwischen Orexin A und dem Glutamat-Rezeptor waren Anlass, Experimente durchzuführen, die den Mechanismus eingrenzen sollten. Es wurden dazu Co-Applikationen mit Orexin A und Glutamat-Rezeptor-Agonisten (Kainat, Quisqualat, AMPA) durchgeführt. In SCN-Neuronen, die durch Kainat beeinflusst wurden, trat nach gleichzeitiger Gabe von Kainat und Orexin A eine eindeutige Verstärkung des Effektes auf. Dies trifft sowohl für die hemmende (Abb. 33B, 41) als auch für die

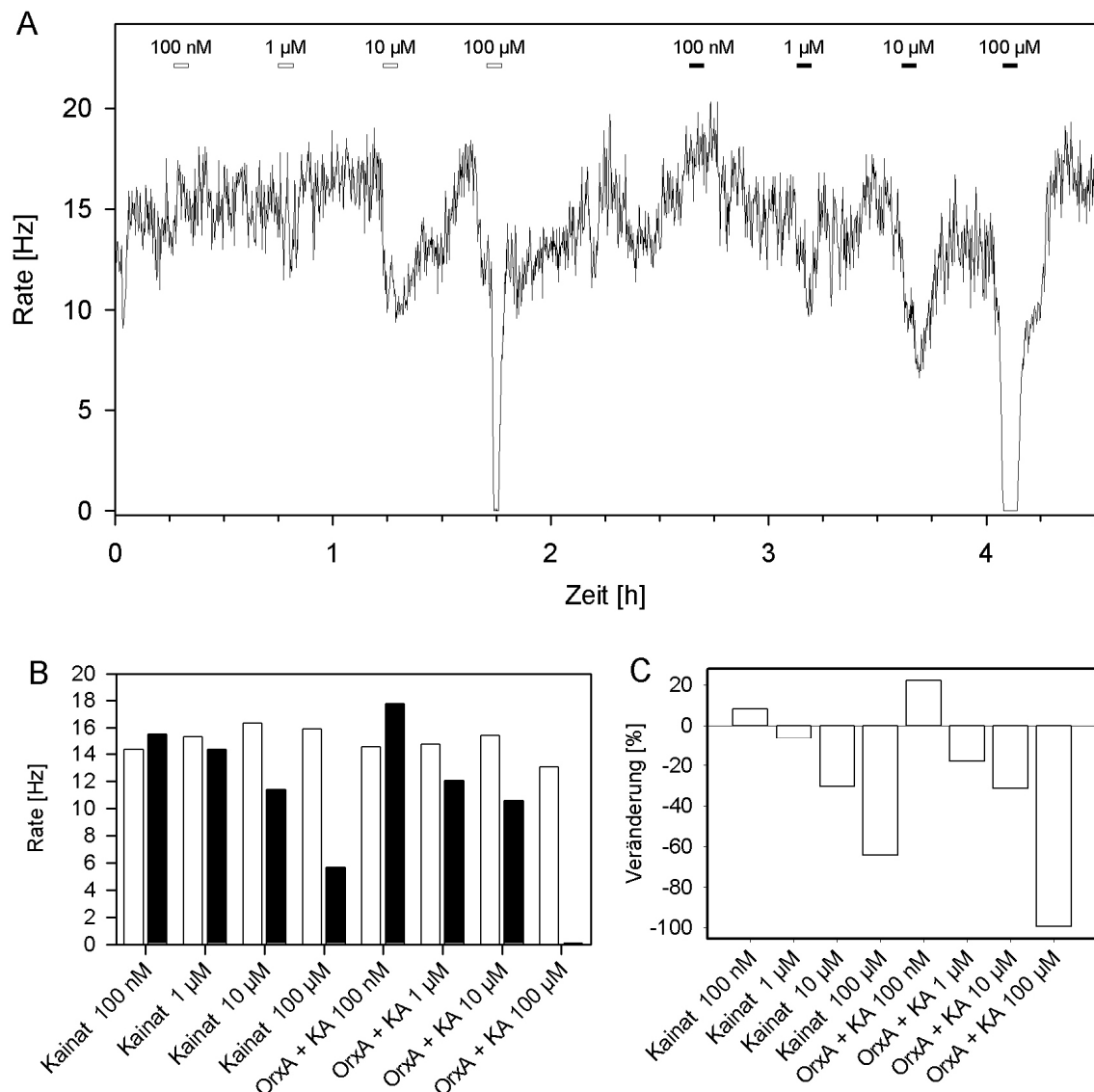


Abb. 41 Verstärkung des Kainat Effekts durch Orexin A

Die im Diagramm **A** dargestellte Spikerate eines Neurons zeigt eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung durch die Applikation von Kainat (weiße Balken). Bei gleichzeitiger Applikation von Kainat und 33 nM Orexin A wird die hemmende Wirkung von Kainat verstärkt (schwarze Balken). **B**: Vergleich der Mittelwerte vor (weiße Balken) und während (schwarze Balken) der Applikation. **C**: Veränderungen der mittleren Spikerate bei beiden Applikationsarten.

erregende Kainat-Wirkung (Abb. 33A, 42) zu.

Ein Beispiel zeigt Abbildung 41. Dieses Neuron wurde durch Kainat konzentrationsabhängig gehemmt. Diese Hemmung war bei der höchsten Kainat-Konzentration (100 μM) vollständig. Bei Co-Applikation mit Orexin A (33 nM) ist dieser Hemm-Effekt sowohl stärker als auch länger, was besonders deutlich bei der höchsten Konzentration wird. Ein ähnlicher Verstärkungseffekt kann auch bei der exzitatorischen Wirkung beobachtet werden (Abb. 42). Während bei alleiniger Kainat-Applikation nur eine schwache Erregung

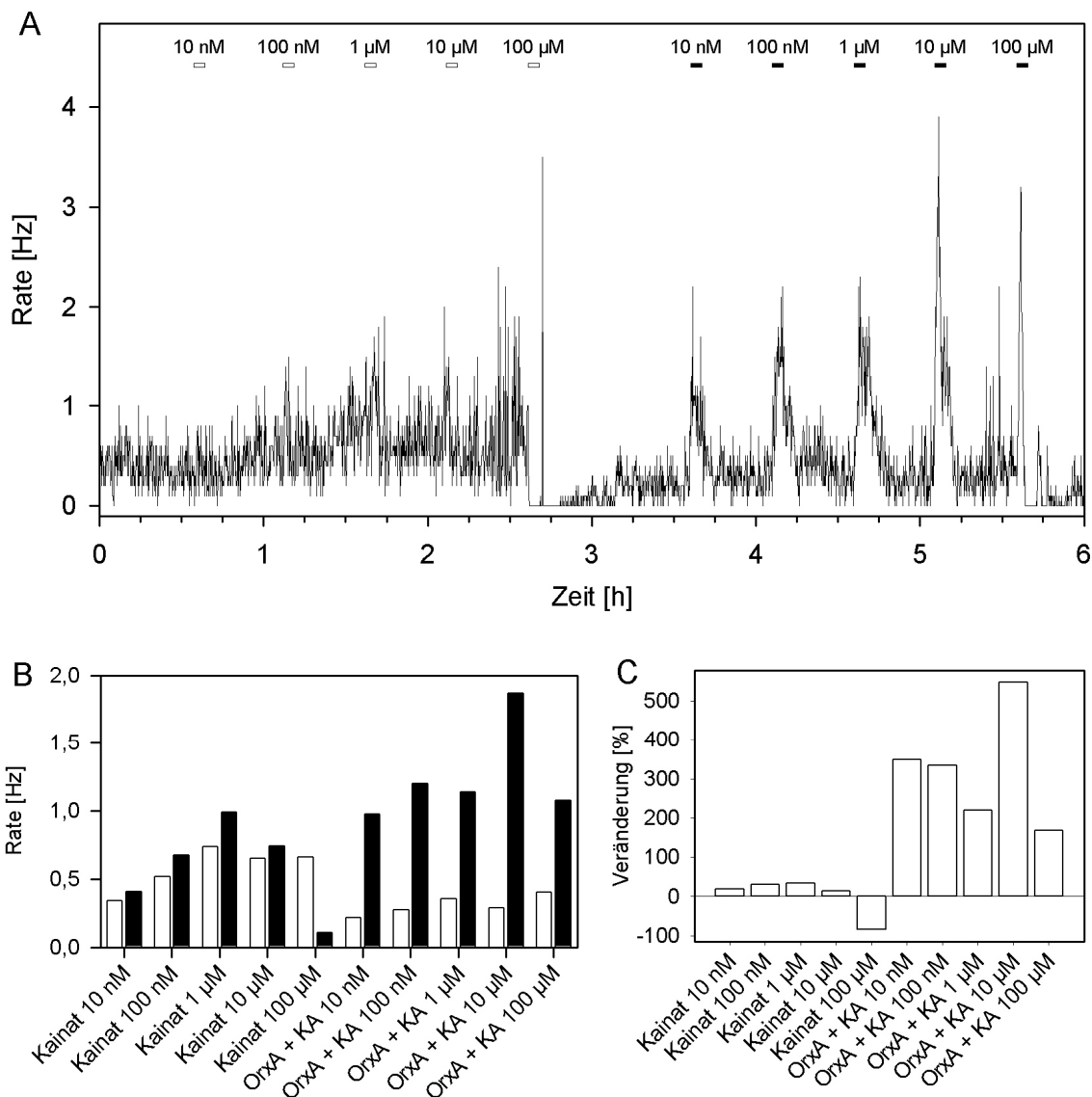


Abb. 42 Orexinerge Erregung und schwacher Kainateffekt

Die im Diagramm **A** dargestellte *Spikerate* eines Neurons zeigt keinen Effekt durch die Applikation von Kainat (weiße Balken) bis 10 μM . Bei gleichzeitiger Applikation von Kainat und 33 nM Orexin A wurde das Neuron deutlich erregt (schwarze Balken). Applikationen von 100 μM Kainat führten in beiden Fällen zu einer Inhibition, der jedoch bei der kombinierten Applikation eine kurze Erregung vorausging. **B**: Vergleich der Mittelwerte vor (weiße Balken) und während (schwarze Balken) der Applikation. **C**: Veränderungen der mittleren *Spikerate* bei beiden Applikationsarten.

gemessen wurde – in der höchsten Konzentration sogar eine Hemmung – kommt es bei Applikation beider Substanzen zu einer deutlichen Erregung.

In einigen Fällen wird die Kainat-Wirkung durch Orexin unterdrückt und nicht verstärkt. Ein derartiges Beispiel zeigt Abbildung 43 am Beispiel eines einzelnen SCN-Neurons. Kainat hemmte schon bei der niedrigsten Konzentration (10 nM) die Aktivität des Neurons. Diese Hemmung nahm dosisabhängig zu, bis die *Spikeaktivität* der Zelle bei etwa 10 μM Kainat vollständig erloschen war. Danach wurde lediglich die Zeitdauer der Hemmung länger.

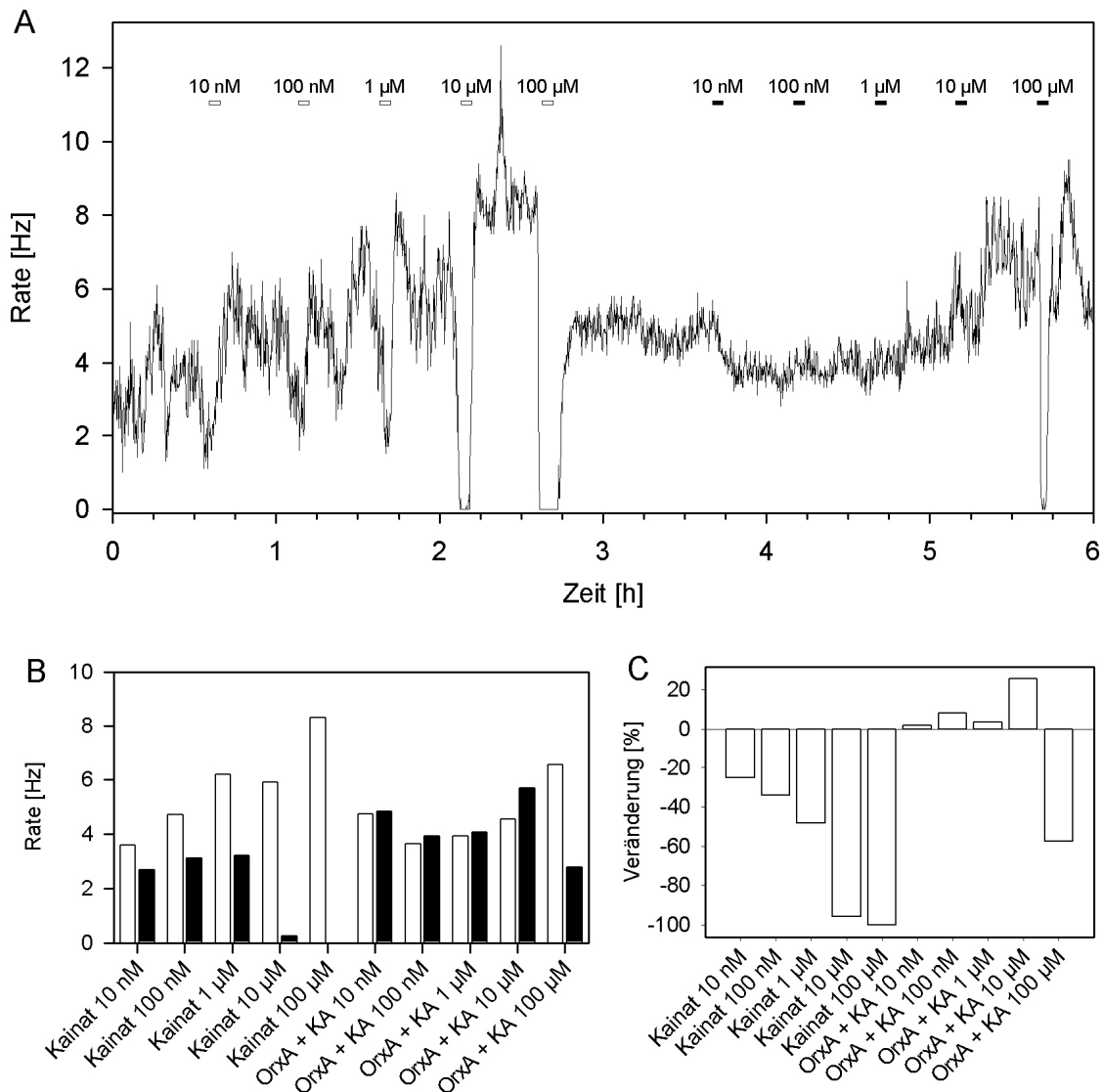


Abb. 43 Hemmung der Kainat-Effekte durch Orexin A

Die im Diagramm **A** dargestellte *Spike*rate eines Neurons zeigt eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung der Aktivität durch Kainat (weiße Balken). Wird gleichzeitig mit Kainat auch 33 nM Orexin A appliziert (schwarze Balken), tritt die Hemmung erst bei höheren Konzentrationen (100 μM Kainat) auf. **B**, weiße Balken: vor Applikation; schwarze Balken: während der Applikation. **C**, Veränderungen bei beiden Applikationsarten.

Ergebnisse

Wird aber gleichzeitig mit Kainat Orexin A appliziert, wird die Kainat-Hemmung bei niedrigen und mittleren Konzentrationen vollständig aufgehoben. Lediglich die höchste Kainat-Konzentration (100 μM) besitzt dann noch eine deutliche, aber abgeschwächte Hemmwirkung. Auch die exzitatorischen Antworten können durch Orexin A aufgehoben werden, wie Abbildung 44 verdeutlicht. Das sehr empfindlich auf Kainat reagierende Neuron antwortete nur noch schwach, wenn gleichzeitig Orexin gegeben wurde. Lediglich die bei der höchsten Konzentration (100 μM) auftretende Hemmung blieb unbeeinflusst.

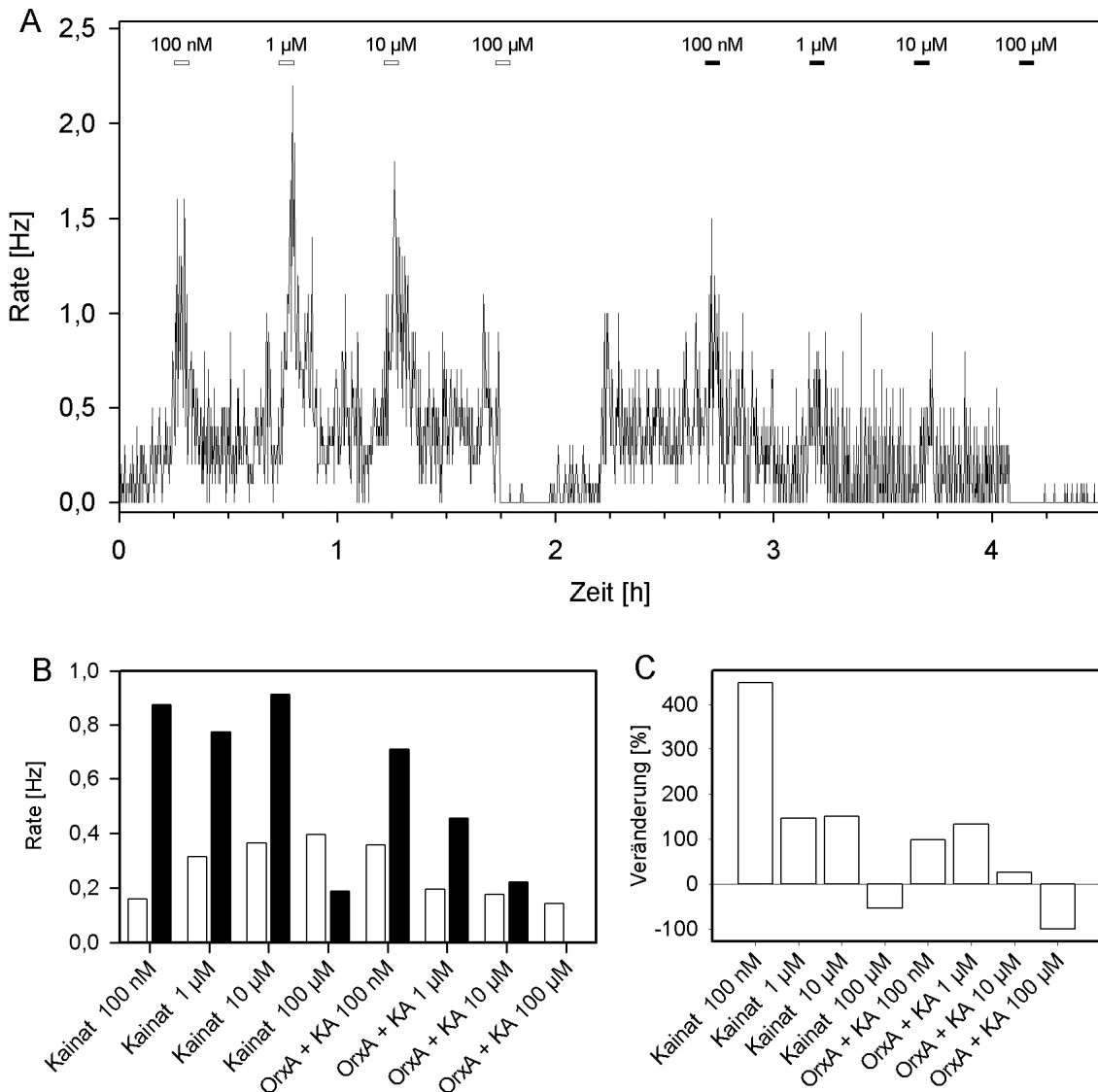


Abb. 44 Hemmung des Kainat-Effekts durch Orexin A

Die im Diagramm A dargestellte Spikerate eines Neurons zeigt eine Erregung durch die Applikation von Kainat (weiße Balken) bis 10 μM . Bei gleichzeitiger Applikation von Kainat und 33 nM Orexin A (schwarze Balken) wurde die erregende Wirkung von Kainat stark reduziert (schwarze Balken). Applikationen von 100 μM Kainat führten in beiden Fällen zu einer totalen und lang anhaltenden Hemmung. **B**: Vergleich der Mittelwerte vor (weiße Balken) und während (schwarze Balken) der Applikation. **C**: Veränderungen der mittleren Spikerate bei beiden Applikationsarten.

Ergebnisse

Ein drittes Beispiel zeigt, dass nicht nur die hemmende oder erregende Wirkung verstärkt oder abgeschwächt, sondern dass sich auch das Antwortmuster verändern kann (Abb. 45). In diesem Neuron wird beispielsweise die hemmende Wirkung durch Kainat in eine biphasische Reaktion umgewandelt. Die Hemmung wird durch Orexin A verkürzt und ist von einer Erregung gefolgt. In einem Fall eines durch Kainat inhibierten Neurons wurde ein biphasischer Effekt durch zusätzliches Orexin A ausgelöst (Abb. 45).

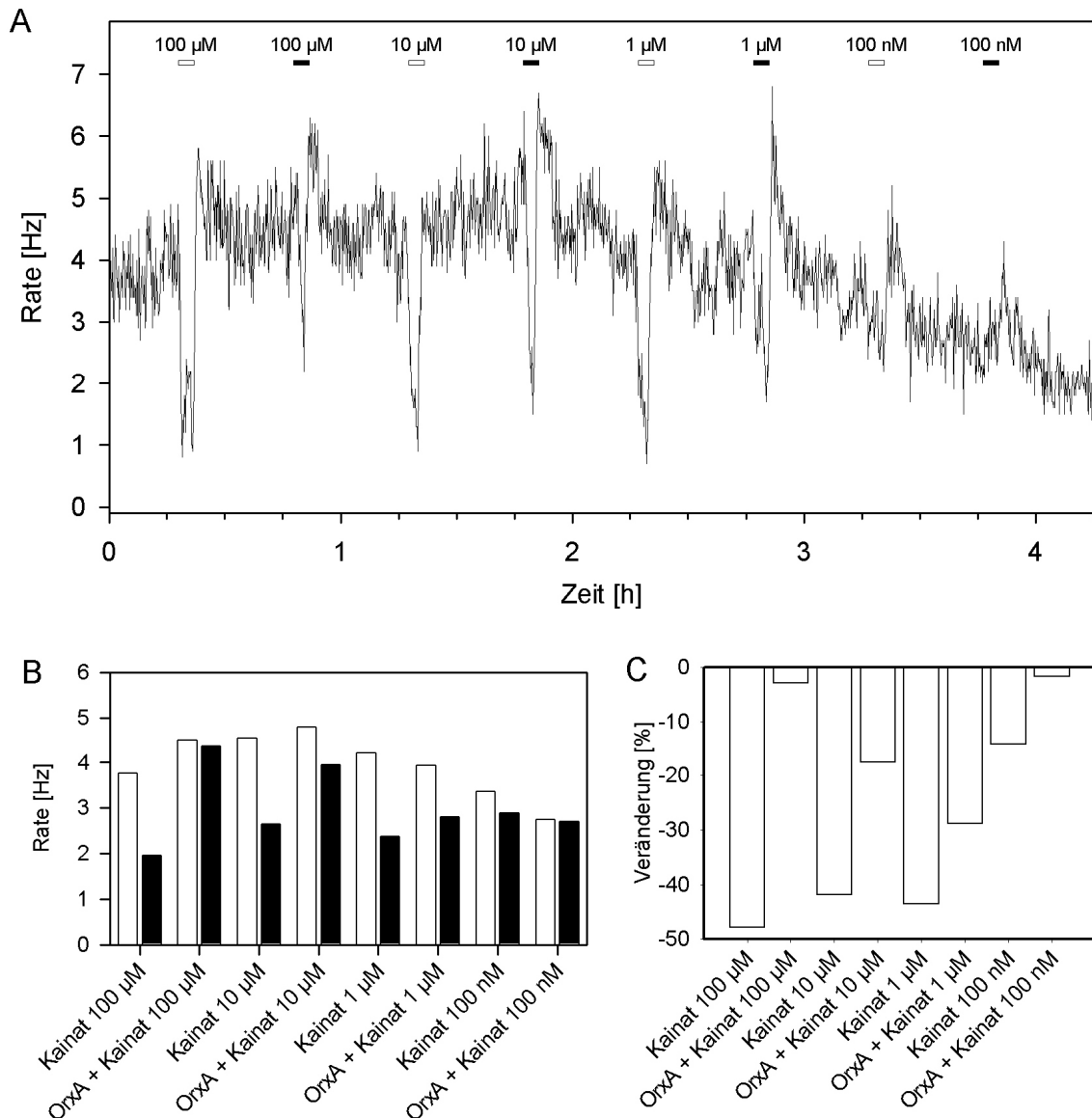


Abb. 45 Biphasischer Kainat-Effekt durch Orexin A

Die im Diagramm **A** dargestellte *Spikerate* eines Neurons zeigt eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung durch die Applikation von Kainat (weiße Balken). Bei gleichzeitiger Applikation von Kainat und 33 nM Orexin A fällt die hemmende Wirkung von Kainat schwächer aus, ist verkürzt und wird von einer Erregung gefolgt (schwarze Balken). **B**: Vergleich der Mittelwerte vor (weiße Balken) und während (schwarze Balken) der Applikation. **C**: Veränderungen der mittleren *Spikerate* bei beiden Applikationsarten.

Nach kombinierten Gaben von Orexin und Kainat lagen die Mittelwerte aller Effekte etwas höher als bei reinem Kainat (Abb. 32). Dies beruht auf der starken Steigerung der mittleren exzitatorischen Effekte durch wenige besonders sensiblen Neurone (Abb. 33A). Auch die inhibitorischen Einflüsse wurden durch Orexin verstärkt (bei 10 nM und 10 μ M Kainat: Mann-Whitney-Test $P < 0,05$) (Abb. 33B). Die Antworten

setzten sich aus 25 % exzitatorischen Antworten und einem mit der Konzentration von 20 % auf 50 % steigenden inhibitorischen Anteil zusammen (Abb. 46). Die Verhältnisse bleiben auch zusammen mit Orexin A konstant. Lediglich bei der höchsten Konzentration von 100 μ M sinkt der exzitatorische Anteil auf 6 % ab und der inhibitorische steigt auf 61 %. Die Proportionen der exzitatorischen wie

inhibitorischen Antworten werden durch Orexin A signifikant geändert (z-Test: $P < 0,001$). Bei dieser Konzentration zeigten die meisten zuvor exzitatorische Neurone eine deutliche Hemmung (Abb. 44, 42). Bemerkenswert dabei ist, dass trotz der durch Orexin A zugunsten inhibitorischer Antworten verschobenen Verhältnisse der inhibitorische Effekt auf die gesamte Population schwächer ist (Abb. 32, 46).

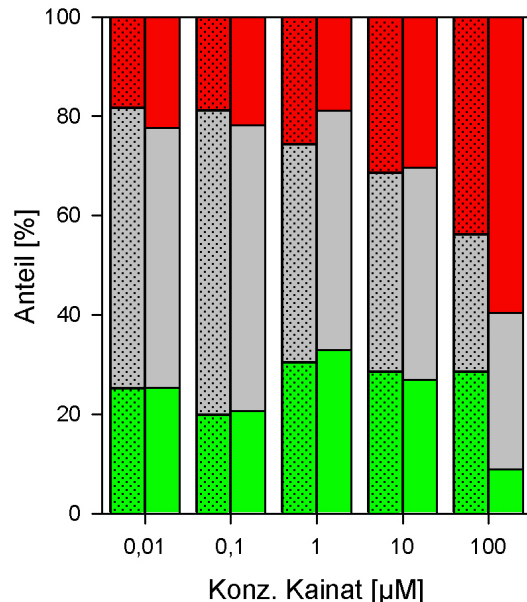


Abb. 46 Orexin verändert die Proportionen der Kainat-Antwort

Das Säulendiagramm bildet die Proportionen der inhibitorischen (rot), exzitatorischen (grün) und neutralen (grau) Reaktionen auf verschiedene Kainat-Konzentrationen ab. Reine Kainat-Applikationen sind gepunktet, mit 33 nM Orexin A kombinierte ungemustert dargestellt.

Der Anteil an inhibitorischen Reaktionen steigt mit der Kainat-Konzentration. Orexin A verringert bei 100 μ M Kainat den Anteil an exzitatorischen Antworten und erhöht den der inhibitorischen signifikant (z-Test, $P < 0,001$).

3.5.4.3 Quisqualat

Die Quisqualat-Antworten werden ebenfalls durch Orexin A-Behandlung beeinflusst. Während in manchen Neuronen die exzitatorische Quisqualat-Antwort deutlich verstärkt wurde (Abb. 47), wurde in anderen Neuronen die Antwort vollständig blockiert (Abb. 48, 49). Selbst bei der höchsten Quisqualat-Konzentration (100 μM) blockierte Orexin in diesen Zellen die Wirkung vollständig.

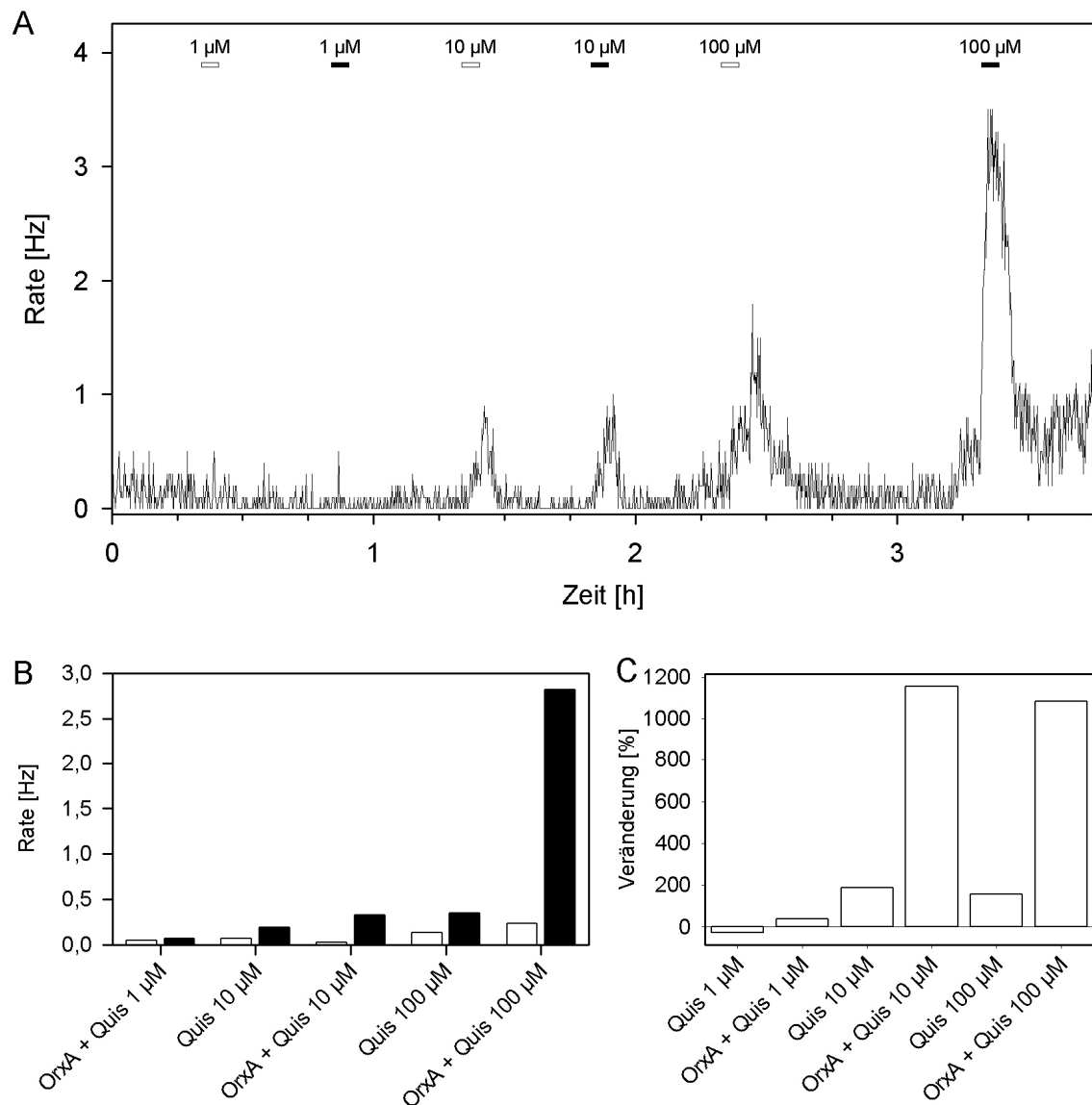


Abb. 47 Verstärkung der Quisqualat-Antwort durch Orexin A

Die im Diagramm **A** dargestellte Spikerate eines Neurons zeigt eine deutliche konzentrationsabhängige Steigerung der Aktivität durch die Applikation von Quisqualat (weiße Balken). Bei gleichzeitiger Applikation von Quisqualat und 33 nM Orexin A (schwarze Balken) wird die erregende Wirkung von 100 μM Quisqualat verstärkt. **B**, Vergleich der Mittelwerte vor (weiße Balken) und während (schwarze Balken) der Applikation. **C**, Veränderungen der mittleren Spikerate bei beiden Applikationsarten.

