Aus dem Physiologischen Institut – Lehrstuhl Zelluläre Physiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Arthur Konnerth

# Entwicklungsabhängige Änderung neuronaler Kalziumsignale

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michael Noll-Hussong
aus
Homburg
2002

**dissertation.de - Verlag im Internet GmbH**
Sonderausgabe des Werkes mit der ISBN /
Special edition of the book with the ISBN: 3-89825-415-1

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. A. Konnerth |
| | Prof. Dr. B. Sutor |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. W. Lange |
| | PD Dr. Ch. Linington |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 24.01.2002 |

**dissertation.de - Verlag im Internet GmbH**
Pestalozzistr. 9
10 625 Berlin
URL: http://www.dissertation.de

## Vorbemerkungen

Die zur Erstellung der vorliegenden Dissertation verwendete Analysesoftware *FastAnalysis* steht als funktionsbeschränkte PC-Version zusammen mit einer Präsentation von *FastRecord* als Internet-Website unter *http://www.lrz-muenchen.de/~fast* zur Verfügung. Eine CD-ROM mit den Demoprogrammen sowie einer entsprechenden Dokumentation ist beim Autor erhältlich.

Das hier verwendete Bildaufnahmeprogramm *FastRecord* wurde im Wettbewerb „*Building the Future*“ von National Instruments im Oktober 1999 mit dem 3. Preis ausgezeichnet.

Teile der Arbeit wurden als Poster auf der Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2001 in Berlin präsentiert (M. Noll-Hussong, M. Meyer, A. Konnerth (2001). „*Switch in $Ca^{2+}$-signalling during early neuronal development*”. *European Journal of Physiology* 441(6): R189).

Die Veröffentlichung eines Teils dieser Arbeit ist unter dem Titel „*Switch in $Ca^{2+}$-signalling during early neuronal development*“ (Michael Noll-Hussong, Michael Meyer, Arthur Konnerth; in Vorbereitung) vorgesehen.

Ergebnisse dieser Dissertation flossen in die Arbeit „*Calbindin in cerebellar Purkinje cells is required for motor control and accurate AMPA-receptor mediated calcium signaling*” (Jaroslaw J. Barski, Jana Hartmann, Christine Rose, Karin Mörl, Michael Noll-Hussong, Arthur Konnerth, Michael Meyer) ein, welche zur Veröffentlichung in „*Cell*“ eingereicht wird.

# Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung....4
1- Entwicklung eines Softwarepaketes zur Aufnahme und Analyse von Bilddaten... 4
2- Bedeutung von intrazellulären Kalziumsignalen in der Neurophysiologie..... 6
3- Calbindin D28k als intrazellulärer Kalzium-Puffer....8
4- Die Purkinje-Zelle des Kleinhirns....12
5- Zur Fragestellung....17

II. Material und Methoden....19
1- Versuchstiere....19
2- Herstellung von Kleinhirnschnitten....19
3- Pipetten und Lösungen....20
4- Der Kalzium-Indikator Oregon Green® 488 BAPTA-2....22
5- Elektrophysiologische Versuchsanordnung....24
6- Versuchsanordnung für die schnelle konfokale Fluoreszenzmessung....25
7- Entwicklung einer Datenerfassungs- und –analysesoftware....28
7.1- Die Programmiersprache LabVIEW®....29
7.2- Entwicklung einer Aufnahme-Software (*FastRecord*)....34
7.3- Entwicklung einer Analyse-Software (*FastAnalysis*)....34
8- Datenanalyse und Statistik....36

III. Ergebnisse....38
1- Die Datenerfassungs- und -analysesoftware *FastRecord* bzw. *FastAnalysis*..... 38
1.1- Datenerfassung mit *FastRecord*....38
1.2- Datenanalyse mit *FastAnalysis*....41
1.3- Zusammenfassung der Software-Ergebnisse....44
2- Versuche zum Entwicklungsprofil von Kalziumsignalen in der Purkinje-Zelle des Kleinhirns....45
2.1- Kalzium-Transienten in verschiedenen Zellkompartimenten bei Ratten.....46
2.2- Kalzium-Transienten bei Mäusen....54
2.3- Kalzium-Transienten bei Calbindin D28k defizienten Mäusen ....56
2.4- Zusammenfassung der experimentellen Befunde....58

IV. Diskussion.....60
1- Erfolgreicher Einsatz eines neuen Software-Paketes zur Aufnahme und Analyse von Kalzium-Fluoreszenzdaten.....60
2- Bedeutung der ontogenetisch differentiellen Kalzium-Pufferung in der Maturation des Neurons.....62
3- Schlußfolgerung.....70

V. Zusammenfassung.....71

VI. Literaturverzeichnis.....72

Anhang.....88
- Danksagungen.....88
- Lebenslauf.....89

# I. Einleitung

Gegenstand vorliegender Arbeit sind Untersuchungen zu Aktionspotential-induzierten Kalzium-Signalen in unreifen Neuronen. In Widerspiegelung des hierzu gewählten zweigleisigen Vorgehens ist diese Dissertation in zwei Teile gegliedert: Im ersten Abschnitt wird die Entwicklung eines Softwarepaketes beschrieben, mit dem die Aufnahme und Analyse des für diese Arbeit relevanten Bilddatenteils erfolgte. Im zweiten Abschnitt wurden dann unter Anwendung dieser Software Experimente in heranreifenden Purkinje-Neuronen des Kleinhirns (Zerebellum) von Ratten und Mäusen durchgeführt. Besonderes Augenmerk galt in diesem Zusammenhang dem maturationsbedingt unterschiedlichen Grad der Ausprägung von intrazellulären Kalzium-Signalen infolge der Evozierung von somatischen Aktionspotentialen. Darauf aufbauend wurden Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung des intrazellulären Kalzium-Puffers Calbindin D28k (Calbindin) und dessen Rolle für das zeitliche wie räumliche Profil dieser Kalziumsignale durchgeführt.

## I.1 Entwicklung eines Softwarepaketes zur Aufnahme und Analyse von Bilddaten

Die Aufnahme und Auswertung von (konfokalen), zeitlich wie räumlich hochauflösenden Bilddaten ist ohne die Hilfe von leistungsfähigen Computern nicht mehr denkbar (Inoue and Gliksman 1998). Dabei wird zum einen auf kommerziell erhältliche eigenständige (z.B. *Image-Pro® Plus* von *Media Cybernetics®*, z.B. (Ruehlmann, Lee et al. 2000)) oder die Software des jeweils verwendeten Aufnahmesystems zurückgegriffen (z.B. auf die *FluoView®*-Software von *Olympus®*, z.B. (Majewska, Yiu et al. 2000; Reynaud, Nogueira et al. 2001)). Zum anderen werden über das Internet frei verfügliche *Public Domain*-Programme wie *NIH-Image®* (http://rsb.info.nih.gov/nih-image/, z.B. (Hiscock, Murphy et al. 2000)) und dessen Derivate (*Scion Image®*, z.B. (Hortovanyi, Varbiro et al. 2001) oder *Image/J®*) bzw. selbsterstellte Softwarelösungen (z.B. (Kriete and Schwebel 1996; Kaufman 1998)) eingesetzt. Zur präsentationsgerechten Aufbereitung von Bilddaten werden zumeist

kommerziell verfügbare Softwarepakete wie *Adobe® Photoshop®* (z.B. (Paddock, Hazen et al. 1997; Brunner, Krummenauer et al. 2000)) verwendet.

Ein maßgebliches Argument für den Kauf eines bestimmten konfokalen Mikroskopiersystems ist die Art der Software, z.B. in Hinsicht auf Bedienfreundlichkeit, welche für die *online*-Aufnahme und *offline*-Analyse eingesetzt wird (Steyger 1999). Dabei wird immer wieder deutlich, daß kommerzielle Lösungen in ihrem Funktionsumfang (z.B. Aufnahmegeschwindigkeit) oder ihrer Benutzerführung wissenschaftlichen Fragestellungen nicht in adäquater Weise gerecht werden, oftmals sehr teuer sind und nur eine überaus eingeschränkte Möglichkeit der Modifizierung von monolithischen Programmstrukturen erlauben. Eine Einsicht in die zugrundeliegenden Algorithmen wird vom Hersteller aus regelmäßig verwehrt, so daß keine oder nur eine sehr aufwendige Kontrolle der Richtigkeit der erzielten Ergebnisse möglich ist. Wünsche nach Implementierung von neuen Programmfunktionalitäten werden, wenn überhaupt und kommerziell interessant, nur mit sehr langen Entwicklungszeiten realisiert. Der Schutz vieler Software-Produkte durch Kopierschutzeinrichtungen, wie z.B. *Dongles* (Hardware-Modul, welches oft auf die Parallelschnittstelle eines PCs gesteckt wird und ohne welches eine Software nicht gestartet werden kann), macht den Einsatz dieser Programme, neben den lizenzrechtlichen Fragestellungen, nur auf einem Computer zu einem bestimmten Zeitpunkt möglich. So wird z.B. im Falle des *FluoView®*-Systems ein Rechner, der eigentlich für experimentelle Aufgaben vorgesehen ist, mit Analyseaufgaben belegt und steht so regelmäßig nicht für den wissenschaftlichen Versuch zur Verfügung. Bei der Bearbeitung einer wissenschaftlichen Fragestellung mit Hilfe mehrerer Computersysteme stört neben der stets uneinheitlichen Bedienbarkeit der verschiedenen Programme vor allem die Inkompatibilitäten in den verwendeten Daten- bzw. Dateiformaten. Darüberhinaus fällt gerade bei kommerziellen Lösungen auf, daß ausschließlich eine bestimmte Hardware unterstützt wird – oft die des gleichnamigen Software-Anbieters – und so der Zugriff auf andere Hardware-Komponenten, wenn überhaupt, dann nur unter einem immensen Arbeits- und Zeitaufwand möglich ist, wobei auf Unterstützung von Seiten des Software-Herstellers häufig ganz verzichtet werden muß.

Alle diese Einschränkungen hinsichtlich der auf dem Markt verfügbaren Softwarelösungen gaben Anlaß zur Entwicklung der für diese Arbeit verwendeten Aufnahme- und Analysesoftware. Diese wurde unter der Programmiersprache

LabVIEW® und Beachtung eines guten Softwaredesigns (Christ 1994; Chevlin and Jorgens 1996) erstellt. Dabei wurden von Grund auf alle Algorithmen des Aufnahme- und Auswerteprozesses in modularer Weise neu programmiert, um, nicht zuletzt bei Weiterentwicklungsbedarf, stets Zugriff auf alle Programmkomponenten zu haben. Von besonderem Vorteil war es dabei, daß die elektrophysiologische mit der Bilddaten-Erfassung in einer Anwendung simultan verschränkt werden konnte. Die dabei anfallenden Echtzeitdaten werden bei Bedarf *online* analysiert und gleichzeitig verlustfrei dauerhaft gespeichert. So konnte ein PC-basiertes Softwarepaket entwickelt werden, welches mit seinen Komponenten *FastRecord* und *FastAnalysis* zwei sich bis heute stets in Weiterentwicklung befindliche und beliebig ausbaufähige Programme enthält. Hinsichtlich Ausführungsgeschwindigkeit, Funktionsumfang, Bedienungsführung und Offenheit für Hardware unterschiedlichster Hersteller stellt diese Software somit eine nicht nur für vorliegende Fragestellung adäquate und preiswerte Alternative zu allen bisher erhältlichen Programmen zur Verfügung.

## I.2 Bedeutung von intrazellulären Kalziumsignalen in der Neurophysiologie

Kalzium (Ca) ist eines der wichtigsten *second-messenger*-Moleküle der eukaryotischen Zelle (Abbildung 1).

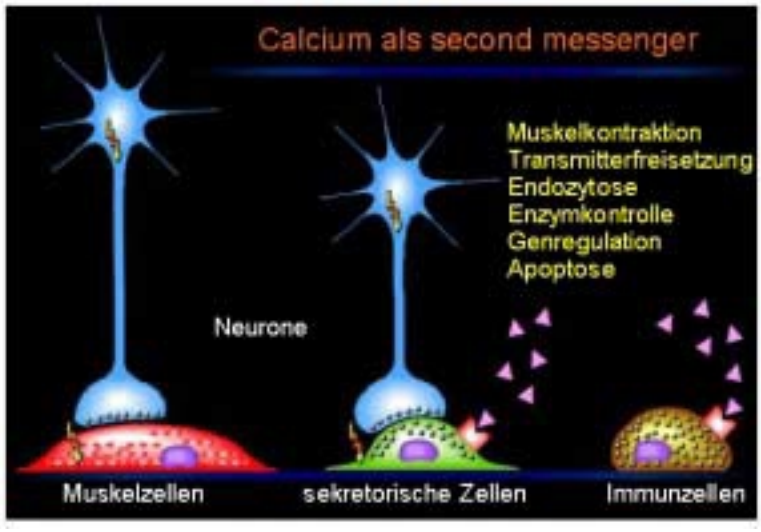


Abbildung 1: Kalzium als *second messenger* in verschiedenen eukaryotischen Zellen. Seine vielfältigen Bedeutungen für exemplarische Zellfunktionen sind in der Zeichnung wiedergegeben (nach Penner; http://lcms.biomed.hawaii.edu/)

In der Purkinje-Zelle (PC) des Kleinhirns ist Kalzium beispielsweise an der regelrechten synaptischen Übertragung via Parallel- und Kletterfasern (Eilers, Augustine et al. 1995; Eilers, Callewaert et al. 1995) und der Kontrolle der Erregbarkeit (Llinas and Sugimori 1980; Hounsgaard and Midtgaard 1989; Köhr, Lambert et al. 1991) beteiligt. Weiterhin spielt es bei der Induktion von Langzeitveränderungen im Sinne von Veränderungen der Effektivität von exzitatorischen (Konnerth, Dreessen et al. 1992) und inhibitorischen Synapsen (Kano, Rexhausen et al. 1992) eine Rolle. Die intrazelluläre freie Kalzium-Konzentration beträgt unter physiologischen Bedingungen im neuronalen Ruhezustand weniger als $10^{-7}$ M, während sie im Extrazellulärraum normalerweise um wenigstens einen Faktor 1000 höher liegt (pCa<3).

Am wichtigsten für die Aufrechterhaltung dieses Kalzium-Gradienten sind zwei Proteine, welche Kalzium aus dem Intra- in den Extrazellulärraum translozieren: eine Kalzium-Pumpe (ATPase) und ein $Na^+/Ca^{2+}$-Austauscher, welcher intrazelluläres Kalzium im Gegenstrom zum einströmenden Natrium aus der Zelle transportiert (Carafoli 1991; Carafoli 1991; Augustine and Neher 1992; Neher 1992). Zusätzlich zu diesen Plasmamembran-ständigen Mechanismen wird Kalzium auch in das endoplasmatische Retikulum (ER) sowie in die Mitochondrien gepumpt. Auf diese Art und Weise können diese Zellorganellen somit als Kalzium-Speicher dienen, welche am Kalzium-Signalverhalten einer Zelle teilnehmen. Schließlich verfügen Nervenzellen über Kalzium-bindende Proteine, wie z.B. Calbindin, welches, wie auch im folgenden gezeigt werden kann, als Kalzium-Puffer dient. Diese Puffer sind in der Lage, Kalzium reversibel zu binden und damit die Größe und Kinetik eines intrazellulären Kalzium-Signals zu modifizieren (Heizmann and Hunziker 1991; Heizmann 1992).

Die Kalzium-Ionen, die als intrazelluläre sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) fungieren, gelangen durch einen oder mehrere Typen von Kalzium-permeablen Ionenkanälen in die Zelle. Dabei kann es sich sowohl um spannungsgesteuerte (*voltage gated*) oder ligandenkontrollierte (*ligand gated*) Kanäle in der Plasmamembran handeln, welche den Kalzium-Einstrom entlang des Kalzium-Gradienten vom Extra- in den Intrazellulärraum ermöglichen. Zusätzlich ermöglichen andere Kanäle, daß Kalzium aus dem ER in das Zytosol freigesetzt werden kann. Diese intrazellulären Kalzium-Kanäle sind in dem Sinne kontrolliert, daß sie auf verschiedene intrazelluläre Signale hin schließen oder öffnen. So besitzt z.B. einer

dieser Kanäle einen Inositol-Triphosphat ($IP_3$) Rezeptor, ein anderer einen Ryanodin-Rezeptor. Diese verschiedenen Mechanismen der intrazellulären Kalzium-Homöostase erlauben eine genaue Kontrolle des Zeitverlaufs und der Lokalisation von Kalzium-Signalen in der Zelle, welche es wiederum ermöglicht, daß Kalzium eine Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden kontrolliert. So erlaubt z.B. die durch spannungsgesteuerte Kalzium-Kanäle auf ein eintreffendes Aktionspotential hin vermittelte Kalzium-Antwort in der präsynaptischen Endigung letztlich die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der Plasmamembran und so die Freisetzung von Neurotransmitter(n). Langsamere und intrazellulär verteiltere Anstiege der Kalzium-Konzentration regulieren eine Vielzahl weiterer Zellantworten, einschließlich der Genexpression im Zellkern (Bito, Deisseroth et al. 1997).

## I.3 Calbindin D28k als intrazellulärer Kalzium-Puffer

Calbindin D28k gehört mit Calbindin D9k, Calmodulin, Parvalbumin, Troponin C und S100 Protein zu einer Familie von Kalzium-bindenden Proteinen mit einer hohen Affinität für Kalzium ($K_d=10^{-8}$-$10^{-9}$ M) (Van Eldik, Zendegui et al. 1982). Seine molekulare Masse beträgt 28 kDalton. Ein gemeinsames strukturelles Merkmal dieser Proteine ist das Vorhandensein einer oktaedrischen Kalzium-bindenden Struktur, welche durch eine *Helix-Loop-Helix*-Anordnung der Polypeptidkette im Sinne einer sog. EF-Hand erzeugt wird (Christakos, Gabrielides et al. 1989). Calbindin D28k besitzt 6 solcher EF Hände, wobei aber nur 4 hiervon die Anzahl und Position von sauerstofftragenden Aminosäuren besitzen, welche zur selektiv - hochaffinen Kalziumbindung notwendig sind (Hunziker 1986; Hunziker and Schrickel 1988).

Erstmals 1966 durch Wasserman und Taylor als Vitamin D – abhängiges Kalzium-bindendes Protein in der intestinalen Mukosa von Hühnern beschrieben (Wasserman and Taylor 1966; Taylor and Wasserman 1967), ließ sich Calbindin später in einer Vielzahl anderer Spezies wie Nagern, Schweinen (Hitchman, Kerr et al. 1973; Arnold, Kuttner et al. 1975; Arnold, Kuttner et al. 1975), Kühen, Pferden, Meerschweinchen (Fullmer and Wasserman 1975), Neuweltaffen (Wasserman and Taylor 1971), Menschen (Alpers, Lee et al. 1972) sowie anderen Vertebraten (Alpers, Lee et al. 1972) und Geweben wie Niere (Hermsdorf and Bronner 1975; Intrator,

Elion et al. 1985; Mounier, Hinglais et al. 1987), Knochen (Christakos and Norman 1978), Pankreas (Morrissey, Bucci et al. 1975), Plazenta (Bruns, Fausto et al. 1978; Bruns, Wallshein et al. 1982) und Gehirn (Jande, Maler et al. 1981; Baimbridge, Miller et al. 1982; Feldman and Christakos 1983) nachweisen. Wiewohl nun das intestinale und renale Calbindin als Vitamin-D-abhängig induzierbar beschrieben sind, ist zerebelläres Calbindin D28k unempfänglich gegenüber Vitamin D - Depletion (Sonnenberg, Pansini et al. 1984; Schneeberger, Norman et al. 1985; Sonnenberg, Luine et al. 1986; Varghese, Lee et al. 1988). Phylogenetische Studien weisen hierbei darauf hin, daß Calbindin zuerst als neuronales Protein in der Evolution auftrat und sein Vorhandensein in anderen Geweben mit der Entwicklung höherer Spezies einherging (Parmentier, Ghysens et al. 1987; Christakos, Gabrielides et al. 1989).