Ergebnisse

Obwohl die Mediane aller Antworten praktisch unverändert bei null bleiben, entwickelt die Verteilung ab 10 μM eine deutliche Schiefe (Abb. 34A). Der Mittelwert verlagert sich immer stärker in den exzitatorischen Bereich. Bei 100 μM Quisqualat ist der Unterschied signifikant ($P < 0,05$). Die exzitatorischen Antworten fallen zusammen mit Orexin A im Mittel stärker aus (Abb. 34B). Die Schiefe der Verteilung nimmt mit der Konzentration vor allem deswegen zu, weil eine kleine Gruppe durch Orexin in ihrer Antwort verstärkt wird. Die Spikerate von Zellen, die mit einer mindestens 20-prozentigen Verringerung der Spikerate antworten, verändert sich durch zusätzliche Orexin-

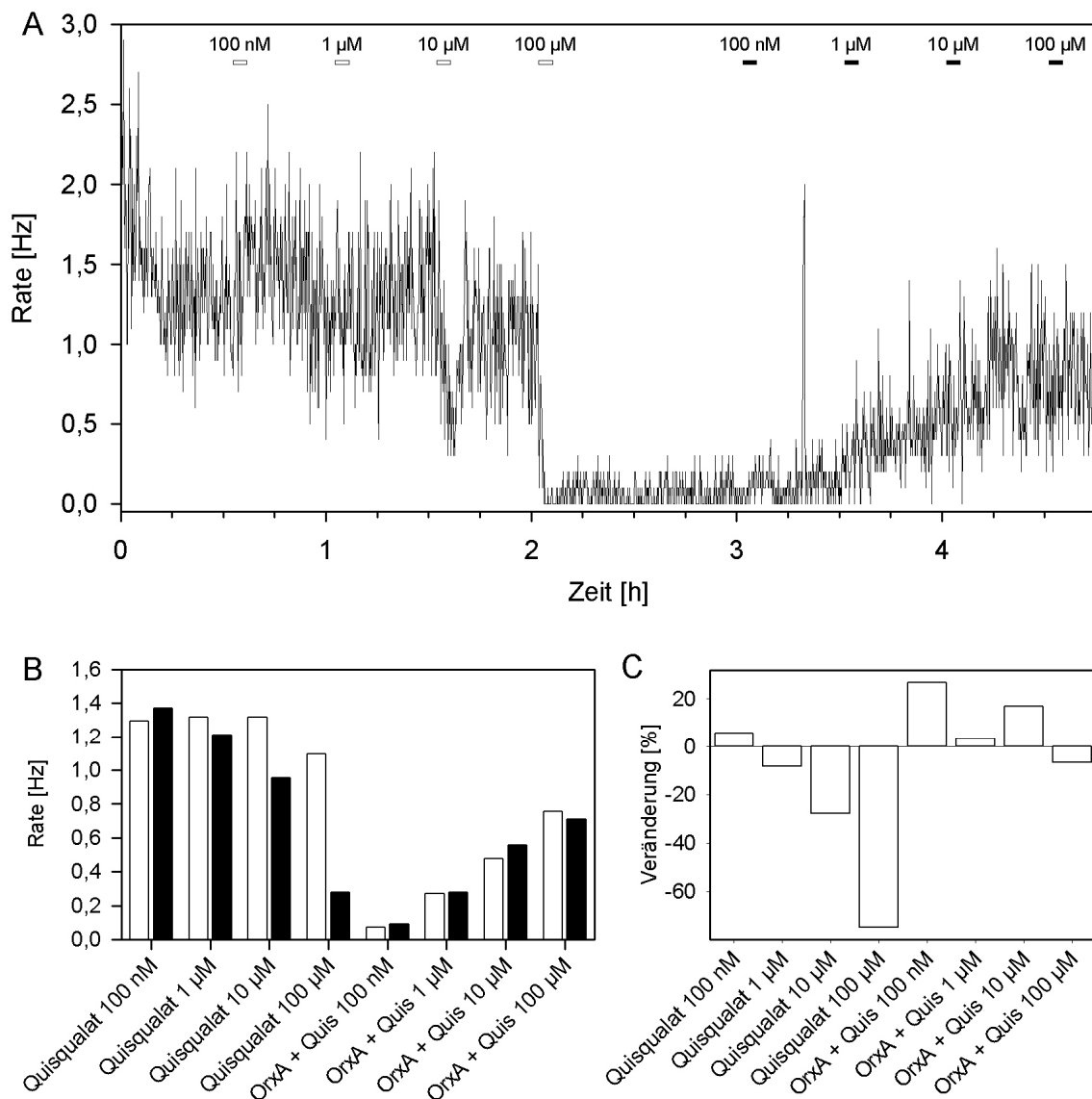


Abb. 48 Aufhebung der Quisqualat-Inhibition durch Orexin A

Die im Diagramm **A** dargestellte Spikerate eines Neurons zeigt eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung der Aktivität durch die Applikation von Quisqualat (weiße Balken). Bei gleichzeitiger Applikation von Quisqualat und 33 nM Orexin A (schwarze Balken) wird die Wirkung von Quisqualat aufgehoben. **B**, Vergleich der Mittelwerte vor (weiße Balken) und während (schwarze Balken) der Applikation. **C**, Veränderungen der mittleren Spikerate bei beiden Applikationsarten.

Ergebnisse

Applikationen kaum (Abb. 34B), allerdings geht ihr Anteil drastisch zurück (Abb. 50). Der Unterschied ist ab 100 μM Quisqualat signifikant (z-Test: $P < 0,001$).

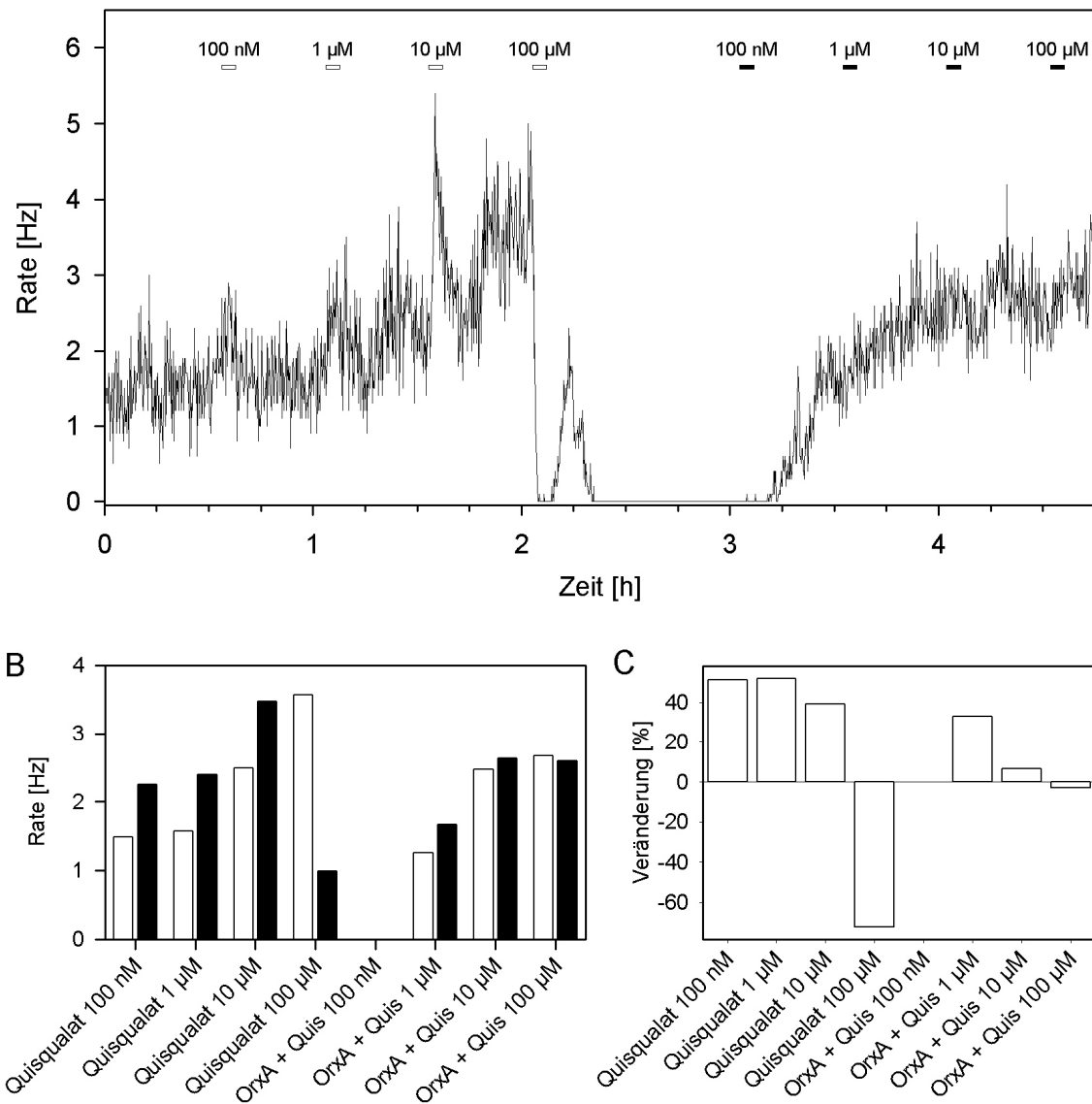


Abb. 49 Aufhebung der Quisqualat-Erregung durch Orexin A

Die im Diagramm **A** dargestellte *Spikerate* eines Neurons zeigt eine deutliche Steigerung der Aktivität durch die Applikation von Quisqualat (weiße Balken). Jedoch führt die Gabe von 100 μM Quisqualat zu einer totalen Hemmung. Bei gleichzeitiger Applikation von Quisqualat und 33 nM Orexin A (schwarze Balken) wird die Wirkung von Quisqualat selbst bei 100 μM aufgehoben. **B**, Vergleich der Mittelwerte vor (weiße Balken) und während (schwarze Balken) der Applikation. **C**, Veränderungen der mittleren *Spikerate* bei beiden Applikationsarten.

Ergebnisse

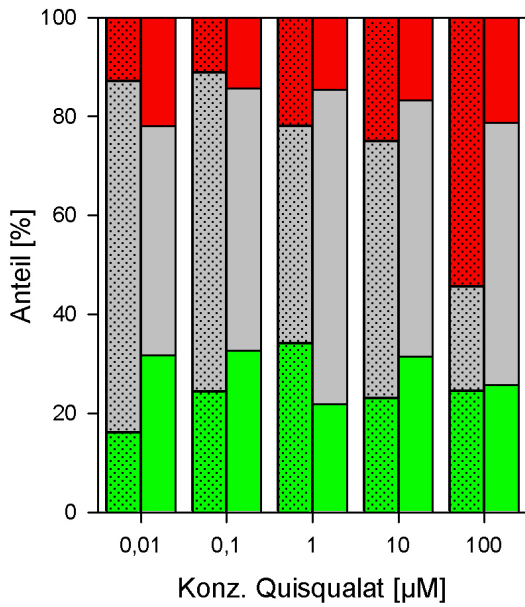


Abb. 50 Orexin verändert die Proportionen der Quisqualat-Antwort

Das Säulendiagramm bildet die Proportionen der inhibitorischen (rot), exzitatorischen (grün) und neutralen (grau) Reaktionen auf verschiedene Quisqualat-Konzentrationen ab. Reine Quisqualat-Applikationen sind gepunktet, mit 33 nM Orexin A kombinierte ungemustert, dargestellt.

Orexin A verringert bei 100 µM Quisqualat den Anteil an inhibitorischen Antworten signifikant (z-Test, $P < 0,001$).

3.5.4.4 AMPA

AMPA veränderte die *Spikerate* von SCN Neuronen nur geringfügig. Lediglich in der stärksten Konzentration trat eine eindeutige Hemmung auf (Abb. 35, 51) Bei Co-Applikation mit Orexin A (33 nM) konnte im Gegensatz zu den anderen Glutamat-Agonisten keine eindeutige Veränderung, Verstärkung oder Abschwächung, des Effektes beobachtet werden.

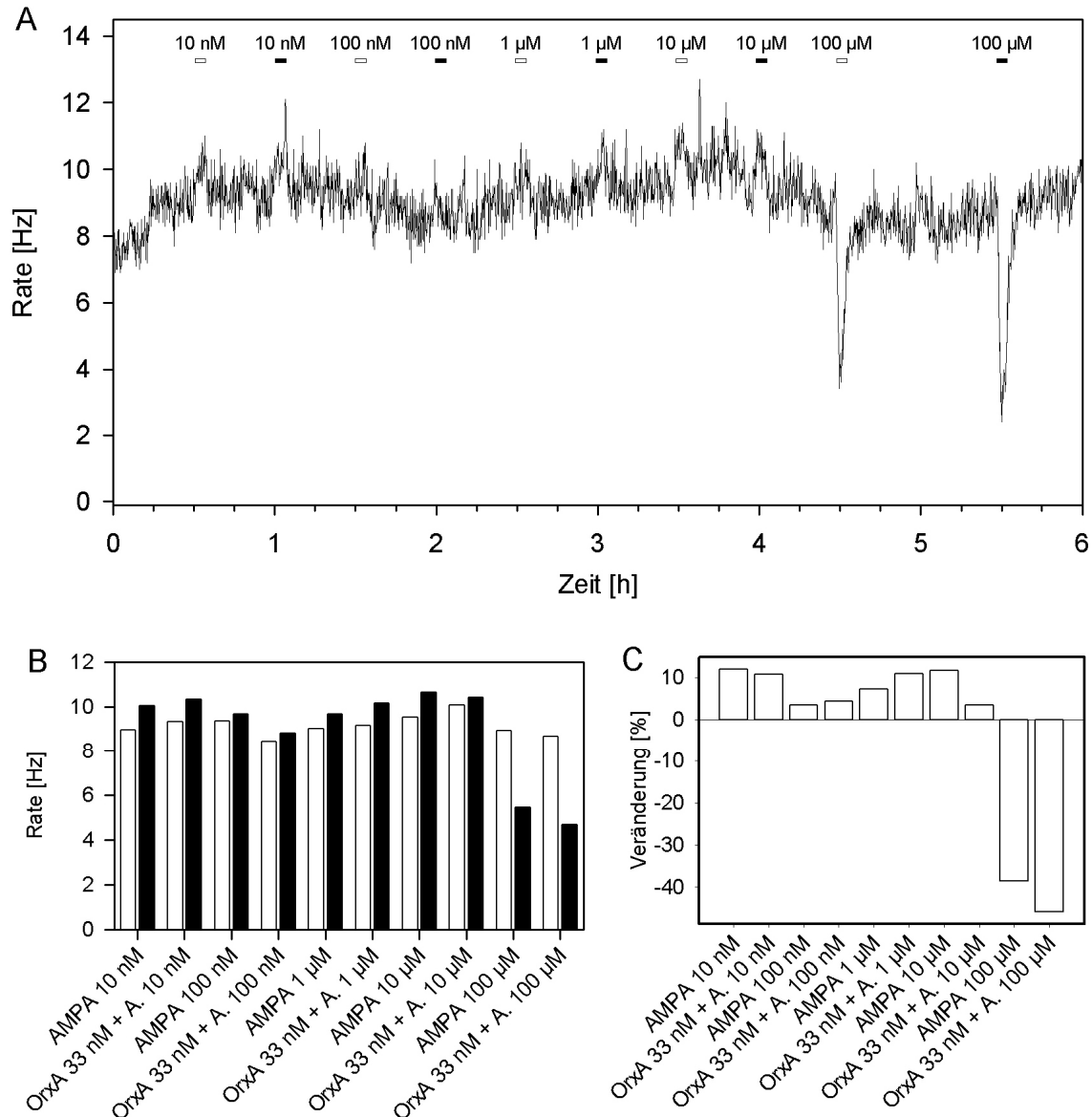


Abb. 51 Verstärkung der AMPA-Inhibition durch Orexin A

Die im Diagramm **A** dargestellte *Spikerate* eines Neurons zeigt wenig Veränderung der Aktivität durch die Applikation von AMPA (weiße Balken). Allerdings führt die Gabe von 100 μM AMPA zu einer deutlichen Hemmung. Bei gleichzeitiger Applikation von AMPA und 33 nM Orexin A (schwarze Balken) wird die Wirkung von 100 μM AMPA leicht verstärkt. **B**, Vergleich der Mittelwerte vor (weiße Balken) und während (schwarze Balken) der Applikation. **C**, Veränderungen der mittleren *Spikerate* bei beiden Applikationsarten.

4 Diskussion

Die Beobachtung von circadianen Phänomenen ist darauf angewiesen, dass Prozesse über lange Zeiträume, die ein Vielfaches von 24 Stunden ausmachen, registriert werden können. Dies ist *in vivo* ohne größere Schwierigkeiten bei der Registrierung der Bewegungsaktivität möglich, stellt aber in der Elektrophysiologie eine große Herausforderung dar. Konventionelle elektrophysiologische Methoden erlauben die Registrierung von Potentialveränderungen im Zeitrahmen von Minuten oder manchmal Stunden, stoßen aber bei circadianen Vorgängen an ihre Grenzen. Mit extrazellulären oder intrazellulären Ableitungen sowie mit *patch-clamp*-Ableitungen ist es nur möglich, bestimmte Zeitfenster während des Tagesverlaufes zu untersuchen; kontinuierliche Registrierungen der Zellaktivität bleiben damit aber unmöglich. Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine Methode zu entwickeln und zu etablieren, die es erlaubte elektrische Potentialveränderungen über Zeiträume von mehreren Tagen bis Wochen zu untersuchen.

4.1 Methodendiskussion

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode basiert auf der Kultivierung von SCN-Neuronen auf Multielektrodenarrays. Diese Methode bietet für Untersuchungen der inneren Uhr von Säugern deutliche Vorteile gegenüber konventionellen elektrophysiologischen Methoden. Im Gegensatz zu klassischen Mikroelektroden-Ableitungen wird bei dieser Technik ein aktives Neuron nicht mit Mikroelektroden aufgesucht und abgeleitet, sondern die Zellen werden direkt auf Mikroelektroden kultiviert. Dadurch, dass die Zellkulturen auf den substratintegrierten Mikroelektroden anwachsen, lassen sie sich über Tage, Wochen und Monate hinweg störungsfrei ableiten. Diese Kulturen erwiesen sich als funktionierendes Modell des SCN. Die verringerte Komplexität des Uhrennetzwerkes gegenüber Kulturen aus Hirnschnitten oder gegenüber *in vivo* Experimenten ermöglichte die Untersuchung der Funktion der circadianen Uhr auf Ebene einzelner selbständiger Oszillatoren. Weiterhin konnte durch die auch in Kultur vorhandene Netzwerkbildung der Neurone die synaptische Kommunikation in Form von korrelierter Aktivität untersucht werden. In Kombination mit einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Mikroperfusionskammer zur schnellen Kurzeitapplikation von Substanzen

ließen sich auch die Auswirkungen von Neurotransmittern, Analogsubstanzen oder Inhibitoren auf das Netzwerk untersuchen.

4.1.1 Kultivierung von SCN-Neuronen auf MEAs

Die Primärzellkultur von SCN-Zellen auf Multielektroden-Arrays ist die bislang einzige Methode, die es erlaubt, die neuronale Aktivität von einzelnen Zellen über lange Zeiträume zu untersuchen. Im Gegensatz zu klassischen extrazellulären Ableitungen (Gillette, 1986) treten keine mechanische Verletzungen des Gewebes auf und es kommt auch nicht zu einem Verlust der abgeleiteten Zelle durch geringfügige Bewegungen der Elektrode (Gross *et al.*, 1977). Die Entladungen eines einzelnen Neurons lassen sich so im Idealfall über Monate hinweg verfolgen und es können dadurch Phasenverschiebungen von circadianen Rhythmen auf zellulärer Ebene gemessen werden. Durch die Dissoziation von SCN-Gewebe werden die Einflüsse von anderen mit dem SCN verbundenen Hirnstrukturen weitestgehend ausgeschaltet, jedoch geht andererseits dadurch die ursprüngliche anatomische Anordnung verloren.

Lebensfähige Kulturen waren immer spontanaktiv und zeigten dabei die selben drei Entladungsmuster, die zuvor schon *in vivo* und in Schnittpräparaten beobachtet wurden (Shibata *et al.*, 1984; Thomson *et al.*, 1984): a) regelmäßige Entladungen, b) unregelmäßige Entladungen und c) *burst*-artige Muster.

Die Anzahl von spontanaktiven Neuronen und die Häufigkeit von Zellen, deren Spontanaktivität sich circadian veränderte, stiegen mit dem Alter der Kulturen an. Interessanterweise zeigen die einzelnen Zellen in derselben Kultur aber sehr unterschiedliche Phasen, sind also nicht synchronisiert.

Die Neurone bildeten schon kurz nach dem Ausplattieren Fortsätze aus, die andere sichtbar kontaktierten. Das bestätigt, dass sich die aus neugeborenen Tieren gewonnenen SCN-Kulturen ähnlich wie im intakten suprachiasmatischen Nucleus entwickeln (Moore, 1991; Welsh *et al.*, 1995). Das zunehmende Auftreten von zeitlich korrelierter Aktivität kann als Zeichen für stattfindende Synaptogenese und den Ausbau von synaptischen Verbindungen gewertet werden, die *in vivo* postnatal zwischen P1 und P10 stattfindet (Moore, 1991). Trotz der Reifung der histiotypischen Kultur zeigt nur ein Teil der spontanaktiven Zellen eine circadian oszillierende Entladungsrate. Die verschiedenen Zellen derselben Kultur weisen in der Regel unterschiedliche Phasen auf. Werden in seltenen Fällen Neurone mit derselben Phasenlage

registriert, bleibt dieser Zustand nicht lange bestehen, da auch die Perioden der einzelnen Neurone voneinander abweichen, sie sind somit nicht synchronisiert. Diese fehlende Synchronisation in Zellkultur-Präparaten wurde zuvor schon als typischer Unterschied zu den Kulturen von Hirnschnitten mit ihren weitgehend intakten neuronalen Verbindungen hervorgehoben (Welsh *et al.*, 1995; Honma *et al.*, 1998b; Herzog *et al.*, 2004). Die Entkopplung der Oszillatoren in kultivierten SCN-Neuronen bringt den entscheidenden Vorteil mit sich, dass die phasenverschiebenden Effekte von Neurotransmittern auf Ebene einzelner Uhrenneurone untersucht werden können.

Die Ursache für eine fehlende Synchronisation in den Zellkulturen ist unklar, da sich eindeutig synaptische Verbindungen zwischen den Neuronen ausbilden. Allerdings ist denkbar, dass die synaptische Vernetzung in den Zellkulturen zu gering oder zu schwach ausgeprägt ist. Eine weitere Ursache für die fehlende Synchronisation könnte am Verlust von Gap-Junctions zwischen den einzelnen Neuronen liegen (Welsh und Reppert, 1996), die zumindest *in vivo* mitverantwortlich für die Synchronisation der Zellen sind (Colwell, 2000; Long *et al.*, 2005). Weiterhin könnten diffusible Faktoren eine wichtige Funktion bei der Synchronisation spielen, die aber unter unseren Versuchsbedingungen durch die ständige Perfusion und das relativ hohe Mediumvolumen nicht zum Tragen kommen.

4.1.2 Perfusions- /Applikationssystem

Der Aufbau aus Spritzenpumpe, automatischem Probengeber und den verschiedenen Zellkulturkammern hat sich als dauerhaft stabil und unempfindlich erwiesen. Die geschlossene Konstruktion sorgte für Sterilität. Durch eine gleichmäßige Perfusion der Kultur konnten Störungen durch notwendige Mediumwechsel vermieden werden. Es entstanden so keine schwankenden Konzentrationen von Metaboliten und Nährstoffen, die die molekulare Teil der inneren Uhr beeinflussen können (Nishide *et al.*, 2008), aber auch ganz allgemein die neuronale Aktivität kurzfristig stören können. Die verwendeten Spritzenpumpen waren den verbreiteten Schlauchpumpen an Präzision und Zuverlässigkeit überlegen. Durch die mechanisch gekoppelte Zu- und Abführung des Mediums konnte das Flüssigkeitsvolumen konstant gehalten werden. Der zwischengeschaltete automatische Probengeber konnte Substanzen direkt in den Mediumstrom geben. Die Sterilität des Systems wurde

dadurch gewahrt, dass die Proben mit Septen verschlossen waren. Elektrische Störungen, wie sie bei manueller Applikation fast unvermeidlich sind, traten nicht auf. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Vehikelapplikation und zufällig ausgewählten applikationsfreien Zeitpunkten festgestellt werden. Die Programmierbarkeit des Probengebers ermöglicht, bis zu 96 Substanzen automatisch zu applizieren. Die Automatisierung ist der bislang fehlende Schritt, neuronale Kulturen zur Rasterung von Pharmaka einzusetzen, was schon häufig für MEA-Ableitungen propagiert wurde (Gross *et al.*, 1995; Morefield *et al.*, 2000; Gramowski *et al.*, 2004). Bei den Methoden *voltage-clamp*- (Joshi *et al.*, 2004) und *patch-clamp*-Methoden (Asmild *et al.*, 2003) und Untersuchungen des Zellmetabolismus (Thedinga *et al.*, 2007) wurden automatische Applikations- und Perfusionssysteme bereits mit Erfolg verwandt. Die Vorteile der Automatisierung waren bei Langzeit- wie bei Kurzzeitexperimenten von hohem Nutzen. Versuche zur Phasenverschiebung konnten zur passenden circadianen Zeit angesetzt werden. Versuche zur Ermittlung von mehreren Konzentrationsreihen konnten unbeaufsichtigt durchgeführt werden. Ein noch zu verbessernder Makel des Systems liegt in der Latenzzeit zwischen Auslösung der Substanzinjektion und Ankunft der Substanz in der Kulturkammer, die von Länge und Volumen der Zuleitung sowie Perfusionsrate abhängig ist. Höhere Durchflussraten erhöhen jedoch den Mediumverbrauch beträchtlich und verkürzen so die Zeit zwischen der Wiederbefüllung der Spritzen. Durch die Materialeigenschaften der in der Pumpe eingespannten Spritzen, kam es manchmal zu kleinen pulsartigen Bewegungen der Stempel, die kurzfristig die Perfusionsrate und damit den Applikationszeitpunkt beeinflussen konnten. Bei Versuchen zur Phasenverschiebung ist diese Abweichung unproblematisch, da die untersuchten Zeiträume lang sind. Bei Kurzzeitexperimenten hingegen war es wichtig, den exakten Zeitrahmen der Applikation zu kennen. Daher waren in manchen Fällen Nachjustierungen notwendig. Das könnte bei zukünftigen Experimenten mit niedervolumigen HPLC-Pumpen gelöst werden.

Die entwickelten Perfusionskammern waren zuverlässig und sorgten für eine gleichmäßige Nährstoffversorgung der Kulturen ohne mechanische oder elektrische Störungen. Die Mikro-Perfusionskammer war ein Entwicklungsschritt zu höherem Durchsatz bei der Rasterung von neuronal wirksamen Substanzen

mit MEA-Ableitungen. Sie kann eventuell auftretende Luftblasen von der Kultur fernhalten und strömt das Medium direkt auf das ganze Zentrum der Kultur. Die zu testenden Pharmaka erreichen als unverdünnter Bolus direkt die Neuronen und werden anschließend ebenso schnell wieder ausgespült. Die Zellen werden so nur für einen kurzen Zeitraum mit Testsubstanzen belastet. Die Erholungsphasen können kürzer ausfallen, sodass die Frequenz der Messpunkte steigt. Die Kulturen überstanden über drei Tage hinweg die Applikationen ohne Ausfallserscheinungen.

4.1.3 Netzwerkanalyse

Die Auswertung korrelierter Aktivität zwischen allen Elektroden des MEA-Feldes konnte erfolgreich automatisiert werden. Zwar ist durch die Beschränkung auf ausschließlich erregende Zusammenhänge nur ein Teilaspekt neuronaler Aktivität erfasst, jedoch gestaltet sich das Aufspüren von Inhibitionen besonders bei niedrigen Entladungsraten als schwierig und unzuverlässig (Melssen und Epping, 1987). Die automatische Analyse ermöglichte nicht nur eine einfache Visualisierung von räumlichen und zeitlichen Zusammenhängen der Entladungen im Netzwerk, sondern auch von deren Veränderung. Eine zufriedenstellende Menge an korrelierter Aktivität konnte aber nur in Kulturen mit hoher Zelldichte gefunden werden, was die Anwendung einschränkt.

Besonders der Anteil an neugebildeten Korrelationen an der Gesamtzahl zeigte sich dabei als geeigneter Indikator für die Plastizität innerhalb des Netzwerkes. Dieser Quotient war unabhängig von Veränderungen der *Spikerate* oder der Anzahl aller Kreuzkorrelationen und reagierte spezifisch auf die Applikation von Neuropeptiden.

4.2 Präzision der neuronalen Aktivität

Die mittlere Periode aller circadianen Rhythmen von einzelnen SCN-Neuronen entsprach mit $24,15 \pm 1,5$ Stunden exakt der mittleren Periode, die in Hirnschnitten gemessen wurde ($24,2 \text{ h} \pm 0,7$). Die Streuung der Perioden war in Zellkulturen jedoch größer, was für einen höheren Anteil von instabilen Oszillatoren in der Zellkultur spricht. Es wurden drei verschiedene Grundtypen von Oszillationen entdeckt: instabile, stabile sinusförmige und stabile blockförmige Rhythmen. Auffällig dabei war, dass stabile Rhythmen auch ohne

äußere Einflussnahme plötzlich entstehen, aber auch wieder vergehen konnten. Stabil oszillierende Zellen hatten ein sehr gleichmäßiges Entladungsmuster mit harmonischen Wellen während ihrer hochaktiven Phase. Unregelmäßige oder *burst*-artige Muster wurden nur bei instabil rhythmischen oder unrhythmischen Zellen beobachtet. Die Kreuzkorrelationsanalyse dieser Neurone zeigte immer zeitliche Abhängigkeiten mit einigen anderen Neuronen der Kultur. Den sich metronomisch entladenden stabilen Oszillatoren konnte jedoch keine korrelierte Aktivität nachgewiesen werden. Synchrone Rhythmen innerhalb einer Kultur traten weder bei instabilen noch stabilen Oszillatoren auf.

4.2.1 Periode

Ein Vergleich zwischen SCN-Gewebekulturen und Zellkulturen zeigt, dass die circadianen Perioden einzelner Zellen in den Hirnschnitten wesentlich geringere Abweichungen haben, demnach stärker synchronisiert sind (Brown *et al.*, 2006) als SCN-Neurone in Zellkulturen (siehe auch Welsh *et al.*, 1995; Honma *et al.*, 1998b; Herzog *et al.*, 2004). Diese hohe Präzision der circadianen Periodik findet *in situ* seine Entsprechung in der Bewegungsaktivität der Tiere, die unter freilaufenden Bedingungen ausgesprochen stabil ist (Herzog *et al.*, 2004). Die Präzision circadianer Rhythmen nimmt demnach mit dem Organisationsgrad der Zellen zu. Die Phasen zwischen einzelnen Zellen im SCN können sich aber durchaus unterscheiden (Schaap *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2006).

Die fehlende Kopplung der Rhythmen in der Zellkultur bestätigt frühere Theorien, dass die innere Uhr aus vielen eigenständigen Oszillatoren bestehen muss (Winfree, 1967; Enright, 1980; Bouskila und Dudek, 1995). Die einzelnen Oszillatoren mit verschiedenen intrinsischen Perioden sollen sich demnach gegenseitig stabilisieren und synchronisieren, woraufhin sie eine gemeinsame Periode ausbilden (Bernard *et al.*, 2007). Die von der Arbeitsgruppe Honma beschriebenen synchronen Rhythmen in Zellkulturen sind ein Beispiel für direkt exzitatorisch propagierte Aktivität, jedoch nicht für eine Synchronisation (Honma *et al.*, 2000; Shirakawa *et al.*, 2000).

Es stellt sich die Frage, welche Eigenschaft den kultivierten Neuronen fehlt, damit sie sich untereinander synchronisieren können. Neben einer nicht ausreichenden Vernetzung könnten andere Mechanismen, wie z.B. die

Ausbildung von *gap junctions* oder humorale und parakrine Faktoren wie VIP und Stickstoffmonoxid (NO) durch die Kulturbedingungen beeinträchtigt sein.

Wieweit die synaptische Verschaltung in den Zellkulturen den *in vivo* Verhältnissen entspricht, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Allerdings sollen neuronale Zellkulturen *in vitro* ähnliche Eigenschaften bezüglich ihrer Konnektivität aufweisen wie ihr Ursprungsgewebe (Eytan *et al.*, 2004). Denkbar ist, dass die Anzahl der Synapsen je Zelle verringert ist. Dies könnte schon dadurch zustande kommen, dass dissoziierte Neurone in der Regel in Form einer einzelnen flachen Zellschicht als *monolayer* auswachsen, wodurch die Anzahl der direkten Nachbarzellen im Gegensatz zu einem dreidimensionalen Netzwerk stark verringert ist. Dafür spricht, dass auch in Gewebekulturen die Phasenwinkel umso größer sind, je weiter die räumliche Distanz der Zellen ist (Schaap *et al.*, 2003). Der Einfluss der Neurone untereinander könnte somit direkt von ihrer räumlichen Nähe abhängen. Eine zu schwache Kopplung der Aktivität oder zu wenige Interaktionspartner führen in Simulationen zu sehr heterogenen Oszillator-Netzwerken, die sich unterhalb eines kritischen Wertes nur sehr langsam synchronisieren. Unter freilaufenden Bedingungen, d.h. ohne externen Zeitgeber, ist die Synchronisation besonders erschwert (Kunz und Achermann, 2003). Die flache räumliche Anordnung der Kultur könnte daher die Kopplung der Neurone so stark verringern, dass eine vollständige Synchronisation des Netzwerkes nicht erreicht wird (Bernard *et al.*, 2007).

Aufgrund der relativ niedrigen Zelldichte dürften auch die somatischen Kontakte und dadurch die Ausbildung von *gap junctions*, die *in vivo* einen erheblichen Anteil an der Synchronisation haben (Colwell, 2000; Long *et al.*, 2005), relativ niedrig sein, bzw. könnten vollkommen abwesend sein. So wurden in Zellkulturen des SCN *gap junctions* nur zwischen Gliazellen, nicht jedoch zwischen Neuronen nachgewiesen (Welsh und Reppert, 1996).

Das verhältnismäßig große Flüssigkeitsvolumen in den Zellkulturkammern sowie die kontinuierliche Perfusion mit Medium könnten außerdem diffusible Faktoren, die einen synchronisierenden Einfluss haben, zu stark verdünnen. Zu diesen möglichen Substanzen gehört das mit einem circadianen Rhythmus freigesetzte vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) (Kalsbeek *et al.*, 1995), das eine wichtige Rolle bei der Synchronisation und bei der Aufrechterhaltung des

Rhythmus innerhalb des SCN spielt (Reed *et al.*, 2001; Harmar *et al.*, 2002; Aton *et al.*, 2005). Weiterhin könnte das Stickstoffmonoxid, das ein wichtiger Mediator für phasenverschiebende Stimuli ist (Ding *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1995; Ding *et al.*, 1997), durch die Kulturbedingungen (größere räumliche Distanz der Zellen, sowie kontinuierliche Perfusion) in seiner Wirksamkeit beeinträchtigt sein.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Zellkulturen und *in vivo* Bedingungen besteht darin, dass in Kultur sämtliche Umweltreize fehlen, die *in vivo* synchronisierend wirken können. Dieser Mangel an Stimulation kann dazu führen, dass Uhrenneurone geringere Mengen an denjenigen Proteinen synthetisieren, die den molekularen Oszillator bilden. Die Stärke der Expression der Proteine Per1 und Per2 ist beispielsweise bei den meisten Neuronen im SCN abhängig von der neuronalen Aktivität sowie von externen Reizen (Nielsen *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2003; Lundkvist *et al.*, 2005). Da zumindest ein großer Teil der Neurone weniger stark selbsterhaltende, also gedämpfte, Oszillatoren sind (Aton *et al.*, 2005; Maywood *et al.*, 2006), könnten zu schwache oder uneinheitliche Signale von den primären Schrittmacherneuronen eine Stimulation und Synchronisation der schwächeren Oszillatoren verhindern (Kunz und Achermann, 2003; Bernard *et al.*, 2007). Auch die Bildung von kleinen Neuronenverbänden, die synchron arbeitende zelluläre Inseln bilden, könnte eine Folge davon sein.

Die unterschiedlichen Rhythmen in den Entladungsraten, könnten auf das Vorhandensein von verschiedenen Oszillatortypen, primäre (selbsterhaltende) und gedämpfte Oszillatoren zurückzuführen sein. Die stabilen blockförmigen sowie die ausgeprägten sinusförmigen Oszillationen zeigten sich als robust und ausdauernd, während andere Neurone wesentlich weniger präzise arbeiteten und instabil waren. Diese Neurone waren auch zum Tiefpunkt ihrer Zyklen aktiv und zeigten in den Fällen, in denen die Rhythmizität verloren ging, weiterhin eine mittlere *Spikeaktivität*. In Gewebekulturen weisen praktisch alle Neurone im SCN eine rhythmische Aktivität auf (Yamaguchi *et al.*, 2003). Unter entkoppelnden Bedingungen, wie es in der $VIP^{-/-}$ Maus auftritt, können jedoch nur etwa 30 % der Neurone ihre Oszillation aufrechterhalten (Aton *et al.*, 2005). Das entspricht dem Anteil an stabilen sinus- und blockförmigen Entladungsraten, die in dissoziierten Kulturen beobachtet wurden. Der Anteil an

stabil circadianen Neuronen übersteigt damit den Anteil an VIP-positiven Zellen, die die größte Zellpopulation im SCN bilden (Abrahamson und Moore, 2001).

4.2.2 Entladungsmuster der SCN-Neurone

In primären SCN-Kulturen konnten anhand des Entladungsmusters drei verschiedene Klassen von Neuronen unterschieden werden: unregelmäßige, gleichmäßig feuernde (im Folgenden als metronomische Muster bezeichnet) und *burst*-artig feuernde Neurone. Dabei wurden die metronomischen Entladungsmuster, die besonders präzise während des Aktivitätsmaximums waren, ausschließlich bei stabilen circadianen Neuronen beobachtet.

Diese unterschiedlichen Aktivitätsmuster wurden zuvor sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Groos und Hendriks, 1979; Shibata *et al.*, 1984; Welsh *et al.*, 1995) beschrieben, allerdings konnten sie nicht einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden. Dadurch, dass die metronomischen Muster nur bei stabilen Oszillatoren gefunden werden, scheinen sie aber ein Charakteristikum der Uhrenzellen im SCN zu sein. *In vivo* können die präzisen metronomischen Entladungsmuster nach Licht-Reizung der Retina auch zu Nachtzeiten von sonst unregelmäßig entladenden Zellen abgeleitet werden (Aggelopoulos und Meissl, 2000). Neurone im SCN, die Lichtinformationen von der Retina erhalten, liegen im ventromedialen SCN und gehören vermutlich einer recht heterogenen Zellpopulation an, obwohl sie ähnliche Membraneigenschaften besitzen (Kim und Dudek, 1993). Das deckt sich mit der Tatsache, dass die Zellpopulation mit stabilen Oszillatoren größer ist als die größte neuropeptiderge Zellpopulation (VIPerge Neurone) im SCN (Abrahamson und Moore, 2001; Aton *et al.*, 2005). Daraus kann man schließen, dass die primären Oszillatoren mehrere neuropeptiderge Phänotypen besitzen.

4.3 Informationsverarbeitung im SCN

Die schnellen Neurotransmitter Glutamat und GABA sind im SCN weit verbreitet. Beide Neurotransmitter werden zur Informationsverarbeitung innerhalb des SCN genutzt (Strecker *et al.*, 1995; Ebling, 1996; Albus *et al.*, 2005), Glutamat überträgt aber auch das Lichtsignal vom retinohypothalamischen Trakt (Castel *et al.*, 1993; de Vries *et al.*, 1993). Mit den durchgeführten Kurzzeitversuchen sollte die Kurzzeitwirkung von Glutamat und GABA bzw. ihren Agonisten untersucht werden. Ebenfalls wurde überprüft ob

Orexin A einen modulierenden Einfluss auf die Effekte von Glutamat ausübt, da im Hypothalamus Axone nachgewiesen wurden, die Orexin und Glutamat zusammen enthielten (Torrealba *et al.*, 2003).

4.3.1 Kurzzeiteffekte von Glutamat und GABA

Die inhibitorische Aminosäure GABA ist der vorherrschende Neurotransmitter im SCN und wird dort von den meisten Zellen ausgeschüttet (Okamura *et al.*, 1989; Moore und Speh, 1993). Diese GABAergen Neurone sind für die lokale intrinsische Signalübertragung verantwortlich, verbinden aber auch den SCN mit anderen hypothalamischen Regionen, wie zum Beispiel Teilen des paraventriculären Nucleus (Buijs *et al.*, 1994). Im SCN ist GABA mit zahlreichen Neuropeptiden colokalisiert (van den Pol und Tsujimoto, 1985; Moore und Speh, 1993; Tanaka *et al.*, 1997). GABA-Rezeptoren sind an fast allen Neuronen im SCN vorhanden, wobei ein leichter Gradient in der Verteilung der Rezeptor-Untereinheiten besteht (Gao *et al.*, 1995; Ohara *et al.*, 1995; Novak *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass alle Zellen im SCN von GABAergen Terminalien kontaktiert werden (Decavel und van den Pol, 1990).

In den vorliegenden Versuchen hatte der GABA_A-Agonist Muscimol, nicht aber der GABA_B-Agonist Baclofen, eine klare dosisabhängige Hemmung bei allen untersuchten SCN-Neuronen zur Folge. In einigen Fällen war diese Hemmung allerdings mit einer initialen Erregung verknüpft. Diese biphasischen Antworten werden später diskutiert. GABA-Rezeptoren sind im SCN weit verbreitet, wobei vor allem GABA_A-Rezeptoren in hoher Dichte über den gesamten Nucleus verteilt sind (Gao *et al.*, 1995; Belenky *et al.*, 2003). GABA_A-Rezeptoren besitzen eine dominierende Rolle in der Signalübertragung im SCN, wie in Ableitungen von akuten Hirnschnitten gezeigt wurde (Kim und Dudek, 1992; Gribkoff *et al.*, 2003; Kononenko und Dudek, 2004). Ihre Bedeutung liegt vermutlich hauptsächlich im Datenaustausch zwischen einzelnen SCN-Neuronen (Strecker *et al.*, 1997) und in einem Einfluss auf die Präzision der circadianen Periode und des Entladungsmusters (Liu und Reppert, 2000; Kononenko und Dudek, 2004; Novak *et al.*, 2004; Aton *et al.*, 2006). Eine Blockierung der GABA_A-Rezeptoren durch Bicucullin führte dementsprechend in SCN-Kulturen mit hoher Zelldichte zu globalen *burst*-artigen Entladungen, was darauf hindeutet, dass GABAerge Neurone eine

überschießende positive Rückkopplung durch exzitatorische Verbindungen verhindern.

GABA ist normalerweise der primäre inhibitorische Transmitter im gesamten Hypothalamus (Decavel und van den Pol, 1990). Einige SCN-Neurone reagierten allerdings in den MEA-Ableitungen überraschenderweise nicht mit einer Hemmung der *Spike*aktivität auf Muscimol-Applikation, sondern mit einer eindeutigen Erregung. Diese Aktivierung schlug dann bei höheren Konzentrationen in biphasische Antworten um, wobei die initiale Erregung von einer starken Hemmung gefolgt wurde. Ähnliche biphasische Reaktionen auf Muscimol wurden in Untersuchungen an SCN-Gewebekulturen beschrieben (Liou *et al.*, 1990), sind also nicht auf die Isolierung einzelner Zellen in den MEA-Kulturen zurückzuführen. Erregende Wirkungen von GABA scheinen vor allem in sich entwickelnden hypothalamischen Neuronen vorzukommen, wobei GABA und nicht Glutamat die treibende Kraft für die Generierung von Aktionspotentialen ist (Wang *et al.*, 2001; Gao und van den Pol, 2001b). Eine weitere Möglichkeit sind Tageszeit-abhängige Wirkungen im SCN mit einer GABA-vermittelten Erregung am Tag und einer Hemmung während der Nacht, wie sie von Wagner *et al.* (1997) postuliert wurden. Ein derartiger circadianer Mechanismus wurde später jedoch wieder in Frage gestellt (Gribkoff *et al.*, 1999; de Jeu und Pennartz, 2002) und konnte auch in den vorliegenden Untersuchungen an isolierten SCN-Zellen nicht verifiziert werden. Auch wenn zurzeit keine eindeutigen Aussagen über mögliche circadiane Veränderungen der GABAergen Mechanismen getroffen werden können, scheint eine depolarisierende Wirkung von GABA auch in adulten SCN Neuronen vorhanden zu sein. Diese exzitatorische Rolle von GABA tritt sowohl in der dorsalen als auch in der ventralen Region des SCN auf und ist abhängig von einem Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Cotransporter (Choi *et al.*, 2008). Eine circadiane Komponente könnte bei diesem Mechanismus ebenfalls vorhanden sein, da exzitatorische Vorgänge verstärkt während der Nacht im dorsalen SCN auftreten, was allerdings im Gegensatz zu Wagner *et al.* (1997) steht, die depolarisierende Effekte von GABA während des Tages beschrieben haben. Es stellt sich jetzt die Frage, warum derartige circadiane Vorgänge nicht in dissoziierten SCN-Neuronen nach GABA-Applikation beobachten werden konnten. Möglicherweise ist der Mechanismus unabhängig von der molekularen Uhr. Untersuchungen an akut

dissoziierten SCN-Neuron zeigten, dass die über den Tag schwankende intrazelluläre Cl^- -Konzentration, die das Vorzeichen der GABA-Reaktion bestimmt, sich ab dem Todeszeitpunkt nicht mehr verändert (Shimura *et al.*, 2002). Das lässt auf eine exogene Regelung der Kaskade schließen, die auch weitgehend unabhängig von der Ionenkonzentration des Außenmediums ist. Ein derartiger Einfluss würde in den Versuchen an Zellkulturen fehlen.

GABA_B-Rezeptoren sind im SCN vor allem an den Präsynapsen von Retinaefferenzen sowie in einer somatodentritischen postsynaptischen Position in vasopressinergen Neuronen des dorsomedialen SCN lokalisiert (Belenky *et al.*, 2008). Die Bedeutung von GABA_B-Rezeptoren auf die neuronale Aktivität ist nicht eindeutig geklärt (Liou *et al.*, 1990; Kim und Dudek, 1992; Liu und Reppert, 2000). Dies trifft sowohl für kurzzeitige Effekte als auch für die langfristige Kontrolle der Aktivität, d.h. auf den Einfluss auf die circadiane Aktivität zu. Die Lokalisation an den präsynaptischen Retinaefferenzen spricht dafür, dass die Eingänge des retinohypothalamischen Traktes in den SCN, beispielsweise die Freisetzung von Glutamat und PACAP und dadurch die von der Retina eingehenden Lichtinformationen, moduliert werden können (Jiang *et al.*, 1995a; Gillespie *et al.*, 1997; Novak *et al.*, 2004; Moldavan *et al.*, 2006). Von einigen Autoren wurde außerdem eine phasenverschiebende Wirkung beschrieben (Biggs und Prosser, 1998; Bergeron *et al.*, 1999), während andere das nicht verifizieren konnten (Novak *et al.*, 2004). Daneben könnten GABA_B-Rezeptoren für eine tonische Modulation der vasopressinergen Neurone verantwortlich sein, die durch das intrinsische GABAerge Netzwerk kontrolliert werden (Belenky *et al.*, 2008).

Glutamat, der dominierende erregende Neurotransmitter im ZNS, wirkte sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch auf die Aktivität von kultivierten SCN-Neuronen. Beide Effekte waren streng konzentrationsabhängig und konnten durch die Glutamat-Agonisten Kainat und Quisqualat weitgehend nachgeahmt werden, während AMPA vornehmlich hemmende Wirkungen aufwies. Der überraschende Anteil an Neuronen, die durch Glutamat und seine selektiven Agonisten gehemmt wurden könnte auf zwei verschiedene Mechanismen zurückzuführen sein. Zum einen könnten intrinsische GABAerge SCN-Neurone stimuliert worden sein, die sekundäre inhibitorische Effekte in postsynaptischen Neuronen auslösen. Der inhibitorische Effekt durch die Erregung des

GABAergen Neurons müsste dann stärker als die direkte, erregende Glutamatwirkung sein und diese maskieren. Als zweite Möglichkeit könnte ein Depolarisationsblock zu einer Dauerdepolarisation und einer Inaktivierung der Natriumkanäle führen, wie es sowohl an dissoziierten SCN-Neuronen als auch im SCN von akuten Hirnschnitten beobachtet wurde (Meijer *et al.*, 1993).

Zwischen den einzelnen Glutamat-Agonisten gibt es beträchtliche Unterschiede in ihrer Wirkung. Während nach Glutamat-Applikation Erregungen und Hemmungen relativ gleichmäßig verteilt waren, dominierte bei Kainat die Hemmwirkung. Auch nach AMPA und Quisqualat traten bevorzugt inhibitorischen Effekte auf. Dies könnte daran liegen, dass die einzelnen im SCN nachgewiesenen Glutamatrezeptoren GluR_{1,2,4} (AMPA), GluR_{5,6} (Kainat) und NMDAR_{1,2C} (NMDA) (van den Pol *et al.*, 1994a; Ebling, 1996; Eyigor *et al.*, 2001) sehr unterschiedlich in den verschiedenen Subregionen im SCN verteilt sind (Gannon und Rea, 1993; Mikkelsen *et al.*, 1995; Eyigor *et al.*, 2005). Die verschiedenen Neuronenpopulationen des SCN dürften daher abhängig von ihrer Funktion im Netzwerk sehr unterschiedlich von Glutamatapplikationen angesprochen werden. Ähnliche Mechanismen wurden in anderen hypothalamischen Neuronen beschrieben. So wird die besonders starke Hemmung der Entladungsrate von hypothalamischen Neuronen durch Kainat mit einer Erregung von GABAergen Interneuronen erklärt (Joanny *et al.*, 2000), deren Einfluss durch präsynaptischen Kainatrezeptoren noch verstärkt wird (Liu *et al.*, 1999). Bei AMPA-Rezeptoren, die im gesamten SCN auf den Somata und dem Neuropil verbreitet sind (Michel *et al.*, 2002), fehlt der präsynaptische Mechanismus, was ein Grund für die geringere Effektivität sein könnte. Quisqualat hingegen, welches ebenfalls an Rezeptoren des AMPA-Typen angreift, kann zusätzlich auch an metabotropen mGluR_{1,5}-Rezeptoren im SCN angreifen (van den Pol, 1994; van den Pol *et al.*, 1994b; 1995; Mateos *et al.*, 1998). Diese metabotropen Glutamat-Rezeptoren sind im Hypothalamus in der Lage, glutamaterge und GABAerge Übertragungswege präsynaptisch und postsynaptisch akut zu verstärken oder zu hemmen (Schrader und Tasker, 1997; Chen und van den Pol, 1998; Haak, 1999; Pampillo *et al.*, 2002; Huang und van den Pol, 2007). Durch die Modulation der synaptischen Signalstärke bei gleichzeitiger Erregung einer gut vernetzten Subpopulation scheint es möglich zu sein, dass ein exzitatorischer Neurotransmitter oder sein Agonist

eine überwiegend inhibitorische Wirkung auf das gesamte Netzwerk entfalten. Dies zeigt, dass sich in der Zellkultur ein komplexes Netzwerk reorganisiert, das viele Eigenschaften der natürlichen Situation besitzt.

4.3.2 Orexin A und Glutamat

Das Neuropeptid Orexin A wird im Gehirn von Säugern ausschließlich von Neuronen des lateralen Hypothalamus (LH) gebildet und ausgeschüttet (de Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998). Orexin ist ein Hungersignal (Sakurai *et al.*, 1998; Thorpe *et al.*, 2003), greift aber auch in viele andere Mechanismen der Energiehomöostase ein wie Schlaf, Durst (Kunii *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 2000; Willie *et al.*, 2001) und lokomotorische Aktivität (Kotz *et al.*, 2006). Orexinerge Fasern erstrecken sich in die meisten Gehirn-Regionen (Cutler *et al.*, 1999; Date *et al.*, 1999; Nambu *et al.*, 1999), darunter in den SCN, der zwar nur vereinzelte Orexin-Fasern erhält, aber eine hohe Dichte an OX₁-Rezeptoren aufweist (Hervieu *et al.*, 2001; Bäckberg *et al.*, 2002). Die enge Verbindung zwischen circadianem System und dem Orexin-System wird dadurch unterstrichen, dass die Orexin-Konzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit einem circadianen Muster folgt (Fujiki *et al.*, 2001; Grady *et al.*, 2006), das nach SCN-Läsionen verschwindet, also direkt abhängig von der circadianen Uhr im SCN ist (Zhang *et al.*, 2004).

In den vorliegenden Versuchen bewirkte die Kurzzeitapplikation von Orexin A (100 nM) bei etwa zwei Dritteln der SCN-Neurone eine deutliche Veränderung der Entladungsrates. Die Mehrheit der Neurone reagierte mit einer Erhöhung der Spikerate, andere zeigten deutliche inhibitorische Antworten. Die exzitatorischen Effekte waren streng dosisabhängig, nicht jedoch die inhibitorischen Effekte. Dies bestätigt vorläufige frühere Untersuchungen am SCN, die ähnliche inhibitorische und exzitatorische Wirkungen von Orexin nachweisen konnten (Farkas *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2008).

Der Mechanismus der Orexinwirkung ist nicht vollständig aufgeklärt und scheint abhängig vom jeweils untersuchten Zelltyp zu sein. Da Orexin-Rezeptoren über gekoppelte G-Proteine wirken (Sakurai *et al.*, 1998), ist es möglich, dass sie über Kanäle und Transporter direkt das Membranpotential verändern, andere Rezeptoren modulieren oder präsynaptisch die Transmitterausschüttung regulieren.

4.3.2.1 Präsynaptischer Orexin-Effekt

Für eine Modulation von GABAergen Neuronen im SCN durch Orexin spricht, dass Orexin konzentrationsabhängig die Häufigkeit von spontanen, vermutlich GABAergen, IPSS verringert, was sich als Konsequenz in einer Erregung des Neurons äußert (Klisch *et al.*, 2009). Ein weiterer Hinweis auf eine Modulation, die besonders die Sekretion von GABA verringert, ergibt sich daraus, dass eine gleichzeitige Erregung vieler SCN-Neurone durch die Dominanz von GABAergen Neuronen zu einer allgemeinen Hemmung führen könnte (siehe auch Müller *et al.*, 1997). In der medianen und lateralen hypothalamischen Region sind etwa ein Drittel der Neurone Orexin-empfindlich. Orexin kann dort direkt an axonalen Terminalien angreifen und die Neurotransmitter-Freisetzung, besonders von GABA oder Glutamat, modulieren (van den Pol *et al.*, 1998). Das Neuropeptid hat dabei deutliche Effekte auf prä-, sowie auch auf postsynaptische Rezeptoren. So führt Orexin A in magnozellulären Neuronen des PVN zu einem Anstieg der Frequenz und der Amplitude von exzitatorischen postsynaptischen Strömen (EPSS) (Follwell und Ferguson, 2002). Dieser Effekt wird durch TTX blockiert, während der Anstieg in der Amplitude der Miniatur-EPSS bestehen bleibt. Dies deutet darauf hin, dass Orexin sowohl einen exzitatorischen Input beeinflusst, der von der Aktionspotenzialfrequenz abhängig ist, als auch an einem postsynaptischen Rezeptor modulierend angreift und die EPSS-Amplitude steigert. Parvozelluläre Neurone zeigen dagegen zwar auch eine Depolarisation nach Orexin A, aber dieser Effekt bleibt nach TTX-Applikation bestehen. Dies beweist, dass Orexin A auch präsynaptisch wirken kann. Ähnliche Wirkungen von Orexin A auf prä- und postsynaptische Rezeptoren werden im hypothalamischen *N. arcuatus* beschrieben, wo Orexin A ebenfalls glutamaterge und GABAerge Neurone moduliert (van den Pol *et al.*, 1998). Im rostralateralen Hypothalamus scheint Orexin A die Freisetzung von GABA zu reduzieren, wie in einer Mikrodialyse-Studie gezeigt werden konnte (Thorpe *et al.*, 2006).

4.3.2.2 Orexin-Modulation der synaptischen Übertragung

Alle orexinergen Neurone des LH co-exprimieren Glutamat (Abrahamson *et al.*, 2001) und in einem Zielgebiet dieser Neurone, im *Nucleus tubero-mammillaris*, wurden in Axonterminalien neben Vesikeln mit Orexin auch mit Glutamat gefüllte Vesikel nachgewiesen (Torrealba *et al.*, 2003). Das lässt

vermuten, dass in diesem Kerngebiet Orexin zusammen mit Glutamat ausgeschüttet wird.

Versuche im SCN mit einer Co-Applikation von Orexin A und Glutamat bestätigen, dass Orexin die Wirkung des Glutamats bzw. seiner Agonisten im SCN beeinflussen kann. In der Regel kann Orexin sowohl die erregenden als auch die hemmenden Glutamat-Antworten verstärken, kann aber auch die Anzahl der Glutamat-empfindlichen Neurone variieren. Ein eindrucksvolles Beispiel dafür bietet die Kainat-Wirkung. So kann die hemmende Kainat-Wirkung durch Orexin A deutlich verstärkt, aber auch abgeschwächt werden. Ähnliches trifft für die erregende Kainat-Wirkung zu. Die unterschiedlichen Kainat-Wirkungen können durch die unterschiedliche Lokalisation von Kainatrezeptoren verursacht werden. Von primären hypothalamischen Kulturen ist bekannt, dass Kainat sowohl an prä- als auch an postsynaptischen Rezeptoren angreifen kann (Liu *et al.*, 1999). Die präsynaptische Aktivierung von Kainat-Rezeptoren führt zu einer verstärkten Freisetzung des inhibitorischen Transmitters GABA und folglich zu einer Hyperpolarisation des postsynaptischen Neurons. Da Kainat aber auch an postsynaptischen somatodendritischen Rezeptoren von hypothalamischen Neuronen angreift (Liu *et al.*, 1999), ist seine Wirkung sehr stark von der Rezeptorlokalisierung abhängig. Die prä- und postsynaptische Rezeptorlokalisierung von Kainat könnte für die unterschiedlichen Wirkungen des Glutamat-Agonisten verantwortlich sein. Da GABAerge Neurone im Hypothalamus und SCN dominieren (Moore und Speh, 1993) und hypothalamische Kulturen besonders reich an inhibitorischen synaptischen Verbindungen sind (Müller *et al.*, 1997), könnte die überwiegend depolarisierende Wirkung des Orexins im Hypothalamus (Follwell und Ferguson, 2002), bzw. auch in anderen Hirnregionen (Yang und Ferguson, 2002; Hoang *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004) vollkommen gegensätzliche Antworten hervorrufen. Eine Modulation der präsynaptischen Kainat-Antwort könnte zu einer Verstärkung der GABA-Freisetzung in präsynaptischen Neuronen führen, folglich zu einer stärkeren Hemmung, während eine Modulation des postsynaptischen Rezeptors die erregende Kainat-Antwort verstärkt.

Orexin A scheint nicht nur den Kainat-Rezeptor zu modulieren, sondern auch quisqualatsensitive Rezeptoren. So schwächt Orexin A die inhibitorische

Quisqualat-Wirkung in den SCN-Kulturen deutlich ab, verstärkt aber die exzitatorischen Effekte.

AMPA, welches anders als Quisqualat nicht auch metabotrope Glutamatrezeptoren aktiviert, bewirkte mit und ohne Orexin vornehmlich Inhibitionen, was wohl auf eine Erregung GABAerger Neurone hinweist. Im SCN reduziert die Aktivierung von mGluR_{1,5}-Rezeptoren, wie es durch Quisqualat geschieht, bei circa einem Drittel der SCN-Neurone präsynaptisch die GABA-Ausüttung (Chen und van den Pol, 1998). Da auch Orexin A im SCN die GABA-Ausüttung präsynaptisch reduzieren kann (Klisch *et al.*, 2009), wäre eine weitgehende Blockade sekundärer GABA-Effekte denkbar, so dass verstärkt die direkten exzitatorischen Effekte der ionotropen AMPA-Rezeptoren hervortreten. Eine allgemeine Verringerung der GABA-Sekretion durch Orexin-Applikation wurde auch im rostralen lateralen Hypothalamus nachgewiesen (Thorpe *et al.*, 2006). Orexin A ist auch in der Lage, die durch AMPA-Rezeptoren vermittelte synaptische Transmission zu verstärken (Borgland *et al.*, 2006), was auch bei den exzitatorisch auf AMPA oder Quisqualat reagierenden Neuronen beobachtet werden konnte.

4.3.2.3 Orexin Wirkung auf Kanäle und Transporter

Interessanterweise bestehen im SCN viele exzitatorische und inhibitorische Effekte von Orexin in Gegenwart von GABA- und Glutamat-Antagonisten fort (Brown *et al.*, 2008), was deutlich zeigt, dass der Einfluss von Orexin auf die GABAerge und glutamaterge Transmission nicht der einzige Wirkmechanismus sein kann. Transfizierte CHO-Zellen werden beispielsweise durch einen Ca²⁺-Einstrom depolarisiert, der daraufhin PLC aktiviert (Larsson *et al.*, 2005; Ekholm *et al.*, 2007). In der *Area postrema* werden Neurone durch die Öffnung unspezifischer Kationenkanäle depolarisiert (Yang und Ferguson, 2002). Die Hemmung verschiedener K⁺-Einwärtsgerichteter-Kanäle (Hoang *et al.*, 2003; 2004) und auch die Aktivierung von Natrium-Calcium-Austauschern (Wu *et al.*, 2004) depolarisiert Neurone in unterschiedlichen Regionen des ZNS. Direkte Effekte auf das Membranpotential von SCN-Neuronen durch Orexin konnten bislang jedoch nicht nachgewiesen werden (van den Pol *et al.*, 1998).