Calbindin stellt zwischen 0,1 bis 1,5 % des gesamten löslichen Proteins im Gehirn dar. Das Protein läßt sich primär in Neuronen und einigen ependymalen Zellen nachweisen und ist in Gliazellen nicht vorhanden. Immunoreaktiv läßt sich Calbindin dabei in allen Teilen des Neurons nachweisen, so im Zellsoma, den proximalen Dendriten, dem Axon und den terminalen Zellfortsätzen. Auf diese Art und Weise ist Calbindin in der Lage, die Kalziumkonzentration im gesamten Neuron zu regulieren (Christakos, Gabrielides et al. 1989).

Die höchste Konzentration von Calbindin D28k findet sich im Zerebellum mit 1 bis 2 % des gesamten löslichen Proteins, wobei es sich hier ausschließlich in Purkinje-Zellen finden läßt (Jande, Maler et al. 1981; Baimbridge and Miller 1982; Legrand, Thomasset et al. 1983; Enderlin, Norman et al. 1987). Ontogenetisch tritt Calbindin D28k im Zerebellum am 17. Tag der embryonalen Entwicklung (Thomasset, Rabie et al. 1984) auf, was seine besondere Bedeutung für die Maturation der Purkinje-Zelle nahe legt (Wassef, Zanetta et al. 1985). Ultrastrukturelle Studien haben gezeigt, daß Calbindin D28k vornehmlich im Soma verteilt vorliegen soll (Pasteels, Pochet et al. 1986). Nichtsdestotrotz läßt es sich auch im Dendriten, im Axon (Christakos, Gabrielides et al. 1989; Celio 1990) und auch im Nukleus, nicht aber im Nukleolus (German, Ng et al. 1997), nachweisen. German et al. wiesen im Gegensatz zu Pasteels et al. (Pasteels, Pochet et al. 1986) ausdrücklich darauf hin, daß es Purkinje Zellen gibt, in denen sich Calbindin immunzytochemisch ausschließlich im Nukleus und in zumindest gleichen oder höheren Konzentrationen als im Zytoplasma nachweisen läßt (Winsky and Kuznicki 1995; German, Ng et al. 1997). Die Verteilung

von Calbindin D28k im gesamten Zellkörper weist darauf hin, daß Calbindin als ein Puffer-System funktionieren könnte, welches Nervenzellen vor exzessiv hohen Kalziumspiegeln zu schützen vermag (Baimbridge, Miller et al. 1982). Daten an PC12-Zellen zeigen, daß Calbindin Kalzium aus extrazellulären Quellen puffert, nicht jedoch Kalzium aus intrazellulären Speichern (McMahon, Wong et al. 1998). Der Mechanismus, wie Calbindin die intrazelluläre Kalzium-Homöosstase modifiziert, ist unbekannt. Es wurde vorgeschlagen, daß Calbindin die Kalzium-Pumpen stimuliert und dadurch die aktive Kalzium-Extrusion erleichtert (Morgan, Welton et al. 1986; Reisner, Christakos et al. 1992), die Aktivität der Kalzium-Kanäle beeinflußt (Köhr, Lambert et al. 1991; Köhr and Mody 1991), Enzyme aktiviert (Reisner, Christakos et al. 1992) und die intrazelluläre Kalziumdiffusion erleichtert (Feher 1983). Darüberhinaus spielt das Vorhandensein von Calbindin D28k in den synaptischen Terminalen auch eine Rolle bei der synaptischen Übertragung (Christakos, Gabrielides et al. 1989). Eingehend diskutiert wird auch die Rolle von Calbindin für Kalziumsignale im Nukleus (Bito, Deisseroth et al. 1997), z.B. im Sinne Kalzium-abhängiger CREB-Phosphorylierung (Sheng, McFadden et al. 1990), wo es die Genexpression regulieren und damit die gesamte Zellfunktion – so nicht zuletzt auch die Kalzium-Pufferung - entscheidend beeinflussen könnte (German, Ng et al. 1997; McMahon, Wong et al. 1998).

Molekularbiologische Untersuchungen an Mäusen und Ratten zeigten, daß der Gipfel der Calbindin D28k – Genexpression einhergeht mit der Synaptogenese der Purkinje-Zellen in der zweiten postnatalen Woche (Thomasset, Parkes et al. 1982; Thomasset, Rabie et al. 1984; Wassef, Zanetta et al. 1985). Zwischen dem 30. und 70. Tag scheint der Calbindin-Spiegel in Ratten relativ konstant zu bleiben. Das alternde Kleinhirn zeigt einen signifikanten Purkinje-Zell-Verlust (Terry 1980; Rogers, Zornetzer et al. 1981; Greenough, McDonald et al. 1986), wobei der Mechanismus hierfür unbekannt ist, ein Rückgang der Calbindin D28k-Genexpression in den betroffenen Zellen jedoch auffällig ist (z.B. beim Menschen 50-88 %) (Iacopino and Christakos 1990). Im Kleinhirn der Ratte läßt sich im Radioimmunassay ein Calbindin-Rückgang ab der 30. postnatalen Woche nachweisen (Thomasset, Rabie et al. 1984).

Es ist weiterhin bekannt, daß die Erhöhung von freiem zytosolischen Kalzium mit einer Destruktion des neuronalen Zytoskeletts (Gilbert and Newby 1975), dem Zusammenbruch der Zellmembran (Farber 1981), der Produktion von Superoxid-

Radikalen (Flicker, Dean et al. 1983), sowie der Entstehung von Plaques und Fibrillen (Metuzals, Pant et al. 1988), welche gerade bei neurodegenerativen Erkrankungen gesehen werden, einhergeht. Die schädigende Wirkung von Kalzium beruht dabei auf Kalzium-aktivierten katabolischen Enzymen (Proteasen, Lipasen) (Farber 1981; Choi 1988), Chromatinabbau (Farber 1981) oder Störungen im Betriebsstoffwechsel der Zelle (Choi 1988). Von klinischem Interesse ist so nicht zuletzt der potentiell neuroprotektive Effekt von Calbindin (Scharfman and Schwartzkroin 1989; Sloviter 1989; Mattson, Rychlik et al. 1991; Iacopino, Christakos et al. 1992; Lledo, Somasundaram et al. 1992; Cheng, Christakos et al. 1994; McMahon, Wong et al. 1998), welchen dieses einerseits in wahrscheinlich nicht-konzentrationsabhängiger Weise mit anderen Kalzium-bindenden Proteinen wie Calretinin teilt (Isaacs, Wolpoe et al. 2000). Andererseits scheint dieser Effekt auf wenige Kalzium-bindende Proteine beschränkt zu sein, da z.B. Parvalbumin enthaltende Zellen keinen diesbezüglichen Überlebensvorteil zu haben scheinen (Iacopino, Christakos et al. 1992). Vergleicht man erkranktes Hirngewebe mit einer alters- und geschlechtsadäquaten Kontrollgruppe, so fällt auf, daß bei neurodegenerativen Erkrankungen Calbindin wie die entsprechende mRNA reduziert sind in der Substantia nigra beim Morbus Parkinson, im Corpus striatum beim Morbus Huntington, im Nucleus basalis bei Morbus Alzheimer und im Hippocampus (Maguire-Zeiss, Li et al. 1995) sowie im Nucleus raphe dorsalis bei Parkinsonscher, Huntingtonscher und Alzheimerscher Krankheit (Iacopino and Christakos 1990; Heizmann 1992; Heizmann and Braun 1992). Die Genexpression von Calbindin scheint nun spezifisch in den Hirnarealen aufzutreten, welche partiell durch Alterseffekte sowie auch jeder der genannten Krankheiten betroffen sind. Diese Ergebnisse suggerieren, daß eine erniedrigte Calbindin-Genexpression zu einem Versagen der Kalziumpufferung oder intraneuronalen Kalziumhomöostase führen könnte, welche dann wieder zu Kalzium-vermittelten zytotoxischen Schädigungen während des Alterns wie in der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten hinleiten könnten (Scharfman and Schwartzkroin 1989; Iacopino and Christakos 1990). Ebenso wurde ein neuroprotektiver Effekt von Kalzium-bindenden Proteinen bei Epilepsien (Lowenstein, Miles et al. 1991; Sonnenberg, Frantz et al. 1991) und Ischämien (Johansen, Tonder et al. 1990) beschrieben. Demgegenüber liegen aber auch Publikationen vor, die einen neuroprotektiven Effekt von Calbindin D28k verneinen, z.B. im Hippocampus unter ischämischen Bedingungen (Klapstein, Vietla

et al. 1998) sowie in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns unter toxischen Bedingungen (Airaksinen, Thoenen et al. 1997).
Inzwischen sind gentechnisch modifizierte Calbindin D28k defiziente Mäuse verfügbar, welche sich durch Kleinhirnzeichen (Thompson and Day 1993) wie kinetischer Tremor, Ataxie sowie neurophysiologisch durch ein verändertes dendritisches Kalziumsignalverhalten in Purkinje-Zellen im Sinne einer höheren Amplitude der postsynaptisch evozierten Kalziumtransienten mit schneller Zeitkonstante bei den Mutanten gegenüber den Wildtyp-Mäusen auszeichnen (Airaksinen, Eilers et al. 1997). Abgesehen von motorischen Defiziten entwickeln sich die Calbindin-Mutanten ohne Hinweis auf einen gestörten Kalzium-Metabolismus normal, was ein Hinweis darauf sein könnte, daß die gestörte Calbindin D28k – Expression in verschiedenen peripheren Organen (Christakos, Gabrielides et al. 1989) für die generelle Entwicklung nicht von einschneidender Bedeutung ist oder durch andere Mechanismen kompensiert wird (Celio 1990). Die Klärung der stets diskutierten Rolle von Parvalbumin (Endo, Takazawa et al. 1986; Kosaka, Kosaka et al. 1993) in oben genannten Prozessen bleibt weiteren Studien vorbehalten – eine Redundanz beider Systeme scheint jedoch nicht zu bestehen (Hubbard and McHugh 1995; Winsky and Kuznicki 1995). Die Hörfunktion wird in den normalerweise an Calbindin D28k reichen Haarzellen des Innenohres in den Mutanten ebenso wenig beeinträchtigt gefunden wie ein verminderter Schutz vor Schalltraumen (Airaksinen, Virkkala et al. 2000). In morphometrischen Studien fällt auf, daß vor allem die Länge dendritischer *Spines* in Purkinje-Zellen in Calbindin D28k defizienten Tieren geringfügig größer ist als in Wildtyp-Tieren, was als Hinweis auf morphologische Kompensationsmechanismen gewertet wird (Vecellio, Schwaller et al. 2000).
Beim Menschen ist die Geninformation für Calbindin D28k auf Chromosom 8 in der Region q21.3-q22.1 (Parmentier, De Vijlder et al. 1989; Heizmann 1992) codiert.

## I.4 Die Purkinje-Zelle des Kleinhirns

Das Kleinhirn von Säugetieren zeigt eine gefaltete Struktur (Dudel, Menzel et al. 1996). Makroskopisch gliedert es sich in drei Hauptanteile, welche auch einer besonderen Funktion vorbehalten sind: 1. Vermis: Steuerung der Stützmotorik (Haltung, Tonus, Körpergleichgewicht); 2. Partes intermediae: Koordination von

Stütz- und Zielmotorik; 3. Hemisphären: Steuerung schneller (gelernter, ballistischer) Zielmotorik. Zusätzlich 1 und 2: Mitkontrolle der Okulomotorik (Schmidt 1992).
Die Mittelteile des Kleinhirns (Vermis, Flocculus, Nodulus, Pars intermedia) erhalten Afferenzen aus dem somatosensorischen, vestibulären und visuellen System, Efferenzen ziehen direkt zu motorischen Zentren im Hirnstamm und im Rückenmark. Die Kleinhirnhemisphären erhalten Zuflüsse aus dem sensomotorischen assoziativen Kortex, Efferenzen ziehen zum motorischen Thalamus und damit zum Motorkortex. Alle Eingänge des gesamten Zerebellums ziehen zur Kleinhirnrinde und sind immer doppelt als Moos- und als Kletterfasern angelegt, deren genaue funktionelle Bedeutung noch unklar ist. Einziger Ausgang aus der Kleinhirnrinde sind die Axone der Purkinje-Zellen, die ausschließlich hemmende Synapsen unter Verwendung des Neurotransmitters GABA auf Neuronen der Kleinhirnkerne bilden (Modulation der Motorik durch Zu- und Abnahme der Hemmung).
Funktionell erhalten die mittelständigen Anteile des Kleinhirns eine Efferenzkopie von Kommandosignalen, die von den motorischen Zentren über absteigende motorische Bahnen zum Rückenmark übermittelt werden. Andererseits erhält das Kleinhirn auch eine sensorische Afferenzkopie über Kollateralen von aufsteigenden Bahnen.
Eine Hypothese besagt, daß das Zerebellum aus dem Vergleich der zwei Eingänge Abweichungen vom Sollwert (Fehler) berechnen kann. Über rückläufige Verbindungen zu den motorischen Zentren können somit laufend Korrekturen am motorischen Programm vorgenommen werden, wenn einmal eine Bewegung in Gang gesetzt ist. Bei Schädigungen des Kleinhirns können je nach Lokalisation Asynergie, Tremor, Hypotonus, Nystagmus und Sprachstörungen auftreten. Läsionen der Kleinhirnkerne erzeugen insgesamt schwerere Symptome als solche in der Kleinhirnrinde.

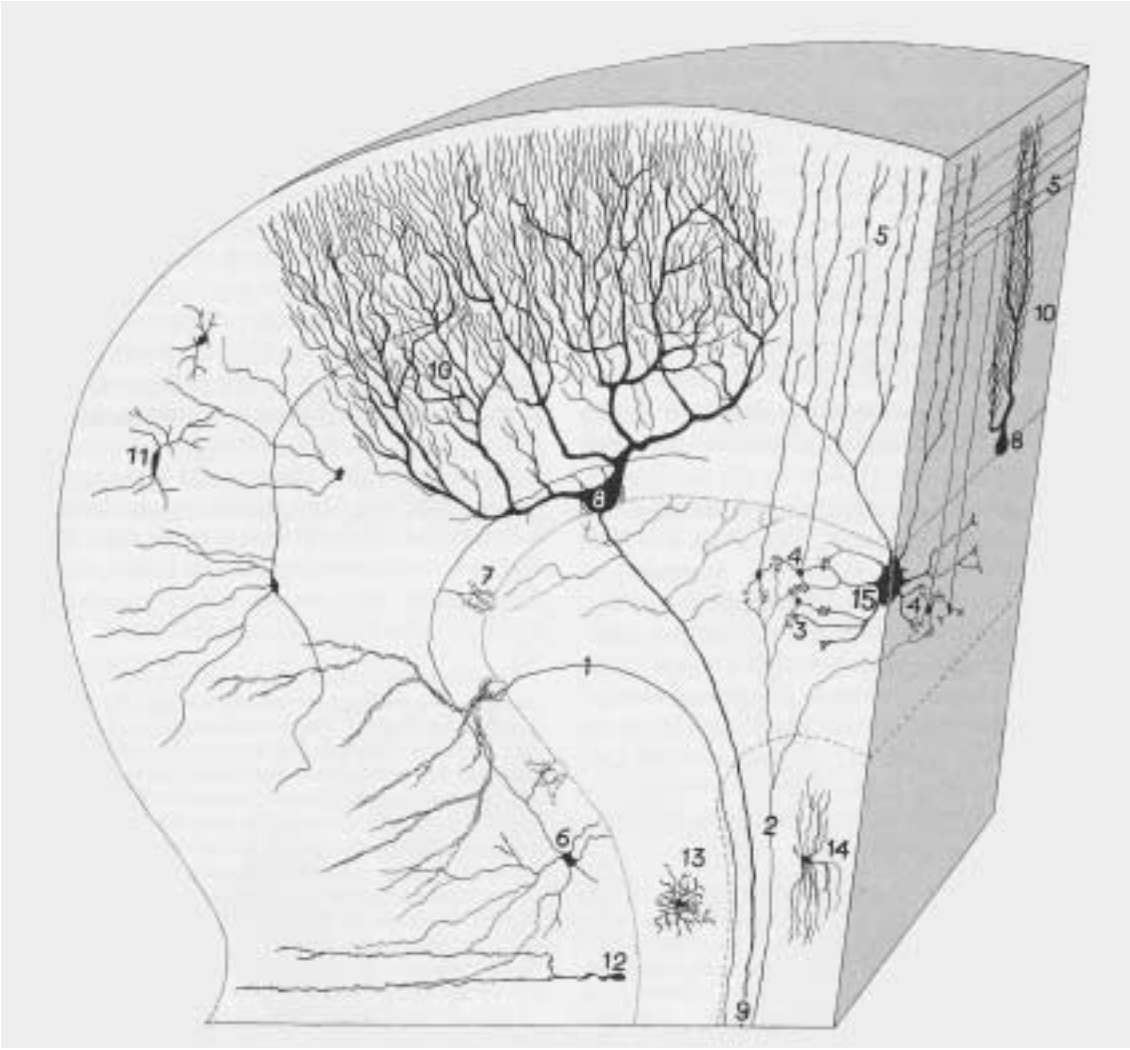


Abbildung 2: Aufbau der Kleinhirnrinde. Diese besteht aus insgesamt drei Schichten, die insgesamt fünf Typen von Neuronen enthalten. Ihr allgemeiner Bauplan ist in einem Vertikalschnitt durch ein einzelnes Kleinhirnfolium veranschaulicht, sowohl in der Longitudinal- als auch in der Transversalebene. (1) Kletterfaser, (2) Moosfaser, (3) Parenchyminsel, (4) kleine Körnerzelle, (5) Parallelfasern, (6) Korbzelle, (7) Fibrillenkorb um den Körper einer Purkinje-Zelle (8), (9) Neurit, (10) Dendritenverästelung einer Purkinje-Zelle, (11) äußere Sternzelle in der Molekularschicht, (12) Bergmannsche Stützzelle, (13) Kurzstrahler in der Körnerschicht und (14) Langstrahler im Mark (Astrozyten), (15) Golgi-Zelle. (aus (Bucher und Wartenberg 1989)).

Die für die Kleinhirnrinde (Abbildung 2) charakteristischen Purkinje-Zellen (Abbildung 3) besitzen im Stratum ganglionare gelegene, meistens pigmentfreie, mehr oder weniger birnenförmige Zellkörper, die beim adulten Menschen einen Querdurchmesser von durchschnittlich 44 μm, bei der Ratte von 16 μm und bei der Maus von 19 μm haben (Friede 1963). Aus ihnen gehen gegen die Körnerschicht je ein Neurit und gegen die Molekularschicht je ein bis zwei – seltener drei – kräftige Dendriten hervor. Diese verzweigen sich spalierbaumartig und bilden ein bis zur Hirnoberfläche reichendes, dichtes, mit *Spines* (Spinulae dendriticae) versehenes Astwerk, dessen Ebene zur Längsrichtung der Kleinhirnwindung senkrecht steht. Die

Neuriten erhalten noch innerhalb des Stratum granulosum eine Markscheide und enden größtenteils als kortikonukleäre Fasern in den zentralen Kleinhirnkernen. Die in der Körnerschicht von den Neuriten abgehenden, ebenfalls markhaltigen rückläufigen Kollateralen verzweigen sich, bilden die Plexus supra- und infraganglionaris und enden schließlich mit Synapsen an anderen Purkinje-Zellen.

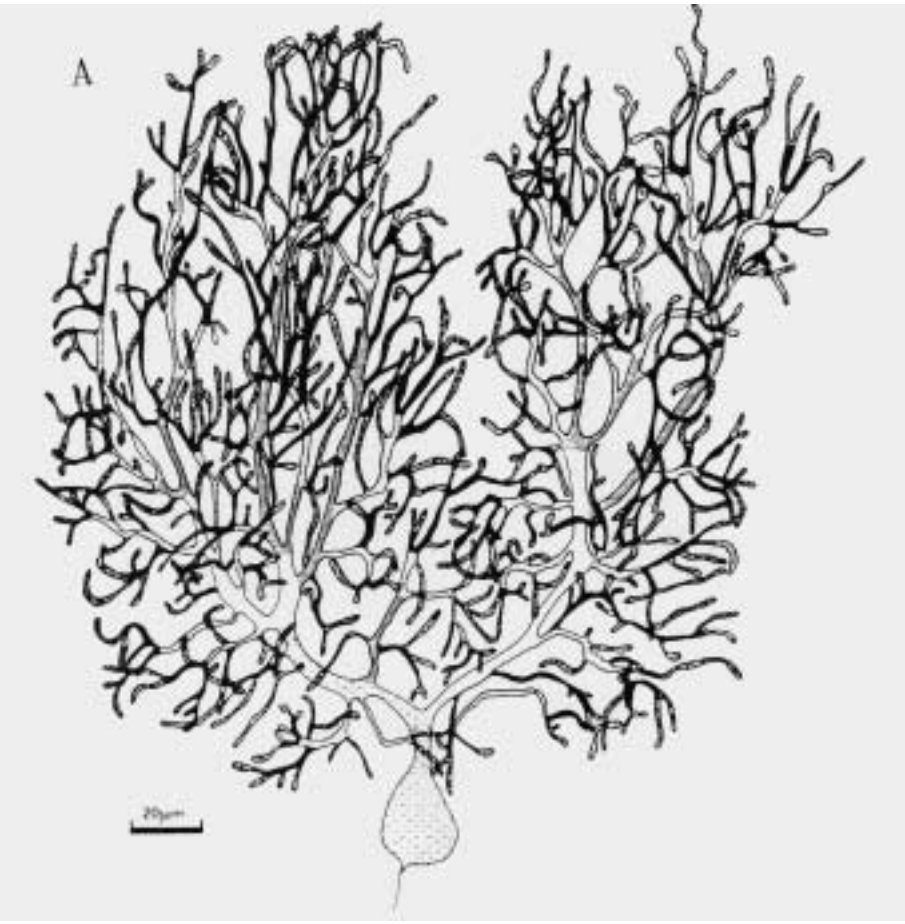


Abbildung 3: Purkinje-Zelle einer 30 Tage alten Ratte mit typischem dendritischen Verzweigungsmuster (aus (Ito 1984))

Die in die Kleinhirnrinde gelangenden Erregungen erreichen die Purkinje-Zellen teils direkt, teils indirekt durch Vermittlung von im Stratum granulosum und im Stratum moleculare gelegenen kleineren Nervenzellen. Die afferenten Fasern begeben sich entweder als Moosfasern in das Stratum granulosum oder als Kletterfasern in das Stratum moleculare; die Moosfasern stammen vorwiegend aus den Vestibulariskernen, dem Rückenmark, der Brücke, der Vierhügelplatte und der Formatio reticularis, die Kletterfasern aus den Olivenkernen (Bucher and Wartenberg 1989).

Im Ratten-Foetus sind Purkinje-Zellen erstmals um den 14. bis 17. embryonalen Tag nachweisbar (Das and Nornes 1972). Altman (Altman 1972; Altman 1972) hat detailliert das postnatale Wachstum und die Synaptogenese von Purkinje-Zellen von Ratten beschrieben (Abbildung 4): Während der ersten 4 Tage gruppieren sich die Purkinje-Zellen von einer Schicht, die aus 2 bis 3 irregulär angeordneten Purkinje-Zell-Banden besteht, so um, daß alle Zellen endlich in einer Linie liegen, wobei jedoch noch keine oder wenige Synapsen ausgebildet werden. Zwischen dem 5. und 7. Tag entwickeln sich ein hypertrophierter apikaler Wachstumskegel sowie laterale somatische Fortsätze, welche durch Kletterfasern kontaktiert werden. Vom 8. bis zum 15. Tag verschwinden die somatischen Fortsätze und das Zytoplasma verteilt sich nunmehr in die wachsenden Dendriten. Hierauf erhält das Soma Synapsen von Korbzellen. Letztendlich ist die synaptische Maturation des Somas gekennzeichnet durch das Auftreten einer Ummantelung durch Fortsätze von Gliazellen. Am 15. Tag bilden Parallelfasern Synapsen mit dendritischen *Spines* in der unteren Hälfte der Molekularzellschicht aus, und am 21. Tag, wenn die äußere Körnerschicht verschwindet, bilden die Parallelfasern auch Synapsen mit der oberen Molekularzellschicht aus. Zwischen der 3. und 4. postnatalen Woche tritt eine deutliche Zunahme der synaptischen Kontakte im Zerebellum auf (Aghajanian and Bloom 1967).

In der Maus hören die Purkinje-Zellen am 12. Schwangerschaftstag auf, sich zu teilen (Miale and Sidman 1961). Nach dem Ende der Tragezeit (21 Tage) liegen die Purkinje-Zellen noch immer in einer mehrschichtigen Zone vor (Uzman 1960). Am 10. postnatalen Tag sind sie Purkinje-Zellen einschichtig angeordnet (Miale and Sidman 1961). Der Dendritenbaum von Purkinje-Zellen der Maus entwickelt sich zwischen der 2. und 3. postnatalen Woche. Obwohl sich der dendritische Bereich von Purkinje-Zellen auch noch nach 20 Tagen stets weiter vergrößert, verkleinert sich die Gesamtlänge des dendritischen Astes mit zunehmendem Alter (Weiss and Pysh 1978). Da die Anzahl der dendritischen *Spines* per dendritischer Längeneinheit zwischen dem 20. und 350. Lebenstag in etwa gleich ist, sollte die Anzahl der *Spines* pro Zelle nach 20 Lebenstagen abnehmen. Die funktionelle Bedeutung dieser ontogenetischen Remodellierung von Dendriten der Purkinje-Zelle der Maus ist unbekannt (Ito 1984).

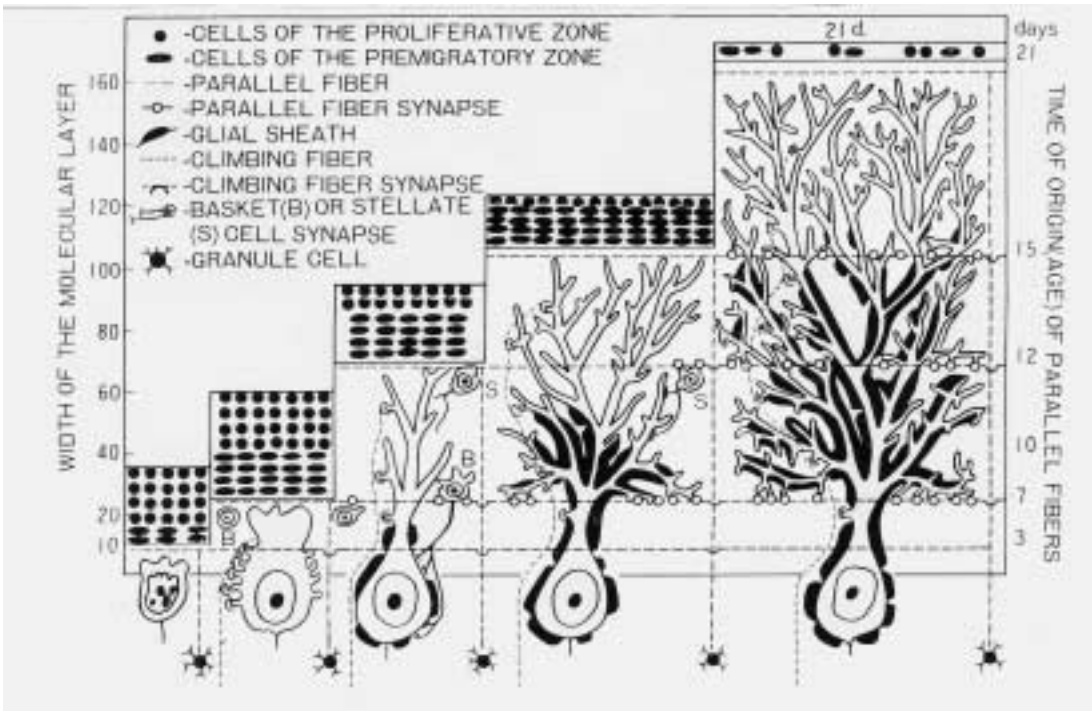


Abbildung 4: Schematische Darstellung einiger wichtiger Meilensteine der Entwicklung der Purkinje-Zelle sowie der Molekularzellschicht (linke Abszisse) als Funktion des Tieralters (Altersangabe in Tagen auf rechter y-Achse; 5 diskrete Altersabschnitte sind dargestellt). (B = Korbzelle; S = Sternzelle; d = Tag) (aus (Ito 1984))

## I.5 Zur Fragestellung

Die vorliegende Fragestellung beinhaltet die Untersuchung von Aktionspotential-induzierten Kalzium-Signalen in rasch wachsenden, unreifen Purkinje-Neuronen des Kleinhirns.

In Neuronen des ZNS von Säugetieren wurden transiente Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration in Nerventerminalen, neuronalen Zellkörpern, Dendriten und sogar in Spines (Eilers, Augustine et al. 1995; Takechi, Eilers et al. 1998) nachgewiesen (Review in (Yuste and Tank 1996)). Diese Kalziumsignale zeigen einerseits eine unterschiedliche Amplitude wie Kinetik in den verschiedenen Zellkompartimenten (Lev-Ram, Miyakawa et al. 1992; Eilers, Augustine et al. 1995; Eilers, Callewaert et al. 1995; Callewaert, Eilers et al. 1996; Eilers, Plant et al. 1996; Fierro and Llano 1996; Fierro, DiPolo et al. 1998), andererseits ein Entwicklungsprofil in der Ontogenese von Nagern (Fierro and Llano 1996). Dieses wird insbesondere auf die maturationsbedingt unterschiedliche Ausprägung von Kalzium-bindenden Proteinen zurückgeführt.

In dieser Arbeit wurde zunächst der Frage nachgegangen, wie sich Aktionspotential-induzierte Kalziumsignale in verschiedenen Zellkompartimenten (Soma, Dendrit und Nukleus) abhängig vom Lebensalter der verwendeten Nager verhalten. Die gefundenen altersbedingten Unterschiede legten mit Fierro et al. (Fierro and Llano 1996) die Hypothese nahe, daß es in der Entwicklung von Purkinje-Zellen zu einer unterschiedlichen Ausprägung von Kalzium-puffernden Kalzium-bindenden Proteinen kommt. Daher wurden die Experimente in analoger Weise in Mäusen wiederholt, denen das Kalzium-bindende Protein Calbindin D28k fehlt. Hierbei wurden alle hier vorliegenden Untersuchungen mit einer eigens für diese Arbeit entwickelten Bildverarbeitungs- und –analysesoftware (*FastRecord* und *FastAnalysis*) durchgeführt. Diese gestattete es in ihrer Funktionsfähigkeit erstmals, PC-basiert in Echtzeit Bild- und elektrophysiologische Daten zu verarbeiten. Dabei war sie zum einen in der Lage, intraexperimentell *online*-Analysen durchzuführen, zum anderen alle verfügbaren Datenströme verlustfrei direkt auf Festplatte abzuspeichern. Eine nachgeschaltete, zum Aufnahmeprogramm vollkompatible Software (*FastAnalysis*) gestattete es, ausführliche Bilddatenanalysen durchzuführen.

# II. Material und Methoden

In vorliegender Arbeit wurden Aktionspotential-induzierte Kalzium-Signale in rasch wachsenden, unreifen Neuronen untersucht. Veränderungen des intrazellulären Kalzium-Signalverhaltens von erregbaren Zellen im Verlauf ihrer Maturation geben Hinweise auf die besondere Bedeutung von Kalzium in unterschiedlichen Stadien der Zellentwicklung. Darüberhinaus sind sie Ausdruck der Aktivierung bzw. Inaktivierung von zu diskutierenden Mechanismen zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Kalzium-Homöostase. Die Untersuchungen der evozierten Kalzium-Signale wurden an Purkinje-Zellen des Kleinhirns von Nagern in einem kombinierten elektrophysiologischen und bildverarbeitenden experimentellen Aufbau (Setup) durchgeführt. Zur Datenerfassung wie –auswertung wurde eine eigene PC-basierte Software unter den Programmnamen *FastRecord* und *FastAnalysis* entwickelt.

## II.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an akuten Kleinhirnschnitten von Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten, C57BL/6N Crl BR- und Balb/c-Inzuchtmäusen (Charles River Laboratories bzw. eigene Zucht) sowie Calbindin D28K defizienten Mäusen (Airaksinen, Eilers et al. 1997), welche von Dr. Michael Meyer vom Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt.

## II.2 Herstellung von Kleinhirnschnitten

Zu Herstellung von akuten Hirnschnitten des Zerebellums wurden die Tiere dekapitiert und das Metencephalon (Hinterhirn) durch Entfernen des Epikraniums und der Schädelknochen freigelegt (Edwards, Konnerth et al. 1989; Llano, Marty et al. 1991). Durch zwei paramediane Sagittalschnitte mit dem Skalpell im Bereich des Vermis, einem horizontalen Schnitt im Bereich der hinteren inneren Schädelbasis (Basis cranii interna) sowie eines Frontalschnittes im Bereich des rostralen

zerebellären Pols wurde das Kleinhirn aus dem Schädel gelöst und möglichst schnell (< 1 min.) in eiskalte Ringerlösung (0 – 4 °C, Zusammensetzung s. Lösungen) verbracht, um sowohl metabolische Prozesse auf das Minimum zu reduzieren als auch eine mechanische Verfestigung der vor allem jungen Gewebe zu erzielen. Nach ca. 1 bis 2 Minuten wurde der Gewebeblock mit flüssigem Cyanacrylatkleber (*Uhu sekundenkleber blitzschnell®*, UHU GmbH & Co. KG) mit der lateralen Seite auf den Schneideblock einer Schnittkammer aufgeklebt und sofort mit eiskalter Ringerlösung übergossen. Hierauf wurden unter visueller Kontrolle mittels eines Binokulars bei 20- bis 30-facher Vergrößerung Schnitte von 200 – 300 μm Dicke mit einem „*Vibroslicer*" - Gewebeschnittgerät (*Model HA752*, Campden Instruments Ltd.) angefertigt. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Hirnschnittpräparate in mit Carbogen-begaste Ringerlösung bei Raumtemperatur (~20° C) evakuiert.

Zur Durchführung des eigentlichen Experiments wurden die Schnitte sodann in eine Meßkammer überführt, in der sie durch ein Gitter aus Platindraht und dünnen Nylonfäden am Boden fixiert wurden. Während der gesamten Versuchsdauer wurden sie dort mit einer Carbogen-begasten Ringerlösung mit Hilfe einer Schlauchpumpe (*Modell IPC*, ISMATEC SA; Pumprate: >2 ml/min) bei Raumtemperatur perfundiert.

Bei 60facher Objektivvergrößerung wurden unter Verwendung des differentiellen Interferenzkontrasts (DIC) nach Nomarski im Schnitt oberflächlich lokalisierte Purkinje-Zellen aus dem Stratum ganglionare (Stratum neuronorum piriformium) (Bucher and Wartenberg 1989) des Zerebellums (Goldowitz and Hamre 1998; Middleton and Strick 1998; Voogd and Glickstein 1998) anhand ihrer Lokalisation und Morphe ausgewählt (Palay and Chan-Palay 1974). Zur Durchführung der *Patch-Clamp*-Experimente (siehe unten) wurden vor allem die Zellen ausgewählt, welche sich durch ein großes, rund geformtes Soma auszeichneten und dadurch empirisch die besten experimentellen Voraussetzungen lieferten.

## II.3 Pipetten und Lösungen

Zur Durchführung der simultanen *Patch-Clamp*- (Cahalan and Neher 1992) wie *Imaging*-Experimente (Augustine 1994) fanden spezielle Glaspipetten (*Patch*-Pipetten) Verwendung. Diese wurden mit einem vertikal arbeitenden Zwei-Stufen-Pipettenziehgerät (*Narishige PC-10 Micropipette Puller*, Narishige Co., Ltd.)

hergestellt. Die *Patch*-Pipetten wurden aus Borosilikatglas (*Hilgenberg*, Malsberg) mit 2 mm Außendurchmesser und 0,3 mm Wandstärke angefertigt, und hatten Pipettenwiderstände von 1,5 – 3,0 MΩ. Für die Messungen wurde der Pipettenschaft bis kurz (ca. 100 µm) vor der Spitze mit einem isolierenden Kunstharz („*Sylgard*", General Electric Company, NY, USA) bedeckt, welches dann in einem heißen Luftstrahl getrocknet wurde. Diese Beschichtung trägt zu einer Verminderung der Kapazität der Pipette bei und verhindert das Hintergrundrauschen während der Messung. Die Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch mit schwacher Hitze poliert, um eine möglichst glatte Oberfläche zu erhalten, die zu einer Vereinfachung der *seal*-Bildung im *Patch-Clamp*-Versuch (siehe unten) beiträgt.
Unmittelbar vor dem Experiment wurden die Pipetten mit der bis dahin gekühlten, farbstoffhaltigen (Oregon Green® 488 BAPTA-2) intrazellulären Lösung (Zusammensetzung siehe unten) unter Zuhilfenahme einer Eppendorf-Pipette und *Microloadern* (Eppendorf) befüllt.

**Zusammensetzung der Lösungen [mM]:**

**Normal Ringer**

| | |
|---|---|
| 125 | NaCl |
| 4.5 | KCl |
| 1.25 | $Na_2H_2PO_4$ |
| 26 | $NaHCO_3$ |
| 1 | $CaCl_2$ |
| 1 | $MgCl_2$ |
| 20 | $C_6H_{12}O_6$ |

Osmolarität: 310 mOsm

**Intrazelluläre Lösung in *Patch*-Pipette**

| | |
|---|---|
| 175 | KCl |
| 12.5 | NaCl |
| 12.5 | Hepes |
| 5 | Mg-ATP |
| 0.5 | GTP |
| 0,012-0,050 | Oregon Green® 488 BAPTA-2 |

ph=7,3

Osmolarität: 371 mOsm

## II.4 Der Kalzium-Indikator Oregon Green® 488 BAPTA-2

Zur Erfassung der dynamischen Veränderungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration war die Verwendung eines geeigneten Kalzium-sensitiven Farbstoffes nötig. Hierzu wurde der intrazelluläre Kalzium-Indikator (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985) Oregon Green® 488 BAPTA-2 ($C_{64}H_{34}F_4K_8N_4O_{22}$, zellimpermaeables Oktakaliumsalz, MG=1599.77 Dalton, Ex/Em = 494/523 nm, Molecular Probes) verwendet, welcher mit Calcium Green™, Calcium Orange™ und Calcium Crimson™ zu den niedrig Kalzium-affinen sog. „*long-wavelength calcium indicators*“ zählt (Haugland 1996). Nach Kalziumbindung zeigen diese Farbstoffe eine Zunahme des emittierten Fluoreszenzlichts verbunden mit einer nur geringen Veränderung der emittierten Lichtwellenlänge im Vergleich zur Anregungswellenlänge des Argon-Lasers von 488 nm (siehe Abbildung 5).

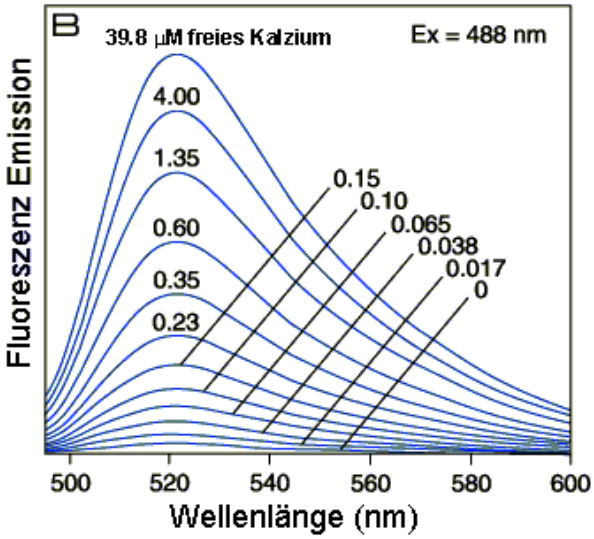


Abbildung 5: Emissionsspektrum des Kalzium-Indikators Oregon Green® 488 BAPTA-2 in Abhängigkeit von verschiedenen Kalzium-Konzentrationen. (aus Haugland, R. P. 1996).