Die unterschiedliche Modulation durch Orexin A zeigt, dass das Neuropeptid die neuronale Aktivität im SCN sehr differenziert steuern kann. Mit Multielektroden-Ableitungen allerdings lässt sich nicht zwischen primären,

direkten Effekten an einem einzelnen Neuron und sekundären Effekten durch die Netzwerkaktivität im SCN unterscheiden. Auf jeden Fall scheint Orexin A aber die synaptische Übertragung von GABA und Glutamat als wichtigste Neurotransmitter im SCN (Decavel und van den Pol, 1990; van den Pol *et al.*, 1994a) zu beeinflussen und zu modulieren. Viele Neuropeptide greifen über verschiedene G-Protein-gekoppelte Kaskaden in diese Signaltransduktion mit ein und können sich so gegenseitig verstärken oder auch abschwächen (van den Pol *et al.*, 1998; Kopp *et al.*, 1999; Gao und van den Pol, 2001a). Orexin A greift ebenfalls in dieses Netzwerk mit ein und kann dabei unterschiedliche Reaktionen im Netzwerk auslösen. Die vielfältige Modulation von Neuronen im SCN wäre eine Möglichkeit, exogene und endogene Signale miteinander zu vergleichen und beispielsweise mit der Regulation der Ernährung oder dem Schlaf-Wachrhythmus zu verrechnen

4.3.3 Netzwerk

Die vorausgegangene Diskussion hat verdeutlicht, dass bei Multielektrodenableitungen nicht zwischen direkten Effekten einer Substanz auf eine einzelne Zelle und zwischen Effekten auf das gesamte neuronale Netzwerk unterschieden werden kann. Dies kann daran liegen, dass die MEA-Ableitungen, ähnlich wie bei einer *in situ* Mikroelektrodenableitung, zwar die Signale von einer bestimmten Zelle auffangen, diese aber nicht nur *in situ* oder im Hirnschnitt, sondern auch in Zellkulturen unter dem Einfluss von zahlreichen vorgeschalteten und nachgeschalteten Neuronen steht. Wie weit sich in SCN-Zellkulturen neuronale Netzwerke mit synaptischen Verbindungen überhaupt ausbilden, war zu Beginn der Untersuchungen nicht ganz klar. In SCN-Kulturen konnten zwar umfangreiche synaptische Verbindungen nachgewiesen werden, die neuronale Aktivität einzelner Uhrenzellen war aber trotzdem nicht synchronisiert (Welsh *et al.*, 1995). Es wurde daraus der Rückschluss gezogen, dass die Uhrenfunktion unabhängig von einer konventionellen synaptischen Übertragung ist und dass die synaptische Übertragung für eine Synchronisation der Neurone untereinander nicht ausreichend ist. Die Kurzzeiteffekte von GABA und Glutamat sowie ihrer Agonisten zeigen aber eindeutig, dass vor allem inhibitorische Vorgänge eine dominierende Rolle im SCN spielen müssen. GABA ist der maßgebliche inhibitorische Neurotransmitter im SCN (Decavel und van den Pol, 1990; Moore und Speh, 1993), bis zu 90 % der SCN-Neurone

sollen GABAerg sein. Kurzeitapplikationen von GABA- aber auch Glutamat-Agonisten zeigten, dass inhibitorische Effekte eine wichtige Rolle im SCN spielen. Werden diese inhibitorischen Mechanismen durch GABA-Rezeptor-Antagonisten blockiert, kommt es jedoch nicht nur zu einer allgemeinen Steigerung der Entladungsrate, sondern häufig zu *burst*-artigen Entladungsmustern, die sich über die ganze Kultur ausbreiteten. Ein ähnliches Verhalten wurde auch in hippocampalen Neuronenkulturen beobachtet (Arnold *et al.*, 2005). Das zeigt, dass sich in primären Zellkulturen aus SCN-Neuronen ein ausgeprägtes Netzwerk geformt haben muss und dass GABA die Ausbreitung überschießender Erregung verhindert. Interessanterweise konnte mit dieser Methode trotz der hohen Anzahl von GABAergen Neuronen im SCN nur sehr selten Kreuzkorrelationen gefunden werden, die auf eine Inhibition hinweisen.

Die starken, *burst*-artigen Erregungswellen, die sich nach Blockierung der GABA_A-Rezeptoren über die gesamte Kultur ausbreiten, verdeutlichen, dass in dichten SCN-Kulturen nicht nur inhibitorische synaptische Mechanismen, sondern auch exzitatorische Mechanismen eine große Rolle spielen. Diese exzitatorischen synaptischen Mechanismen dürften aber unter normalen Bedingungen durch den vorherrschenden GABAergen Phänotyp der SCN-Neurone weitgehend maskiert sein. In den Versuchen waren daher auch nur Entladungen kleinerer Zell-Gruppen miteinander korreliert, die in der Regel zu den Nicht-Oszillatorzellen gehörten. Stabile Oszillatoren waren niemals mit anderen Neuronen korreliert, woraus man schließen kann, dass die stabilen Oszillatoren zwar in das Netzwerk eingebunden sind, aber ihre Entladungsmuster von benachbarten Zellen nicht akut beeinflusst werden. Diese Eigenschaft, auf äußere Signale nur langsam zu reagieren, könnte für die Stabilität der inneren Uhr notwendig sein, um nicht durch unwesentliche Ereignisse permanent verschoben zu werden. Des Weiteren ist eine schwache Kopplung der Oszillatoren untereinander wichtig für eine hohe Stabilität und Präzision eines Multioszillatorsystems (Winfree, 1967; Enright, 1980). In der Zellkultur wird dieses Mindestmaß an Kopplung, das für eine Synchronisation notwendig ist, anscheinend nicht erreicht (Liu *et al.*, 1997b). Eine einseitige, streng korrelierte, exzitatorische Reizweiterleitung, wie sie zwischen Oszillatoren in Kultur beschrieben wurde (Honma *et al.*, 2000; Shirakawa *et al.*,

2000), kann eine synchronisierende Kopplung nicht leisten. Daher ist eine unterschwellige tonische Übertragung wahrscheinlicher, die auch eher zu den metronomischen Entladungsmustern stabiler Oszillatoren passt. Entladungen schwacher Oszillatoren waren jedoch häufig mit denen anderer Zellen korreliert. Diese Neurone integrieren möglicherweise verschiedene Zeit- und Umweltsignale zu einem Ausgangssignal. Die instabile Oszillation könnte die Folge von nicht synchronen circadianen Eingangssignalen sein, die zu instabilen Schwingungen führt (Bouskila und Dudek, 1995).

Die Häufigkeit korrelierter Entladungen hängt grundsätzlich von einer ausreichenden Aktivität der beobachteten Neurone ab und war so durch die stark variierenden Entladungsraten der einzelnen Zellen beeinflusst. Der Anteil neu entdeckter korrelierter Aktivität war jedoch grundsätzlich von der Gesamtzahl unabhängig. Die Applikation von Orexin A hemmte lang anhaltend die Neuausbildung von korrelierter Aktivität. Möglicherweise hängt dieser Effekt mit einer Festigung synaptischer Verbindungen zusammen, wie er im ventralen Tegmentum nach Orexin festgestellt wurde (Borgland *et al.*, 2006). Die Applikation des vornehmlich als Ausgangssignal des SCN diskutierten AVP (Tousson und Meissl, 2004) reduzierte die allgemeine Entladungsrate der Kultur und auch die Gesamtzahl der Korrelationen deutlich. Der Anteil neu entstehender Korrelationen blieb im Gegensatz zu Orexin A jedoch unverändert. Eine Auswirkung auf die Plastizität ist also nicht durch jedes Neuropeptid gegeben.

Die Analyse der Kreuzkorrelationen lässt leider keine Aussage über die Verschaltung im SCN zu. Eine korrelierte Aktivität beweist zwar das Vorhandensein von synaptischen Verbindungen, jedoch lässt sie nur wenige Rückschlüsse auf die Struktur zu. Fehlende Korrelationen müssen auch nicht unbedingt bedeuten, dass es keine Verknüpfungen gibt (Perkel *et al.*, 1967a), zumal die verwendeten 60 Elektroden nur einen kleinen Teil des Geschehens abbilden können. Die Existenz der postulierten *small-world*-Netzwerke im SCN (Vasalou *et al.*, 2009) kann daher nicht nachgewiesen werden.

4.4 Phasenverschiebungen

Ein besonderes Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die beiden Hormone Orexin A und Melatonin die circadianen Entladungsrhythmen im SCN

in ihrer Phase verschieben können, und zwar nicht nur im intakten Zellverband, sondern sogar auf der Ebene einzelner isolierter Zellen. Diese Phasenverschiebungen können ausgesprochen deutlich ausfallen, sind aber in isolierten Neuronen im Gegensatz zu den Gewebekulturen sehr variabel.

Die Möglichkeit, die eigene Phase und Periode anhand äußerer und innerer Stimuli an die Umwelt anzupassen, ist eine notwendige Eigenschaft der inneren Uhr. Die verschiedenen Reize müssen gewichtet und integriert werden, um die sich zyklisch wiederholenden Ereignisse antizipieren zu können (Johnson *et al.*, 2003). *In vivo* ist Licht das wichtigste exogene Signal (Daan und Pittendrigh, 1976; Challet, 2007), das die Phasen der SCN Neurone verschieben kann. Daneben spielen aber auch die lokomotorische Aktivität (Marchant und Mistlberger, 1996) und der Energiehaushalt eine bedeutende Rolle (Challet *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 2005). Zu den endogenen Signalen zählen viele Hormone, wie zum Beispiel Melatonin, das vom Pinealorgan in Dunkelheit ausgeschüttet wird (Wurtman *et al.*, 1963) und auf den SCN zurückkoppeln kann (Lewy *et al.*, 1980; Cassone *et al.*, 1986). Melatonin-Rezeptoren wurden in hoher Dichte im SCN des Nagetier-Gehirns nachgewiesen (Vanecek *et al.*, 1987), wobei sich zwei Subtypen unterscheiden lassen: MT₁-(Mel_{1a}) und MT₂-(Mel_{1b}) Rezeptoren (Reppert *et al.*, 1994; 1995). Der MT₁-Rezeptor wird in sämtlichen Hirnregionen exprimiert, die ¹²⁵I-2-Iodomelatonin-Bindungsstellen aufweisen, und ist im SCN für die akuten inhibitorischen Effekte von Melatonin auf die neuronale Aktivität verantwortlich (Liu *et al.*, 1997a). Eine Ausschaltung dieses Rezeptors führt in MT₁-Rezeptor-defizienten Mäusen aber nicht zu einem vollständigen Verlust der phasen-verschiebenden Aktivität des Melatonins, was den Schluss zulässt, dass auch der zweite Rezeptortyp, der MT₂-Rezeptor, für die circadiane Melatonin-Wirkung verantwortlich sein könnte. Dies konnte mit Hilfe von spezifischen Antagonisten für die beiden Melatonin-Rezeptoren in Untersuchungen an SCN-Gewebekulturen verifiziert werden (Hunt *et al.*, 2001). Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor MT₂ wirkt über second Messenger auf die molekulare Uhr. Die Transduktion führt über die Aktivierung des G_{i/o}-Weges und die Phospholipase C (McArthur *et al.*, 1997; Hunt *et al.*, 2001; von Gall *et al.*, 2002). Die am Ende dieser Kaskaden in ihrem Titer veränderten Signalmoleküle, unter anderem cAMP, Proteinkinase C (PKC) und Ca²⁺, sind

alle Regulatoren der molekularen Uhr (Kopp *et al.*, 1999; Honma und Honma, 2003; Tischkau *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007).

Interessanterweise wurden in den vorliegenden Versuchen niemals akute Veränderungen der *Spikerate* in stabilen Oszillator-Neuronen beobachtet, obwohl die Phasen deutlich durch Melatonin verschoben wurden. Dies könnte bedeuten, dass MT_1 -Rezeptoren, die die akuten, inhibierenden Melatonin-Effekte vermitteln, nur an SCN-Neuronen exprimiert werden, die nicht als Schrittmacher-Neurone fungieren. Diese Annahme bleibt spekulativ, da es zurzeit keine Möglichkeit gibt, den MT_2 -Rezeptor im SCN auf zellulärer Basis zu lokalisieren.

Isolierte, kultivierte Neurone reagieren auf Melatonin-Applikation auch in anderer Hinsicht unterschiedlich als es aus Versuchen an akuten Gewebekulturen zu erwarten wäre (Gillette und McArthur, 1995). Besonders auffällig ist, dass im Gegensatz zu den Gewebekulturen keine eindeutige Phasenantwort-Beziehung vorhanden ist. Die Phasenverschiebungen können sehr variabel ausfallen, was bei Melatonin-Applikation zur selben circadianen Zeit zu einer Phasenbeschleunigung oder manchmal sogar zu einer Phasenverzögerung führen kann. Ein weiteres Novum ist, dass einzelne Neurone kein enges Zeitfenster in der Empfindlichkeit zeigen, wie es *in vivo* bzw. in Gewebekulturen der Fall ist. Sie reagieren in Zellkulturen auch zu einer Zeit sensibel auf Melatonin, wenn sie in der Gewebekultur nicht ansprechbar sind, wie beispielsweise in der subjektiven Mittagszeit zwischen CT 4 und CT 7. In allen bisherigen Untersuchungen an Ratten oder Mäusen ist der resynchronisierende Effekt von Melatonin auf die Abendphase beschränkt, also auf den Übergang von der Hell- zur Dunkelphase, wenn die natürliche Melatoninausschüttung durch das Pinealorgan noch niedrig ist (Redman *et al.*, 1983; Gillette und McArthur, 1995). Ein zweites Empfindlichkeitsfenster tritt in der Morgenphase, beim Übergang von der Dunkel- zur Hellphase auf. Phasen-Antwortkurven der Melatoninwirkung, die in Untersuchungen am Menschen durchgeführt wurden, bestätigen dieses enge Zeitfenster in der Empfindlichkeit (Lewy *et al.*, 1992; Arendt und Skene, 2005). Es wird angenommen, dass das Empfindlichkeitsfenster auf die Desensibilisierung des MT_2 -Rezeptors zum Beginn der Nacht zurückzuführen ist, wenn der Rezeptor durch die ansteigenden Konzentrationen des endogenen Agonisten Melatonin während

der Nacht internalisiert wird (Jockers *et al.*, 2008). Dies würde das enge zeitliche Empfindlichkeitsprofil der biologischen Uhr in Bezug auf die Melatoninwirkung schlüssig erklären (Gerdin *et al.*, 2004). Bei den hier durchgeführten *in vitro* Versuchen fehlt dieses endogene Zeitsignal mit ansteigenden und wieder abfallenden Melatoninspiegeln. Eine Desensibilisierung der Melatoninrezeptoren durch den endogenen Agonisten kann dementsprechend nicht stattfinden und als Konsequenz fehlt das enge zeitliche Empfindlichkeitsfenster, das *in vivo* beobachtet wird. Melatonin könnte demnach ein endogenes Signal darstellen, das *in vivo* den circadianen Rhythmus der inneren Uhr stabilisiert und auch moduliert. Fehlt dieses endogene Signal, wäre denkbar, dass die Oszillatorneurone empfindlicher auf externe Störsignale reagieren. Auffällig war zum Beispiel in den Langzeit-Versuchen, dass nach einmaliger Melatoningabe der erste Zyklus nach der Applikation sehr variabel sein konnte und sich der Rhythmus manchmal sogar erst nach 3 bis 4 Tagen, stabilisierte. Diese Variabilität könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass in den Versuchen die Aktivität von einzelnen stabilen Oszillatorneuronen betrachtet wurden, die morphologisch weitgehend unabhängig von Nachbarneuronen waren, also faktisch aus dem Netzwerkverbund herausgelöst waren. Neue synaptische Verbindungen bilden sich in den Kulturen mit niedriger Dichte, die bei den Melatonin-Experimenten verwendet wurden, nur vereinzelt, wie immunhistochemisch mit dem Synapsenmarker Synapsin I gezeigt werden konnte (siehe Welsh *et al.*, 1995; Klisch *et al.*, 2006). Dies bedeutet, dass auch die Kopplung zwischen einzelnen Neuronen, falls überhaupt vorhanden, wesentlich schwächer sein muss als in Gewebekulturen. Je kleiner aber die Zahl gekoppelter Oszillatoren ist, umso instabiler ist auch ihr gemeinsamer Rhythmus (Bernard *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007). Ein weiterer methodischer Faktor kommt hinzu, der die Vergleichbarkeit zwischen den Versuchen an Einzelzellen und im Gewebsverband erschwert. Untersuchungen an Gewebeschnitten basieren in der Regel auf einer randomisierten Registrierung der elektrischen Aktivität von einzelnen Zellen über einen sehr kurzen Zeitraum von nur wenigen Minuten (Gillette und McArthur, 1995; Starkey *et al.*, 1995). Diese Messungen werden über einen Tag, maximal über zwei Zyklen, durchgeführt und daraus die elektrische Aktivität der gesamten Neuronen-Population im SCN gemittelt und als Maß für

das circadiane neuronale Ausgangssignal des SCN genommen. Unberücksichtigt bleibt dabei, dass die Phasen einzelner Neurone regional und entlang eines rostral-caudalen Gradienten voneinander abweichen können, obwohl die Periode konstant bleibt (Nakamura *et al.*, 2001; Schaap *et al.*, 2003; Noguchi und Watanabe, 2008). Dieses Phänomen der räumlichen Divergenz kann auch in einem Multi-Oszillatormodell *in silico* bestätigt werden (Kunz und Achermann, 2003) und scheint eine Bedeutung für die verschiedenen Ausgangssignale des SCN, sowie für die Codierung von Lang- und Kurztag zu haben (Rohling *et al.*, 2006; Inagaki *et al.*, 2007).

Während Melatonin direkt an den Hell-Dunkelzyklus gekoppelt ist, stellt Orexin A, das ausschließlich in Zellen des lateralen Hypothalamus (LH) produziert wird, ein Hungersignal dar (Sakurai *et al.*, 1998) und spielt zudem eine wichtige Rolle für den Schlaf (Willie *et al.*, 2001; Martynska *et al.*, 2005). Der LH wird zudem auch von nervösen Bahnen, die ihren Ursprung im SCN haben, direkt oder indirekt innerviert, sodass er ebenso wie das Pinealorgan unter dem Einfluss des circadianen Systems steht. Zellen des LH projizieren wiederum zum ventromedialen Teil des SCN (Date *et al.*, 1999). Auch wenn diese Innervation sehr spärlich ausgeprägt ist, lässt sie auf eine Rückkopplung von hormonbildenden Zellen des LH auf den SCN schließen. Dafür spricht auch, dass Orexin-Rezeptoren des Subtyps OX₁ im SCN stark verbreitet sind (Bäckberg *et al.*, 2002). Die Orexin-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten 7-Helix-Transmembran-rezeptoren. Ein Haupteffekt ihrer Aktivierung besteht in einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels (Sakurai *et al.*, 1998), die auf verschiedenen Signaltransduktionswegen erreicht werden kann: durch eine Aktivierung des PLC-Weges und eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, sowie durch eine Erhöhung des Calcium-Einstroms aus dem Extrazellulärraum über Ionenkanäle (Lund *et al.*, 2000). Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch diverse Formen von G_s, G_{i/o} und des PLC-Weges womöglich via G_q unter bestimmten Bedingungen aktiviert werden können (Offermanns, 2003; Zhu *et al.*, 2003; Holmqvist *et al.*, 2005; Gorojankina *et al.*, 2007). Die verschiedenen Transduktionswege wurden in unterschiedlichen Modellsystemen gefunden und sind daher wahrscheinlich vom Zelltyp abhängig. Eine Untersuchung der OXR₁-Transduktions-

mechanismen im SCN gibt es bislang nicht, jedoch beeinflussen alle genannten Wege die molekulare Uhr (Gillette und Mitchell, 2002).

Die Applikation von Orexin A konnte in isolierten SCN-Zellen deutliche Phasenverschiebungen auslösen, und zwar sowohl Phasenbeschleunigungen als auch Phasenverzögerungen. Ähnlich wie bei Melatonin-Applikation reagierten stabile Oszillatorneurone sehr variabel auf Orexin; demzufolge war auch die Phasen-Antwort-Beziehung nicht eindeutig, sondern variierte sehr stark. Dies würde bedeuten, dass auch in diesem Fall stabilisierende Mechanismen, die in einem intakten Netzwerk vorhanden sind, fehlen. Bestätigt wird das dadurch, dass Phasenverschiebungen durch Orexin in organotypischen Hirnschnitten wesentlich stabiler und reproduzierbarer sind als in Zellkultur (Klisch *et al.*, 2009). Bemerkenswert ist, dass SCN-Neurone auf Orexin-Applikation wiederum mit zwei unterschiedlichen Mechanismen reagierten: mit langfristigen Verschiebungen der Phasen der neuronalen Aktivität oder mit akuten, schnell auftretenden Veränderungen der Entladungsrate. Ein Wirkungsmechanismus scheint direkt in die molekulare Uhr der Oszillatorzellen einzugreifen, während der andere schnell auf die Entladungsrate wirkt. Neurone mit regelmäßigen Entladungsmustern, wie sie vorwiegend bei stabilen Oszillatorzellen vorkommen, wurden auch in anderen Studien (Brown *et al.*, 2008) kaum in ihrer Aktivität beeinflusst. Direkte Effekte auf die circadiane Phase, die unabhängig von Natrium-abhängigen Aktionspotentialen zu sein scheinen, wurden bereits bei Applikation von *gastrin releasing-peptide* (GRP) beschrieben (Maywood *et al.*, 2006).

In vielen Bereichen des zentralen Nervensystems wurden präsynaptische und postsynaptische Effekte von Orexin nachgewiesen (van den Pol *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2003; Klisch *et al.*, 2009). Präsynaptische Orexin-Rezeptoren können dabei als Heterorezeptoren agieren und die Freisetzung von Neurotransmittern, besonders von Glutamat und GABA, stimulieren. In allen Untersuchungen steigerte Orexin die Frequenz von spontanen inhibitorischen (sIPSS) und exzitatorischen postsynaptischen Strömen (sEPSS). Dieser Effekt kann auf einen direkten Einfluss auf die Vesikelfreisetzung oder aber auch auf einen Einfluss auf Calcium- bzw. Kaliumkanäle zurückgeführt werden. Auf diese Weise könnte Orexin selbst Phasenverschiebungen auslösen, oder Einfluss auf das gesamte neuronale

Netzwerk im SCN nehmen und modulieren. Es ist dabei denkbar, dass die akuten Änderungen der Entladungsraten im SCN womöglich nicht direkt auf die Hauptoszillatoren des Uhrensystems wirken, sondern nur die Ein- und Ausgangssignale des Systems kontrollieren. Es stellt sich dabei besonders die Frage nach der Funktion der nichtrhythmischen Neurone im SCN. Diese könnten ein wichtiger Faktor des Uhrennetzwerkes sein, indem sie zwischen den verschiedenen Instanzen vermitteln. Diese Instanzen wären funktionelle Einheiten, die Aufgaben wie die Integration der Eingangssignale, die diversifizierte Verteilung des Zeitsignals oder vor allem die eigentliche Oszillation selbst wahrnehmen. Die Kopplung der einzelnen Uhrenzellen ist für Synchronität notwendig (Liu *et al.*, 2007). Aufgrund von Versuchen *in silico* wurde die Hypothese aufgestellt, dass logische Gatter für eine homogene Reaktion auf phasenverschiebende Stimuli notwendig sind (Antle *et al.*, 2003; 2007). Solche Gatter steuern die Effektivität von Reizen in Abhängigkeit der circadianen Zeit. Es wurde beispielsweise angenommen, dass im SCN VIP-, GRP- oder Calbindin-exprimierende Zellen diese Funktion übernehmen können (Hamada *et al.*, 2003; Antle *et al.*, 2007). Diese Zelltypen stellen selbst keine stabilen Oszillatorzellen dar, jedoch geht ohne sie jegliche interne Synchronisation im SCN verloren. Ein geringer Vernetzungsgrad der Zellkultur im Vergleich zur *in vivo*-Situation, könnte die Regulierungskraft der Gatter (-Zellen) herabsetzen und für die fehlende Synchronisation verantwortlich sein. Die nicht ausreichende Synchronisation könnte wiederum die Ursache für eine sehr volatile Phasenantwort sein, denn es konnte gezeigt werden, dass phasenverschiebende Reize besonders stark auf einen SCN mit einer weit gespreizten Phasenverteilung einwirken. Dadurch reagieren einzelne Neurone weniger kohärent (Ukai *et al.*, 2007; vanderLeest *et al.*, 2009). Das würde bedeuten, dass Phasenverschiebungen in der Zellkultur weitgehend auf direkte Effekte auf die molekulare Uhr zurückzuführen sind und nicht auf Netzwerkaktivitäten. Akute Kurzeiteffekte beeinflussen dagegen das regulierende Netzwerk, welches in unseren *in vitro*-Kulturen zu wenig ausgeprägt ist, um einen größeren Einfluss zu nehmen. Diese Annahme wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass stabil oszillierende Zellen nie mit anderen Neuronen in ihrer Aktivität korreliert waren.

5 Zusammenfassung

Der suprachiasmatische Nucleus (SCN) des Hypothalamus enthält die zentrale innere Uhr der Säugetiere. Diese innere Uhr besteht aus einem Verbund von untereinander gekoppelten Neuronen, die durch ein intrinsisches molekulares Uhrenwerk eine selbsterhaltende Oszillation mit einer Periode von circa einem Tag (circadian) aufrechterhalten. Diese Oszillation dient dem Organismus als innere Uhr und muss, da ihre Periode nicht exakt 24 Stunden beträgt, durch Zeitgeber mit der Umwelt synchronisiert werden. Der wichtigste circadiane Zeitgeber ist das Licht. Die Lichtsignale gelangen von der Retina über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) direkt zum SCN. Von dort werden circadiane Informationen an zentrale und periphere Effektoren weitergeleitet, unter anderem an das Pinealorgan, welches zyklisch das Hormon Melatonin als Dunkelheitssignal ausschüttet. Melatonin kann wiederum auf die circadiane Uhr zurückkoppeln und in einem engen, sensitiven Zeitfenster die Phasen des SCN verschieben. Neben diesem Regelkreis gibt es direkte Verbindungen vom SCN zum lateralen Hypothalamus (LH), der eine zentrale Rolle bei der Regulation des Schlafes und der Energiehomöostase innehat. Ein spezieller Neuronentyp des LH schüttet das Neuropeptid Orexin aus, das große Bedeutung bei der Schlafregulation und der Appetitbildung besitzt. Diese orexinergen Neurone projizieren in weite Teile des Gehirns, unter anderem in die Region des SCN, was aufgrund der bekannten Wechselbeziehungen zwischen circadianer Aktivität, Schlaf und Appetit auf eine Rückkoppelung auf das circadiane System schließen lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Multielektroden-Ableitungen (MEAs) die neuronalen Signale einzelner Zellen des SCN, die zusammen ein komplexes Netz für die Steuerung der Effektormechanismen bilden, analysiert. Es standen dabei folgende Fragestellungen im Vordergrund:

Bieten primäre Zellkulturen von SCN-Neuronen ein ausreichendes Modell für die Untersuchung der zellulären Kommunikation und der neuronalen Ausgangssignale der circadianen Uhr?

Wirken Zeitgebersignale direkt auf die primären Oszillatoren oder sind Phasenverschiebungen eine Eigenschaft des gesamten Netzwerkes im SCN?

Besteht ein Einfluss der orexinergen Neurone des lateralen Hypothalamus auf die Uhren-Neurone im SCN?

Auf Multielektrodenplatten kultivierte SCN Neurone sind spontanaktiv und zeigen über Tage und Wochen ausgeprägte circadiane Rhythmen in ihrer *Spikerate*. In der Regel sind diese Aktivitäts-Rhythmen einzelner Neurone nicht synchronisiert, obwohl die Zellkulturen zahlreiche synaptische Verbindungen und korrelierte Aktivität aufweisen. Um die Interaktion der verschiedenen Neuronen innerhalb des Uhrennetzwerkes aufzuklären, wurde eine Methode basierend auf Kreuzkorrelationen entwickelt. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass korrelierte Aktivität in SCN-Zellkulturen verbreitet ist, die stabilen Oszillatoren davon jedoch immer ausgenommen waren, obwohl eine durchgehende Vernetzung innerhalb der Kulturen bestand. Somit bilden Zellkulturen von SCN Neuronen ein sehr heterogenes Netzwerk mit stabilen Oszillatoren, schwachen Oszillatoren und nicht rhythmischen Neuronen, das viele einzelne Uhren elastisch miteinander koppelt und mit verarbeiteten Informationen über äußere und innere Zustände versorgt.

Stabile Oszillatoren können direkt durch Zeitgeber-Stimuli, wie zum Beispiel Melatonin, beeinflusst und in ihren Aktivitäts-Phasen verschoben werden. Die Phasen-Antwortkurven sind im Vergleich zu *in vivo* Untersuchungen jedoch variabler, was für eine starke Beteiligung des neuronalen Netzwerkes bei der Verarbeitung und Stabilisierung der Antworten auf die Zeitgeber-Stimuli spricht. Phasenverschiebungen als Reaktion auf einen Zeitgeber-Stimulus sind demnach eine Eigenschaft der einzelnen Oszillatorzelle, die aber durch die Interaktion der verschiedenen Uhren-Neurone in ein stabiles Ausgangssignal umgesetzt werden müssen.

Kultivierte SCN-Neurone reagieren auf Applikation von Orexin A mit kurzzeitigen Änderungen der *Spikerate*, sowie mit deutlichen Phasenverschiebungen, die in Zellkulturen sehr variabel ausfallen, während sie in Ableitungen von organotypischen Hirnschnitten stabil und reproduzierbar sind. Dies unterstreicht wiederum die Bedeutung des neuronalen Netzwerkes im SCN. Orexin A scheint zwar direkt auf stabile Oszillatorzellen einzuwirken, aber auch auf die synaptische Übertragung zwischen den SCN-Neuronen. Sein Wirkungsmechanismus könnte dabei in einer Hemmung der GABAergen und in einer Verstärkung der glutamatergen synaptischen Übertragung liegen. Die Wirkung von Orexin A im SCN spricht für eine vielfältige Rückkoppelung des orexinergen Systems auf den circadianen Schrittmacher.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY, 2001. The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12: 435-440.
- Abrahamson EE, Moore RY, 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research* 916: 172-191.
- Aggelopoulos NC, Meissl H, 2000. Responses of neurones of the rat suprachiasmatic nucleus to retinal illumination under photopic and scotopic conditions. *Journal of Physiology-London* 523: 211-222.
- Albus H, Vansteensel MJ, Michel S, Block GD, Meijer JH, 2005. A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Current Biology* 15: 886-893.
- Antle MC, Foley DK, Foley NC, Silver R, 2003. Gates and oscillators: A network model of the brain clock. *Journal of Biological Rhythms* 18: 339-350.
- Antle MC, Foley NC, Foley DK, Silver R, 2007. Gates and oscillators II: Zeitgebers and the network model of the brain clock. *Journal of Biological Rhythms* 22: 14-25.
- Arendt J, Skene DJ, 2005. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Medicine Reviews* 9: 25-39.
- Arnold FJL, Hofmann F, Bengtson CP, Wittmann M, Vanhoutte P, Bading H, 2005. Microelectrode array recordings of cultured hippocampal networks reveal a simple model for transcription and protein synthesis-dependent plasticity. *Journal of Physiology-London* 564: 3-19.
- Aschoff J, 1951. Die 24-Stunden-Periodik der Maus unter konstanten Umgebungsbedingungen. *Naturwissenschaften* 38: 506-507.
- Aschoff J, 1954. Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften* 41: 49-56.
- Aschoff J, 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 25: 11-28.
- Aschoff J, Wever R, 1962. Spontanperiodik des Menschen bei Ausschluss aller Zeitgeber. *Naturwissenschaften* 49: 337-341.
- Asmild M, Oswald N, Krzywkowski KM, Friis S, Jacobsen RB, Reuter D, Taboryski R, Kutchinsky J, Vestergaard RK, Schroder RL, Sorensen CB, Bech M, Korsgaard MPG, Willumsen NJ, 2003. Upscaling and automation of electrophysiology: Toward high throughput screening in ion channel drug discovery. *Receptors & Channels* 9: 49-58.
- Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ, Waschek J, Herzog ED, 2005. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience* 8: 476-483.
- Aton SJ, Huettner JE, Straume M, Herzog ED, 2006. GABA and $G_{i/o}$ differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 19188-19193.
- Bäckberg M, Hervieu G, Wilson S, Meister B, 2002. Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *European Journal of Neuroscience* 15: 315-328.
- Belenky MA, Sagiv N, Fritschy JM, Yarom Y, 2003. Presynaptic and postsynaptic GABA_A receptors in rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 118: 909-923.
- Belenky MA, Yarom Y, Pickard GE, 2008. Heterogeneous expression of gamma-aminobutyric acid and gamma-aminobutyric acid-associated receptors and transporters in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 506: 708-732.
- Bergeron HE, Danielson B, Biggs KR, Prosser RA, 1999. TTX blocks baclofen-induced phase shifts of the mammalian circadian pacemaker *in vitro*. *Brain Research* 841: 193-196.