Das Oregon Green® 488 BAPTA-2 - Molekül enthält zwei chromophore Gruppen pro BAPTA Chelator (siehe Abbildung 6) und hat in der Abwesenheit von Kalzium nur eine sehr geringe Fluoreszenz. Diese steigert sich um mindestens das 37-fache in einer gesättigten Kalzium-Umgebung, wobei der $K_d$ für Kalzium in der Abwesenheit von Magnesium bei ca. 580 nM (~ 22°C) liegt. Diese Eigenschaften lassen Oregon Green® 488 BAPTA-2 ideal erscheinen hinsichtlich seines niedrigkonzentrierten Einsatzes in der konfokalen *Laser Scanning* Mikroskopie (Haugland, R. P. 1996).
Die hier beschriebenen Experimente wurden mit einer Konzentration von 12,5 – 50 µM Oregon Green® 488 BAPTA-2 in der *Patch*-Pipette durchgeführt.

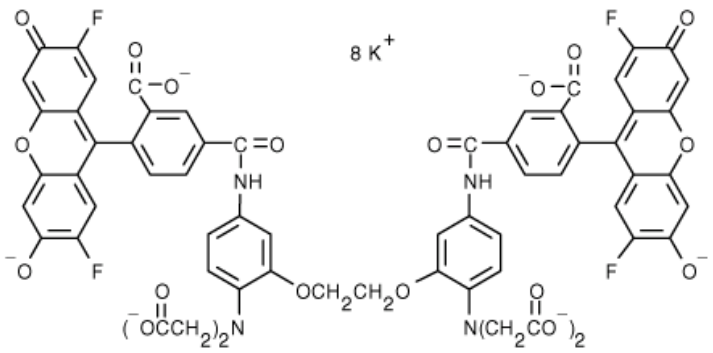


Abbildung 6: Molekulare Struktur des Kalzium-Indikators Oregon Green® 488 BAPTA-2. (aus Haugland, R. P. 1996).

## II.5 Elektrophysiologische Versuchsanordnung

Da in vorliegender Arbeit die auf Induktion von Aktionspotentialen folgende Veränderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration von Interesse war, wurde zur Auslösung der Aktionspotentiale die *whole-cell* Variante der *Patch-Clamp*-Technik (Hamill, Marty et al. 1981) benutzt. Die Prinzipien dieser Methode (Sigworth 1986; Numberger and Draguhn 1996) sind in der Literatur detailliert beschrieben, deshalb soll hier nur kurz darauf eingegangen werden:

Eine Glaspipette mit einer sehr kleinen Öffnung wird benutzt, um einen dichten Kontakt mit einem winzigen Bezirk – einem Fleck oder „*patch*“ von einigen wenigen Mikrometern Durchmesser – der Zellmembranoberfläche, z.B. einer Nervenzelle, herzustellen. Durch die Applikation eines leichten Unterdruckes wird die Membran nun derart an die Pipette festgesaugt, daß das ausgesuchte Membranareal vom Rest der Zelle isoliert wird. Die *Patch*-Pipette ist mit einer leitenden Elektrolytlösung (intrazelluläre Lösung, siehe dort) gefüllt, in welcher sich wiederum ein chlorierter Silber-Elektrodendraht befindet, der mit einem ultrasensitiven elektronischen Verstärker verbunden ist. Dieser „klemmt“ als Rückkopplungsverstärker (*FBA = Feed Back Amplifier*) die elektrische Spannung U auf einen Sollwert. Die Stärke des zum Aufrechterhalten dieser Spannung notwendigen Stromes I ist ein direktes Maß für die Ionenströme durch die Kanäle im interessierenden Membranareal. Die Abdichtung (*seal*) zwischen Pipette und Membran beträgt einige GΩ (*giga seal*), womit unerwünschte Leckströme unterdrückt und die im pA zu messenden Ströme deutlich vom Rauschen differenziert werden können.

Die unterschiedlichen Varianten der *Patch-Clamp*-Technik gestatten es, sowohl extra- wie intrazelluläre Eigenschaften der Zelle wie ihrer Membran gezielt zu verändern.

In vorliegender Untersuchung wurde ausschließlich die *whole-cell*-Konfiguration verwendet. Die elektrischen Ableitungen wurden hier mit einem computerkontrollierten EPC-9/2 *Patch-Clamp*-Verstärker (HEKA Elektronik) (Sigworth 1995) mit eingebautem AD/DA-*Interface* (Analog-Digital-/Digital-Analog-*Interface*) und zugehörigem Pipettenhalter durchgeführt. Über ein MAC-23-*Board* (MAC-23-Erweiterungskarte; HEKA Elektronik) wurde der Verstärker via *NuBUS*-Schnittstelle mit einem *Macintosh Quadra* verbunden und von dort vollständig über die PULSE-Software (HEKA Elektronik) (Sigworth, Affolter et al. 1995) gesteuert.

Die *Patch*-Pipetten wurden manuell und in der Endstrecke mikrometergenau mit piezogesteuerten Manipulatoren an das Neuron herangeführt.
Nach Herstellung der *whole-cell*-Konfiguration lag das Haltepotential bei allen hier vorgestellten Versuchen bei –70 mV. Die Messung der Kalzium-Transienten wurde nach 15 - 20 Minuten Farbstoff-Ladezeit initiiert.

## II.6 Versuchsanordnung für die schnelle konfokale Fluoreszenzmessung

Die Registrierung der experimentell induzierten Kalziumsignale machte, um deren Dynamik wie intrazellulären Verteilung gerecht zu werden, ein hochauflösendes mikroskopisches Aufnahmeverfahren mit Echtzeiteigenschaften erforderlich. Diesen Anforderungen wurde das hier verwendete Odyssey® *Real Time Laser Confocal Microscope* von *Noran Instruments* (Noran Instruments, Inc.; U.S. Patent Nr. 4.863.226) gerecht, welches ausschließlich in Verbindung mit einem PC betrieben werden und *Live*-Bilder in Videorate bzw. -format (*NTSC Video Standard*: 30 Bilder/sec, 512 x 480 Pixel; *PAL Video Standard*: 25 Bilder/sec, 512 x 512 Pixel; *interlaced*) erzeugen konnte.
Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (*Laser Scanning Confocal Microscopy*, LSCM, oder CSLM, *Confocal Scanning Laser Microscopy*) ist eine auf Marvin Minsky (Minsky 1988) (U.S. Patent Nr. 3.013.467) zurückgehende und nach den Vorarbeiten von Egger (Egger MD 1967) und Davidovits (Davidovits and Egger 1969) in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts durch A. Boyde (Boyde, Petran et al. 1983) und M. Petran (Petran, Hadravsky et al. 1986) mit der Weiterentwicklung der Lasertechnologie (Weber 1998) erfolgreich in die Biologie eingeführte lichtmikroskopische Methode, um hochauflösende Bilder und dreidimensionale Rekonstruktionen von Untersuchungsobjekten zu erhalten (Paddock 2001).
Die Prinzipien der konfokalen Mikroskopie sind in der Literatur hinreichend beschrieben (Brakenhoff, van der Voort et al. 1986; Brakenhoff, van der Voort et al. 1988; Brakenhoff, van der Voort et al. 1988; Brakenhoff, van der Voort et al. 1989; Brakenhoff, van Spronsen et al. 1989; van der Voort, Brakenhoff et al. 1989; Stricker and Whitaker 1999), so daß hier nur kurz erläuternd auf dieses hochauflösende lichtmikroskopische Verfahren eingegangen werden soll:

Bei der konventionellen Lichtmikroskopie wird das Lampenlicht durch eine Kondensorlinse auf das Untersuchungsobjekt gebündelt. Das vom Objekt ausgehende Licht wird durch die Objektivlinse in die Zwischenbildebene fokussiert. Das so entstehende Bild wird durch die Okularlinse betrachtet. Nicht nur Licht aus der Brennebene des Objektivs, sondern auch unfokussiertes Licht aus Bereichen außerhalb der Brennebene erreicht bei diesem Verfahren das menschliche Auge. Durch diese Interferenz von fokussiertem und unfokussiertem Licht ist die räumliche Auflösung des konventionellen Mikroskops limitiert.

Beim konfokalen Mikroskop wird Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, ausgeblendet. Die einfachste Konstruktion zeigt folgenden Aufbau: Die Kondensorlinse wird durch eine Linse ersetzt, die mit der Objektivlinse identisch ist. Die Ausleuchtung des Objekts wird durch eine Lochblende beschränkt, die auf dem Objekt scharf abgebildet wird. Eine zweite Lochblende (*pinhole*) beschränkt das Sichtfeld auf einen Punkt. Durch den symmetrischen Aufbau dieses Systems sind beide Blenden und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal. Der Durchmesser der Blenden wird so klein gewählt, daß Licht aus Bereichen des Objekts, die nicht in der Brennebene liegen, nicht in die Apertur der oben genannten zweiten Blende fallen und damit ausgeblendet werden. In den *Photomultiplier* (PMT; Lichtvervielfacher) gelangt deshalb nur Licht aus der Brennebene des Objekts.

Im Unterschied zum konventionellen Mikroskop erzeugt das konfokale Mikroskop also zunächst nur einen Bildpunkt, der allerdings genau einen Punkt aus der Brennebene des Objektivs darstellt. Um ein vollständiges Bild des Objekts zu erhalten, muß das Objekt Punkt für Punkt gerastert (*gescannt*) werden.

Zum Abrastern ("*Scannen*") des Objektes muß der Anregungsstrahl nacheinander auf viele Punkte des Objekts gelenkt werden. Laserlicht eignet sich für diese Anwendung besonders gut, weil ein Laserstrahl monochromatisches Licht mit hoher Intensität auf einen kleinen Punkt fokussieren kann. Um ein Bild zu erhalten, wird das Objekt Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgerastert. Herkömmlicherweise sind zwei *Scan*-Spiegel hierzu nötig, einer für die Punkte innerhalb einer Zeile (X-Richtung) und einer für die Zeilen des Bildes (Y-Richtung). Im vorliegenden Fall des Noran-Mikroskops wurde für die horizontale Auslenkung ein akustooptischer Deflektor (AOD) verwendet, wodurch die hohe temporale Bildauflösung garantiert war. Das Fluoreszenzlicht wird über die selben Spiegel, die aufgrund ihrer dichroischen Eigenschaften für Licht bestimmter Wellenlängenbereiche entweder

durchlässig oder reflektierend sind, zum Detektor geleitet. Ein Computer steuert meist über zwei Stellglieder die Position der *Scan*-Spiegel bzw. den AOD und rekonstruiert aus der gemessenen Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Punktes ein Bild des Objekts.

Zudem kann der Rechner über einen Stellmotor das Objekt in Richtung des Strahlengangs (Z-Richtung) bewegen. Da die konfokale Optik dafür sorgt, daß nur Licht aus der Brennebene des Objektivs zum Detektor gelangt, können nacheinander mehrere Schichten des Objekts *gescannt* und abgebildet werden. Solche optische Schnitte können dann im Rechner zu dreidimensionalen Bildern des Objekts zusammengesetzt werden.

Das CLSM wurde in Verbindung mit einem aufrechten BX50WI-Mikroskop von *Olympus®* betrieben, welches über ein von Noran mitgeliefertes Verbindungsstück (*Relay Tube*) mit dem *Noran Video Scan Modul* verbunden wurde. Als Objektiv wurde ein 60fach vergrößerndes Wasserimmersionsobjektiv der Firma *Olympus®* verwendet (*Olympus® Universal Plan Fluorite* LUMPLFL 60x W/IR, N.A. 0.90). Das Anregungslicht der Wellenlänge von 488 nm stammte von einem *Omnichrome® Argon Ionen Laser* (Modell-Nr.: 532R-MA-A03; Laser 2000 GmbH, Weßling) und wurde über einen optischen Leiter in das konfokale Mikroskop eingespeist (Abbildung 7).

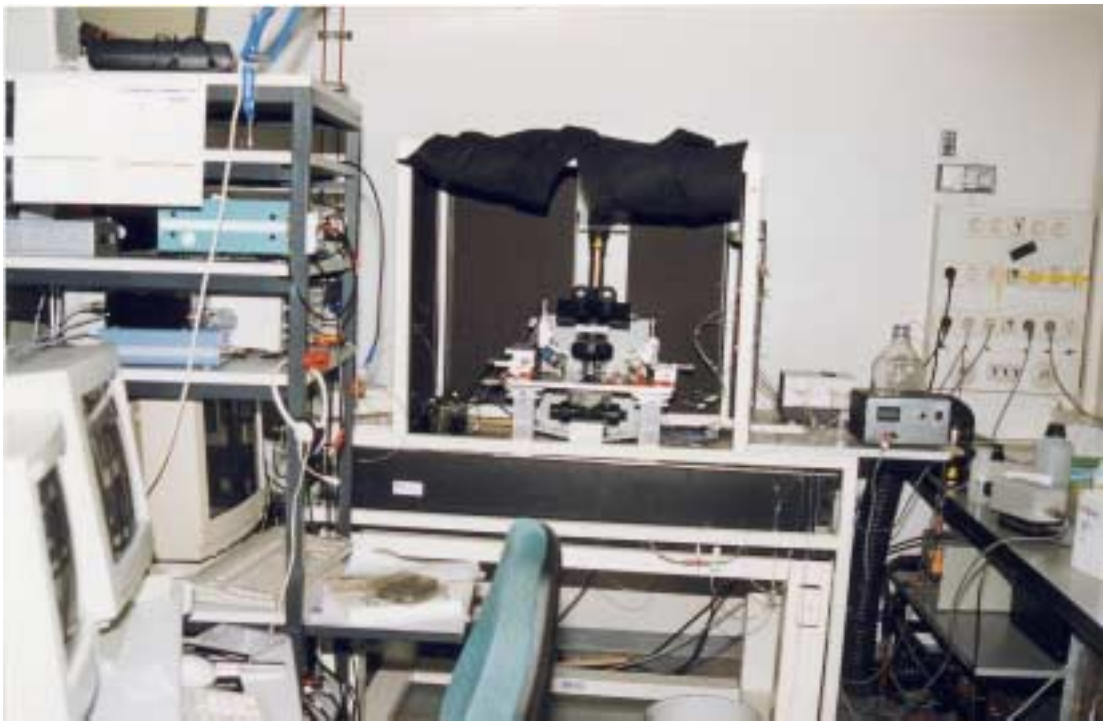

Abbildung 7: Der für vorliegende Untersuchung verwendete Meßaufbau besteht grundsätzlich aus einer elektrophysiologischen wie einer Bildverarbeitungs-Einheit. Im hinteren Bildteil sieht man das verwendete BX50WI-Mikroskop von *Olympus®*, welches über ein Verbindungsstück direkt mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop verbunden ist. Direkt links davon sind die Gerätschaften zum Durchführen der Elektrophysiologie untergebracht, so der *Patch-Clamp*-Verstärker EPC9 und der zugehörige Macintosh Steuer- bzw. Aufzeichnungsrechner. Im linken vorderen Bildteil sieht man die Monitore der Bildverarbeitungseinheit.

## II.7 Entwicklung einer Datenerfassungs- und Analysesoftware

Anfangs wurden die mit dem konfokalen Mikroskop gewonnenen Videodaten mit Hilfe einer *Indigo®-Workstation* von *Silicon Graphics®* (Silicon Graphics Inc. SGI) aufgezeichnet, da bis vor wenigen Jahren nur derartige Rechner in der Lage waren, Bilder im Videostandard IEEE RS-170 der Größe 512 x 480 Pixel und 8-bit-Auflösung mit 30 fps (*frames per second*) und einer Frequenz von 60 Hz online und verlustfrei in Echtzeit sowohl zu digitalisieren wie zu verarbeiten (Melamed and Rahamimoff 1991; Belichenko and Dahlstrom 1995). Zu Beginn unten beschriebener Experimente bestand der verwendete Meßstand so insgesamt aus vier Computern: Ein Rechner zum Durchführen der Elektrophysiologie (Macintosh® Quadra mit Instrutech® NuBUS Interface-Karte zu HEKA EPC 9), ein Rechner zur Steuerung des konfokalen Mikroskopes (via serielle Schnittstelle), eine Workstation zum transienten Aufzeichnen der Videodaten (SGI Indigo-2; Silicon Graphics, Inc.) und ein Rechner

zum Auswerten der Daten (Intel Pentium-II MMX - PC), wobei die gewonnenen Bilddaten je nach Bedarf dauerhaft auf optischen Bildplatten, unter Zuhilfenahme eines Bandlaufwerkes oder auf magnetooptischen Medien gespeichert wurden. Die gewonnenen elektrophysiologischen wie Bilddaten lagen somit auf drei unterschiedlichen Betriebssystemplattformen (Windows, Macintosh und Unix) vor, und vorläufig auch in drei verschiedenen Dateiformaten, die sich nicht zwanglos ineinander überführen ließen, um sie auf nachgeordneten Systemen weiter analysieren zu können. Kompliziert, umfangreich und zeitaufwendig waren darüberhinaus die im eigentlichen Experiment wie die zur Analyse durchzuführenden Operationen, störanfällig der komplexe Aufbau, schwierig der Datenaustausch zwischen den verwendeten Rechnern. Erst mit dem Aufkommen rechenstarker PC-Prozessoren (Kling-Petersen, Pascher et al. 1998), der Entwicklung hochleistungsfähiger PC-basierter Bilderfassungskarten (*Framegrabber*) und adäquater Programmiermöglichkeiten war es möglich, ein effizientes, entwicklungsoffenes, kostengünstiges wie (nicht nur) für die vorliegende Problematik umfassend abdeckendes Softwarepaket zu entwickeln.

### II.7.1 Die Programmiersprache LabVIEW®

Zur Programmierung der für diese Arbeit verwendeten Software wurde sich für die Programmiersprache G bzw. LabVIEW® (LabVIEW, Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench) von National Instruments (National Instruments Corporation, NI) entschieden. Diese ist als Programmiersprache der 4. Generation inzwischen eine der meistgenutzten Software-Entwicklungsumgebungen im Bereich der MSR (Messen, Steuern, Regeln) - Technik (Jamal and Pichlik 1999). Basierend auf dem Datenflußmodell (Sharp 1992) wird durch LabVIEW® ein grafisches Programmiersystem (Kodosky and Dye 1989) zur Verfügung gestellt, welches sowohl zur Datenerfassung und Steuerung als auch zur Datenanalyse und Datenpräsentation eingesetzt werden kann (Johnson 1997; Jamal and Krauss 1998). Dabei wird die Flexibilität einer leistungsstarken Programmiersprache ohne die damit verbundene Schwierigkeit und Komplexität traditioneller textbasierter endlicher Sprachen, wie z.B. C oder Basic, garantiert. So gestaltet sich die grafische Programmiermethode selbst äußerst intuitiv (Gulotta 1995), zeitsparend (Lim,

Walkup et al. 1992) und insbesondere technische wie wissenschaftlich-experimentelle Abläufe direkt modellhaft abbildend (Kalkman 1995; Essick 1998; Jamal and Heinze 2001; Jamal and Jaschinsky 2001). Ein weiterer entscheidender Vorteil stellt die präzise Abstimmung zwischen der von NI entwickelten Software wie der vom gleichen Hersteller verfügbar gemachten Hardware, z.B. in Form von digitalen *Frame-Grabber*-Karten oder anderen DAQ (*Data Acquisition*; Datenerfassung-) - Karten, dar (NI 2000). Der unter G entwickelte Quellcode läßt sich prinzipiell plattformunabhängig portieren, aktuell auf die Betriebssystemumgebungen MS Windows (2000, ME, 98, 95, NT), MAC OS 7.6.1 (oder später), HP-UX 10.20 (oder später), Sun-Solaris 2.5.1 (oder später) und Linux (x86; Linux Kernel 2.0.x oder später) (NI 2000), womit einmal entwickelte Programme grundsätzlich auch auf anderen Rechnersystemen betrieben werden können.