Literaturverzeichnis

- Bernard S, Gonze D, Cajavec B, Herzog H, Kramer A, 2007. Synchronization-induced rhythmicity of circadian oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *Plos Computational Biology* 3: 667-679.
- Bernardis LL, Bellinger LL, 1996. The lateral hypothalamic area revisited: Ingestive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 20: 189-287.
- Bernardis LL, Bellinger LL, 1993. The lateral hypothalamic area revisited: Neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 17: 141-193.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M, 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295: 1070-1073.
- Biggs KR, Prosser RA, 1998. GABA_B receptor stimulation phase-shifts the mammalian circadian clock *in vitro*. *Brain Research* 807: 250-254.
- Bingham C, Arbogast B, Guillaume GC, Lee JK, Halberg F, 1982. Inferential statistical-methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9: 397-439.
- Borgland SL, Taha SA, Sarti F, Fields HL, Bonci A, 2006. Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* 49: 589-601.
- Bosler O, Beaudet A, 1985. VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus: a combined radioautographic and immunocytochemical study. *Journal of Neurocytology* 14: 749-763.
- Bouskila Y, Dudek FE, 1995. Can a population of suprachiasmatic nucleus neurons with different period lengths produce a stable circadian rhythm. *Brain Research* 670: 333-336.
- Brewer GJ, 1995. Serum-free B27/Neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia-nigra, septum, cerebral-cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *Journal of Neuroscience Research* 42: 674-683.
- Browman LG, 1943a. The effect of controlled temperatures upon the spontaneous activity rhythms of the albino rat. *Journal of Experimental Zoology* 94: 477-489.
- Browman LG, 1943b. The effect of bilateral optic enucleation upon the activity rhythms of the albino rat. *Journal of Comparative Psychology* 36: 33-46.
- Brown TM, Banks JR, Piggins HD, 2006. A novel suction electrode recording technique for monitoring circadian rhythms in single and multiunit discharge from brain slices. *Journal of Neuroscience Methods* 156: 173-181.
- Brown TM, Coogan AN, Cutler DJ, Hughes AT, Piggins HD, 2008. Electrophysiological actions of orexins on rat suprachiasmatic neurons *in vitro*. *Neuroscience Letters* 448: 273-278.
- Buijs RM, Hou YX, Shinn S, Renaud LP, 1994. Ultrastructural evidence for intra- and extranuclear projections of GABAergic neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 340: 381-391.
- Buijs RM, Scheer FA, Kreier F, Yi CX, Bos N, Goncharuk VD, Kalsbeek A, 2006. Organization of circadian functions: interaction with the body. *Hypothalamic Integration of Energy Metabolism* 153: 341-360.
- Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM, 1986. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiology & Behavior* 36: 1111-1121.
- Castel M, Belenky MA, Cohen S, Ottersen OP, Stormmathisen J, 1993. Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience* 5: 368-381.
- Challet E, 2007. Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148: 5648-5655.
- Challet E, Solberg LC, Turek FW, 1998. Entrainment in calorie-restricted mice: conflicting zeitgebers and free-running conditions. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 43: R1751-R1761.

Literaturverzeichnis

- Chen G, van den Pol AN, 1998. Coexpression of multiple metabotropic glutamate receptors in axon terminals of single suprachiasmatic nucleus neurons. *Journal of Neurophysiology* 80: 1932-1938.
- Choi HJ, Lee CJ, Schroeder A, Kim YS, Jung SH, Kim JS, Kim DY, Son EJ, Han HC, Hong SK, Colwell CS, Kim YI, 2008. Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience* 28: 5450-5459.
- Colwell CS, 2000. Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neurobiology* 43: 379-388.
- Cutler DJ, Morris R, Sheridhar V, Wattam TAK, Holmes S, Patel S, Arch JRS, Wilson S, Buckingham RE, Evans ML, Leslie RA, Williams G, 1999. Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 20: 1455-1470.
- Daan S, Pittendrigh CS, 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. 2. Variability of phase response curves. *Journal of Comparative Physiology* 106: 253-266.
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M, 1999. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 748-753.
- Davis SF, Williams KW, Xu WY, Glatzer NR, Smith BN, 2003. Selective enhancement of synaptic inhibition by hypocretin (orexin) in rat vagal motor neurons: Implications for autonomic regulation. *Journal of Neuroscience* 23: 3844-3854.
- de Jeu MTG, Pennartz CMA, 2002. Circadian modulation of GABA function in the rat suprachiasmatic nucleus: Excitatory effects during the night phase. *Journal of Neurophysiology* 87: 834-844.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG, 1998. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 322-327.
- de Vries MJ, Cardozo BN, Vanderwant J, Dewolf A, Meijer JH, 1993. Glutamate immunoreactivity in terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat. *Brain Research* 612: 231-237.
- Decavel C, van den Pol AN, 1990. GABA: A dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 302: 1019-1037.
- Deurveilher S, Semba K, 2005. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: Implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience* 130: 165-183.
- Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA, Gillette MU, 1994. Resetting the biological clock: Mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266: 1713-1717.
- Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR, Gillette MU, 1997. Resetting the biological clock: Mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *Journal of Neuroscience* 17: 667-675.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF, 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* 51: 7-61.
- Ebling FJP, 1996. The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Progress in Neurobiology* 50: 109-132.
- Egert U, Schlosshauer B, Fennrich S, Nisch W, Fejtl M, Knott T, Muller T, Hämmerle H, 1998. A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. *Brain Research Protocols* 2: 229-242.
- Ekholm ME, Johansson L, Kukkonen JP, 2007. IP₃-independent signalling of OX₁ orexin/hypocretin receptors to Ca²⁺ influx and ERK. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 353: 475-480.

Literaturverzeichnis

- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK, 1998. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *Journal of Comparative Neurology* 402: 442-459.
- Enright JT, 1980. Temporal precision in circadian systems - A reliable neuronal clock from unreliable components. *Science* 209: 1542-1545.
- Eyigor O, Centers A, Jennes L, 2001. Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 434: 101-124.
- Eyigor O, Minbay Z, Cavusoglu K, Jennes L, 2005. Localization of kainate receptor subunit GluR5-immunoreactive cells in the rat hypothalamus. *Molecular Brain Research* 136: 38-44.
- Eytan D, Minerbi A, Ziv N, Marom S, 2004. Dopamine-induced dispersion of correlations between action potentials in networks of cortical neurons. *Journal of Neurophysiology* 92: 1817-1824.
- Farkas B, Vilagi I, Detari L, 2002. Effect of orexin-A on discharge rate of rat suprachiasmatic nucleus neurons *in vitro*. *Acta Biologica Hungarica* 53: 435-443.
- Follwell MJ, Ferguson AV, 2002. Cellular mechanisms of orexin actions on paraventricular nucleus neurones in rat hypothalamus. *Journal of Physiology-London* 545: 855-867.
- Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B, Honda K, Mignot E, Nishino S, 2001. Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuroreport* 12: 993-997.
- Gannon RL, Rea MA, 1993. Glutamate-receptor immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 622: 337-342.
- Gao B, Fritschy JM, Moore RY, 1995. GABA_A-receptor subunit composition in the circadian timing system. *Brain Research* 700: 142-156.
- Gao XB, van den Pol AN, 2001a. Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *Journal of Physiology-London* 533: 237-252.
- Gao XB, van den Pol AN, 2001b. GABA, not glutamate, a primary transmitter driving action potentials in developing hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology* 85: 425-434.
- Gerdin MJ, Masana MI, Rivera-Bermudez MA, Hudson RL, Earnest DJ, Gillette MU, Dubocovich ML, 2004. Melatonin desensitizes endogenous MT₂ melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: Relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *The FASEB Journal* 18: 1646-1656.
- Gillespie CF, Mintz EM, Marvel CL, Huhman KL, Albers HE, 1997. GABA_A and GABA_B agonists and antagonists alter the phase-shifting effects of light when microinjected into the suprachiasmatic region. *Brain Research* 759: 181-189.
- Gillette MU, 1986. The suprachiasmatic nuclei: Circadian phase-shifts induced at the time of hypothalamic slice preparation are preserved *in vitro*. *Brain Research* 379: 176-181.
- Gillette MU, McArthur AJ, 1995. Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. *Behavioural Brain Research* 73: 135-139.
- Gillette MU, Mitchell JW, 2002. Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell and Tissue Research* 309: 99-107.
- Gorojankina T, Grebert D, Salesse R, Tanfin Z, Caillol M, 2007. Study of orexins signal transduction pathways in rat olfactory mucosa and in olfactory sensory neurons-derived cell line Odora: Multiple orexin signalling pathways. *Regulatory Peptides* 141: 73-85.
- Grady SP, Nishino S, Czeisler CA, Hepner D, Scammell TE, 2006. Diurnal variation in CSF Orexin-A in healthy male subjects. *Sleep* 29: 295-297.
- Gramowski A, Jugelt K, Weiss DG, Gross GW, 2004. Substance identification by quantitative characterization of oscillatory activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays. *European Journal of Neuroscience* 19: 2815-2825.

Literaturverzeichnis

- Green DJ, Gillette R, 1982. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Research* 245: 198-200.
- Gribkoff VK, Pieschl RL, Dudek FE, 2003. GABA receptor-mediated inhibition of neuronal activity in rat SCN *in vitro*: Pharmacology and influence of circadian phase. *Journal of Neurophysiology* 90: 1438-1448.
- Gribkoff VK, Pieschl RL, Wisialowski TA, Park WK, Strecker GJ, de Jeu MTG, Pennartz CMA, Dudek FE, 1999. A reexamination of the role of GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms* 14: 126-130.
- Groos GA, Hendriks J, 1979. Regularly firing neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Experientia* 35: 1597-1599.
- Groos GA, Hendriks J, 1982. Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded *in vitro*. *Neuroscience Letters* 34: 283-288.
- Groos GA, Mason R, 1978. Maintained discharge of rat suprachiasmatic neurons at different adaptation levels. *Neuroscience Letters* 8: 59-64.
- Gross GW, Rhoades BK, Azzazy HME, Wu MC, 1995. The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 10: 553-567.
- Gross GW, Rieske E, Kreutzberg GW, Meyer A, 1977. New fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal-activity *in vitro*. *Neuroscience Letters* 6: 101-105.
- Gurdjian ES, 1927. The diencephalon of the albino rat - Studies on the brain of the rat no 2. *Journal of Comparative Neurology* 43: 1-114.
- Haak LL, 1999. Metabotropic glutamate receptor modulation of glutamate responses in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neurophysiology* 81: 1308-1317.
- Hamada T, LeSauter J, Lokshin M, Romero MT, Yan LL, Venuti JM, Silver R, 2003. Calbindin influences response to photic input in suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience* 23: 8820-8826.
- Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU, Mikkelsen JD, 1997. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: A potential daytime regulator of the biological clock. *Journal of Neuroscience* 17: 2637-2644.
- Harmar AJ, Marston HM, Shen SB, Spratt C, West KM, Sheward WJ, Morrison CF, Dorin JR, Piggins HD, Reubi JC, Kelly JS, Maywood ES, Hastings MH, 2002. The VPAC₂ receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* 109: 497-508.
- Hastings MH, 1991. Neuroendocrine rhythms. *Pharmacology & Therapeutics* 50: 35-71.
- Hastings MH, Best JD, Ebling FJP, Maywood ES, McNulty S, Schurov I, Selvaige D, Sloper P, Smith KL, 1996. Entrainment of the circadian clock. *Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms* 111: 147-174.
- Hendrickson AE, Wagoner N, Cowan WM, 1972. Autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 135: 1-26.
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA, 2001. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 103: 777-797.
- Herzog ED, Aton SJ, Numano R, Sakaki Y, Tei H, 2004. Temporal precision in the mammalian circadian system: A reliable clock from less reliable neurons. *Journal of Biological Rhythms* 19: 35-46.
- Hoang QV, Bajic D, Yanagisawa M, Nakajima S, Nakajima Y, 2003. Effects of orexin (hypocretin) on GIRK channels. *Journal of Neurophysiology* 90: 693-702.
- Hoang QV, Zhao P, Nakajima S, Nakajima Y, 2004. Orexin (hypocretin) effects on constitutively active inward rectifier K⁺ channels in cultured nucleus basalis neurons. *Journal of Neurophysiology* 92: 3183-3191.

Literaturverzeichnis

- Holmqvist T, Johansson L, Ostman M, Ammoun S, Akerman KEO, Kukkonen JP, 2005. OX₁ orexin receptors couple to adenylyl cyclase regulation via multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 280: 6570-6579.
- Honma S, Honma K, 2003. The biological clock: Ca²⁺ links the pendulum to the hands. *Trends in Neurosciences* 26: 650-653.
- Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K, Nomura M, 1998a. Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene *Clock*, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 250: 83-87.
- Honma S, Nakamura W, Shirakawa T, Honma K, 2004. Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neuroscience Letters* 358: 173-176.
- Honma S, Shirakawa T, Katsuno Y, Namihira M, Honma K, 1998b. Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neuroscience Letters* 250: 157-160.
- Honma S, Shirakawa T, Nakamura W, Honma K, 2000. Synaptic communication of cellular oscillations in the rat suprachiasmatic neurons. *Neuroscience Letters* 294: 113-116.
- Huang H, van den Pol AN, 2007. Rapid direct excitation and long-lasting enhancement of NMDA response by group I metabotropic glutamate receptor activation of hypothalamic melanin-concentrating hormone neurons. *Journal of Neuroscience* 27: 11560-11572.
- Hunt AE, Al Ghouli WM, Gillette MU, Dubocovich ML, 2001. Activation of MT₂ melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 280: C110-C118.
- Inagaki N, Honma S, Ono D, Tanahashi Y, Honma K, 2007. Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7664-7669.
- Inouye S-IT, Kawamura H, 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 5962-5966.
- Jiang ZG, Allen CN, North RA, 1995a. Presynaptic inhibition by baclofen of retinohypothalamic excitatory synaptic transmission in rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 64: 813-819.
- Jiang ZG, Nelson CS, Allen CN, 1995b. Melatonin activates an outward current and inhibits I-H, in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Research* 687: 125-132.
- Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, Reppert SM, 1999. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96: 57-68.
- Joanny P, Steinberg J, Guerrero F, Sauze N, Oliver C, Grino M, 2000. The effects of ionotropic agonists of excitatory amino acids on the release of arginine vasopressin in rat hypothalamic slices. *Journal of Neuroendocrinology* 12: 970-976.
- Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrange P, 2008. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *British Journal of Pharmacology* 154: 1182-1195.
- Johnson CH, Elliott JA, Foster R, 2003. Entrainment of circadian programs. *Chronobiology International* 20: 741-774.
- Johnson RF, Moore RY, Morin LP, 1988a. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Research* 460: 297-313.
- Johnson RF, Morin LP, Moore RY, 1988b. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Research* 462: 301-312.
- Joshi PR, Suryanarayanan A, Schulte MK, 2004. A vertical flow chamber for *Xenopus* oocyte electrophysiology and automated drug screening. *Journal of Neuroscience Methods* 132: 69-79.

Literaturverzeichnis

- Kalsbeek A, Buijs RM, Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R, 1995. *In vivo* measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 682: 75-82.
- Kalsbeek A, Cutrera RA, van Heerikhuijze JJ, van der Vliet J, Buijs RM, 1999. GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience* 91: 453-461.
- Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, van der Vliet J, Simonneaux V, Pevet P, Buijs RM, 2000. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *European Journal of Neuroscience* 12: 3146-3154.
- Kim YI, Dudek FE, 1993. Membrane properties of rat suprachiasmatic nucleus neurons receiving optic nerve input. *Journal of Physiology-London* 464: 229-243.
- Kim YI, Dudek FE, 1992. Intracellular electrophysiological study of suprachiasmatic nucleus neurons in rodents: inhibitory synaptic mechanisms. *Journal of Physiology-London* 458: 247-260.
- Klein DC, Weller JL, 1970. Indole metabolism in pineal gland: A circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169: 1093-1095.
- Klisch C, Inyushkin A, Mordel J, Karnas D, Pevet P, Meissl H, 2009. Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus *in vitro*. *European Journal of Neuroscience* 30: 66-75.
- Klisch C, Mahr S, Meissl H, 2006. Circadian activity rhythms and phase-shifting of cultured neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *Chronobiology International* 23: 181-190.
- Kononenko NI, Dudek FE, 2004. Mechanism of irregular firing of suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slices. *Journal of Neurophysiology* 91: 267-273.
- Konopka RJ, Benzer S, 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 2112-2116.
- Kopp MD, Schomerus C, Dehghani F, Korf HW, Meissl H, 1999. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and melatonin in the suprachiasmatic nucleus: effects on the calcium signal transduction cascade. *Journal of Neuroscience* 19: 206-219.
- Kotz CM, Wang C, Teske JA, Thorpe AJ, Novak CM, Kiwaki K, Levine JA, 2006. Orexin A mediation of time spent moving in rats: Neural mechanisms. *Neuroscience* 142: 29-36.
- Krieg WJS, 1932. The hypothalamus of the albino rat. *Journal of Comparative Neurology* 55: 19-89.
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin XW, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, 1999. *mCRY1* and *mCRY2* are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98: 193-205.
- Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T, 1999. Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Research* 842: 256-261.
- Kunz H, Achermann P, 2003. Simulation of circadian rhythm generation in the suprachiasmatic nucleus with locally coupled self-sustained oscillators. *Journal of Theoretical Biology* 224: 63-78.
- Larsson KP, Peltonen HM, Bart G, Louhivouri LM, Penttonen A, Antikainen M, Kukkonen JP, Akerman KEO, 2005. Orexin-A-induced Ca^{2+} entry - Evidence for involvement of TRPC channels and protein kinase C regulation. *Journal of Biological Chemistry* 280: 1771-1781.
- Leak RK, Moore RY, 2001. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *Journal of Comparative Neurology* 433: 312-334.
- Lee B, Almad A, Butcher GQ, Obrietan K, 2007. Protein kinase C modulates the phase-delaying effects of light in the mammalian circadian clock. *European Journal of Neuroscience* 26: 451-462.
- Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M, Bittman EL, 1987. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Journal of Neuroscience* 7: 1626-1638.

Literaturverzeichnis

- Lewy AJ, Ahmed S, Jackson JML, Sack RL, 1992. Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase response curve. *Chronobiology International* 9: 380-392.
- Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Markey SP, 1980. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 210: 1267-1269.
- Liou SY, Shibata S, Albers HE, Ueki S, 1990. Effects of GABA and anxiolytics on the single unit discharge of suprachiasmatic neurons in rat hypothalamic slices. *Brain Research Bulletin* 25: 103-107.
- Liu AC, Welsh DK, Ko CH, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, Buhr ED, Singer O, Meeker K, Verma IM, Doyle FJ, Takahashi JS, Kay SA, 2007. Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell* 129: 605-616.
- Liu C, Reppert SM, 2000. GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 25: 123-128.
- Liu C, Weaver DR, Jin XW, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM, 1997a. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19: 91-102.
- Liu C, Weaver DR, Strogatz SH, Reppert SM, 1997b. Cellular construction of a circadian clock: Period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91: 855-860.
- Liu QS, Patrylo PR, Gao XB, van den Pol AN, 1999. Kainate acts at presynaptic receptors to increase GABA release from hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology* 82: 1059-1062.
- Lomb NR, 1976. Least-Squares Frequency-Analysis of Unequally Spaced Data. *Astrophysics and Space Science* 39: 447-462.
- Long MA, Jutras MJ, Connors BW, Burwell RD, 2005. Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Neuroscience* 8: 61-66.
- Lund PE, Shariatmadar R, Uustare A, Dethoux M, Parmentier M, Kukkonen JP, Akerman KEO, 2000. The orexin OX₁ receptor activates a novel Ca²⁺ influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *Journal of Biological Chemistry* 275: 30806-30812.
- Lundkvist GB, Kwak Y, Davis EK, Tei H, Block GD, 2005. A calcium flux is required for circadian rhythm generation in mammalian pacemaker neurons. *Journal of Neuroscience* 25: 7682-7686.
- Lynch HJ, 1971. Diurnal oscillations in pineal melatonin content. *Life Science Part 1 Physiology & Pharmacology* 10: 791-&.
- Madeira MD, Pereira PA, Silva SM, Cadete-Leite A, Paula-Barbosa MM, 2004. Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 125: 889-901.
- Marchant EG, Mistlberger RE, 1996. Entrainment and phase shifting of circadian rhythms in mice by forced treadmill running. *Physiology & Behavior* 60: 657-663.
- Martynska L, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Bik W, Baranowska B, 2005. The physiological role of orexins. *Neuroendocrinology Letters* 26: 289-292.
- Mateos JM, Azkue J, Benitez R, Sarria R, Losada J, Conquet F, Ferraguti F, Kuhn R, Knopfel T, Grandes P, 1998. Immunocytochemical localization of the mGluR1b metabotropic glutamate receptor in the rat hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 390: 225-233.
- Matthews PC, Mirrollo RE, Strogatz SH, 1991. Dynamics of a large system of coupled nonlinear oscillators. *Physica D* 52: 293-331.
- Maywood ES, Reddy AB, Wong GKY, O'Neill JS, O'Brien JA, McMahon DG, Harmar AJ, Okamura H, Hastings MH, 2006. Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Current Biology* 16: 599-605.
- McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU, 1997. Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 138: 627-634.

Literaturverzeichnis

- McGranaghan PA, Piggins HD, 2001. Orexin A-like immunoreactivity in the hypothalamus and thalamus of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) and Siberian hamster (*Phodopus sungorus*), with special reference to circadian structures. *Brain Research* 904: 234-244.
- Meijer JH, Albus H, Weidema F, Ravesloot JH, 1993. The effects of glutamate on membrane potential and discharge rate of suprachiasmatic neurons. *Brain Research* 603: 284-288.
- Meijer JH, Schaap J, Watanabe K, Albus H, 1997. Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: *In vivo* versus *in vitro* models. *Brain Research* 753: 322-327.
- Meijer JH, Watanabe K, Detari L, Schaap J, 1996. Circadian rhythm in light response in suprachiasmatic nucleus neurons of freely moving rats. *Brain Research* 741: 352-355.
- Melssen WJ, Epping WJM, 1987. Detection and estimation of neural connectivity based on cross-correlation analysis. *Biological Cybernetics* 57: 403-414.
- Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pevet P, Challet E, 2005. Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *Journal of Neuroscience* 25: 1514-1522.
- Michel S, Itri J, Colwell CS, 2002. Excitatory mechanisms in the suprachiasmatic nucleus: The role of AMPA/KA glutamate receptors. *Journal of Neurophysiology* 88: 817-828.
- Mikkelsen JD, Larsen PJ, Mick G, Vrang N, Ebling FJP, Maywood ES, Hastings MH, Moller M, 1995. Gating of retinal inputs through the suprachiasmatic nucleus: Role of excitatory neurotransmission. *Neurochemistry International* 27: 263-272.
- Miyake S, Sumi Y, Yan L, Takekida S, Fukuyama T, Ishida Y, Yamaguchi S, Yagita K, Okamura H, 2000. Phase-dependent responses of *Per1* and *Per2* genes to a light-stimulus in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience Letters* 294: 41-44.
- Moga MM, Moore RY, 1997. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 389: 508-534.
- Moldavan MG, Irwin RP, Allen CN, 2006. Presynaptic GABA_B receptors regulate retinohypothalamic tract synaptic transmission by inhibiting voltage-gated Ca²⁺ channels. *Journal of Neurophysiology* 95: 3727-3741.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW, 1989. The excitatory amino-acid receptors - Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 29: 365-402.
- Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Hanada R, Sakata T, Matsukura S, 1999. Characterization of orexin-A and orexin-B in the microdissected rat brain nuclei and their contents in two obese rat models. *Neuroscience Letters* 273: 45-48.
- Moore RY, 1991 Development of the suprachiasmatic nucleus. In: Klein, D. C., Moore, R. Y., Reppert, S. M. (Eds.), *Suprachiasmatic Nucleus - The Mind's Clock*. Oxford University Press, pp. 391-404.
- Moore RY, Eichler VB, 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in rat. *Brain Research* 42: 201-&.
- Moore RY, Klein DC, 1974. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Research* 71: 17-33.
- Moore RY, Lenn NJ, 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 146: 1-14.
- Moore RY, Speh JC, 1993. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters* 150: 112-116.
- Moore RY, Speh JC, Leak RK, 2002. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research* 309: 89-98.
- Morefield SI, Keefer EW, Chapman KD, Gross GW, 2000. Drug evaluations using neuronal networks cultured on microelectrode arrays. *Biosensors & Bioelectronics* 15: 383-396.
- Müller TH, Swandulla D, Zeilhofer HU, 1997. Synaptic connectivity in cultured hypothalamic neuronal networks. *Journal of Neurophysiology* 77: 3218-3225.

Literaturverzeichnis

- Nakamura W, Honma S, Shirakawa T, Honma K, 2001. Regional pacemakers composed of multiple oscillator neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience* 14: 666-674.
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K, 1999. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research* 827: 243-260.
- Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F, 1979. Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 6: 305-323.
- Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J, 2002. Vasoactive intestinal polypeptide induces per1 and per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus late at night. *European Journal of Neuroscience* 15: 570-574.
- Nisch W, Böck J, Egert U, Hämmerle H, Mohr A, 1994. A thin film microelectrode array for monitoring extracellular neuronal activity *in vitro*. *Biosensors & Bioelectronics* 9: 737-741.
- Nishide SY, Honma S, Honma K, 2008. The circadian pacemaker in the cultured suprachiasmatic nucleus from pup mice is highly sensitive to external perturbation. *European Journal of Neuroscience* 27: 2686-2690.
- Nishino H, Koizumi K, Brooks CM, 1976. The role of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm. *Brain Research* 112: 45-59.
- Noguchi T, Watanabe K, 2008. Regional differences in circadian period within the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*.
- Novak CM, Ehlen JC, Huhman KL, Albers HE, 2004. GABA_B receptor activation in the suprachiasmatic nucleus of diurnal and nocturnal rodents. *Brain Research Bulletin* 63: 531-535.
- Offermanns S, 2003. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 83: 101-130.
- Ohara BF, Andretic R, Heller HC, Carter DB, Kilduff TS, 1995. GABA_A, GABA_C, and NMDA receptor subunit expression in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Molecular Brain Research* 28: 239-250.
- Okamura H, Berod A, Julien JF, Geffard M, Kitahama K, Mallet J, Bobillier P, 1989. Demonstration of GABAergic cell bodies in the suprachiasmatic nucleus: *in situ* hybridization of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and immunocytochemistry of GAD and GABA. *Neuroscience Letters* 102: 131-136.
- Pampillo M, Scimonelli T, Duvilanski BH, Celis ME, Seilicovich A, Lasaga M, 2002. The activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects GABA and alpha-melanocyte stimulating hormone release from the hypothalamus and the posterior pituitary of male rats. *Neuroscience Letters* 327: 95-98.
- Paxinos G, Watson C, 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Pennartz CMA, de Jeu MTG, Geurtsen AMS, Sluiter AA, Hermes MLHJ, 1998. Electrophysiological and morphological heterogeneity of neurons in slices of rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Physiology-London* 506: 775-793.
- Perkel DH, Gerstein GL, Moore GP, 1967b. Neuronal spike trains and stochastic point processes. I. The single spike train. *Biophysical Journal* 7: 391-418.
- Perkel DH, Gerstein GL, Moore GP, 1967a. Neuronal spike trains and stochastic point processes. II. Simultaneous spike trains. *Biophysical Journal* 7: 419-440.
- Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou ML, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, Simonneaux V, Pevet P, Buijs RM, 2003. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *European Journal of Neuroscience* 17: 221-228.
- Pickard GE, 1989. Entrainment of the circadian rhythm of wheel-running activity is phase shifted by ablation of the intergeniculate leaflet. *Brain Research* 494: 151-154.
- Pine J, 1980. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *Journal of Neuroscience Methods* 2: 19-31.

Literaturverzeichnis

- Piper DC, Upton N, Smith MI, Hunter AJ, 2000. The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats. *European Journal of Neuroscience* 12: 726-730.
- Pittendrigh CS, 1961. On temporal organization in living systems. *Harvey Lectures*: 93-125.
- Prosser RA, Gillette MU, 1989. The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset *in vitro* by cAMP. *Journal of Neuroscience* 9: 1073-1081.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M, 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247: 975-978.
- Redman J, Armstrong S, Ng KT, 1983. Free-running activity rhythms in the rat: Entrainment by melatonin. *Science* 219: 1089-1091.
- Reed HE, Meyer-Spasche A, Cutler DJ, Coen CW, Piggins HD, 2001. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) phase-shifts the rat suprachiasmatic nucleus clock *in vitro*. *European Journal of Neuroscience* 13: 839-843.
- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel_{1b} melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 8734-8738.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13: 1177-1185.
- Rohling J, Meijer JH, vanderLeest HT, Admiraal J, 2006. Phase differences between SCN neurons and their role in photoperiodic encoding; a simulation of ensemble patterns using recorded single unit electrical activity patterns. *Journal of Physiology-Paris* 100: 261-270.
- Roland BL, Sawchenko PE, 1993. Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 332: 123-143.
- Rollag MD, Berson DM, Provencio I, 2003. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *Journal of Biological Rhythms* 18: 227-234.
- Sakurai T, 2007. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nature Reviews Neuroscience* 8: 171-181.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JRS, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M, 1998. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 573-585.
- Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J, 2005. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends in Neurosciences* 28: 152-157.
- Sawaki Y, Nihonmatsu I, Kawamura H, 1984. Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci. Res* 1: 67-72.
- Scargle JD, 1982. Studies in astronomical time-series analysis .2. Statistical aspects of spectral-analysis of unevenly spaced data. *Astrophysical Journal* 263: 835-853.
- Schaap J, Albus H, vanderLeest HT, Eilers PHC, Detari L, Meijer JH, 2003. Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications, for circadian waveform and photoperiodic encoding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15994-15999.
- Schoepp DD, Jane DE, Monn JA, 1999. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 38: 1431-1476.
- Schrader LA, Tasker JG, 1997. Presynaptic modulation by metabotropic glutamate receptors of excitatory and inhibitory synaptic inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Journal of Neurophysiology* 77: 527-536.
- Schwartz WJ, Davidsen LC, Smith CB, 1980. *In vivo* metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 189: 157-167.

Literaturverzeichnis

- Schwartz WJ, Gainer H, 1977. Suprachiasmatic nucleus: Use of ^{14}C -labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 197: 1089-1091.
- Schwartz WJ, Reppert SM, 1985. Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal-fluid - A pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Neuroscience* 5: 2771-2778.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng BH, Kume K, Lee CC, van der Horst GTJ, Hastings MH, Reppert SM, 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288: 1013-1019.
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Reppert SM, 1997. Two *period* homologs: Circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19: 1261-1269.
- Shibata S, Oomura Y, Kita H, Hattori K, 1982. Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Research* 247: 154-158.
- Shibata S, Oomura Y, Liou SY, Ueki S, 1984. Electrophysiological studies of the development of suprachiasmatic neuronal activity in hypothalamic slice preparations. *Developmental Brain Research* 13: 29-35.
- Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, Tei H, Moriya T, Shibata S, Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H, 1997. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell* 91: 1043-1053.
- Shimura M, Akaike N, Harata N, 2002. Circadian rhythm in intracellular Cl^- activity of acutely dissociated neurons of suprachiasmatic nucleus. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 282: C366-C373.
- Shinohara K, Honma S, Katsuno Y, Abe H, Honma K, 1998. Circadian release of amino acids in the suprachiasmatic nucleus *in vitro*. *Neuroreport* 9: 137-140.
- Shirakawa T, Honma S, Katsuno Y, Oguchi H, Honma K, 2000. Synchronization of circadian firing rhythms in cultured rat suprachiasmatic neurons. *European Journal of Neuroscience* 12: 2833-2838.
- Slaughter GE, Bieberich E, Wnek GE, Wynne KJ, Guiseppi-Elei A, 2004. Improving neuron-to-electrode surface attachment via alkanethiol self-assembly: An alternating current impedance study. *Langmuir* 20: 7189-7200.
- Smart D, Jerman JC, Brough SJ, Neville WA, Jewitt F, Porter RA, 2000. The hypocretins are weak agonists at recombinant human orexin-1 and orexin-2 receptors. *British Journal of Pharmacology* 129: 1289-1291.
- Smith BN, Davis SF, van den Pol AN, Xu W, 2002. Selective enhancement of excitatory synaptic activity in the rat nucleus tractus solitarius by hypocretin 2. *Neuroscience* 115: 707-714.
- Starkey SJ, Walker MP, Beresford IJM, Hagan RM, 1995. Modulation of the rat suprachiasmatic circadian clock by melatonin *in vitro*. *Neuroreport* 6: 1947-1951.
- Stephan FK, Zucker I, 1972a. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69: 1583-1586.
- Stephan FK, Zucker I, 1972b. Rat drinking rhythms - Central visual pathways and endocrine factors mediating responsiveness to environmental illumination. *Physiology & Behavior* 8: 315-326.
- Strecker GJ, Bouskila Y, Dudek FE, 1995. Neurotransmission and electrophysiological mechanisms in the suprachiasmatic nucleus. *Seminars in the Neurosciences* 7: 43-51.
- Strecker GJ, Wuarin JP, Dudek FE, 1997. GABA_A-mediated local synaptic pathways connect neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neurophysiology* 78: 2217-2220.
- Swanson LW, Cowan WM, 1975. The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 160: 1-12.

Literaturverzeichnis

- Swanson LW, Cowan WM, Jones EG, 1974. An autoradiographic study of the efferent connections of the ventral lateral geniculate nucleus in the albino rat and the cat. *Journal of Comparative Neurology* 156: 143-163.
- Takatsuji K, Miguelhidalgo JJ, Tohyama M, 1991. Substance P-immunoreactive innervation from the retina to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Research* 568: 223-229.
- Takatsuji K, Tohyama M, 1993. Differential effects on substance P immunoreactivity in the rat suprachiasmatic and olivary pretectal nuclei. *Neuroreport* 4: 647-650.
- Tanaka M, Matsuda T, Shigeyoshi Y, Iyata Y, Okamura H, 1997. Peptide expression in GABAergic neurons in rat suprachiasmatic nucleus in comparison with other forebrain structures: A double labeling in situ hybridization study. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45: 1231-1237.
- Teclemariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM, 1999. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *Journal of Comparative Neurology* 406: 171-182.
- Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y, 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature* 389: 512-516.
- Thedinga E, Kob A, Holst H, Keuer A, Drechsler S, Niendorf R, Baumann W, Freund I, Lehmann M, Ehret R, 2007. Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220: 33-44.
- Thomas CA, Springer PA, Okun LM, Berwald-Netter Y, Loeb GE, 1972. Miniature microelectrode array to monitor bioelectric activity of cultured cells. *Experimental Cell Research* 74: 61-66.
- Thomson AM, West DC, Vlachonikolis IG, 1984. Regular firing patterns of suprachiasmatic neurons maintained *in vitro*. *Neuroscience Letters* 52: 329-334.
- Thorpe AJ, Doane DF, Sweet DC, Beverly JL, Kotz CM, 2006. Orexin A in the rostralateral hypothalamic area induces feeding by modulating GABAergic transmission. *Brain Research* 1125: 60-66.
- Thorpe AJ, Mullett MA, Wang CF, Kotz CM, 2003. Peptides that regulate food intake - Regional, metabolic, and circadian specificity of lateral hypothalamic orexin A feeding stimulation. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 284: R1409-R1417.
- Tischkau SA, Weber ET, Abbott SM, Mitchell JW, Gillette MU, 2003. Circadian clock-controlled regulation of cGMP-protein kinase G in the nocturnal domain. *Journal of Neuroscience* 23: 7543-7550.
- Torrealba F, Yanagisawa M, Saper CB, 2003. Colocalization of orexin and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience* 119: 1033-1044.
- Tousson E, Meissl H, 2004. Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroscience* 24: 2983-2988.
- Ueda S, Kawata M, Sano Y, 1983. Identification of serotonin- and vasopressin immunoreactivities in the suprachiasmatic nucleus of four mammalian species. *Cell and Tissue Research* 234: 237-248.
- Ukai H, Kobayashi TJ, Nagano M, Masumoto KH, Sujino M, Kondo T, Yagita K, Shigeyoshi Y, Ueda HR, 2007. Melanopsin-dependent photo-perturbation reveals desynchronization underlying the singularity of mammalian circadian clocks. *Nat. Cell Biol.* 9: 1327-1334.
- van den Pol AN, 1994. Metabotropic glutamate receptor mGluR1 distribution and ultrastructural localization in hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 349: 615-632.
- van den Pol AN, 1991. Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. *Journal of Neuroscience* 11: 2087-2101.
- van den Pol AN, 1980. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *Journal of Comparative Neurology* 191: 661-702.

Literaturverzeichnis

- van den Pol AN, Finkbeiner SM, Cornellbell AH, 1992. Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia *in vitro*. *Journal of Neuroscience* 12: 2648-2664.
- van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB, 1998. Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, Hypocretin/Orexin. *Journal of Neuroscience* 18: 7962-7971.
- van den Pol AN, Hermansborgmeyer I, Hofer M, Ghosh P, Heinemann S, 1994a. Ionotropic glutamate-receptor gene-expression in hypothalamus - Localization of AMPA, Kainate, and NMDA receptor RNA with *in situ* hybridization. *Journal of Comparative Neurology* 343: 428-444.
- van den Pol AN, Kogelman L, Ghosh P, Liljelund P, Blackstone C, 1994b. Developmental regulation of the hypothalamic metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Journal of Neuroscience* 14: 3816-3834.
- van den Pol AN, Romano C, Ghosh P, 1995. Metabotropic glutamate receptor mGluR5 subcellular distribution and developmental expression in hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 362: 134-150.
- van den Pol AN, Tsujimoto KL, 1985. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15: 1049-1086.
- vanderLeest HT, Rohling JH, Michel S, Meijer JH, 2009. Phase shifting capacity of the circadian pacemaker determined by the SCN neuronal network organization. *PLoS ONE*. 4: e4976.
- Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H, 1987. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Research* 435: 359-362.
- Vasalou C, Herzog ED, Henson MA, 2009. Small-world network models of intercellular coupling predict enhanced synchronization in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms* 24: 243-254.
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, Mcdonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS, 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264: 719-725.
- von Gall C, Stehle JH, Weaver DR, 2002. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell and Tissue Research* 309: 151-162.
- Wagner S, Castel M, Gainer H, Yarom Y, 1997. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 387: 598-603.
- Wang YF, Gao XB, van den Pol AN, 2001. Membrane properties underlying patterns of GABA-dependent action potentials in developing mouse hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology* 86: 1252-1265.
- Watts AG, Swanson LW, 1987. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 258: 230-252.
- Watts AG, Swanson LW, Sanchez-Watts G, 1987. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 258: 204-229.
- Weber ET, Gannon RL, Michel AM, Gillette MU, Rea MA, 1995. Nitric-oxide synthase inhibitor blocks light-induced phase-shifts of the circadian activity rhythm, but not c-Fos expression in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian-hamster. *Brain Research* 692: 137-142.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM, 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14: 697-706.
- Welsh DK, Reppert SM, 1996. Gap junctions couple astrocytes but not neurons in dissociated cultures of rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 706: 30-36.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M, 2001. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annual Review of Neuroscience* 24: 429-458.

Literaturverzeichnis

- Winfree AT, 1967. Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. *Journal of Theoretical Biology* 16: 15-42.
- Wu M, Zaborszky L, Hajszan T, van den Pol AN, Alreja M, 2004. Hypocretin/orexin innervation and excitation of identified septohippocampal cholinergic neurons. *Journal of Neuroscience* 24: 3527-3536.
- Wurtman RJ, Axelrod J, Phillips LS, 1963. Melatonin synthesis in pineal gland: Control by light. *Science* 142: 1071-1073.
- Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H, 2003. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302: 1408-1412.
- Yamaguchi S, Kobayashi M, Mitsui S, Ishida Y, van der Horst GTJ, Suzuki M, Shibata S, Okamura H, 2001. Gene expression: View of a mouse clock gene ticking. *Nature* 409: 684.
- Yamaguchi S, Mitsui S, Miyake S, Yan L, Onishi H, Yagita K, Suzuki M, Shibata S, Kobayashi M, Okamura H, 2000. The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Current Biology* 10: 873-876.
- Yang B, Ferguson AV, 2002. Orexin-A depolarizes dissociated rat area postrema neurons through activation of a nonselective cationic conductance. *Journal of Neuroscience* 22: 6303-6308.
- Zhang S, Zeitzer JM, Yoshida Y, Wisor JP, Nishino S, Edgar DM, Mignot E, 2004. Lesions of the suprachiasmatic nucleus eliminate the daily rhythm of hypocretin-1 release. *Sleep* 27: 619-627.
- Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K, 2003. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *Journal of Pharmacological Sciences* 92: 259-266.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
Arc	<i>Nucleus arcuatus</i>
ASCII	<i>american standard code for information interchange</i>
AVP	Arginin-Vasopressin
B	Byte (= 8 Bit)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CT	circadiane Zeit (<i>circadian time</i>)
DIV	Tag(e) in Kultur (<i>dia(e) in vitro</i>)
DMH	dorsomedialer Hypothalamus
EBSS	<i>Earl's balanced salt solution</i>
EMF	verbessertes Windows Metaformat
EPSS	exzitatorischer postsynaptischer Strom
FBS	fötales bovines Serum
FIR	endliche Impulsantwort (<i>finite impuls response</i>)
GABA	γ -Aminobuttersäure
Glut	Glutamat
GRP	Gastrin-freisetzendes Peptid (<i>gastrin releasing peptide</i>)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HPLC	Hochdruck-Chromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
IGL	<i>intergeniculate leaflet</i>
IML	intermediolaterale Kolumne
IPSS	inhibitorischer postsynaptischer Strom
ISI	Interspike-Intervall
JPG	Rasterbildformat nach JFIF-Standard
KA	Kainat
LH	lateraler Hypothalamus
MEA	Multielektroden-Anordnung (<i>multielectrode array</i>)
MPA	mediales präoptisches Areal
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NaOH	Natriumhydroxid
NBA	Neurobasal A
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
OrexA	Orexin A
P	Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese
P#	postnataler Tag #
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase activating peptide</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEEK	Polyetheretherketon
PKC	Proteinkinase C

Abkürzungsverzeichnis

PLC	Phospholipase C
PVN	paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus
Quis	Quisqualat
RAM	Arbeitsspeicher (<i>read and memory</i>)
RHT	retinohypothalamischer Trakt
r_P	Korrelationskoeffizient nach Pearson
r_S	Korrelationskoeffizient nach Spearman
SCG	<i>Ganglion cervicale superius</i>
SCN	suprachiasmatischer Nucleus
sEPSS	spontaner exzitatorischer postsynaptischer Strom
sIPSS	spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom
SMR	Spike2 Rohdatendatei
SP	Substanz P
SPZ	subparaventriculäre Zone
SXY	Spike2 XY-Datei
TTL	Transistor-Transistor-Logik
TTX	Tetrodotoxin
VE	Verpackungseinheit
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
WMF	Windows Metaformat
XCM	Latenzkartenformat
ZNS	zentrales Nervensystem
ZT	Zeitgeberzeit (<i>zeitgeber time</i>)

8 Anhang

8.1 Perfusionskammern

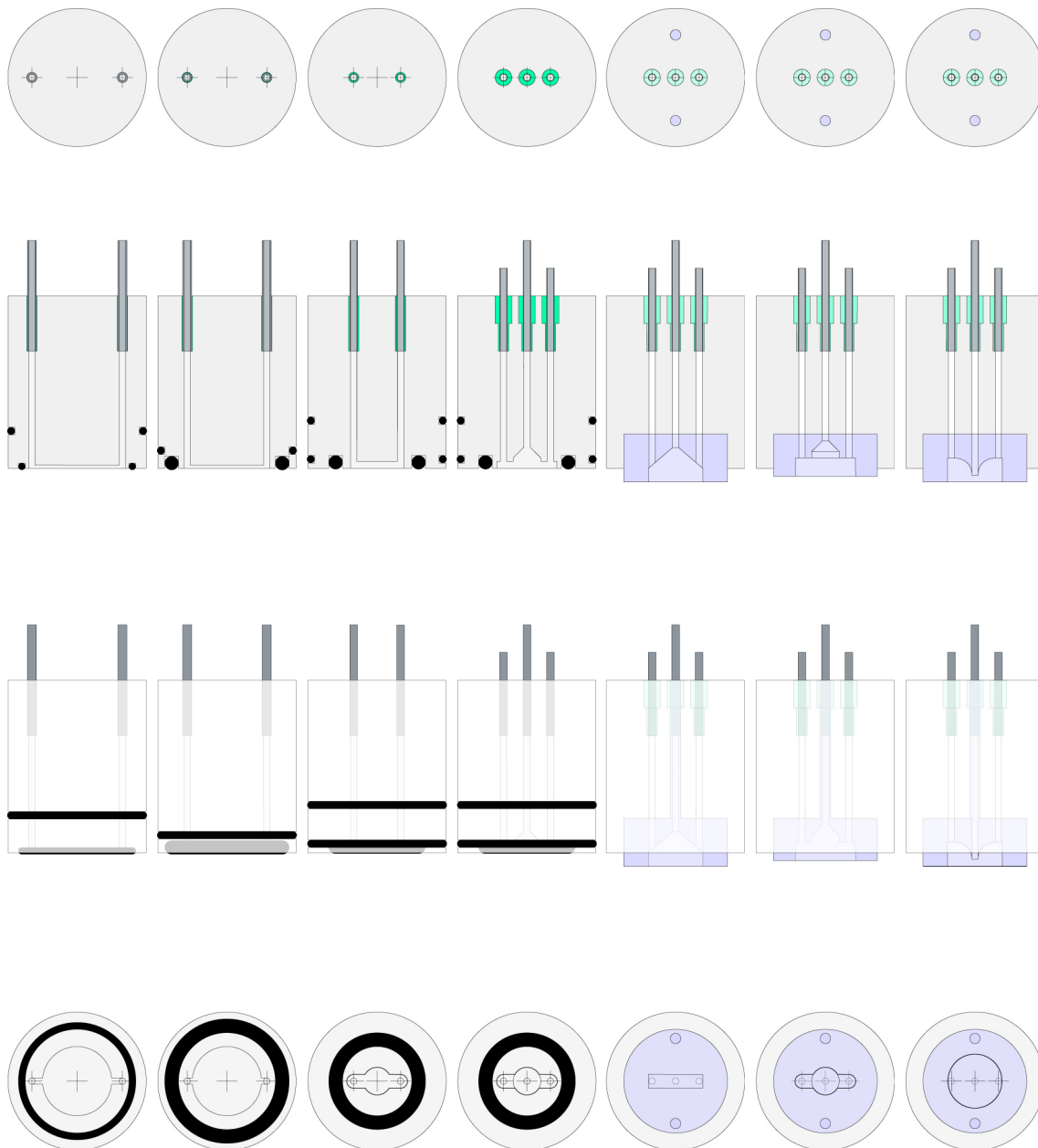


Abb. 52 Entwicklungsstufen der Mikro-Perfusionskammer

Von links nach rechts sind die wesentlichen Prototypen der Stempel des Mikro-Perfusions-Systems im Maßstab 1:1 dargestellt. Von oben nach unten sind obere Aufsicht, Schnittzeichnung, seitliche Aufsicht und untere Aufsicht abgebildet. Die Stempel wurden aus Makrolon oder Polyethersulfon (hellgrau) gefräst. Die Anschlüsse für die Mediumschläuche wurden aus Edelstahlkanülen (dunkelgrau) gefertigt, die in den Stempel mit einem Harzkleber (grün) eingeklebt wurden. Die eigentliche Perfusionskammer wurde mit O-Ringen (schwarz) abgedichtet oder aus selbstdichtendem PDMS (hellblau) gegossen.

8.2 Spike2 Skripte

8.2.1 xCorrMap

```
'$xCorrMap|Cross-Correlation Mapping Tool beta 002 Build 100

Var sTimeX := 0;
Var eTimeX := 600;
'Var CL$(62); NameFill();
Var xFilter$(3);
    xFilter$(0) := 0;      'type
    xFilter$(1) := 111;   'width
    xFilter$(2) := 1;     'passes
Var B% := 6400;
Var BW := 0.0000625;
Var xFrame; xFrame := b%*BW;
Var OS := 0.2;
Var Bins$; Bins$ := Str$(B%);
Var InterFrame; InterFrame := 0;

var ExMode% := 0;
var xcMode% := 0;
var tMode% := 2;

Var PL := 0.01;          'Color Calibration
Var NL := -0.01;

Var bPos%;              'current binary position
Var xmcHdl%;            'Binary Handle
var Pfad$;
Var ViabilityCheck [5];
    ViabilityCheck [0] := 0.11; 'maximum Latency Threshold
    ViabilityCheck [1] := 2;    'minimum Peak Threshold
    ViabilityCheck [2] := 600;  'minimum event Threshold
    ViabilityCheck [3] := 1.5;  'minimum Peak/mean Quota
    ViabilityCheck [4] := 0;    'Evaluation Mode

View(App(3)).WindowVisible(0);
var ok%;

var firstSec, lastSec, RecStart% [7], RecEnd% [7];

xcMode% := DlgModeSelect();

docase
    case xcMode% = 0 then
        DlgCorrMapC();
        ok% := FilePathSet("",0," Select folder with source files");
        if ok% < 0 then PrintLog(error$(ok%)); Halt endif
        Pfad$ := FilePath$();
        BMode();

    case xcMode% = 1 then
        var gap, delay, multiFrame%;
        DlgCorrMapT(gap, delay, multiFrame%);
        ok% := FilePathSet("",0," Select folder with source files");
        if ok% < 0 then PrintLog(error$(ok%)); Halt endif
        Pfad$ := FilePath$();
        imode(delay,gap);

endcase

Func xCorrMap (Hdl%, sTime, eTime, ChList$[], Bins%, BinW, Offset, Filter%[],vCheck[])

var Dummy% [2], n%, c%, i%, X1%, X2%, s%, indexX%, found%, CorrHdl%, TxtHdl%, FrameStart, xList% [200],
    rList% [200];

FrameStart := ExpTime(Hdl%) + sTime;

Var LatencyMap[Len(ChList$)][Len(ChList$)]; 'Map [Trigger] [measure] relative time of X-Corr Peak
Var PeakMap[Len(ChList$)][Len(ChList$)];   'Map [Trigger] [measure] amplitude of X-Corr Peak
Var TroughMap[Len(ChList$)][Len(ChList$)]; 'Map [Trigger] [measure] amplitude of X-Corr Trough
Var MeanMap[Len(ChList$)][Len(ChList$)];   'Map [Trigger] [measure] averaged value of all X-Corr bins
Var AbundanceMap[Len(ChList$)][Len(ChList$)]; 'Map [Trigger] [measure] sum of all X-Corr bins =
    Events/Correlation
ArrConst(LatencyMap[[]], -offset);
Var ViabilityMap[Len(ChList$)][Len(ChList$)]; 'Map [Trigger] [measure] Viability of measurement (1 =
    positive / 0 = negative)
'Var FireOrder[3][Len(ChList$)];           'FireOrder [0] [] = MeanLatency | [1] [] = viable
    Correlations | [2] [] = global channelindex
Var xyHdl%;

Var ChanNum% [Len(ChList$)];
For X1% := 0 to Len(ChList$)-1 step 1 do
    ChanNum% [X1%] := X1%;
next

View(Hdl%);
n% := ChanList(Dummy%);
var cList% [n%+1], cList$(n%+1), ChanMap% [n%+1];
ChanList(cList%);

For c% := 1 to n% step 1 do
    cList$(c%) := ChanTitle$(cList%(c%));
next;
```

Anhang

```

For c% := 1 to n% step 1 do          'ChanMap% [c%] holds global channelindex (ChList$); c% =
corresponding channelnumber of current file
i% := 1;
repeat
found% := 0;
found% := InStr(cList$(c%),ChList$(i%));
if found% = 1 then ChanMap%(c%) := i%; endif
i% += 1;
until found% = 1 or i% = Len(ChList$());
next

ArrConst (LatencyMap [] [0], ChanNum% []);
ArrConst (LatencyMap [0] [], ChanNum% []);
ArrConst (PeakMap [] [0], ChanNum% []);
ArrConst (PeakMap [0] [], ChanNum% []);
ArrConst (TroughMap [] [0], ChanNum% []);
ArrConst (TroughMap [0] [], ChanNum% []);
ArrConst (MeanMap [] [0], ChanNum% []);
ArrConst (MeanMap [0] [], ChanNum% []);
ArrConst (AbundanceMap [] [0], ChanNum% []);
ArrConst (AbundanceMap [0] [], ChanNum% []);
ArrConst (ViabilityMap [] [0], ChanNum% []);
ArrConst (ViabilityMap [0] [], ChanNum% []);
'ArrConst (FireOrder[2] [], ChanNum% []);

For X1% :=1 to n% step 1 do

xList% [0] := n% - (X1%-1);
ArrConst (xList% [1:], cList% [X1%:]);
View (Hdl%);
CorrHdl% := SetEvtCrl(xList% [], Bins%, BinW, Offset, cList% [X1%]); 'Test diagonal
View(CorrHdl%).Process(sTime, eTime, 1);
View(CorrHdl%).ChanList (rList%);
ResSmooth (CorrHdl%, rList% [], xFilter% [0], xFilter% [1], xFilter% [2]);

For X2% := 1 to xList% [0] step 1 do
indexX% := Max( View(CorrHdl%, X2%). [] );
peakMap [ChanMap% [X1%] ] [ChanMap% [xList% [X2%]] ] := View(CorrHdl%, X2%). [indexX%];
peakMap [ChanMap% [xList% [X2%]] ] [ChanMap% [X1%] ] := View(CorrHdl%, X2%). [indexX%];
LatencyMap [ChanMap% [X1%] ] [ChanMap% [xList% [X2%]] ] := View(CorrHdl%). BinToX (indexX%);
LatencyMap [ChanMap% [xList% [X2%]] ] [ChanMap% [X1%] ] := -View(CorrHdl%). BinToX (indexX%);
indexX% := Min( View(CorrHdl%, X2%). [] );
TroughMap [ChanMap% [X1%] ] [ChanMap% [xList% [X2%]] ] := View(CorrHdl%, X2%). [indexX%];
TroughMap [ChanMap% [xList% [X2%]] ] [ChanMap% [X1%] ] := View(CorrHdl%, X2%). [indexX%];
AbundanceMap [ChanMap% [X1%] ] [ChanMap% [xList% [X2%]] ] := ArrSum (View(CorrHdl%, X2%). [], MeanMap
[ChanMap% [X1%] ] [ChanMap% [xList% [X2%]] ] );
AbundanceMap [ChanMap% [xList% [X2%]] ] [ChanMap% [X1%] ] := ArrSum (View(CorrHdl%, X2%). [], MeanMap
[ChanMap% [xList% [X2%]] ] [ChanMap% [X1%] ] );
next

View(CorrHdl%); FileClose (0, -1);
next

For X1% :=1 to Len(ChList$)-1 step 1 do
PeakMap [X1%] [X1%] := 0;
LatencyMap [X1%] [X1%] := 0;
'MeanMap [X1%] [X1%] := 0;
'ViabilityMap [X1%] [X1%] := 1;
next

For X1% := 1 to Val(ChList$[0]) step 1 do          'Check Viability
For X2% := 1 to Val(ChList$[0]) step 1 do
if MeanMap[X1%] [X2%] = 0 then
ViabilityMap[X1%] [X2%] := 0
else
if Abs(LatencyMap [X1%] [X2%]) < vCheck[0] and PeakMap[X1%] [X2%] > vCheck[1] and
AbundanceMap[X1%] [X2%] > vCheck[2] and PeakMap[X1%] [X2%] / MeanMap [X1%] [X2%] > vCheck[3] then
ViabilityMap [X1%] [X2%] := 1;
else ViabilityMap [X1%] [X2%] := 0;
endif
endif
endif
next
next

For X1% := 1 to Val(ChList$[0]) step 1 do
if ArrSum(ViabilityMap [1:] [X1%]) > 0 and ArrSum(ViabilityMap [X1%] [1:]) > 0 then ViabilityMap
[X1%] [X1%] := 1;
endif
next

docase
Case ExMode% = 0 then
Var Sweeps%;
View(xmcHdl%).BSeek(0,2); 'go to end of file
if InterFrame = 0 then View(xmcHdl%).BWrite(FrameStart); endif
View(xmcHdl%).BWrite(LatencyMap, AbundanceMap, MeanMap, PeakMap, TroughMap, ViabilityMap);
View(xmcHdl%).BSeek(8,0); 'go to Sweeps
View(xmcHdl%).BRead(Sweeps%); 'read Sweeps
View(xmcHdl%).BSeek(8,0); 'go to Sweeps
View(xmcHdl%).BWrite(Sweeps%+1); 'write Sweeps

endcase

return 1;
end

Func ResSmooth (Hdl%, cList% [], Filter%, Width%, Multi%)

var Coef[Width%];
var N%, M%, C%;
Docase

```

Anhang

```

case Filter% = 0 then
    N% := 0;
    repeat
        Coef[0+N%] := 1+ N%; Coef[Width% -1 -N%] := 1+ N%;
        N% += 1;
    until N% = Width% / 2 +1;
    ArrMul(Coef[], (1.0 / ArrSum(Coef[])));
case Filter% = 1 then
    N% := 0;
    repeat
        Coef[0+N%] := Pow (2, N%); Coef[Width% -1 -N%] := Pow (2, N%);
        N% += 1;
    until N% = Width%/2 +1;
    ArrMul(Coef[], (1.0 / ArrSum(Coef[])));
case Filter% = 2 then
    ArrConst(Coef[] , 1);
    ArrMul(Coef[], (1.0 / ArrSum(Coef[])));
Endcase

For c% := 1 to cList%[0] step 1 do

    M% := Multi%;
    Repeat
        ArrFilt (View(Hdl%,cList%[C%]).[], Coef[]);
        M% -= 1;
    until M% = 0;
next

return 1 ;
end

Func RGB$ (Value,LimitN,LimitP,Mode%)

Var SigCol$,Integer%;
docase
case Mode% = 0 then 'positive/green; negative/red; zero = yellow
    docase
    case Value = 0 then
        SigCol$ := ("@RGB(255,255,0)");
    case Value < 0 then
        SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,0,0)", Round((1-(Value / LimitN))*255));
    case value > 0 then
        SigCol$ := Print$("@RGB(0,%.0f,0)", Round((1-(Value / LimitP))*255));
    endcase
case Mode% = 1 then 'positive/cyan; negative/pink; zero = yellow
    docase
    case Value = 0 then
        SigCol$ := ("@RGB(255,255,0)");
    case Value < 0 then
        SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,0,%.0f)", Round((1-(Value / LimitN))*255),Round((1-(Value /
LimitN))*255));
    case value > 0 then
        SigCol$ := Print$("@RGB(0,%.0f,%.0f)", Round((1-(Value / LimitP))*255),Round((1-(Value /
LimitP))*255));
    endcase
case Mode% = 2 then 'greyscale white>black
    docase
    case Value < LimitN then
        SigCol$ := Print$("@RGB(255,255,255)");
    case Value > LimitN and Value <LimitP then
        if LimitN <= 0
            then Integer% := Round((Abs(LimitN)+Value) / (LimitP+Abs(LimitN))*255);
            SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,%.0f,%.0f)", Integer%,Integer%,Integer%);
        else Integer% := Round(((Value-LimitN)/(LimitP-LimitN))*255);
            SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,%.0f,%.0f)", Integer%,Integer%,Integer%);
        endif
    case Value >LimitP then
        SigCol$ := Print$("@RGB(0,0,0)");
    endcase
case Mode% = 3 then 'greyscale black>white
    docase
    case Value < LimitN then
        SigCol$ := Print$("@RGB(0,0,0)");
    case Value > LimitN and Value <LimitP then
        if LimitN <= 0
            then Integer% := Round((1-(Abs(LimitN)+Value) / (LimitP+Abs(LimitN)))*255);
            SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,%.0f,%.0f)", Integer%,Integer%,Integer%);
        else Integer% := Round((1-((Value-LimitN)/(LimitP-LimitN)))*255);
            SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,%.0f,%.0f)", Integer%,Integer%,Integer%);
        endif
    case Value >LimitP then
        SigCol$ := Print$("@RGB(255,255,255)");
    endcase
endcase
return SigCol$;
end

Func XYmapExport (PrimaryMap[][],SecondaryMap[][],ViaMap[][],Chan2xy%[][],Mode%)

var Hdl%, small%,big%,Background[4][2];
ReadStr("10,89,89,10",Background[][0]);
ReadStr("-10,-10,-89,-89",Background[][1]);
small%:= 6;
big% := 8;

Hdl% := FileNew (12);
View(Hdl%);

```

Anhang

```

Colour(32,23);          'xy Background to weird pink
XYSize (1,4);          'background white   Ch1
XYColour(1,6,1);       'Colour
XYDrawMode(1,2,0);    'size
XYDrawMode(1,4,0);    'Line thickness
XYAddData(1,Background[0],Background[1]);
XYJoin(1,3);

XYSetChan (0,1000);    'secondary white   Ch2
XYColour(2,6,1);       'Colour
XYDrawMode(2,1,0);    'shape
XYDrawMode(2,2,big%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary grey 1   Ch3
XYColour(3,5,1);       'Colour
XYDrawMode(3,1,0);    'shape
XYDrawMode(3,2,big%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary grey 2   Ch4
XYColour(4,4,1);       'Colour
XYDrawMode(4,1,0);    'shape
XYDrawMode(4,2,big%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary grey 3   Ch5
XYColour(5,3,1);       'Colour
XYDrawMode(5,1,0);    'shape
XYDrawMode(5,2,big%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary grey 4   Ch6
XYColour(6,2,1);       'Colour
XYDrawMode(6,1,0);    'shape
XYDrawMode(6,2,big%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary grey 5   Ch7
XYColour(7,1,1);       'Colour
XYDrawMode(7,1,0);    'shape
XYDrawMode(7,2,big%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary black    Ch8
XYColour(8,0,1);       'Colour
XYDrawMode(8,1,0);    'shape
XYDrawMode(8,2,big%); 'size

XYSetChan(0,1000);     'primary green      Ch9
XYColour(9,14,1);      'Colour
XYDrawMode(9,1,0);    'shape
XYDrawMode(9,2,small%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'primary red         Ch10
XYColour(10,16,1);     'Colour
XYDrawMode(10,1,0);   'shape
XYDrawMode(10,2,small%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'primary yellow     Ch11
XYColour(11,18,1);     'Colour
XYDrawMode(11,1,0);   'shape
XYDrawMode(11,2,small%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'primary cyan       Ch12
XYColour(12,15,1);     'Colour
XYDrawMode(12,1,0);   'shape
XYDrawMode(12,2,small%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'primary pink       Ch13
XYColour(13,17,1);     'Colour
XYDrawMode(13,1,0);   'shape
XYDrawMode(13,2,small%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'primary white      Ch14
XYColour(14,6,1);      'Colour
XYDrawMode(14,1,0);   'shape
XYDrawMode(14,2,small%); 'size

Var r%, s%, sL%;

For r%:= 1 to Len(PrimaryMap[0][0])-2 step 1 do
  For s%:= 1 to Len(PrimaryMap[0][1])-2 step 1 do
    docase
      case ViaMap[r%][s%] = 0 then
        XYAddData(14,Chan2xy[r%][1]*10+Chan2xy[s%][1],-
(Chan2xy[r%][2]*10+Chan2xy[s%][2]));
        case ViaMap[r%][s%] > 0 then 'Excitation red / green (-/+)
          Docase
            case PrimaryMap[r%][s%] = 0 then
              XYAddData(11,Chan2xy[r%][1]*10+Chan2xy[s%][1],-
(Chan2xy[r%][2]*10+Chan2xy[s%][2]));
              case PrimaryMap[r%][s%] < 0 then
                XYAddData(10,Chan2xy[r%][1]*10+Chan2xy[s%][1],-
(Chan2xy[r%][2]*10+Chan2xy[s%][2]));
              case PrimaryMap[r%][s%] > 0 then
                XYAddData(9,Chan2xy[r%][1]*10+Chan2xy[s%][1],-
(Chan2xy[r%][2]*10+Chan2xy[s%][2]));
            endcase
          case ViaMap[r%][s%] < 0 then 'Inhibition pink / cyan (-/+)
            Docase
              case PrimaryMap[r%][s%] = 0 then
                XYAddData(11,Chan2xy[r%][1]*10+Chan2xy[s%][1],-
(Chan2xy[r%][2]*10+Chan2xy[s%][2]));
              case PrimaryMap[r%][s%] < 0 then
                XYAddData(13,Chan2xy[r%][1]*10+Chan2xy[s%][1],-
(Chan2xy[r%][2]*10+Chan2xy[s%][2]));
              case PrimaryMap[r%][s%] > 0 then
                XYAddData(12,Chan2xy[r%][1]*10+Chan2xy[s%][1],-
(Chan2xy[r%][2]*10+Chan2xy[s%][2]));
            endcase
          endcase
        sL% := SecondaryMap[r%][s%] / ViabilityCheck[2];
        docase
          case sL% = 0 then XYAddData(2,Chan2xy[r%][1]*10+Chan2xy[s%][1],-
(Chan2xy[r%][2]*10+Chan2xy[s%][2]));