Ein LabVIEW®-Programm besteht aus virtuellen Instrumenten (VIs), welche mit Subroutinen verglichen werden können. Ein solches VI wiederum besteht aus dem *Frontpanel* (siehe Abbildung 8), welches die interaktive Benutzerschnittstelle (Mensch-Maschine-Interface) des VI darstellt und oft die Frontblende eines Meßinstrumentes simuliert. So kann man hier Schaltflächen, Drehknöpfe, Kontrolllämpchen und eine Vielzahl anderer Ein-/Ausgabeelemente finden. Der zweite Bestandteil einer LabVIEW®-Anwendung liegt mit dem Blockdiagramm vor (siehe Abbildung 9), dem eigentlichen G-Quellcode, und zuletzt ist das Symbol und Anschlußfeld zu nennen, welches das VI identifiziert, so daß dieses in einem anderen VI verwendet werden kann (NI 1998).

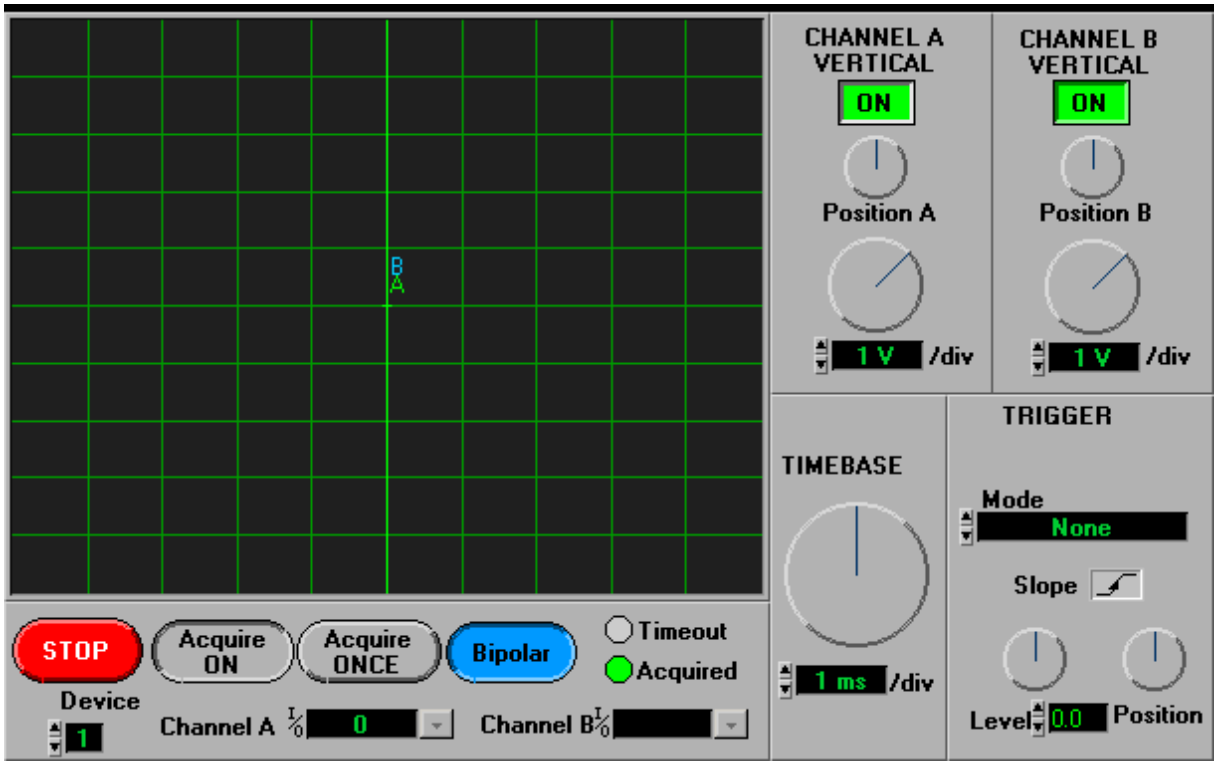


Abbildung 8: Darstellung des für die elektrophysiologischen Messungen eingesetzten *Frontpanels*. Ein *Frontpanel* ist eine graphische Benutzerschnittstelle (GUI), welche über den Computerbildschirm alle vom physikalischen Instrument gewohnten Bedienmöglichkeiten als sog. Virtuelles Instrument (VI) zur Verfügung stellt. Sichtbar sind die LabVIEW®-typischen Bedienelemente in Form von Schaltern und Knöpfen, welche das Design von Meßinstrumenten nachahmen und als virtuelle Instrumente vorzugsweise mit Hilfe der PC-Maus bedient werden. Die Anzeige von Meßergebnissen erfolgt hier in einem Oszilloskopfenster. [Beispiel von National Instruments]. Weitere typische *Frontpanels* sind in den Abbildungen 12 und 13 der Ergebnisteils wiedergegeben.

Für die Verwendung von LabVIEW® im Bereich der Neurophysiologie liegen inzwischen mehrere Veröffentlichungen vor (Kling-Petersen and Svensson 1993; Budai 1994; Poindessault, Beauquin et al. 1995; Grossmann and Skinner 1996; Jackson and Gnadt 1999; Duffin 2000; Kaelin-Lang and Cohen 2000), interessanterweise auch – trotz des augenscheinlichen Vorhandenseins adäquater kommerzieller Lösungen - einige zur direkten Durchführung elektrophysiologischer Experimente selbst (Budai, Kehl et al. 1993; Nordstrom, Mapletoft et al. 1995; Robinson, Thomsen et al. 2000).

Sowohl für die Anwendung von LabVIEW® im Kalzium-*Imaging* als auch für die Verknüpfung von Elektrophysiologie mit *Imaging*-Prozeduren in einem einzigen PC-basierten Programmpaket gab es trotz entsprechender Ansätze (Lasser-Ross, Miyakawa et al. 1991; Young, Wong et al. 2000) keine für die vorliegende Arbeit befriedigende Lösung. Ein wesentliches Ziel vorliegender Arbeit war es somit, eine Software zu programmieren, die den unten näher beschriebenen Anforderungen

eines integriert elektrophysiologisch-bildverarbeitenden experimentellen Aufbaus in adäquater Weise gerecht wird.

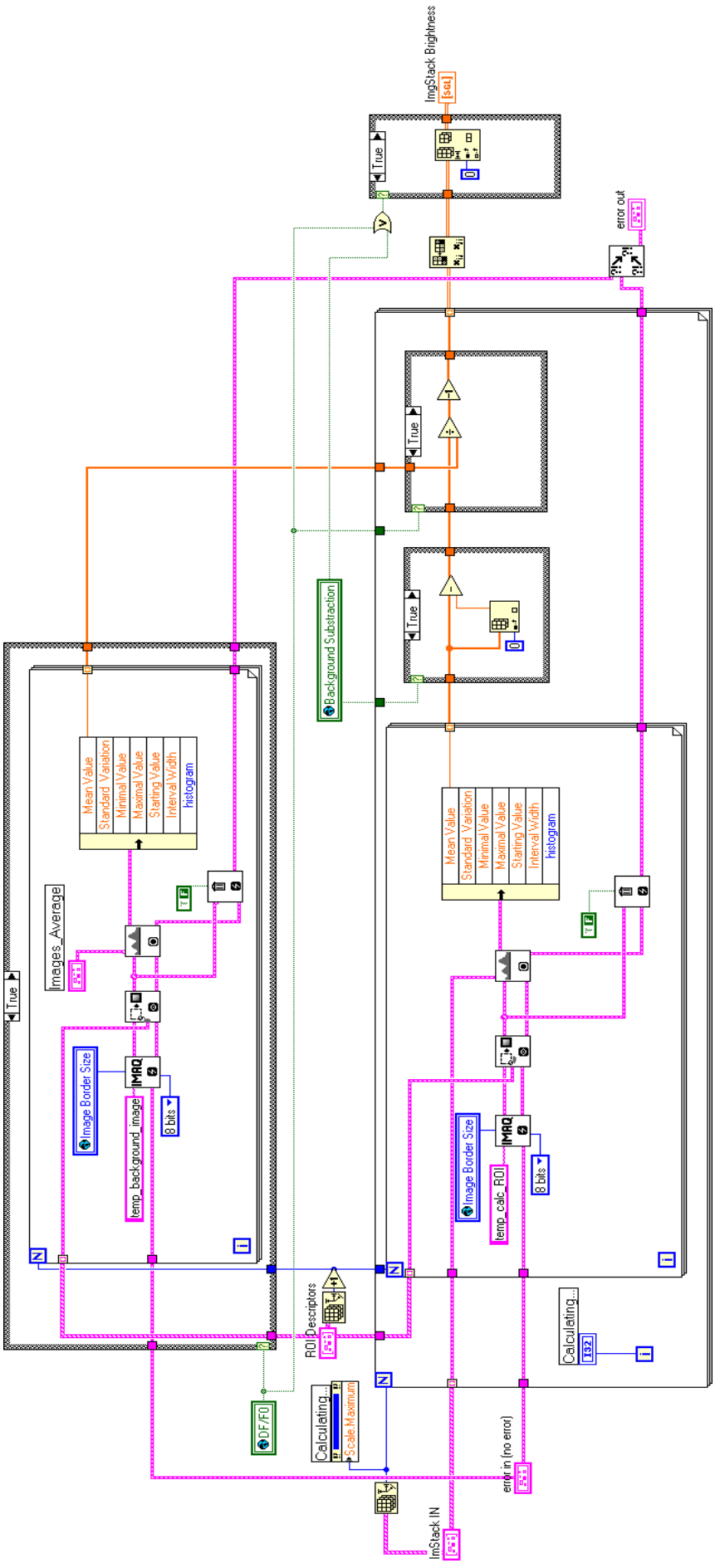


Abbildung 9: LabVIEW®-Blockdiagramm zur Durchführung der sog. Brightness-versus-Time – Arithmetik, wo es darum geht, Bildhelligkeiten im Zeitverlauf zu erfassen und gegebenenfalls zu Referenzwerten (z.B. Hintergrundshelligkeit) in Beziehung zu setzen. Die graphische Programmiertechnik unterscheidet sich deutlich von herkömmlichen textbasierten Sprachen. Dargestellt sind hier drei *For-Next-Schleifen*, welche die Einzelbilder aus einer Bildsequenz extrahieren und dann der datenanalytischen Mathematik zuführen. Nähere Einzelheiten im Text.

### II.7.2 Entwicklung einer Aufnahme-Software

Zunächst wurde die Entwicklung eines Computerprogrammes unter dem Namen *FastRecord* angestrebt, welches das gesamte Management der Aufnahmeprozedur der vom Noran-System erzeugten Videodaten ermöglichen sollte. Hierzu wurden an das Programm folgende essentielle Anforderungen gestellt:

1.) Möglichkeit der verlustfreien Echtzeit-Darstellung des zu untersuchenden biologischen Objekts auf dem Computermonitor – hierbei wird das durch das Noran-Mikroskop zur Verfügung gestellte konfokale Bild direkt durch das Computerprogramm prozessiert
2.) Möglichkeit, *Regions of Interest* (ROIs) auf interessierende Bildbereiche zu plazieren und dabei weiterhin verlustfrei *Brightness-versus-Time* (Helligkeit-Zeitverlaufs) -Kurvenverläufe in Echtzeit-Darstellung zu erhalten
3.) Möglichkeit, Bildsequenzen in Echtzeit und verlustfrei direkt auf die Festplatte zu speichern (*lossless recording*)
4.) Möglichkeit der Mikroskopsteuerung, z.B. über die serielle Schnittstelle (Laser-*Shutter*steuerung, Steuerung des Z-Antriebes)
5.) Möglichkeit der Kommunikation mit der elektrophysiologischen Einheit, z.B. über Triggerleitungen
6.) Einfachheit (Wessel 1998) und Standardisierung der Programmbedienung, vor allem in Hinblick auf Aufgabenangemessenheit, Selbstbeschreibungsfähigkeit und Erwartungskonformität (gemäß EN ISO 9241 (Pfitzinger 1995)). In diesem Zusammenhang wurde auch eine synthetische Sprachausgabe implementiert, die den Benutzer auf wichtige Programmmeldungen hinweisen kann
7.) Modulares Softwarekonzept mit der jederzeitigen Option der Erweiterung der Programmfunktionalität.

### II.7.3 Entwicklung einer Analyse-Software

Die mit der Aufnahme-Software *FastRecord* aufgezeichneten Meßdaten sollten direkt einer Auswertung zugeführt werden können, sodaß zum einen schon während des eigentlichen Experiments fundierte Entscheidungen über das weitere aktuelle Vorgehen getroffen werden konnten, zum anderen die nachexperimentelle

Aufbereitung der gewonnenen Meßdaten weitestgehend zeit- und arbeitsökonomisch sowie bei Bedarf unabhängig vom Meßcomputer durchgeführt werden konnte. Zwar existieren auf dem Markt Programme, welche die Auswertung von Bild (*Imaging*) - Daten ermöglichen und auch von vielen Arbeitsgruppen verwendet werden, z.B. *NIH-Image®* (http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html) (Shaw, Salmon et al. 1995; Brown, Garcia et al. 1998), jedoch gestaltete sich der Dateitransfer weiterhin umständlich, die Benutzerführung war uneinheitlich, wünschenswerte Programmoptionen waren von vornherein nicht verfügbar und mußten umständlicherweise, z.B. als Makros, neu entwickelt werden. Aus diesen Gründen sollte in Ausbau des *FastRecord*-Programmes ein für diese Versuche neuer Software-Standard (siehe Abbildung 10) entwickelt werden, der es - vergleichbar den kommerziell erhältlichen Office-Produkten - ermöglicht, in einheitlicher Benutzerführung Daten aufzuzeichnen (*FastRecord*), welche dann auf demselben Rechner, die *Multitasking*-Fähigkeiten moderner PC-Betriebssysteme, wie z.B. Windows ME® ausnutzend, ausgewertet werden können. Das Programm *FastAnalysis* sollte dabei folgende essentielle Anforderungen erfüllen:

1.) Möglichhkeit der Durchführung von *Brightness-versus-Time*-Auswertungen - vor allem im Hinblick auf Analysen in *Regions of Interest* - aller mit *FastRecord* gewonnenen Daten
2.) Möglichkeit, die ausgewerteten Daten in herkömmlichen *Spreadsheet* (Tabellen-Kalkulations) - Dateiformaten (MS Excel®, Wavemetrics Igor®) abzuspeichern
3.) Möglichkeit des simultanen Betriebs auf demselbigen PC, auf welchem auch *FastRecord* läuft
4.) Möglichkeit des Exports der aufbereiteten Bilddaten in herkömmliche Präsentationsprogramme wie MS Powerpoint®
5.) Standardisierung der Programmbedienung mit *FastRecord* und Einfachheit der Benutzerführung, z.B. über eine synthetische Sprachausgabe, die den Benutzer auf wichtige Programmmeldungen hinweisen kann
6.) Modulares Softwarekonzept mit der jederzeitigen Option der Erweiterung der Programmfunktionalität

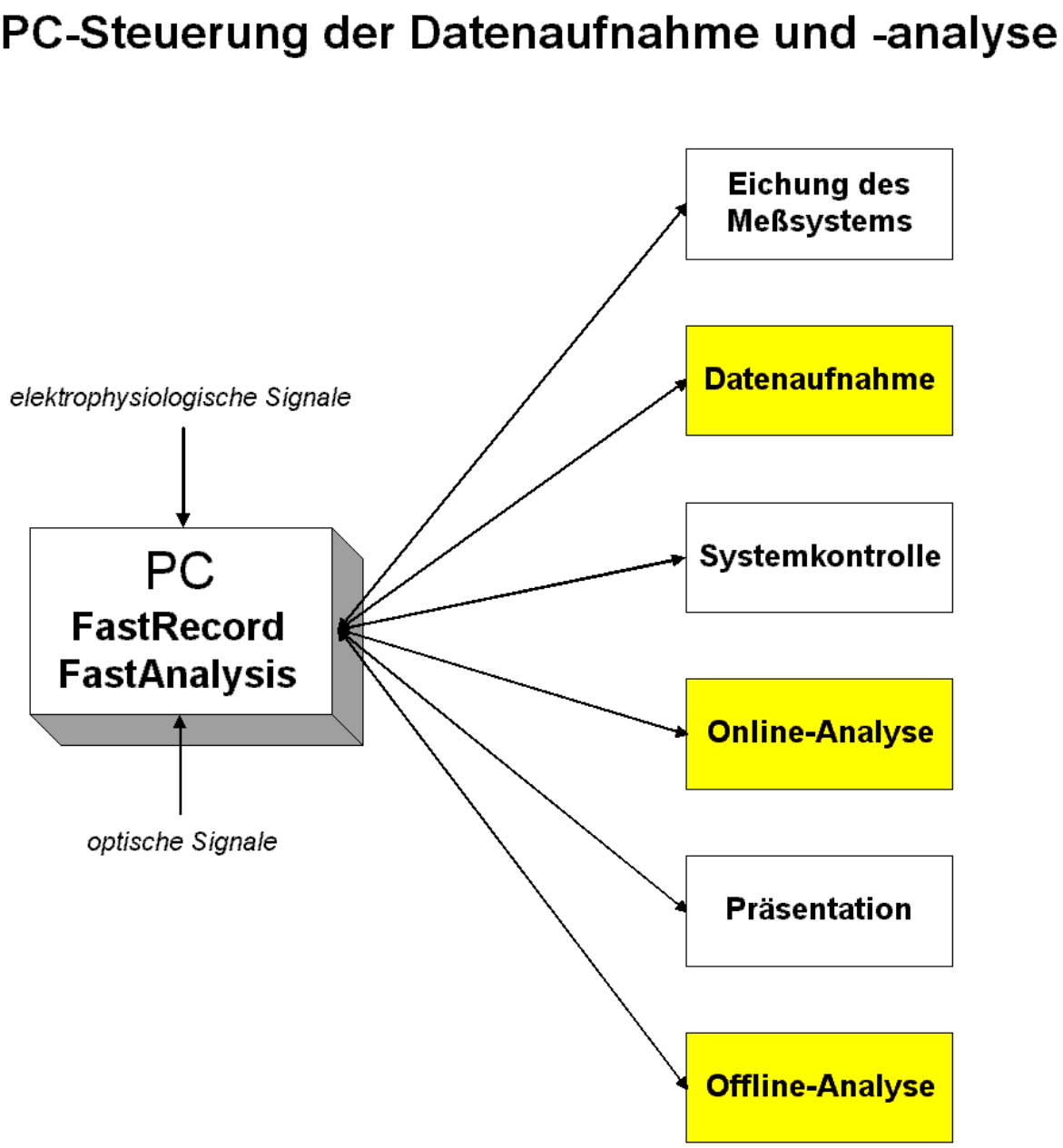


Abbildung 10: Komponenten der eingesetzten Aufnahme- und Analysesoftware. Sie umfaßt ein Software-Paket, welches rein PC-basiert zum einen in der Lage sein sollte, die elektrophysiologische wie mikroskopische (optische) Einheit des hier verwendeten experimentellen Setups zu kalibrieren, zu steuern als auch die Bildaufnahme durchzuführen. Zum anderen sollte die postexperimentelle Analyse der gewonnenen Daten vollständig ermöglicht werden.

## II.8 Datenanalyse und Statistik

Die mit Hilfe der PULSE® Software (HEKA Elektronik) gewonnenen elektrophysiologischen Daten wurden zur vorliegenden Präsentation mit dem technischen Analyseprogramm *Igor®* (WaveMetrics Inc.) aufbereitet; eine

Veränderung der Rohdaten wurde dabei nicht vorgenommen, die graphische Darstellung jedoch im Sinne einer mathematischen Rundung geglättet.