```

Anhang

```

        case sL% = 1 then XYAddData(3,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1], -
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]));
        case sL% = 2 then XYAddData(4,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1], -
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]));
        case sL% = 3 then XYAddData(5,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1], -
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]));
        case sL% = 4 then XYAddData(6,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1], -
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]));
        case sL% = 5 then XYAddData(7,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1], -
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]));
        case sL% >= 6 then XYAddData(8,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1], -
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]));
    endcase
next
next

XAxis(0);
YAxis(0);
XAxisMode(63);
YAxisMode(63);
XRange(10,89);
YRange(0,-89,-10);

Var Screen%[4];
'Var aspectRatio;
System(1,1,Screen%[]);
'aspectRatio := (1.0*Screen%[2])/Screen%[3];
Window(0, 6, (88/(1.0*Screen%[2]/Screen%[3])), 94 ,1,1);
return Hdl%
end

Func SigmaTxtExport(LatencyMap[][],AbundanceMap[][],ViabilityMap[][],ChList$[]) 'ChList$ besser ohne
Stimuluskanal

Var TxtHdl%, c%, i%;

    TxtHdl% := FileNew(1);
    View (TxtHdl%);
    Print( "X\t");
    Print( "Y\t");
    For c% := 1 to Len(ChList$[])-1 step 1 do          'ColoumnHeader
        Print( "%s-L\t%s-E\t", ChList$(c%),ChList$(c%));
    next
    Print ("\n");

    For i% := 1 to Len(ChList$[])-1 step 1 do          '
        Print( "%d\t", Val(Mid$(ChList$(i%),2,1))-1);
        Print( "%d\t", 8-Val(Mid$(ChList$(i%),3,1)));

        For c% := 1 to Len(ChList$[])-1 step 1 do
            docase
                case ViabilityMap [c%][i%] > 0 then 'Excitation
                    Print("%s\t",RGB$(LatencyMap[c%][i%],NL,PL,0));
                case ViabilityMap [c%][i%] = 0 then      'not viable
                    Print ("@RGB(255,255,255)\t");
                case ViabilityMap [c%][i%] < 0 then      'Inhibition
                    Print("%s\t",RGB$(LatencyMap[c%][i%],NL,PL,1));
            endcase
            Print("%s\t",RGB$(AbundanceMap[c%][i%],ViabilityCheck [2],ViabilityCheck
[2]*10,2));
            'events as greyscale
        next
        Print("\n");
    next

return TxtHdl%;
end

Func BinaryCreate(bName$,ChList$[],FrameSize,BinWidth,IFI)

var bHdl%, Channels%, HeadSize%, c%, Sweeps%;

if bName$ = "" then
    bHdl% := FileOpen("CrossCorrelationMap (XCM)*.xcm",9,1,"export CorrelationMap to ...");
else
    bHdl% := FileOpen (bName$ + ".xcm",9,1);
endif

Channels% := Val(ChList$(0));
Var cNum% [Channels%+1];

cNum%[0] := Channels%;
for c% := 1 to Channels% step 1 do
    cNum%[c%] := c%;
next

BWrite (Channels%,HeadSize%,Sweeps%,FrameSize,Binwidth,IFI,cNum%,ChList$);

HeadSize% := Bseek();
BSeek(4);
BWrite (HeadSize%);
BSeek (HeadSize%);

return bHdl%;
end
Func ExpTime (fileH%)

view (fileH%);
var FDate% [7];
var FStart%, elapsedS;

FileTimeDate (FDate%[]);

```

Anhang

```

FStart% := FDate%[0] + FDate%[1]*60 + FDate%[2]*3600 + DaysUN%(FDate%[3],FDate%[4],FDate%[5])*86400;
elapsedS := FStart% - firstSec;
return elapsedS
end

Proc BMode ();

var fCount%,n%, i%, ChannelSpC%[200], Alevt%, FileHdl%, InjCount%,Inj[1024], CL$ [200], old%, new%;

var DummyList$[2];
n% := FileList (DummyList$[], 0);

var List$ [n%];
FileList (List$[], 0);

FileHdl% := FileOpen (List$[0], 0, 0);
View (FileHdl%);

FileTimeDate (RecStart%[]);
firstSec := RecStart%[0] + RecStart%[1]*60 + RecStart%[2]*3600 +
DaysUN%(RecStart%[3],RecStart%[4],RecStart%[5])*86400;

View (FileHdl%);
FileClose (0, -1);

FileHdl% := FileOpen (List$[n%-1], 0, 0);
View (FileHdl%);
FileTimeDate (RecEnd%[]);
lastSec := MaxTime() + RecEnd%[0] + RecEnd%[1]*60 + RecEnd%[2]*3600 +
DaysUN%(RecEnd%[3],RecEnd%[4],RecEnd%[5])*86400;
FileClose (0, -1);

PrintLog ("\nin Folder ", Pfad$, " ", n%, " SMR-files have been found:");
For i% := 0 to n% -1 step 1 do
PrintLog ("%s\n",List$[i%]);
next
PrintLog ("\nData in file ", List$[0], " starts at ", RecStart%[2], ":", RecStart%[1], ":",
RecStart%[0]," on ", RecStart%[3],".", RecStart%[4],".", RecStart%[5]);
PrintLog ("last data is found ", (lastSec-FirstSec)/3600.0, " h later in file ", List$[n%-1],
"\n");

For i% := 0 to n% -1 step 1 do
FileHdl% := FileOpen (List$[i%],0,0);
ChanList (ChannelSpC% []);
old% := Val (CL$[0]);
new% := ChanTitleCollect%(FileHdl%,CL$[]);
PrintLog ("\n", List$[i%], " contains ", ChannelSPC%[0], " channels\n", "of ", MaxTime(), " s
length");
PrintLog ("File starts at ", FileTime$(1,7,0,":"), " on ",
FileDate$(2,2,1,2,":."),"\nexperiment elapsed time: ", TimeCalc$(ExpTime(FileHdl%),tMode%)) );

if new% > 0 then PrintLog (new%, " new channels found (" ,CL$[old%:new%], ")") endif

Alevt% := InjectGet% ( FileHdl%, Inj [InjCount%:],ExpTime(FileHdl%));
if Alevt% > 0 then PrintLog (Alevt%, " inject markers ", InjCount% +1," to ", InjCount%+
Alevt%, " found at: ", Inj [InjCount%:Alevt%]) endif
InjCount% += Alevt%;

FileClose(0,-1);
Yield();
next

PrintLog("\nInjection markers found at:\n");

For i% := 0 to InjCount% -1 step 1 do
PrintLog("%s\n",TimeCalc$(Inj [i%], tMode%));
next
PrintLog("\n");

ArrSort (CL$[1:Val (CL$[0])]);

xmcHdl% := BinaryCreate ("",CL$[:Val (CL$[0])+1],eTimeX-sTimeX,BW,0);

For fCount% := 0 to n% -1 step 1 do

FilePathSet (Pfad$,0);

FileHdl% := FileOpen (List$[fCount%], 0, 0);
if FileHdl% < 0 then
PrintLog ("ERROR %s - while accessing %s\n",Error$(FileHdl%),List$[fCount%]) else
PrintLog ("accessing %s\n", List$[fCount%]);
endif

View (LogHandle());
WindowVisible (1);
Window (0,0,100,100);
Frontview (Loghandle());
Yield (0.05);
View (FileHdl%);

var xc;
For xc := 0 to View(FileHdl%).Maxtime() mod ( eTimex-sTimeX) - eTimex-sTimeX step eTimex-sTimeX
do
xCorrMap (FileHdl%,xc,xc+eTimeX,CL$[:Val (CL$[0])+1],B%,BW,OS,xFilter%,ViabilityCheck);
next

View (FileHdl%);
FileClose (0, -1);

```

Anhang

```

next

FrontView (Loghandle());
var FSA%;
DlgCreate ("Save Log?");
DlgText ("Save the log file?",1,1);

FSA% := DlgShow();
if FSA% = 1 then FileSaveAs ("XMC-Batch.log", 1, 0, "Save log file"); endif

end;
Proc iMode (delay,gap);

var fCount%,n%,FileHdl%, i%, j%, xc, InjCount%, Inj[512], Alevt%, ChannelSpc% [1024], finish%,
CL$[200], new%, old%;

View (LogHandle());
WindowVisible (1);
Window (0,0,100,100);
Frontview (Loghandle());
Yield();

var DummyList$[2];
n% := FileList (DummyList$[], 0);

var List$ [n%];
FileList (List$[], 0);
FileHdl% := FileOpen (List$[0], 0, 0);
View (FileHdl%);

FileTimeDate (RecStart%[]);
firstSec := RecStart%[0] + RecStart%[1]*60 + RecStart%[2]*3600 +
DaysUN$(RecStart%[3],RecStart%[4],RecStart%[5])*86400;

View (FileHdl%);
FileClose (0, -1);

FileHdl% := FileOpen (List$[n%-1], 0, 0);
View (FileHdl%);
FileTimeDate (RecEnd%[]);
lastSec := MaxTime() + RecEnd%[0] + RecEnd%[1]*60 + RecEnd%[2]*3600 +
DaysUN$(RecEnd%[3],RecEnd%[4],RecEnd%[5])*86400;
FileClose (0, -1);

PrintLog ("\nin Folder ", Pfad$, " ", n%, " SMR-files have been found:");
For i% := 0 to n% -1 step 1 do
PrintLog ("%s\n",List$[i%]);
next
PrintLog ("Data in file ", List$[0], " starts at ", RecStart%[2], ":", RecStart%[1], ":",
RecStart%[0], " on ", RecStart%[3], ":", RecStart%[4], ":", RecStart%[5]);
PrintLog ("last data is found ", (lastSec-FirstSec)/3600.0, " h later in file ", List$[n%-1],
"\n");

View (LogHandle());
WindowVisible (1);
Window (0,0,100,100);
Frontview (Loghandle());
Yield();

var TT[n%][2];
TimeTableGet (List$, TT);

For i% := 0 to n% -1 step 1 do
FileHdl% := FileOpen (List$[i%],0,0);
ChanList (ChannelSpc% []);
old% := Val (CL$[0]);
new% := ChanTitleCollect$(FileHdl%,CL$[]);
PrintLog ("\n", List$[i%], " contains ", ChannelSPC%[0], " channels\n", " of ", MaxTime(), " s
length");
PrintLog ("File starts at ", FileTime$(1,7,0,":"), " on ",
FileDate$(2,2,1,2,":."), "\nexperiment elapsed time: ", TimeCalc$(TT[i%][0],2), " - ",
TimeCalc$(TT[i%][1],2) );

if new% > 0 then PrintLog (new%, " new channels found (" ,CL$[old%:new%], ")") endif

Alevt% := InjectGet$ ( FileHdl%, Inj[InjCount%:],TT[i%][0]);
if Alevt% > 0 then PrintLog (Alevt%, " inject markers ", InjCount% +1," to ", InjCount%+
Alevt%, " found at: ", Inj[InjCount%:Alevt%]) endif
InjCount% += Alevt%;

FileClose(0,-1);
Yield();

next

PrintLog("\nInjection markers found at:\n");

For i% := 0 to InjCount% -1 step 1 do
PrintLog("%s\n",TimeCalc$(Inj[i%], tMode%));
next
PrintLog("\n");

ArrSort (CL$[1:Val (CL$[0])]);
xmcHdl% := BinaryCreate ("",CL$[:Val (CL$[0])+1],eTimeX,BW,0);

View (LogHandle());
WindowVisible (1);
Window (0,0,100,100);
Frontview (Loghandle());
Yield ();

```

Anhang

```
FilePathSet (Pfad$, 0);

For i% := 0 to InjCount% - 1 step 1 do
    j% := 0; finish% := 0;
    repeat ' Correlations for Controltime
        docase
            case TT[j%][0] < (Inj[i%] + delay - gap - eTimeX) and TT[j%][1] < (Inj[i%] + delay - gap) and
                TT[j%][1] > (Inj[i%] + delay - gap - eTimeX) then 'desired frame exceeds end of file
                    FileHdl% := FileOpen (List$[j%], 0);
                    if FileHdl% < 0 then
                        PrintLog ("ERROR %s - while accessing %s\n", Error$(FileHdl%), List$[j%]) else
                        PrintLog ("accessing %s\n", List$[j%]);
                    endif
                    finish% := xCorrMap (FileHdl%, View (FileHdl%).MaxTime() - eTimeX
                        , View (FileHdl%).MaxTime(), CL$[:Val (CL$[0])+1], B%, BW, OS, xFilter%, ViabilityCheck);
                    View (FileHdl%);
                    FileClose (0, -1);

                    case TT[j%][0] < (Inj[i%] + delay - gap - eTimeX) and TT[j%][1] > (Inj[i%] + delay - gap)
                        then 'desired frame is inside the file
                            FileHdl% := FileOpen (List$[j%], 0);
                            if FileHdl% < 0 then
                                PrintLog ("ERROR %s - while accessing %s\n", Error$(FileHdl%), List$[j%]) else
                                PrintLog ("accessing %s\n", List$[j%]);
                            endif
                            finish% := xCorrMap (FileHdl%, (Inj[i%] + delay - gap - eTimeX) - TT[j%][0], (Inj[i%] + delay
                                - gap) - TT[j%][0], CL$[:Val (CL$[0])+1], B%, BW, OS, xFilter%, ViabilityCheck);
                            View (FileHdl%);
                            FileClose (0, -1);
                        endcase

                    j% += 1;
                until j% >= Len (TT[][0]) or finish% = 1 ;

                j% := 0; finish% := 0;
                repeat ' Correlations for Applicationtime
                    docase
                        case TT[j%][0] < (Inj[i%] + delay) and TT[j%][1] < (Inj[i%] + delay + eTimeX) and TT[j%][1] >
                            (Inj[i%] + delay) then 'desired frame exceeds end of file
                                FileHdl% := FileOpen (List$[j%+1], 0);
                                if FileHdl% < 0 then
                                    PrintLog ("ERROR %s - while accessing %s\n", Error$(FileHdl%), List$[j%+1]) else
                                    PrintLog ("accessing %s\n", List$[j%+1]);
                                endif
                                finish% := xCorrMap (FileHdl%, 0, eTimeX,
                                    CL$[:Val (CL$[0])+1], B%, BW, OS, xFilter%, ViabilityCheck);
                                View (FileHdl%);
                                FileClose (0, -1);

                                case TT[j%][0] < (Inj[i%] + delay) and TT[j%][1] > (Inj[i%] + delay + eTimeX) then 'desired
                                    frame is inside the file
                                        FileHdl% := FileOpen (List$[j%], 0);
                                        if FileHdl% < 0 then
                                            PrintLog ("ERROR %s - while accessing %s\n", Error$(FileHdl%), List$[j%]) else
                                            PrintLog ("accessing %s\n", List$[j%]);
                                        endif
                                        finish% := xCorrMap (FileHdl%, (Inj[i%] + delay) - TT[j%][0], (Inj[i%] + delay + eTimeX) -
                                            TT[j%][0], CL$[:Val (CL$[0])+1], B%, BW, OS, xFilter%, ViabilityCheck);
                                        View (FileHdl%);
                                        FileClose (0, -1);
                                    endcase

                                        j% += 1;
                                    until j% >= Len (TT[][0]) or finish% = 1 ;

                                    View (LogHandle());
                                    WindowVisible (1);
                                    Window (0, 0, 100, 100);
                                    Frontview (Loghandle());
                                    Yield ();
                                next

                                FrontView (Loghandle());
                                var FSA%;
                                DlgCreate ("Save Log?");
                                DlgText ("Save the log file?", 1, 1);

                                FSA% := DlgShow();
                                if FSA% = 1 then FileSaveAs ("XMC-Batch.log", 1, 0, "Save log file"); endif

                                end;

                                Func DaysUN% (d%, month%, y%);

                                var days%;

                                docase
                                    case Month% = 1 then days% := 0;
                                    case Month% = 2 then days% := 31;
                                    case Month% = 3 then days% := 59;
                                    case Month% = 4 then days% := 90;
                                    case Month% = 5 then days% := 120;
                                    case Month% = 6 then days% := 151;
                                    case Month% = 7 then days% := 181;
                                    case Month% = 8 then days% := 212;
```


Anhang

```
        case Month% = 9 then days% := 243;
        case Month% = 10 then days% := 273;
        case Month% = 11 then days% := 304;
        case Month% = 12 then days% := 334;
    endcase

    if y% mod 4 = 0 and month% >2 then days% += 1 endif;

days% := d% + days%;

return days%
end

Func TimeTableGet (fList$, &TimeTable[])
var i%, fHdl%, cHdl%;

cHdl% := View();

For i% := 0 to Len (fList$)-1 step 1 do
    fHdl% := FileOpen(fList$[i%],0);
    TimeTable[i%][0] := ExpTime (fHdl%);
    TimeTable[i%][1] := TimeTable[i%][0] + MaxTime();
    FileClose(0,0);
next

View(cHdl%);

return 1;
end
Func InjectGet% (Hdl%, &Events[], Offset) 'Writes timepoints from channel EA1X into Events[]
corrected by offset, returns number of found events

var found%, cHdl%, cList%[250], i%, n%, A1Yes%, time, A1%;

time := -1;
i% := 1;

cHdl% := View();
View(Hdl%);

n% := ChanList(cList%[]);

Repeat
    A1Yes% := "EA1X" = ChanTitle$(cList%[i%]);
    if A1Yes% = 1 then A1% := i% endif

    i% +=1;
    until i% = n% +1 or A1Yes% = 1;

if A1Yes% =1 then 'find events in EA1X save timepoint in events[] and count number of
events
repeat
    time := NextTime(cList%[A1%], time+3); 'time + deadtime (due to noise / rebound
potential on marker channel)
    if time <> -1 then
        found% += 1;
        Events[found% -1 ] := time + offset;
    endif

    until time = -1;

endif

View(cHdl%);
return found%;
end
Func TimeCalc$(s,mode%)
var Value$;

docase
case Mode% = 0 then
    value$ := Print$("%09.1f s",s);
case Mode% = 1 then
    value$ := Print$("%05d'%'02d min",s/60,s Mod 60);
case Mode% = 2 then
    Value$ := Print$("%03d'%'02d'%'02d h",s/3600,(s Mod 3600)/60,s mod 60);
case Mode% = 3 then
    Value$ := Print$("%02d.%'02d'%'02d'%'02d",s/86400,(s mod 86400)/3600,(s Mod 3600)/60,s mod 60);
endcase

return value$;
end
Func TimeLabel$(mode%)
var label$;

docase
case Mode% = 0 then
    label$ := "time [s]";
case Mode% = 1 then
    label$ := "time [min]";
case Mode% = 2 then
    label$ := "time [h]";
case Mode% = 3 then
    label$ := "time [d]";
endcase

return label$;
end

Func TimeUnit$(mode%)
var unit$;
```

Anhang

```
docase
case Mode% = 0 then
    unit$ := "s";
case Mode% = 1 then
    unit$ := "min";
case Mode% = 2 then
    unit$ := "h";
case Mode% = 3 then
    unit$ := "d";
endcase

return unit$;
end
Func DlgCorrMapC ()
var ok%;

DlgCreate ("xCorrMap settings");
DlgAllow (511,0, DlgCorrMapCX%);

DlgReal ( 1 , "start time [s]",0,14400);
DlgReal ( 2 , "end time [s]",sTimeX,14400);
DlgList ( 3 , "filter type","triangular|logarithmic|flat");
DlgInteger ( 4 , "filter width [bins]", 3, 99999);
DlgInteger ( 5 , "filter passes", 1, 5);
DlgReal ( 6 , "correlation bin width [s]", 0.0000625, 10);
DlgReal ( 7 , "correlation frame size [s]", 5*BW,20);
DlgReal ( 8 , "correlation offset [s]",0,20);
DlgReal ( 9 , "max latency threshold [s]",0,20);
DlgReal (10 , "min peak threshold",0,99999);
DlgReal (11 , "min event threshold",0,999999);
DlgReal (12 , "min peak/mean quota",0,99999);
DlgReal (13 , "pos color calibration",0,99999);
DlgReal (14 , "neg color calibration",-99999,0);

ok% := DlgShow (sTimeX,eTimeX,xFilter%[],BW,xFrame,OS,ViabilityCheck[0:4],PL,NL);
if ok% = 0 then halt endif

return 1;
end

Func DlgCorrMapCX% (item%)
docase
case item% = 0 then
    DlgValue ( 1, sTimeX);
    DlgValue ( 2, eTimeX);
    DlgValue ( 3, xFilter%[0]);
    DlgValue ( 4, xFilter%[1]);
    DlgValue ( 5, xFilter%[2]);
    DlgValue ( 6, BW);
    DlgValue ( 7, xFrame);
    DlgValue ( 8, OS);
    DlgValue ( 9, ViabilityCheck[0]);
    DlgValue (10, ViabilityCheck[1]);
    DlgValue (11, ViabilityCheck[2]);
    DlgValue (12, ViabilityCheck[3]);
    DlgValue (13, PL);
    DlgValue (14, NL);

case item% = 1 then
    DlgValue ( 2, DlgValue(1)+eTimeX-sTimeX);

endcase
return 1
end

Func DlgCorrMapT (&delay,&gap,&multiFrame%)
var ok%;

DlgCreate ("xCorrMap settings");
DlgAllow (511,0, DlgCorrMapTX%);

DlgReal ( 1 , "map frame [s]|time window to analyze for each map",0,14400);
DlgReal ( 2 , "injection delay [s]|delay between injection marker and actual drug
    influx",0,14400);
DlgReal ( 3 , "analysis gap [s]|time between the control map and the drug effect map",0,14000);
DlgInteger ( 4 , "frames per analysis",1,10);
DlgList ( 5 , "filter type","triangular|logarithmic|flat");
DlgInteger ( 6 , "filter width [bins]", 3, 99999);
DlgInteger ( 7 , "filter passes", 1, 5);
DlgReal ( 8 , "correlation bin width [s]", 0.0000625, 10);
DlgReal ( 9 , "correlation frame size [s]", 5*BW,20);
DlgReal (10 , "correlation offset [s]",0,20);
DlgReal (11 , "max latency threshold [s]",0,20);
DlgReal (12 , "min peak threshold",0,99999);
DlgReal (13 , "min event threshold",0,999999);
DlgReal (14 , "min peak/mean quota",0,99999);

ok% := DlgShow (eTimeX, delay, gap, multiFrame%, xFilter%[],BW,xFrame,OS,ViabilityCheck[0:4]);
if ok% = 0 then halt endif

return 1;
end

Func DlgCorrMapTX% (item%)
docase
case item% = 0 then
    DlgValue ( 1, eTimeX);
    DlgValue ( 2, 240);
```

Anhang

```
DlgValue ( 3, 180);
DlgValue ( 4, 1);
DlgValue ( 5, xFilter%[0]);
DlgValue ( 6, xFilter%[1]);
DlgValue ( 7, xFilter%[2]);
DlgValue ( 8, BW);
DlgValue ( 9, xFrame);
DlgValue (10, OS);
DlgValue (11, ViabilityCheck[0]);
DlgValue (12, ViabilityCheck[1]);
DlgValue (13, ViabilityCheck[2]);
DlgValue (14, ViabilityCheck[3]);

endcase
return 1

end

Func DlgModeSelect()

var xm%, ok%;

DlgCreate("select mode");

DlgList      ( 1, "Mode|toggle between continuous and triggered mode", "continuous|triggered");

ok% := DlgShow(xm%);
if ok% = 0 then halt()endif

return xm%;
end

Func ChanTitleCollect% (Hdl%,&CTL$[])

var cHdl%, old%, new%, n%,i%, j%, found%, DummyList%[2];

cHdl% := View();
View(Hdl%);

n% := ChanList(DummyList%[]);
var cList%[n%+1], cList$(n%+1);
ChanList(cList%[]);

For i% := 1 to n% step 1 do
  cList$(i%) := ChanTitle$(cList%(i%));
next

old% := Val(CTL$[0]);

for i% := 1 to n% step 1 do
  j% := 0;
  found% := 0;
  repeat
    found% := InStr(CTL$[j%+1],cList$(i%));
    j% += 1;
  until found% > 0 or j% > old% + new%;
  if found% = 0 then CTL$[j%] := cList$(i%); new% += 1 endif
next

if new% > 0 then CTL$[0] := Str$(old%+new%) endif

View(cHdl%);
return new%;
end
```

8.2.2 ReadOutBinary

```
'$XCM-Read|reads data from XCM-files and produces result files

Var ViabilityCheck [5];
  ViabilityCheck [0] := 0.11; 'maximum Latency Threshold
  ViabilityCheck [1] := 2;   'minimum Peak Threshold
  ViabilityCheck [2] := 600; 'minimum event Threshold
  ViabilityCheck [3] := 1.5; 'minimum Peak/mean Quota
  ViabilityCheck [4] := 0;   'Evaluation Mode

Var PL := 0.01;           'Color Calibration
Var NL := -0.01;

Var mapChk% := 1;
Var xyChk%  := 1;
Var emfChk% := 0;
Var wmfChk% := 1;
Var stChk%  := 0;
Var xytChk% := 1;
Var NetChk% := 1;
Var NetDynChk% := 1;
Var Font$   := "Arial";
Var FSize%  := 10;
Var FStyle% := 0;
Var tForm%  := 2;
var sSelect%:= 0;
var CompRange := 10800;

View(App(3)).WindowVisible(0);

DlgMapExport();
readXMC();

Func readXMC ()

Var bHdl%, bPos%;
Var FrameStart, Channels%, HeadSize%, Sweeps%, fSize, BinWidth, IFI;
var s%, i%, j%;
Var xyHdl%, stHdl%, xyrHdl%, xytHdl%;
var preRangeStart%, postRangeStop%;

bHdl% := FileOpen("CrossCorrelationMap (XCM) |*.xcm", 9, 0, "Load Correlations");

if bHdl% < 0 then Message(Print$("Error! |%s", Error$(bHdl%))); HALT endif

BSeek(0);
BRead(Channels%, HeadSize%, Sweeps%, fSize, BinWidth, IFI); 'Read File Header

Var cList% [Channels%+1], ChList% [Channels%+1];
Var LatencyMap [Channels%+1] [Channels%+1];
Var AbundanceMap [Channels%+1] [Channels%+1];
Var MeanMap [Channels%+1] [Channels%+1];
Var PeakMap [Channels%+1] [Channels%+1];
Var TroughMap [Channels%+1] [Channels%+1];
Var ViabilityMap [Channels%+1] [Channels%+1];
Var AbsoluteMap [Channels%+1] [Channels%+1];
Var CalcMap [Channels%+1] [Channels%+1];
Var CalcMap2 [Channels%+1] [Channels%+1];

BRead(cList%, ChList%);

Var ViaCount% [Channels%+1] [Sweeps%+1];
ArrConst (ViaCount% [] [0], cList% []);
Var ChangeCount% [Channels%+1] [Sweeps%+1];
ArrConst (ChangeCount% [] [0], cList% []);

Var CXY% [Val(ChList$[0])+1] [4]; 'second Dimension: 0 = ResultChan, 1 = Spatial X Coordinate, 2 =
  Spatial Y Coordinate, 3 = Neg/Pos (0=neg 1=pos)

For i% := 1 to Val(ChList$[0]) step 1 do
  if Mid$(ChList$[i%], 2, 1) = "A" then
    CXY% [i%] [0] := cList% [i%];
  else
    CXY% [i%] [0] := cList% [i%];
    CXY% [i%] [1] := Val(Mid$(ChList$[i%], 2, 1));
    CXY% [i%] [2] := Val(Mid$(ChList$[i%], 3, 1));
    if Mid$(ChList$[i%], 4, 1) = "p" then CXY% [i%] [3] := 1 endif
    if Mid$(ChList$[i%], 4, 1) = "X" then CXY% [i%] [3] := 2 endif
  endif
next

For s% := 1 to sweeps% step 1 do

  if IFI <> 0 then 'Read Binary Data
    BSeek (HeadSize%+8*(s%-1)*6*Pow(Channels%+1, 2));
    BRead (LatencyMap, AbundanceMap, MeanMap, PeakMap, TroughMap, ViabilityMap);
  else
    BSeek (BinPos%(s%, 0, HeadSize%, Channels%));
    BRead (FrameStart, LatencyMap, AbundanceMap, MeanMap, PeakMap, TroughMap, ViabilityMap);
  endif

  if mapChk% = 1 then ' Create Map of Correlations & Abundancy
    if xyChk% + wmfChk% + emfChk% > 0 then
      xyHdl% := XYmapExport (LatencyMap, AbundanceMap, ViabilityMap, CXY%, 0);
      if xyChk% = 1 then FileSaveAs (View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_"+
        TimeCalc$(FrameStart, tForm%)+".sxy", 12); endif
    endif
  endif
endfunc

```

Anhang

```
        if wmfChk% = 1 then FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_" +
TimeCalc$(FrameStart,tForm%)+".wmf", 5); endif
        if emfChk% = 1 then FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_" +
TimeCalc$(FrameStart,tForm%)+".emf", 5); endif
        View(bHdl%);
        View(xyHdl%).FileClose(0,-1);
        yield();
    endif

    if stChk% = 1 then
        stHdl% := SigmaTxtExport (LatencyMap,AbundanceMap,ViabilityMap,ChList$[]);
        FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_" +
TimeCalc$(FrameStart,tForm%)+".txt", -1);
        View(bHdl%);
        View(stHdl%).FileClose(0,-1);
    endif
endif

if NetChk% = 1 then      'Analyze Network changes
    if IFI <> 0 then ViaCount%[0][s%] := IFI * s%; else ViaCount%[0][s%] := FrameStart endif

    For i% := 1 to Channels% step 1 do
        ArrConst(absoluteMap[][] ,ViabilityMap[][]);
        Abs(absoluteMap[][]);
        if ArrSum(absoluteMap[i%][1:]) > 0 then ViaCount%[i%][s%] := ArrSum(absoluteMap[i%][1:]) -
1; endif
    next

    if s% > 1 then
        if IFI <> 0 then
            ChangeCount%[0][s%] := IFI * s%;
            BSeek(HeadSize%+8*(s%-2)*6*Pow(Channels%+1,2)+8*5*Pow(Channels%+1,2));
            BRead(CalcMap);
        else
            ChangeCount%[0][s%] := FrameStart;
            BSeek(BinPos%(s%-1,6,HeadSize%,Channels%));
            BRead(CalcMap);
        endif

        ArrSub(CalcMap[1:][1:],ViabilityMap[1:][1:]);
        Abs(CalcMap[1:][1:]);

        For i% := 1 to Channels% step 1 do
            if ArrSum(CalcMap[i%][1:]) > 0 then ChangeCount%[i%][s%] := ArrSum(CalcMap[i%][1:]) -
1; endif
        next
    endif
endif

next

if NetChk% = 1 then      'Export Netchange results

    xyrHdl% := xyResExport%(ViaCount%[][],ChList$[],"correlations [n]");
    if xyChk% = 1 then
        FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_ViaCount"+"sxy", 12); endif
        if wmfChk% = 1 then
            FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_ViaCount"+"s.wmf", 5); endif
        if emfChk% = 1 then
            FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_ViaCount"+"s.emf", 5); endif
        View(bHdl%);
        View(xyrHdl%).FileClose(0,-1);

    if xytChk% = 1 then
        xytHdl% := xyTxtExport%(ViaCount%[][],ChList$[]);
        FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_ViaCount"+"s.txt", -1);
        View(bHdl%);
        View(xytHdl%).FileClose(0,-1);
    endif

    xyrHdl% := xyResExport%(ChangeCount%,ChList$[],"changes in correlations [n]");
    if xyChk% = 1 then
        FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_ChangeCount"+"sxy", 12); endif
        if wmfChk% = 1 then
            FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_ChangeCount"+"s.wmf", 5); endif
        if emfChk% = 1 then
            FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_ChangeCount"+"s.emf", 5); endif
        View(bHdl%);
        View(xyrHdl%).FileClose(0,-1);

    if xytChk% = 1 then
        xytHdl% := xyTxtExport%(ChangeCount%[][],ChList$[]);
        FileSaveAs(View(bHdl%).FileName$(3)+View(bHdl%).FileName$(4)+"_ChangeCount"+"s.txt", -1);
        View(bHdl%);
        View(xytHdl%).FileClose(0,-1);
    endif
endif

endif

if NetDynChk% = 1 then

    View(bHdl%);
    var NetDynTot [8][Sweeps%+1]; ' 0= timepoint, 1 = current value, 2 = sweeps for analysed frame
before, 3 = mean before, 4 = SD before, 5 = sweeps after, 6 = mean after, 7 = SD after
    var NetDynNew [8][Sweeps%+1]; ' 8= current value relative to total connections , 9 = mean
relative before, 10 = SD relative before, mean relative after, 11, SD relative after
    var NetDynBrk [8][Sweeps%+1];
    var NetDynSig [8][Sweeps%+1];

    for s% := 1 to Sweeps% step 1 do
        BSeek(BinPos%(s%,0,HeadSize%,Channels%));
        BRead(NetDynTot[0][s%]);
    endfor
endif
```

Anhang

```

NetDynNew [0] [s%] := NetDynTot [0] [s%];
NetDynBrk [0] [s%] := NetDynTot [0] [s%];
NetDynSig [0] [s%] := NetDynTot [0] [s%];
next

for s% := 1 to Sweeps% step 1 do
  BSeek (BinPos% (s%, 1, HeadSize%, Channels%));
  BRead (LatencyMap, AbundanceMap, MeanMap, PeakMap, TroughMap, ViabilityMap);

  For i% := 1 to Channels% - 1 step 1 do
    for j% := i% + 1 to Channels% step 1 do
      if CXY% [i%] [3] <= sSelect% and CXY% [j%] [3] <= sSelect% then NetDynTot [1] [s%] +=
ViabilityMap [i%] [j%] endif
    next
  next

  if s% > 1 then
    BSeek (BinPos% (s%-1, 6, HeadSize%, Channels%));
    BRead (CalcMap);
    BSeek (BinPos% (s%-1, 1, HeadSize%, Channels%));
    BRead (CalcMap2);

    For i% := 1 to Channels% - 1 step 1 do ' count new and broken correlations
      for j% := i% + 1 to Channels% step 1 do
        if CXY% [i%] [3] <= sSelect% and CXY% [j%] [3] <= sSelect% then NetDynNew [1] [s%] +=
(ViabilityMap [i%] [j%] > CalcMap [i%] [j%]) endif
        if CXY% [i%] [3] <= sSelect% and CXY% [j%] [3] <= sSelect% then NetDynBrk [1] [s%] +=
(ViabilityMap [i%] [j%] < CalcMap [i%] [j%]) endif
      next
    next

    For i% := 1 to Channels% - 1 step 1 do ' count sign changes
      for j% := i% + 1 to Channels% step 1 do
        if CXY% [i%] [3] <= sSelect% and CXY% [j%] [3] <= sSelect% then NetDynSig [1] [s%] +=
(LatencyMap [i%] [j%] < 0 XOR CalcMap2 [i%] [j%] < 0) AND ViabilityMap [i%] [j%] = 1 AND
CalcMap [i%] [j%] = 1 endif
      next
    next
  endif
next

For s% := 1 to Sweeps% step 1 do

  if s% >= 3 then
    preRangeStart% := IndexGet% (NetDynTot [0] [], (NetDynTot [0] [s%] - CompRange) * (CompRange
<= NetDynTot [0] [s%]), 1, 3);

    ArrSum (NetDynTot [1] [preRangeStart% : s% -preRangeStart%], NetDynTot [3] [s%],
NetDynTot [4] [s%]);
    NetDynTot [2] [s%] := s% -preRangeStart%;
    ArrSum (NetDynNew [1] [preRangeStart% : s% -preRangeStart%], NetDynNew [3] [s%],
NetDynNew [4] [s%]);
    NetDynNew [2] [s%] := s% -preRangeStart%;
    ArrSum (NetDynBrk [1] [preRangeStart% : s% -preRangeStart%], NetDynBrk [3] [s%],
NetDynBrk [4] [s%]);
    NetDynBrk [2] [s%] := s% -preRangeStart%;
    ArrSum (NetDynSig [1] [preRangeStart% : s% -preRangeStart%], NetDynSig [3] [s%],
NetDynSig [4] [s%]);
    NetDynSig [2] [s%] := s% -preRangeStart%;
  endif

  if s% <= Sweeps% - 2 then
    if NetDynTot [0] [s%] + CompRange < NetDynTot [0] [Sweeps%] then
      postRangeStop% := IndexGet% (NetDynTot [0] [], (NetDynTot [0] [s%] + CompRange), 1, 3);
    else postRangeStop% := Sweeps%
    endif
    if postRangeStop% < 2 then postRangeStop% := Sweeps% endif

    ArrSum (NetDynTot [1] [s%+1: postRangeStop%-s%], NetDynTot [6] [s%], NetDynTot [7] [s%]);
    NetDynTot [5] [s%] := postRangeStop%-s%;
    ArrSum (NetDynNew [1] [s%+1: postRangeStop%-s%], NetDynNew [6] [s%], NetDynNew [7] [s%]);
    NetDynNew [5] [s%] := postRangeStop%-s%;
    ArrSum (NetDynBrk [1] [s%+1: postRangeStop%-s%], NetDynBrk [6] [s%], NetDynBrk [7] [s%]);
    NetDynBrk [5] [s%] := postRangeStop%-s%;
    ArrSum (NetDynSig [1] [s%+1: postRangeStop%-s%], NetDynSig [6] [s%], NetDynSig [7] [s%]);
    NetDynSig [5] [s%] := postRangeStop%-s%;
  endif
next

var ct$ [8], TEST% [8] [Sweeps%];
ct$ [1] := "current value"; ct$ [3] := "mean before"; ct$ [4] := "SD before"; ct$ [6] := "mean
before"; ct$ [7] := "SD before";
ArrConst (Test%, NetDynTot);
xyResExport% (TEST% [], ct$, "total links");
NetDynExport (NetDynTot [0] [1:], NetDynTot [1] [1:], NetDynTot [3] [1:], NetDynTot [4] [1:], 2, "total
links");

ArrConst (Test%, NetDynBrk);
xyResExport% (TEST% [], ct$, "broken links");
NetDynExport (NetDynBrk [0] [1:], NetDynBrk [1] [1:], NetDynBrk [3] [1:], NetDynBrk [4] [1:], 2, "broken
links");

ArrConst (Test%, NetDynNew);
xyResExport% (TEST% [], ct$, "new links");
NetDynExport (NetDynNew [0] [1:], NetDynNew [1] [1:], NetDynNew [3] [1:], NetDynNew [4] [1:], 2, "new links");

ArrConst (Test%, NetDynSig);
xyResExport% (TEST% [], ct$, "sign changes");
NetDynExport (NetDynSig [0] [1:], NetDynSig [1] [1:], NetDynSig [3] [1:], NetDynSig [4] [1:], 2, "sign
changes");
endif

```

Anhang

```
return 1
end
```

```
Func XYmapExport (PrimaryMap[] [],SecondaryMap[] [],ViaMap[] [],Chan2xy%[] [],Mode%)
```

```
var Hdl%, small%,big%,CoF,Background[4][2];
ReadStr("10,89,89,10",Background[][0]);
ReadStr("-10,-10,-89,-89",Background[][1]);
small%:= 6;
big% := 8;
CoF := 0.3; 'Correction factor for positives
```

```
Hdl% := FileNew (12);
View(Hdl%);
FontSet (Font$, fSize%, fStyle%);
```

```
Colour(32,23);           'xy Background to weird pink
XYSize (1,4);           'background white   Ch1
XYColour(1,6,1);        'Colour
XYDrawMode(1,2,0);      'size
XYDrawMode(1,4,0);      'Line thickness
XYAddData(1,Background[][0],Background[][1]);
XYJoin(1,3);
```

```
XYSetChan (0,1000);     'secondary white   Ch2
XYColour(2,6,1);        'Colour
XYDrawMode(2,1,0);      'shape
XYDrawMode(2,2,big%);   'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary grey 1   Ch3
XYColour(3,5,1);        'Colour
XYDrawMode(3,1,0);      'shape
XYDrawMode(3,2,big%);   'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary grey 2   Ch4
XYColour(4,4,1);        'Colour
XYDrawMode(4,1,0);      'shape
XYDrawMode(4,2,big%);   'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary grey 3   Ch5
XYColour(5,3,1);        'Colour
XYDrawMode(5,1,0);      'shape
XYDrawMode(5,2,big%);   'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary grey 4   Ch6
XYColour(6,2,1);        'Colour
XYDrawMode(6,1,0);      'shape
XYDrawMode(6,2,big%);   'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary grey 5   Ch7
XYColour(7,1,1);        'Colour
XYDrawMode(7,1,0);      'shape
XYDrawMode(7,2,big%);   'size
XYSetChan(0,1000);     'secondary black   Ch8
XYColour(8,0,1);        'Colour
XYDrawMode(8,1,0);      'shape
XYDrawMode(8,2,big%);   'size
```

```
XYSetChan(0,1000);     'primary green   Ch9
XYColour(9,14,1);       'Colour
XYDrawMode(9,1,0);      'shape
XYDrawMode(9,2,small%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'primary red   Ch10
XYColour(10,16,1);      'Colour
XYDrawMode(10,1,0);     'shape
XYDrawMode(10,2,small%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'primary yellow Ch11
XYColour(11,18,1);      'Colour
XYDrawMode(11,1,0);     'shape
XYDrawMode(11,2,small%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'primary cyan   Ch12
XYColour(12,15,1);      'Colour
XYDrawMode(12,1,0);     'shape
XYDrawMode(12,2,small%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'primary pink   Ch13
XYColour(13,17,1);      'Colour
XYDrawMode(13,1,0);     'shape
XYDrawMode(13,2,small%); 'size
XYSetChan(0,1000);     'primary white  Ch14
XYColour(14,6,1);       'Colour
XYDrawMode(14,1,0);     'shape
XYDrawMode(14,2,small%); 'size
```

```
Var r%, s%, sL%;
```

```
For r%:= 1 to Len(PrimaryMap[0][])-2 step 1 do
  For s%:= 1 to Len(PrimaryMap[0][])-2 step 1 do
    docase
      case Chan2xy%[r%][3] = 1 or Chan2xy%[s%][3] = 1 then           'dont do positive
        case ViaMap[r%][s%] = 0 then
          XYAddData(14,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
        case ViaMap[r%][s%] > 0 then           'Excitation red / green (-/+)
          Docase
            case PrimaryMap[r%][s%] = 0 then
              XYAddData(11,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
            case PrimaryMap[r%][s%] < 0 then
              XYAddData(10,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
            case PrimaryMap[r%][s%] > 0 then
              XYAddData(9,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
```

Anhang

```

endcase

case ViaMap[r%][s%] < 0 then 'Inhibition pink / cyan (-/+)
  Docase
    case PrimaryMap[r%][s%] = 0 then
      XYAddData(11,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
      case PrimaryMap[r%][s%] < 0 then
        XYAddData(13,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
      case PrimaryMap[r%][s%] > 0 then
        XYAddData(12,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
      endcase
    endcase

    sL% := SecondaryMap[r%][s%] / ViabilityCheck[2];
    docase
      case Chan2xy%[r%][3] = 1 or Chan2xy%[s%][3] = 1 then 'dont do positive
        case sL% = 0 then XYAddData(2,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
        case sL% = 1 then XYAddData(3,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
        case sL% = 2 then XYAddData(4,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
        case sL% = 3 then XYAddData(5,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
        case sL% = 4 then XYAddData(6,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
        case sL% = 5 then XYAddData(7,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
        case sL% >= 6 then XYAddData(8,Chan2xy%[r%][1]*10+Chan2xy%[s%][1]+Chan2xy%[s%][3]*CoF,-
(Chan2xy%[r%][2]*10+Chan2xy%[s%][2]+Chan2xy%[s%][3]*CoF));
      endcase
    next
  next

XAxis(0);
YAxis(0);
XAxisMode(63);
YAxisMode(63);
XRange(10,89);
YRange(0,-89,-10);

Var Screen%[4];
System(1,1,Screen%[]);
Window(0,6,(88/(1.0*Screen%[2]/Screen%[3])),94,1,1);

return HdI%
end

Func RGB$(Value,LimitN,LimitP,Mode%)

Var SigCol$,Integer%;
docase
case Mode% = 0 then 'positive/green; negative/red; zero = yellow
  docase
    case Value = 0 then
      SigCol$ := ("@RGB(255,255,0)");
    case Value < 0 then
      SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,0,0)",Round((1-(Value / LimitN))*255));
    case value > 0 then
      SigCol$ := Print$("@RGB(0,%.0f,0)",Round((1-(Value / LimitP))*255));
    endcase
case Mode% = 1 then 'positive/cyan; negative/pink; zero = yellow
  docase
    case Value = 0 then
      SigCol$ := ("@RGB(255,255,0)");
    case Value < 0 then
      SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,0,%.0f)",Round((1-(Value / LimitN))*255),Round((1-(Value /
LimitN))*255));
    case value > 0 then
      SigCol$ := Print$("@RGB(0,%.0f,%.0f)",Round((1-(Value / LimitP))*255),Round((1-(Value /
LimitP))*255));
    endcase
case Mode% = 2 then 'greyscale white>black
  docase
    case Value < LimitN then
      SigCol$ := Print$("@RGB(255,255,255)");
    case Value > LimitN and Value < LimitP then
      if LimitN <= 0
        then Integer% := Round((Abs(LimitN)+Value) / (LimitP+Abs(LimitN))*255);
        SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,%.0f,%.0f)",Integer%,Integer%,Integer%);
      else Integer% := Round((Value-LimitN)/(LimitP-LimitN))*255;
        SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,%.0f,%.0f)",Integer%,Integer%,Integer%);
      endif
    case Value > LimitP then
      SigCol$ := Print$("@RGB(0,0,0)");
    endcase
case Mode% = 3 then 'greyscale black>white
  docase
    case Value < LimitN then
      SigCol$ := Print$("@RGB(0,0,0)");
    case Value > LimitN and Value < LimitP then
      if LimitN <= 0
        then Integer% := Round((1-(Abs(LimitN)+Value) / (LimitP+Abs(LimitN)))*255);
        SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,%.0f,%.0f)",Integer%,Integer%,Integer%);
      else Integer% := Round((1-(Value-LimitN)/(LimitP-LimitN))*255);
        SigCol$ := Print$("@RGB(%.0f,%.0f,%.0f)",Integer%,Integer%,Integer%);
      endif
    endcase

```


Anhang

```

        endif
        case Value >LimitP then
            SigCol$ := Print$("@RGB(255,255,255)");
        endcase
    endcase
endcase
return SigCol$;
end

Func SigmaTxtExport(LatencyMap[][],AbundanceMap[][],ViabilityMap[][],ChList$[])
Var TxtHdl%, c%, i%;

    TxtHdl% := FileNew(1);
    View (TxtHdl%);
    Print( "X\t");
    Print( "Y\t");
    For c% := 1 to Len(ChList$[])-1 step 1 do          'ColoumnHeader
        Print( "%s-L\t%s-E\t", ChList$(c%),ChList$(c%));
    next
    Print ("\n");

    For i% := 1 to Len(ChList$[])-1 step 1 do          '
        Print( "%d\t", Val(Mid$(ChList$(i%),2,1))-1);
        Print( "%d\t", 8-Val(Mid$(ChList$(i%),3,1)));

        For c% := 1 to Len(ChList$[])-1 step 1 do
            docase
                case ViabilityMap [c%][i%] > 0 then          'Excitation
                    Print("%s\t",RGB$(LatencyMap[c%][i%],NL,PL,0));
                case ViabilityMap [c%][i%] = 0 then          'not viable
                    Print ("@RGB(255,255,255)\t");
                case ViabilityMap [c%][i%] < 0 then          'Inhibition
                    Print("%s\t",RGB$(LatencyMap[c%][i%],NL,PL,1));
            endcase

            Print("%s\t",RGB$(AbundanceMap[c%][i%],ViabilityCheck [2],ViabilityCheck
[2]*10,2));          'events as greyscale

        next
        Print ("\n");
    next
return TxtHdl%;
end

Func xyResExport%(Data%[][],ChList$[],yText$)
Var xyrHdl%, i%, X[Len(Data%[0][])];

xyrHdl% := FileNew(12);
View (xyrHdl%);
FontSet (Font$, fSize%, fStyle%);

For i% := 1 to Len(Data%[0][]) -1 step 1 do
    X[i%]:= TimeCalc( Data%[0][i%], tForm%);
next

XTitle$(TimeLabel$(tForm%));
TimeScale(tForm%);
ChanTitle$(0,ytext$);
XUnits$("");
ChanUnits$(0,"");

Colour(32,6);
XYSetChan(1,Len(Data%[0][]) -1,1,1);          'Background set to white
XYAddData(1,X[1:],Data%[1][1:]);          'Do first channel
ChanTitle$(1,ChList$(1));

For i% := 2 to Len(Data%[0][]) -1 step 1 do          'Do other channels          '[0] ok ?
    XYSetChan(0,Len(Data%[0][]) -1,1,1);          'Create channel with appropriate size
    XYAddData(i%,X[1:],Data%[i%][1:]);          'Write data into channel
    ChanTitle$(i%,ChList$(i%));          'Change title of channel
next

For i% := 1 to Len(Data%[0][]) -1 step 1 do
    XYColour(i%,(i% mod 33)+7,1);          'Change channel color for every channel (excluding
    shades of grey & b/w)
    XYDrawMode(i%,3,(i% mod 99)/33);          'Change drawing mode every 33 Channels
next

XYDrawMode(-1,2,0);

return xyrHdl%;
end

Func DlgMapExport();
var OK%;

DlgCreate("Settings for read-out");
DlgAllow (511,0, DlgMapExportX%);

DlgCheck ( 1,"MapExport|read out correlation maps and save them in selected form");
DlgCheck ( 2,"NetChange|quantify changes in latency and save them in selected form");
DlgCheck ( 3,"SXY|save data in native Spike2-XY-files",4);
DlgCheck ( 4,"EMF|export data in enhanced metafile format",4);
DlgCheck ( 5,"WMP|export data in windows metafile format",4);
DlgCheck ( 6,"sigma|export map data as text formatted for SigmaPlot",4);
DlgCheck ( 7,"TXT|export network eeffects as spreadsheet text",4);

```

Anhang

```
DlgList      ( 8,"time format|sets the preferred time format for x-
axis", "seconds|minutes|hours|days");

OK% := DlgShow (mapChk%,NetChk%,xyChk%,emfChk%,wmfChk%,stChk%,xytChk%,tForm%);

if OK% = 0 then HALT endif

return 1;
end

Func DlgMapExportX%(item%)
docase
case item% = 0 then
  DlgValue(1,mapChk%);
  DlgValue(2,netChk%);
  DlgValue(3,xyChk%);
  DlgValue(4,emfChk%);
  DlgValue(5,wmfChk%);
  DlgValue(6,stChk%);
  DlgValue(7,xytChk%);
  DlgValue(8,tForm%);

case item% = 1 then
  docase
  case DlgValue(1) = 0 then DlgEnable(0,6);
  case DlgValue(1) = 1 then DlgEnable(1,6);
  endcase

case item% = 2 then
  docase
  case DlgValue(2) = 0 then DlgEnable(0,7);
  case DlgValue(2) = 1 then DlgEnable(1,7);
  endcase
endcase

return 1;
end

Func TimeCalc(s,mode%)
var value;

docase
case Mode% = 0 then
  value := s;
case Mode% = 1 then
  value := s/60;
case Mode% = 2 then
  value := s/3600;
case Mode% = 3 then
  value := s/86400;
endcase

return value;
end

Func TimeCalc$(s,mode%)
var Value$;

docase
case Mode% = 0 then
  value$ := Print$("%09.1f s",s);
case Mode% = 1 then
  value$ := Print$("%05d' '%02d min",s/60,s Mod 60);
case Mode% = 2 then
  value$ := Print$("%03d' '%02d h",s/3600,(s Mod 3600)/60,s mod 60);
case Mode% = 3 then
  value$ := Print$("%02d. '%02d' '%02d",s/86400,(s mod 86400)/3600,(s Mod 3600)/60,s mod 60);
endcase

return value$;
end

Func TimeLabel$(mode%)
var label$;

docase
case Mode% = 0 then
  label$ := "time [s]";
case Mode% = 1 then
  label$ := "time [min]";
case Mode% = 2 then
  label$ := "time [h]";
case Mode% = 3 then
  label$ := "time [d]";
endcase

return label$;
end

Func TimeUnit$(mode%)
var unit$;

docase
case Mode% = 0 then
  unit$ := "s";
case Mode% = 1 then
  unit$ := "min";
case Mode% = 2 then
  unit$ := "h";
case Mode% = 3 then
```

Anhang

```
    unit$ := "d";
endcase

return unit$;
end

Func TimeScale (mode%)

docase
case Mode% = 0 then
  XAxisStyle(0,6,3600);
case Mode% = 1 then
  XAxisStyle(0,6,60);
case Mode% = 2 then
  XAxisStyle(0,4,24);
case Mode% = 3 then
  XAxisStyle(0,2,1);
endcase

return 1;
end

Func xyTxtExport%(Data%[][],ChList$[])

Var xytHdl%, i%, j%, X[Len(Data%[0][])];

xytHdl% := FileNew(1,0);
View (xytHdl%);
WindowVisible(0);

Print ("%s\t",TimeLabel$(tForm%));
For j% := 1 to Len(ChList$[])-1 step 1 do
  Print ("%s\t",ChList$[j%]);
next
Print ("%s","\n");

For i% := 1 to Len(Data%[0][])-1 step 1 do
  Print ("%f\t",TimeCalc(Data%[0][i%],tform%));
  For j%:= 1 to Len(Data%[][i%])-1 step 1 do
    Print ("%f\t",Data%[j%][i%]);
  next
  Print ("%s","\n");
next

return xytHdl%;
end

Func BinPos%(Sweep%,DataSet%,HeadSize%,Channels%)      'Dataset 0:FrameStart, 1:LatencyMap,
  2:AbundanceMap, 3:MeanMap, 4:PeakMap, 5:TroughMap, 6:ViabilityMap

var Pos%;

Pos% := HeadSize%+8*(Sweep%-1)*(1+6*Pow(Channels%+1,2)) ;

if DataSet% > 0 then Pos% += 8* 8*(DataSet%-1)*Pow(Channels%+1,2) endif
return Pos%;

end

Func IndexGet%(Array[],value,start%,mode%)              '0 = ; 1 > ; 2 < ; 3 >= ; 4 <=
var index%, found%;

index% := start%;

docase
case Mode% = 0 then
  repeat
    if Array[index%] = value then
      found% := 1 ; return index% ;
    else index% += 1;
    endif
  until index% = Len(Array[]) -1 or found% = 1;
case Mode% = 1 then
  repeat
    if Array[index%] > value then
      found% := 1 ; return index% ;
    else index% += 1;
    endif
  until index% = Len(Array[]) -1 or found% = 1;
case Mode% = 2 then
  repeat
    if Array[index%] < value then
      found% := 1 ; return index% ;
    else index% += 1;
    endif
  until index% = Len(Array[]) -1 or found% = 1;
case Mode% = 3 then
  repeat
    if Array[index%] >= value then
      found% := 1 ; return index% ;
    else index% += 1;
    endif
  until index% = Len(Array[]) -1 or found% = 1;
case Mode% = 4 then
  repeat
```

Anhang

```
        if Array[index%] <= value then
            found% := 1 ; return index% ;
            else index% += 1;
        endif
    until index% = Len(Array[]) -1 or found% = 1;
endcase

if found% = 0 then return -1 endif

end

Func NetDynExport (X[], Y[], mean[], SD[], sMult, Name$)

var Hdl%, i%, L%;
var ConfArea[2][Len(x)*2];
ArrMul (SD[], sMult);

Hdl% := FileNew(12);
View (Hdl%);
FontSet (Font$, fSize%, fStyle%);

For i% := 1 to Len(X[])-1 step 1 do
    X[i%]:= TimeCalc( X[i%], tForm%);
next

ArrConst(ConfArea[0][], X[]);
ArrConst(ConfArea[1][], mean[]);
ArrAdd(ConfArea[1][], SD[]);

L% := Len(X);
For i% := 0 to L%-1 step 1 do
    ConfArea[0][L%+i%] := X[L%-1-i%];
    ConfArea[1][L%+i%] := mean[L%-1-i%]-SD[L%-1-i%];
next

XUnits$(TimeLabel$(tForm%));

TimeScale(tForm%);

Colour(32,6);                                'Background set to white

XYSetChan(1, Len(X)*2, 0, 3);
XYAddData(1, ConfArea[0][], ConfArea[1][]);
XYColour(1, 5, 2);
XYDrawMode(1, 2, 0);
ChanTitle$(1, "confidence interval");

XYSetChan(0, Len(X), 0, 1, 4);
XYAddData(2, X[], mean[]);
XYDrawMode(2, 2, 0);
XYDrawMode(2, 4, 3);
ChanTitle$(2, "mean");

XYSetChan(0, Len(X), 0, 0, 0);
XYAddData(3, X[], Y[]);
XYDrawMode(3, 1, 2);
XYDrawMode(3, 2, 5);
ChanTitle$(3, "current value");

XYDrawMode(0, 5, 1);
XYKey(1, 1);

ChanTitle$(0, Name$);
WindowTitle$(Name$);
Yrange(-1, 0, Yhigh(0));

return Hdl%;

end
```

8.2.3 mcd2smr

```
'$mcd2smr|Version 3.11, Network Support
'Version 3.11 : Source / Sink division & automatic

message ("Greetings|batch conversion script mcd2smr v3.11\automatic batch conversion");
PrintLog("Hi5\n", Date$(2,2,1,2), " - ", Time$(1,7,3,":"));
View (Loghandle());
WindowVisible (1);
Window (0,0,100,100);

var n%;
var SourcePath$;                                'Pfadname für mcd
var smrPath$;                                    'Pfadname für smr
var error%;

FilePathSet("",0,"select source path");          'Pfad auswählen
SourcePath$ := FilePath$();                      'Pfad in
SourcePath$ schreiben
FilePathSet("",0,"select destination path");      'Pfad auswählen
smrPath$ := FilePath$();                          'Pfad in smrPath$
schreiben

PrintLog ("source path: ", SourcePath$);
PrintLog ("destination path: ", smrPath$,"\n");

Yield();

while Finder$(SourcePath$,smrPath$) <> "" do
  PrintLog("reading ",Finder$(SourcePath$,smrPath$));
  Yield(0.25);
  mcd2smr(SourcePath$, smrPath$, Finder$(SourcePath$,smrPath$));
  Yield(0.5);
wend

PrintLog("\nDone\n", Date$(2,2,1,2), " - ", Time$(1,7,3,":"));

Func Finder$ (sourceF$,sinkF$);

var DoIt$, nMCD%, nSMR%, cMCD%, cSMR%, xSMR%, dummy${2};

FilePathSet(sourceF$);
nMCD% := FileList(dummy$, -1, "*.MCD");
var MCD${nMCD%};
FileList(MCD$, -1, "*.MCD");

FilePathSet(sinkF$);
nSMR% := FileList(dummy$, 0);

if nSMR% > 0 then
  var SMR${nSMR%};
  FileList(SMR$, 0);

  cMCD%:=0;
  cSMR%:=0;

  while cMCD% < nMCD% do
    cSMR%:=nSMR%-1;
    while -1 < cSMR% do
      if Left$(MCD${cMCD%}, Len(MCD${cMCD%})-3) = Left$(SMR${cSMR%}, Len(SMR${cSMR%})-3)
        then cSMR% := -1;
        DoIt$ := "";
      else cSMR% -= 1;
        DoIt$ := MCD${cMCD%};
      endif
    wend;

    if DoIt$ = ""
      then cMCD% += 1;
    else cMCD% := nMCD%;
    endif
  wend
else
  DoIt$ := MCD${0};
endif

return DoIt$;
end

Proc MCD2SMR (sourceF$,sinkF$,sourceN$);
var smrName$ ;

smrName$ := DelStr$(sourceN$,Len (sourceN$)-3,4);
FilePathSet (SourceF$);

smrName$ := FileConvert$(sourceF$ + sourceN$, sinkF$ + smrName$ + ".smr", 0, error%);

if error% = 0 then
  PrintLog (smrName$, " written");          'Feedback ins Logfile
else
  Printlog (sourceN$, " ERROR: ", Error$(error%));
endif
end;
```

Veröffentlichungen

Klisch C, Inyushkin A, Mordel J, Karnas D, Pevet P, Meissl H, 2009. Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus *in vitro*. European Journal of Neuroscience 30: 66-75.

Klisch C, Mahr S, Meissl H, 2006. Circadian activity rhythms and phase-shifting of cultured neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. Chronobiology International 23: 181-190.

Wenisch S, Trinkaus K, Hild A, Hose D, Heiss C, Alt V, Klisch C, Meissl H, Schnettler R, 2006. Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. Bone 38: 911-921.

Lebenslauf

Vorname Christopher Martin
Nachname Klisch
Geburtsdatum 12.08.1979
Geburtsort Frankfurt am Main
Familienstand ledig
Nationalität deutsch
Adresse Ziegenhainer Straße 50
60433 Frankfurt am Main



Ausbildung

- 10.2007 bis jetzt Anschlußstipendium der Max-Planck-Gesellschaft
- 09.2005 - 09.2007 Stipendium des Graduiertenkollegs „Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen, Funktionen“
- 01.03.05 Beginn der Dissertation mit dem Thema „Neuronale Netzwerke von kultivierten Uhrenzellen des hypothalamischen Suprachiasmatischen Nucleus als Modell für die intakte biologische Uhr“ am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Meissl
- 02.2005 Graduierung: Diplom der Biologie
- 05.2004 - 01.2005 Diplomarbeit mit dem Thema:
„Die biologische Uhr im Suprachiasmatischen Nucleus: Elektrophysiologische Untersuchungen circadianer neuronaler Signale im Hypothalamus“
Betreut von Prof. Dr. Peichl in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Meissl
- 04.2004 Diplom-Prüfung
- 1999 - 2004 Studium der Biologie an der Goethe-Universität Frankfurt/M
- 1990 -1999 Besuch des Gymnasiums mit Abitur: Kaiserin-Friedrich-Schule in Bad Homburg v.d.H.
- 1985 -1990 Besuch der Grundschule mit Eingangsstufe: Hölderlin-Schule in Bad Homburg v.d.H.