Für die Berechnung der *Brightness-versus-Time*-Kurven in den Kalzium-*Imaging*-Experimenten wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurde der mittlere Helligkeitswert einer *Region of Interest* (ROI) ermittelt, indem alle Helligkeitswerte (hier 8-bit-Grauwerte) innerhalb eines ROIs aufsummiert, dann durch die Anzahl der das ROI konstituierenden Pixel dividiert und das erhaltene Ergebnis auf die nächste Ganzzahl mathematisch gerundet wurde. Der Wert für die Hintergrunds-Helligkeit (*background fluorescence*) je ROI wurde dadurch ermittelt, indem man in der Videosequenz bis zu der Stelle, an der das evozierte elektrophysiologische Ereignis auftrat, die Einzelbilder aufsummierte, dann durch die Anzahl der Einzelbilder teilte und dann je ROI den mittleren Helligkeitswert bestimmte. Dieser diente dann als Divisor für alle in den interessierenden Regionen gewonnenen mittleren Helligkeitswerte, welche nunmehr als sog. $\Delta F/F_0$-Werte vorlagen (Stricker and Whitaker 1999). Alle in dieser Arbeit gezeigten Kalzium-Fluoreszenzkurven liegen als $\Delta F/F_0$–Kurven vor. Bei einigen Experimenten wurde der Versuch unter exakt gleichen Bedingungen mehrfach wiederholt – wo angegeben, wurde dies zur Erzielung von Mittelwerten bei sich an der technischen Auflösungsgrenze befindlichen Meßergebnissen bei niedrigem Signal-Rausch-Abstand durchgeführt, indem ganze Kurven miteinander addiert und abschließend durch die Anzahl der verwendeten Kurven dividiert wurde.

Zum statistischen Vergleich der Daten aus verschiedenen Experimenten wurde die Varianzhomogenität der normal verteilten Werte mit dem F-Test überprüft. Zur Ermittlung der Signifikanz fand der t-test nach STUDENT für unabhängige Stichproben Verwendung. Kumulative Werte für n Zellen sind in der vorliegenden Arbeit als Mittelwert ± S.E.M. (standard error of the mean; mittlerer Fehler des Mittelwertes) angegeben. Zwei Mittelwerte wurden als signifikant verschieden eingestuft, wenn bei einem Signifikanzniveau $p < 0{,}001$ die Nullhypothese abgelehnt wurde. Die statistische Auswertung wurde unter Zuhilfenahme des Programmes *Origin® 6.0* von *Microcal* durchgeführt.

# III. Ergebnisse

Gegenstand dieser Untersuchung waren die in Abhängigkeit des Maturationszustandes von Neuronen Aktionspotential-induzierbaren intrazellulären Kalziumsignale. Kalzium spielt dabei intrazellulär eine Schlüsselrolle als *second messenger*-Molekül, welches z.B. synaptische Langzeitveränderungen induzieren kann. Als Modellzelle diente das Purkinje-Neuron des Zerebellums von Nagern, wobei einerseits die sich in der Entwicklung verändernde räumliche wie zeitliche Verteilung der intrazellulären Kalziumdynamik Beachtung fand, und andererseits Mechanismen dieser Veränderung anhand des physiologischen intrazellulären Kalziumpuffers Calbindin mit Hilfe von Calbindin D28k defizienten Mäusen untersucht wurden. Alle Ergebnisse wurden durch Kombination elektrophysiologischer mit bildverarbeitenden Techniken gewonnen, wobei zur Datenerfassung wie –auswertung eine eigens entwickelte Software eingesetzt wurde.

## III.1 Die Datenerfassungs- und Analysesoftware *FastRecord* bzw. *FastAnalysis*

### III.1.1 Datenerfassung mit *FastRecord*

Zur Durchführung der für diese Arbeit unternommenen Experimente wurde eine integrierte Software-Umgebung programmiert, die es in dieser Form erstmals gestattete, in standardisierter Weise auf PC-Ebene Bilddaten aufzuzeichnen und zu analysieren. Als Computersystem wurde ein IBM-kompatibler PC herangezogen, welcher mittlerweile bei vergleichsweise geringen Investitionskosten in der Lage ist, sämtliche für vorliegende Arbeit notwendigen Anforderungen in adäquater Weise zu erfüllen. Als Betriebssystem für die Programmentwicklung wurde sich für MS WINDOWS ME® (und damit kompatible, wie z.B. MS WINDOWS 98 SE®) entschieden. Bei diesem Betriebssystem handelt es sich um das weltweit meistverwendete, so daß beim Anwender hier am ehesten der Rückgriff auf schon gewohnte Bediengewohnheiten möglich war.

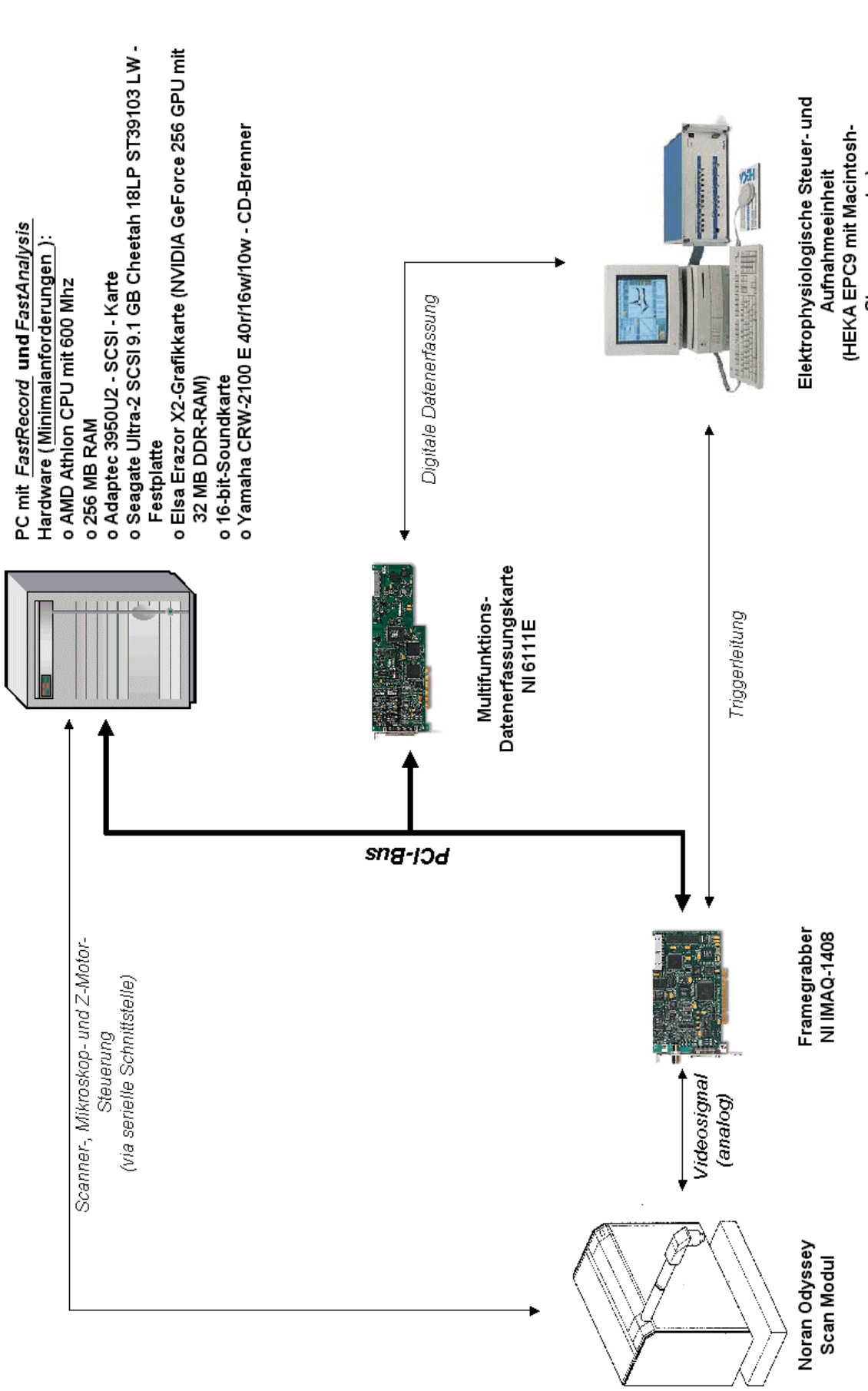


Abbildung 11: Hardwareumgebung von *FastRecord* zur schnellen Datenerfassung und *online*-Analyse: Das vom konfokalen Mikroskop stammende analoge Videosignal wird durch das Noran Odyssey *Scan Modul* generiert und mit Hilfe eines *Framegrabbers* digitalisiert, so daß dieses in geeigneter Form zur Weiterarbeitung auf dem PC vorliegt. Über die serielle Schnittstelle des PCs ist es möglich, den Scanner, das Mikroskop und den Z-Motor zu steuern. Eine Triggerleitung ermöglicht es, die Koordination des Aufnahmeprozesses der Bild- wie elektrophysiologischen Daten zu gewährleisten. Die Multifunktions-Datenerfassungskarte dient der simultanen Aufzeichnung der unkonditionierten elektrophysiologischen Daten auf dem Bildverarbeitungs-PC

Die eingesetzte Hardware in Form einer *Framegrabber*-Karte für die Bildverarbeitung (NI 1408) ließ sich ebenso wie die *DAQ*-Karte (NI 6011E) zwanglos in das schon bestehende *Setup* einfügen. Die Programmiersprache LabVIEW® eignete sich in jeder Hinsicht für die Entwicklung der hier verwendeten Programme:

Die Software *FastRecord* (siehe Abbildung 12) stellte schon in einer ersten Ausbaustufe die Funktionalitäten zur Verfügung, die bereits konzeptionell (siehe Methoden-Teil dieser Arbeit) angedacht waren: Das interessierende biologische Objekt – im vorliegenden Fall einzelne Zellen eines Hirnschnittes – wurden als konfokale Videobilder verlustfrei (*lossless recording*) und in „*real-time*“ auf dem PC-Bildschirm dargestellt. Dabei war es möglich, ROIs in beliebiger Form auf spezielle Bildbereiche zu platzieren. Die gemittelten Helligkeitswerte dieser *Regions of Interest* wurden dabei simultan neben dem *Live*-Bild als *Brightness-versus-Time*-Kurvenverläufe auf dem Monitor visualisiert. Bei Bedarf konnten durch Betätigen einer Aufnahme (*RECORD*) – Taste Bildsequenzen prinzipiell beliebiger Länge verlustfrei und in Echtzeit abgespeichert werden – eine Speichergrenze stellte lediglich die zur Verfügung stehende Festplattenkapazität dar. Die Möglichkeit der direkten Speicherung auf die Festplatte stellte einen wichtigen Fortschritt dar, denn nun war es möglich, jenseits der Beschränkungen des sonst verwendeten relativ teuren wie flüchtigen RAM-Speichers, Digitalfilme mit Hilfe des preiswerten und zumindest theoretisch unbeschränkt großen Mediums Festplatte direkt und dauerhaft digital zu sichern. Notwendig war hierzu einerseits die Verwendung einer Rechnerkonfiguration, die mit einem besonders leistungsfähigen SCSI-Kontroller wie -Festplatte ausgestattet war, zum anderen die Implementierung von Programmprozeduren, die das verlustfreie Schreiben auf den Datenträger im Echtzeitbetrieb zuließen. Darüberhinaus bot *FastRecord* die Möglichkeit, mit verschiedenen Geräten der experimentell benötigten Peripherie zu kommunizieren. So wurde hier die Möglichkeit der Steuerung des Noran®-Mikroskopes genutzt, z.B. um den *Laser-Shutter* zu öffnen bzw. zu schließen oder um den Z-Antrieb anzusteuern. Darüberhinaus wurde über Triggerleitungen ein Datenaustausch mit dem *Patch-Clamp*-Verstärker etabliert, so daß sowohl der Start eines elektrophysiologischen Experiments die Bildaufnahme initialisieren konnte wie umgekehrt. Auch war es im Verlauf der Experimente jederzeit möglich, das Programm neu eingetretenen Anforderungen gemäß zu erweitern, weil von Anfang an auf eine modulare Programmiertechnik geachtet wurde. So war es in einer

Ausbaustufe möglich, elektrophysiologische mit Bilddaten zu kombinieren. Alle hier vorgestellten Ergebnisse sind die Bildverarbeitung betreffend mit *FastRecord* gewonnen und mit *FastAnalysis* ausgewertet worden.

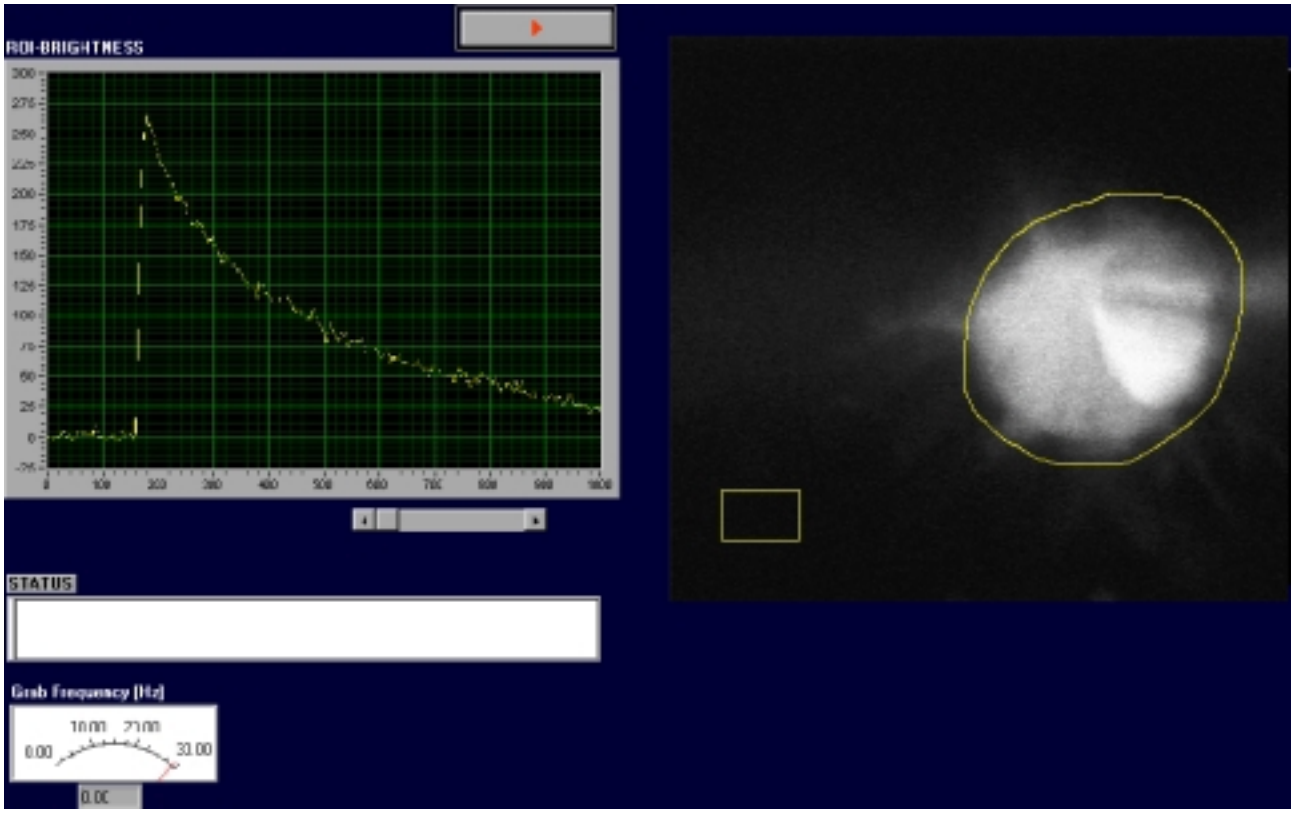


Abbildung 12: Graphische Benutzeroberfläche von *FastRecord* im Bildaufnahmemodus. In der rechten Bildschirmhälfte wird während des Programmbetriebes das Live-Bild des konfokalen Mikroskops angezeigt, wobei beliebige *Regions of Interest* (ROIs) hierauf platziert werden können. Im vorliegenden Fall ist ein sog. Freihand-ROI um das gesamte Zellsoma gelegt, die Hintergrundshelligkeit wird aus dem rechteckig definierten ROI berechnet. Die in den ROIs simultan errechneten Helligkeitswerte werden im sog. Kurvengraph ROI-BRIGHTNESS im linken oberen Bildschirm dargestellt. Darüber befindet sich die rote RECORD-Taste zum manuellen Starten einer Aufnahme. Wichtige Programmmeldungen gibt die Software im entsprechenden Statusfenster wieder. Die aktuell im *Live*-Modus erzielte Videofrequenz wird durch die Anzeige „Grab Frequency [Hz]" wiedergegeben. (Eine Programmdemonstration liegt dieser Arbeit auf CD-ROM bei.)

### III.1.2 Datenanalyse mit *FastAnalysis*

In einem zweiten Schritt war es notwendig, die mit *FastRecord* gewonnenen Bildsequenzen abschließend datenanalytisch aufzubereiten (Abbildung 13). Hierzu wurde das Programm *FastAnalysis* entwickelt, welches nun zusammen mit der Aufnahmesoftware ein integriertes Softwarepaket darstellt. Mit *FastAnalysis* war es möglich, digitale Filme verschiedener Formate (AVI, Bio-Rad®-PIC, BIN) komfortabel und umfassend zu analysieren. Von vornherein sollte dabei *FastAnalysis* in der Lage

sein, nicht nur die von *FastRecord* erzeugten Bilddaten zu verarbeiten, sondern auch andere Bild- bzw. Animationsformate lesen zu können. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Möglichkeit, nach der Definition entsprechender ROIs *Brightness-versus-Time*-Kurvenzüge erzeugen und in einem durch herkömmliche *Spreadsheet*-Programme lesbaren Dateiformat abspeichern zu können. In vorliegender Arbeit wurde im einfachsten Fall dabei wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden die mit *FastRecord* gewonnenen Bildsequenzen in *FastAnalysis* eingelesen. Dann wurde das Bild gesucht, zu welchem das bzw. die Aktionspotential(e) ausgelöst wurde(n) – dieses war z.B. mit Hilfe des sog. *Flaginserters* (Eilers, Hof et al. 1997) möglich, welcher automatisch genau das Bild in einer Videosequenz, z.B. durch ein kleines Rechteck in der linken oberen Bildebene, markiert, welches mit der Induktion eines elektrophysiologischen Ereignisses einhergeht. Im vorliegenden Fall wurde der *Flaginserter* durch den *Patch-Clamp* Verstärker EPC9/2 getriggert, sodaß punktgenau zur Evozierung der Aktionspotentiale auch eine Bildmarkierung erfolgte. Nun wurde vom ersten aufgenommenen Bild an bis zur markierten Stelle ein Durchschnittsbild (*average image*) erzeugt, welches als Hintergrundsbild (*background image*) diente und in seinen Helligkeitswerten als Divisor für alle nachfolgenden Bilder diente (Stricker and Whitaker 1999). Anschließend wurden im Durchschnittsbild die *Regions of Interest* (ROIs) definiert und sodann die Berechnung der Helligkeitswerte gegen Zeit (*Brightness versus Time*) initiiert. Die erhaltenen Kurven wurden dann sowohl im Programm selbst dargestellt als auch in einem konventionellen *Spreadsheet*-Dateiformat (z.B. MS Excel® oder Wavemetrics Igor®) abgespeichert, wo dann die endgültige Analyse durchgeführt werden konnte.

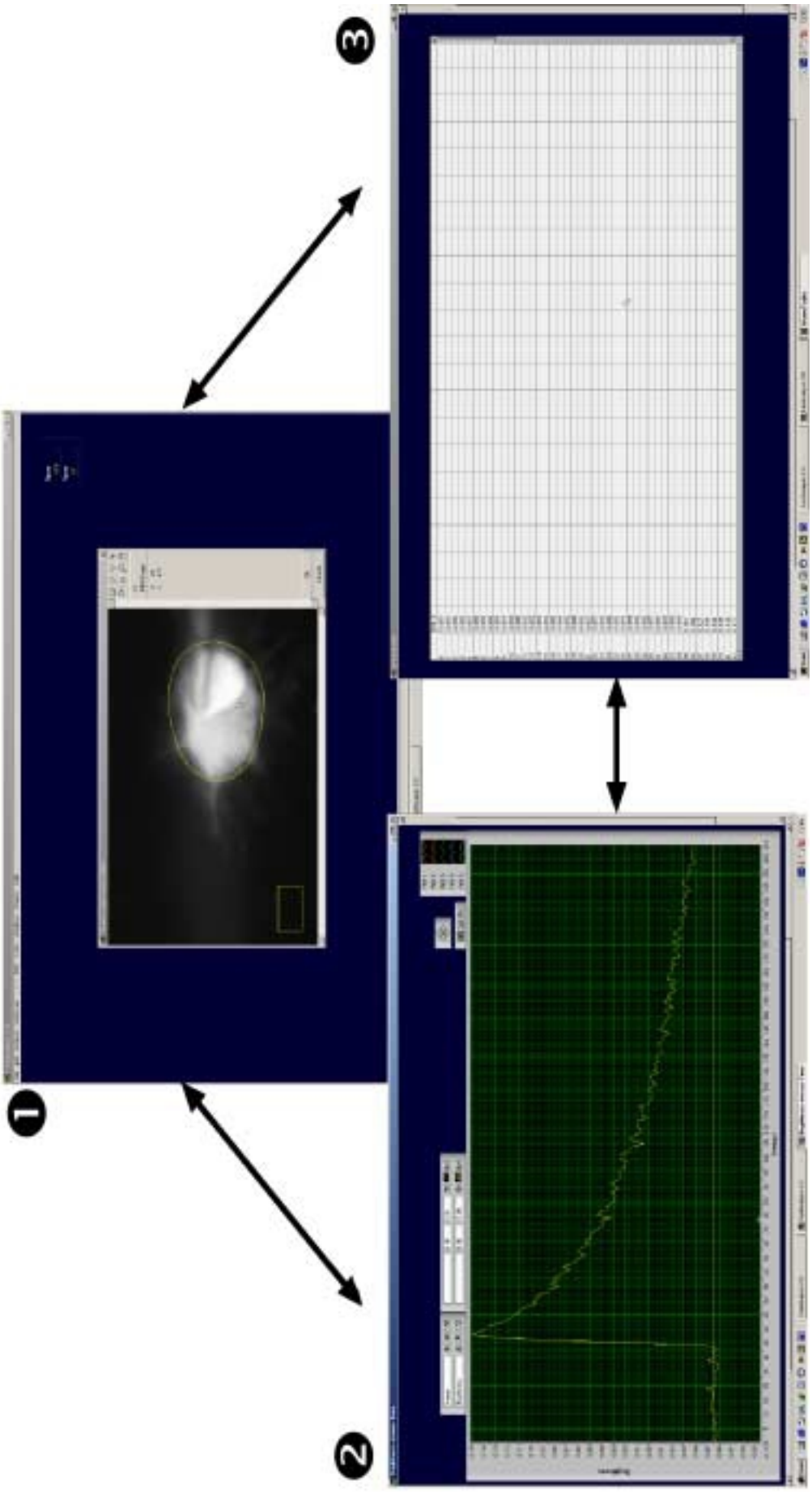


Abbildung 13: Datenanalyse mit *FastAnalysis*. Alle mit *FastRecord* gewonnenen Bilddaten können mit diesem Programm komfortabel ausgewertet und anschließend in einem konventionellen *Spreadsheet*-Format abgespeichert werden. Dargestellt ist hier das Zeichnen von ROIs (❶), um dann den hintergrundskorrigierten (*background corrected*) *Brightness-versus-Time*-Graphen (❷) zu berechnen, welcher dann als sog. *WaveTable* (❸) zur Weiterverarbeitung in konventionellen *Spreadsheet*-Programmen, wie z.B. MS Excel®, abgespeichert werden kann.

So wurden aufgrund der unter LabVIEW® neuentwickelten Software *FastRecord* und *FastAnalysis* für selbige und weiterentwickelte Experimente im vorliegenden *Setting* nur noch zwei Rechner benötigt: einer zum Durchführen der Elektrophysiologie, und ein zweiter PC, der sowohl die Bildaufnahme, -auswertung und Gerätesteuerung via *FastRecord* übernimmt. Eine zeitnahe Analyse der gewonnenen Ergebnisse ist während des eigentlichen Versuchs unter Ausnutzung des unter MS WINDOWS® möglichen *Multitaskings* (Haishi and Kose 1998) mit *FastAnalysis* möglich. Ein Experiment gestaltet sich so gesehen vielfach einfacher, effektiver und zeit- wie arbeitsökonomischer im Vergleich mit der Ausgangssituation: Einstellen der erforderlichen Parameter sowohl auf dem Elektrophysiologie- wie *Imaging*-Rechner, wobei einer den anderen in definierter Weise triggern kann - Startknopf drücken im Bedienpanel von *FastRecord* und der Versuch wird samt Grundauswertung in einem Schritt durchgeführt. Das Experiment kann dann in einem weiteren Schritt mit *FastAnalysis* detaillierter ausgewertet werden. Letztlich läuft also alles darauf hinaus, den Wissenschaftler in seiner experimentellen Arbeit so zu entlasten, daß er sich auf das Wesentliche konzentrieren kann: den biologischen Versuch selbst.

### III.1.3 Zusammenfassung der Software-Ergebnisse

Mit dem hier vorgestellten Softwarepaket liegt eine vollständige und integrierte Lösung zur Aufnahme und Analyse von Fluoreszenzdaten vor. Mit Hilfe von *FastRecord* ist es möglich, PC-basiert in Echtzeit und verlustfrei Videodaten aufzuzeichnen, wobei jederzeit und simultan eine Darstellung des Untersuchungsobjekts auf dem Monitor ebenso möglich ist wie die graphische Wiedergabe der *Live*-Fluoreszenzwerte. Die mit *FastRecord* gewonnenen Daten können mit Hilfe von *FastAnalysis* analysiert und präsentationsreif wiedergegeben werden. Die innere Abstimmung und Modularität dieser Programme erlaubt eine einfache und intuitive Bedienung, wobei bei Bedarf jederzeit die Möglichkeit zur Erweiterung der Programmfunktionalität besteht. Unter Verwendung der PC-Plattform steht dabei eine weitverbreitete und preiswerte Alternative zur Durchführung von *Imaging*-Experimenten zur Verfügung, die in ihren qualitativen (z.B. Signal-Rausch-Verhältnis) wie quantitativen (z.B. Prozessgeschwindigkeit)

Eigenschaften aufwendigen herkömmlich verwendeten Hochleistungscomputern in nichts nachsteht.
Die Software *FastRecord* wurde im wissenschaftlichen Wettbewerb „Building the Future 2000“ von National Instruments mit dem 3. Platz ausgezeichnet. Die Funktionsweise wie eine detaillierte Beschreibung des Programmes ist auf der beiliegenden CD-ROM als HTML-Präsentation verfügbar und mit jedem herkömmlichen *Internet-Browser* in der jeweils aktuellen Version (z.B. Internet-Explorer®, Netscape Navigator®) betrachtbar.
Eine funktionsbeschränkte Version des Programmes *FastAnalysis* ist dieser Arbeit ebenfalls auf CD-ROM beigefügt.

## III.2 Versuche zum Entwicklungsprofil von Kalziumsignalen in der Purkinje-Zelle des Kleinhirns

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob sich im Laufe der Entwicklung von unreifen Purkinje-Zellen früh postnataler Ratten Unterschiede gegenüber ausdifferenzierten Purkinje-Zellen adulter Tieren hinsichtlich der durch Aktionspotentiale (AP) induzierbaren intrazellulären Kalziumsignale ergeben. Dabei wurde unter *current-clamp*-Bedingungen im *whole-cell*-Modus Strom unterschiedlicher Stärke und Dauer derart in die zu untersuchende Zelle injiziert, daß diese die gewünschte Anzahl an Aktionspotentialen generierte. Die hier präsentierten statistischen Ergebnisse wurden ausschließlich mit einer intrazellulären Konzentration von 50 µM des Kalzium-Indikators Oregon Green® 488 BAPTA-2 gewonnen; alle Versuche mit höheren wie niedrigeren Farbstoffkonzentrationen wiesen jedoch ebenso wie die Untersuchungen an Mäusen in die gleiche unten vorgestellte Richtung.
In einem ersten Ansatz wurde das Neuron zunächst als komplette somatische Einheit (Soma inklusive Nukleus) betrachtet, um später detailliert die Zellkompartimente Dendrit, Nukleus wie subplasmalemmale Regionen zu untersuchen. Hierzu wurden systematisch 5-10 Tage alte Tiere (früh postnatale Tiere) mit mehr als 18 Tage alten (adulte Tiere) verglichen, wobei die Versuche zunächst an Ratten vorgenommen wurden, um später die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Mäuse zu überprüfen. Zuletzt wurden die Experimente unter gleichen

Bedingungen an Mäusen reproduziert, denen das Kalzium-bindende Protein Calbindin D28k infolge eines Gendefektes fehlt (*knock out* Mäuse).

### III.2.1 Kalzium-Transienten in verschiedenen Zellkompartimenten bei Ratten

Zuerst wurde der Effekt von 1 und 8 Aktionspotential(en) auf die in Purkinje Zellen induzierbaren Kalziumtransienten von früh postnatalen und adulten Ratten untersucht. In Abbildung 14 ist zunächst ein 5 Tage altes Purkinje-Neuron einer 21 Tage alten Zelle gegenübergestellt. Induziert man 1 bzw. 8 Aktionspotenial(e), so sieht man im gesamten Zellsoma – in der Abbildung durch die gestrichelte *Region of Interest* wiedergegeben -zweierlei: Zum einen werden die Kalziumtransienten ($\Delta F/F_0$) bei Betrachtung nur eines Lebensalters mit zunehmender Anzahl der generierten Aktionspotentiale größer. Zum anderen wird deutlich, daß beim Vergleich des 5 Tage alten Tieres mit dem 21 Tage alten die unter gleichen Bedingungen generierten Kalziumtransienten deutlich größer beim jüngeren im Vergleich zum älteren Tier ausfallen. Der alle diesbezüglichen Experimente zusammenfassende Vergleich (Abbildung 15) ergibt, daß bei 5 - 6 Tage alten Ratten die durch ein Aktionspotential induzierbaren Kalziumtransienten um einen Faktor 4,7 deutlich größer sind ($\Delta F/F_0$ = 0,03818 $\pm$ 0,00728; n=6) als die unter den selben Bedingungen erzielbaren Kalziumantworten bei Tieren, die 19 bis 21 Tage sind ($\Delta F/F_0$ = 0,00804 $\pm$ 0,00247; n=5). Erhöht man die Anzahl der pro Stimulation induzierten Aktionspotentiale auf acht, so bleibt das Signal bei den jüngeren Nagern um einen Faktor 3,5 größer ($\Delta F/F_0$ = 0,16913 $\pm$ 0,04683; n=4) als bei den älteren Tieren ($\Delta F/F_0$ = 0,0478 $\pm$ 0,00785; n=5). Die Amplitude des Kalzium-Signals hat bei den jungen Ratten bei 8 gegenüber 1 Aktionspotential(en) um einen gerundeten Faktor 4 zugenommen, bei den alten um das sechsfache.

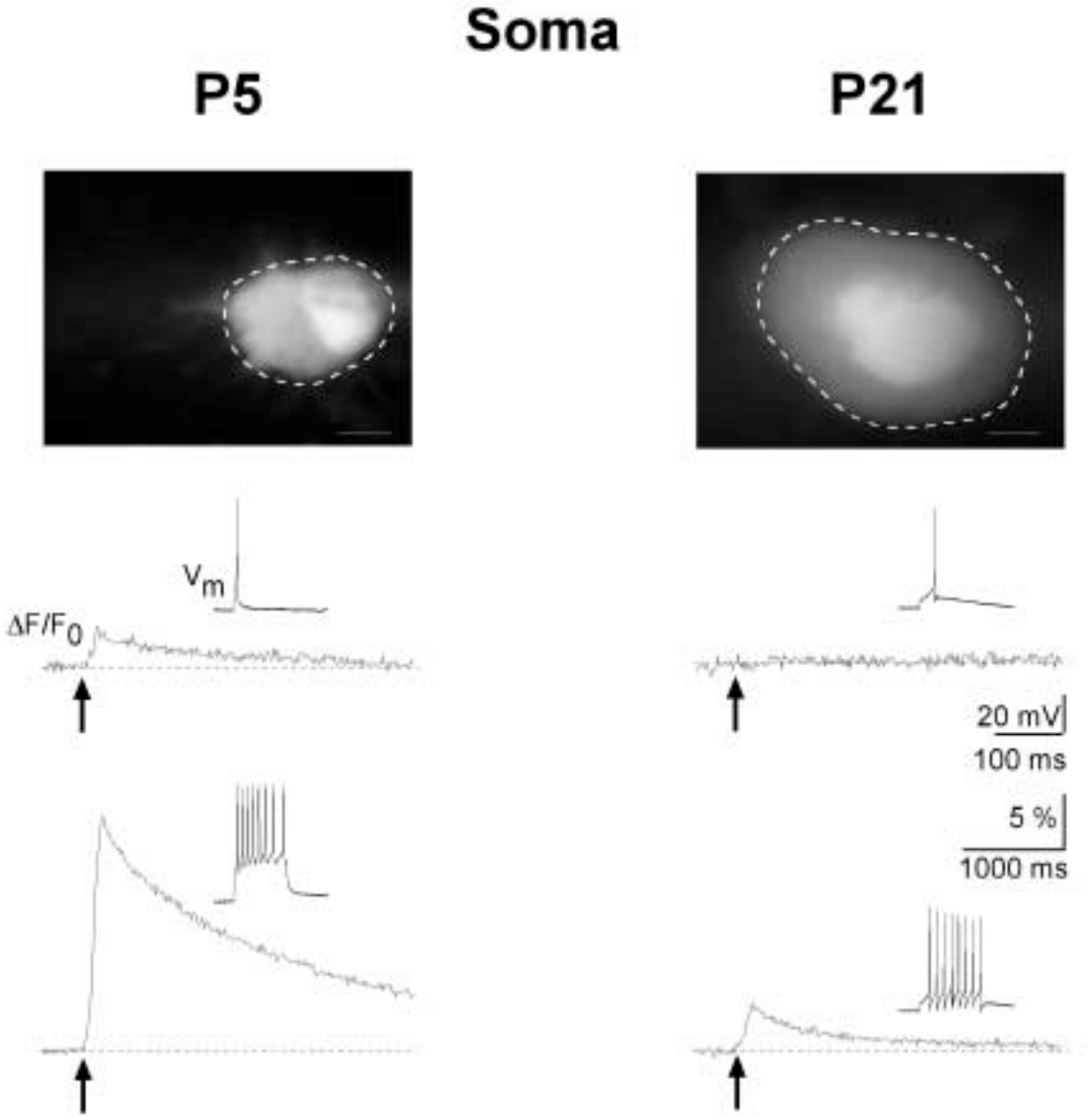


Abbildung 14: Wechsel im Aktionspotential-induzierten somatischen Kalzium-Signalverhalten in unterschiedlich alten Ratten (P5 versus P21). Die gestrichelte Linie im oberen Zellbild kennzeichnet die Region, in welcher das Fluoreszenzsignal gewonnen wurde. $V_m$ stellt die Spannungskurven dar, welche unter *whole cell* - Bedingungen aufgezeichnet wurden. Die Veränderungen in der Kalzium-Konzentration wurden als relative Fluoreszenzveränderungen ($\Delta F/F_0$) aufgenommen (5 gemittelte Kurven). Im mittleren Bildteil liegen die Kalzium-Transienten infolge eines Aktionspotentiales, im unteren infolge von 8 Aktionspotentialen vor. Die Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Induktion von Aktionspotentialen. Das Haltepotential lag bei –70 mV, die Aktionspotentialfolgen wurden durch Strominjektionen verschiedener Länge und Größe induziert. Der weiße Strich in den oberen Zellbildern entspricht jeweils 5 μm.

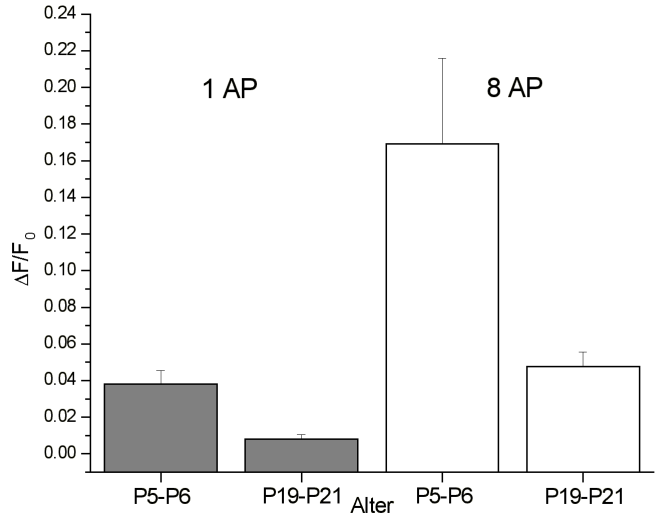


Abbildung 15: Unterschiedliche Ausprägung der mit 1 bzw. 8 Aktionspotential(en) induzierbaren Kalzium-Transienten in Ratten unterschiedlichen Lebensalters (P5-P6 versus P19-21) im Soma. Der Standardfehler ist in den Balkengraphen wiedergegeben. Der $\Delta F/F_0$-Mittelwert für die jungen Tiere bei 1 Aktionspotential (1 AP) liegt bei 0,03818 ± 0,00728 (n = 6), der für die älteren bei 0,00804 ± 0,00247 (n=5); damit ist hier das Signal bei den jungen im Vergleich zu den älteren Ratten im Mittel um einen Faktor 4,7 größer. Der $\Delta F/F_0$-Mittelwert für die jungen Tiere bei 8 Aktionspotentialen (8 AP) liegt bei 0,16913 ± 0,04683 (n=4), der für die älteren bei 0,0478 ± 0,00785 (n=5); Damit ist hier das Signal bei den jungen im Vergleich zu den älteren Ratten im Mittel um einen Faktor 3,5 größer.

In Übertragung der für das Soma der Purkinje-Zelle durchgeführten Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen auch die Kalziumgradienten als $\Delta F/F_0$ – Werte als Reaktion auf verschiedene Aktionspotentialfolgen im Primärdendriten des Neurons untersucht. Als Primärdendrit wurde dabei der Abschnitt der Nervenzelle definiert, welcher unmittelbar am Soma entspringt und als Ursprung weiterer (sekundärer, tertiärer, usf.) Abzweigungen der spalierbaumartigen Dendritenverästelung dient (Ito 1984). In Abbildung 16 sind analog zu Abbildung 14 zunächst die Ergebnisse für ein 5 Tages altes Tier im Vergleich zum 21 Tage alten gegenübergestellt. Der mit 8 Aktionspotentialen induzierbare Kalziumtransient ist innerhalb einer Alterklasse größer als der mit einem Aktionspotential induzierbare. Beim Vergleich des alten mit dem jüngeren Tier fällt auf, daß die Erhöhungen des dendritischen Kalziums beim adulten Tier unter äquivalenten experimentellen Bedingungen kleiner ausfallen als beim juvenilen Tier. Dabei sind in der zusammenfassenden Darstellung (Abbildung 17) die Kalziumtransienten in Folge eines Aktionspotentials in 5 bis 6 Tage alten Tieren ($\Delta F/F_0$ = 0,09381 ± 0,02248; n=7) um einen Faktor 3,8 größer als in 19 bis 21 Tage alten Ratten ($\Delta F/F_0$ = 0,03332 ±

0,02801; n=5). Werden unter den selben Bedingungen 8 Aktionspotentiale induziert, sieht man bei jungen ($\Delta F/F_0$ = 0,55059 ± 0,1449; n=5) im Vergleich zu alten Ratten ($\Delta F/F_0$ = 0,0896 ± 0,02308; n=5) eine um den Faktor 6,1 größere Kalzium-Antwort. Die Signale fallen im Primärdendriten durchweg größer aus als im Soma, so bei den jungen Tieren um das 2,3- bzw. 3,4-fache, bei den 19 bis 21 alten um das 3,8- bzw. 1,5-fache für 1 bzw. 8 Aktionspotential(e), sind aber bei der hier verwendeten somatischen elektrischen Stimulation spätestens ab der Ebene der Tertiärdendriten nicht mehr nachweisbar, wobei diese reifungsbedingt morphologisch frühestens ab P8-P10 nachweisbar sind.

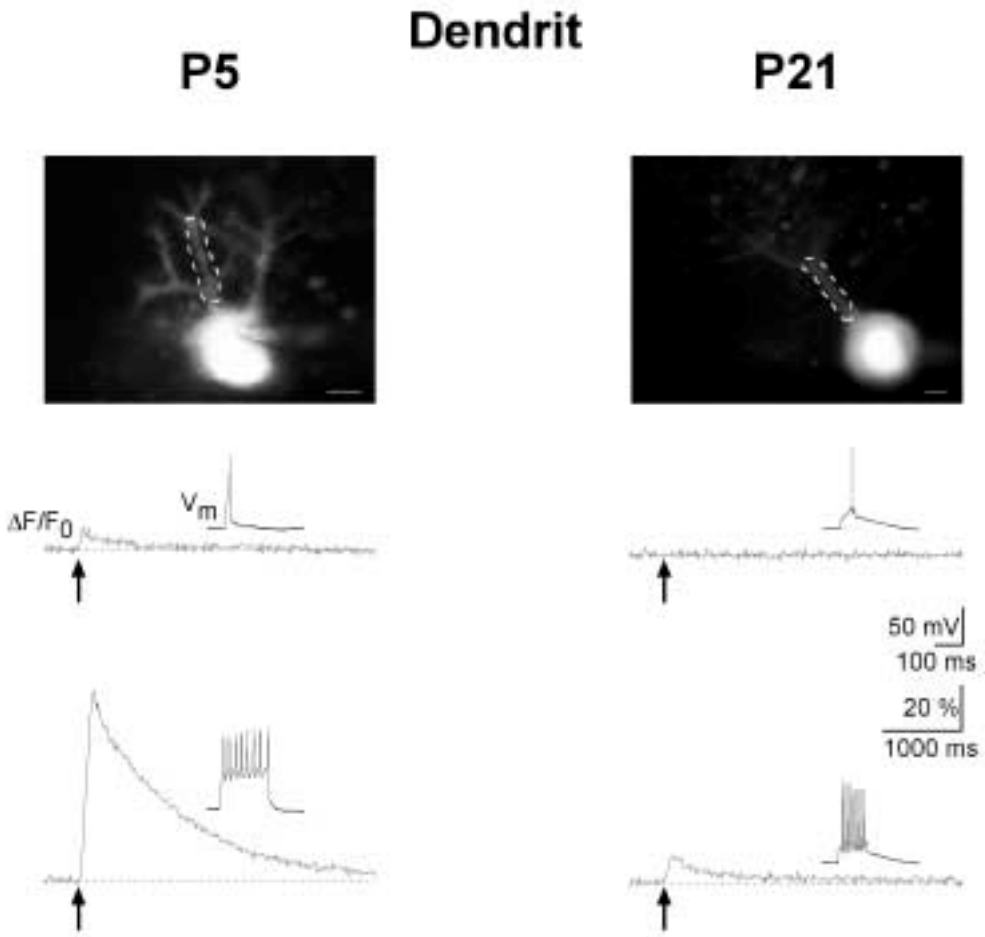


Abbildung 16: Wechsel im Aktionspotential-induzierten dendritischen Kalzium-Signalverhalten in unterschiedlich alten Ratten (P5 versus P21). Gleiche experimentelle Bedingungen wie in Abbildung 14. Der weiße Strich in den oberen Zellbildern entspricht jeweils 5 µm.

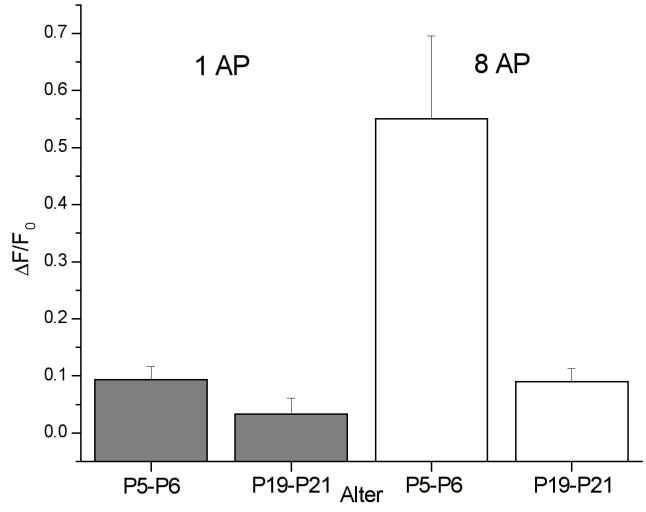


Abbildung 17: Unterschiedliche Ausprägung der mit 1 bzw. 8 Aktionspotential(en) induzierbaren Kalzium-Transienten in Ratten unterschiedlichen Lebensalters (P5-P6 versus P19-21) im Primärdendriten. Der $\Delta F/F_0$-Mittelwert für die jungen Tiere bei 1 AP liegt bei 0,09381 ± 0,02248 (n = 7), der für die älteren bei 0,03332 ± 0,02801 (n=5); damit ist hier das Signal bei den jungen im Vergleich zu den älteren Ratten im Mittel um einen Faktor 3,8 größer. Der $\Delta F/F_0$-Mittelwert für die jungen Tiere bei 8 AP liegt bei 0,55059 ± 0,1449 (n = 5), der für die älteren bei 0,0896 ± 0,02308 (n=5). Damit ist hier das Signal bei den jungen im Vergleich zu den älteren Ratten im Mittel um einen Faktor 6,1 größer.

Die Auswertung der $\Delta F/F_0$-Werte der Kalzium-Transienten im Nukleus ergab qualitativ die selben Ergebnisse, wie sie für das Soma und den Dendriten gezeigt wurden. In Abbildung 18 sind in gewohnter Weise eine 5 Tage alte Purkinje-Zelle einer 21 Tage alten gegenübergestellt. Es wird deutlich, daß die 8 Aktionspotentialen folgenden Kalziumtransienten im jüngeren Tier beträchtlich größer ausfallen als diejenigen in der adulten Ratte. Die Stimulation mit einem Aktionspotential erbrachte bei den jungen Tieren (P5 - P6) gerade noch meßbare Transienten ($\Delta F/F_0$ = 0,01951 ± 0,00852; n=5), während bei den älteren Tieren (P19 – 21) keine evozierbaren Kalziumtransienten nachzuweisen waren (Abbildung 19). Erhöhte man die Anzahl der Aktionspotentiale auf 8, so waren die Kalziumsignale bei den 5 bis 6 Tage alten Ratten ($\Delta F/F_0$ = 0,066613 ± 0,0157; n=3) um einen Faktor 5,6 größer als in den 19 bis 21 Tage alten Tieren ($\Delta F/F_0$ = 0,012 ± 0,0006 ; n=3). Die nukleären Kalzium-Transienten stellten somit die mit Abstand kleinsten Signale unter den untersuchten Zellkompartimenten dar.

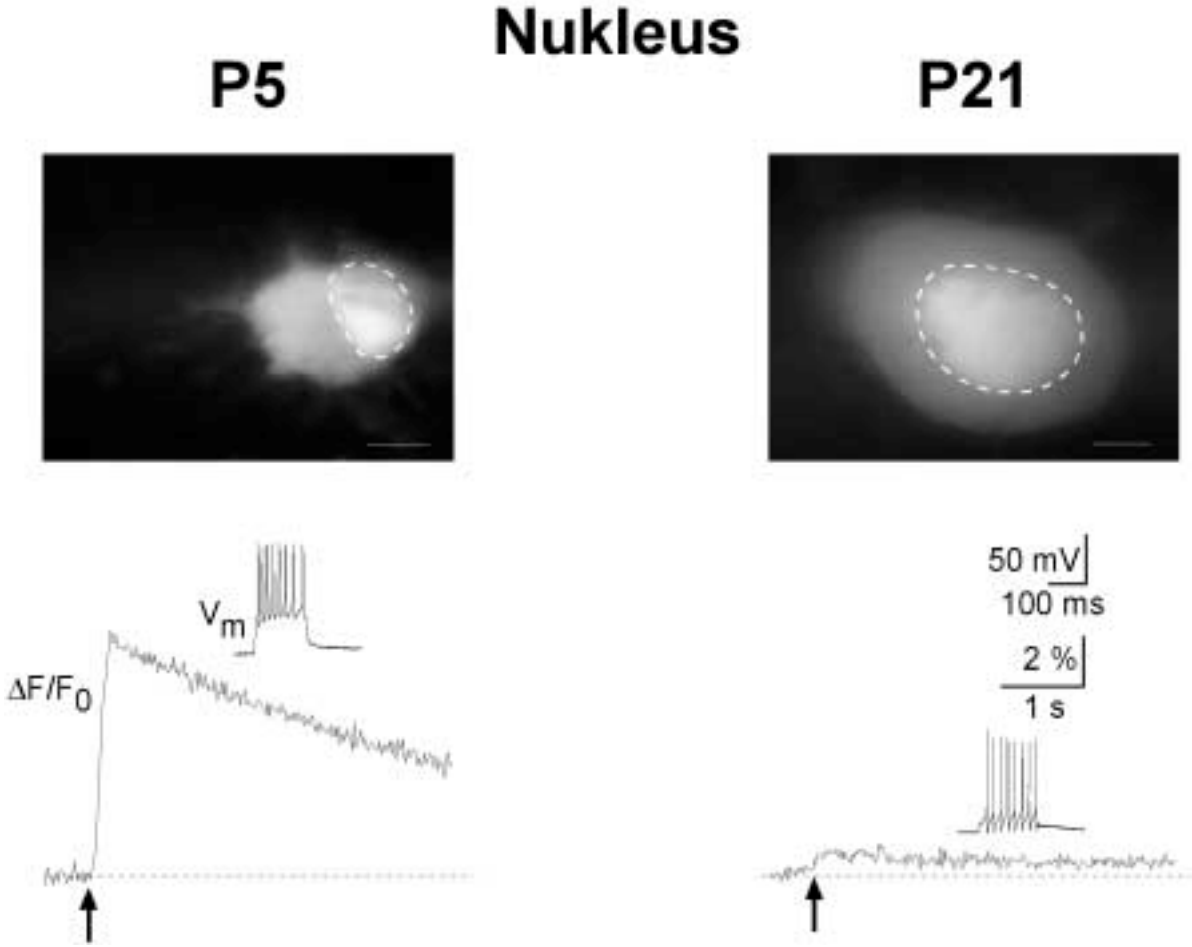


Abbildung 18: Wechsel im Aktionspotential-induzierten nukleären Kalzium-Signalverhalten in unterschiedlich alten Ratten (P5 versus P21). Gleiche experimentelle Bedingungen wie in Abbildung 14. Der weiße Strich in den oberen Zellbildern entspricht jeweils 5 μm.

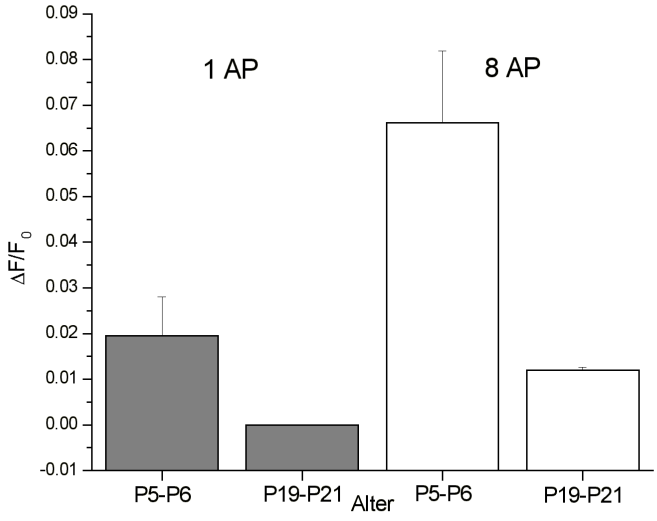


Abbildung 19: Unterschiedliche Ausprägung der mit 1 Aktionspotential induzierbaren Kalzium-Transienten in Ratten unterschiedlichen Lebensalters (P5-P6 versus P19-21) im Nukleus. Der $\Delta F/F_0$-Mittelwert für die jungen Tiere bei 1 AP liegt bei 0,01951 ± 0,00852 (n = 5), bei älteren im nicht mehr meßbaren Bereich und wurde auf 0 gesetzt (n=4). Der $\Delta F/F_0$-Mittelwert für die jungen Tiere bei 8 AP liegt bei 0,066613 ± 0,0157 (n = 3), der für die älteren bei 0,012 ± 0,0006 (n=3). Damit ist hier das Signal bei den jungen im Vergleich zu den älteren Ratten im Mittel um einen Faktor 5,6 größer.

Die Untersuchung der Kalziumtransienten in verschiedenen subplasmalemmalen Schalen zeigte eine Abnahme der Kalziumamplituden von außen nach innen. Nur in der Nähe der Plasmamembran war der Abfall des Kalziumtransienten durch eine doppelexponentielle Funktion beschreibbar, sonst war dieser streng monoton fallend im Sinne einer einfachen Exponentialfunktion. Demzufolge kann man für unmittelbare Zellmembrannähe zwei Zeitkonstanten $\tau$ für den Abfall der Kalziumsignale ermitteln, für die sonstigen Schalen ist eine Zeitkonstante hinreichend. Die Anstiegszeit *rt* (*rise time*; hier die Zeit von 20 % bis 80 % der zu messenden Amplitude) war sowohl in den untersuchten zytoplasmatischen Schalen des Somas wie des Nukleus betragsgleich. Exemplarisch ist eine solche Untersuchung für eine 5 Tage alte Ratte in Abbildung 20 dargestellt: Das auf 8 Aktionspotentiale folgende Kalziumsignal ($\Delta F/F_0$) in der äußeren Schale bildete sich am größten aus und wurde zum Zellinnern hin stetig kleiner. Das kleinste Kalziumsignal bildete sich im Nukleus aus. Die Zeitkonstanten wurden von außen nach innen stetig größer, wobei für das äußere Soma zwei Werte im Sinne einer doppelexponentiellen Funktion ermittelt werden konnten. Die Anstiegszeit *rt* der Kalziumtransienten war unter Berücksichtigung der zeitlichen Auflösung der

Bildaufnahme in allen untersuchten Zellkompartimenten mit 132 bis 144 ms gleich groß.

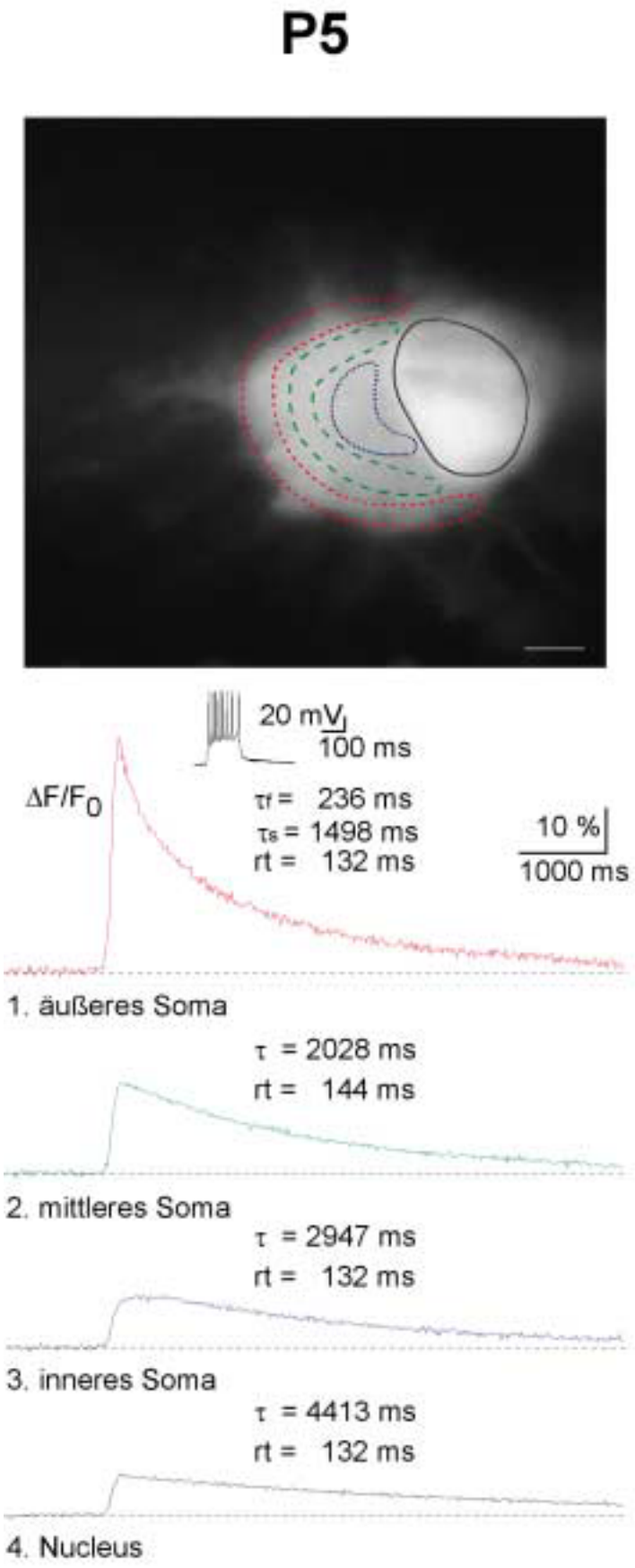

Abbildung 20: Aktionspotential-induziertes Kalzium-Signalverhalten in verschiedenen subsomatischen Regionen sowie im Nukleus einer 5 Tage alten Ratte. Die Kalzium-Transienten wurden – wie im *Inset* gezeigt – durch 16 Aktionspotentiale hervorgerufen. Die Anstiegszeit (*rise time rt*, 20-80 %) und die Zeitkonstante(n) $\tau$ sind für jede einzelne Kurve angegeben. Der weiße Strich im oberen Zellbild entspricht 5 $\mu$m.

Die hier an zerebellären Purkinje-Neuronen von Ratten durchgeführten Versuche zeigen zusammenfassend zunächst eine Zunahme der intrazellulär induzierbaren Kalzium-Transienten in Abhängigkeit der generierten Aktionspotentialfolgen (1 versus 8 AP). Die höchsten $\Delta F/F_0$-Werte wurden im Primärdendriten gesehen, dann im Soma, die kleinsten Kalzium-Signale traten im Nukleus auf. Betrachtet man die intrazytoplasmatische Verteilung der Kalzium-Transienten, so sind diese direkt subplasmalemmal am größten, und werden zum Zellinneren hin kleiner. Dabei bleibt die Anstiegszeit *rt* gleich. Die Ausprägung der Kalzium-Transienten zeigte in allen Zellkompartimenten eine starke Altersabhängigkeit, wobei jüngere Tiere generell größere $\Delta F/F_0$-Werte zeigen als ältere. Das zeitliche Fenster dieser Änderung ist dabei sehr klein und liegt höchstens im Bereich von 15 Tagen (P5-P6 versus P19-P21).

### III.2.2 Kalzium-Transienten bei Mäusen

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich die für Ratten gewonnenen Ergebnisse auch für Wildtyp-Mäuse nachweisen lassen. Hierzu wurden Cb1-Mäuse unter exakt den gleichen experimentellen Bedingungen einer Versuchsreihe, wie sie in Abbildung 14 gezeigt sind, unterzogen. Die bei den Ratten erhobenen Meßdaten lassen sich zusammenfassend qualitativ in gleicher Weise bei Mäusen wie bei Ratten erheben. Ein Beispiel für das Soma einer Purkinje Zelle je einer 5 bzw. 10 Tage alten Cb1-Maus ist in Abbildung 21 dargestellt: Induziert man im gegebenen Fall 1, 2, 4 und 8 Aktionspotential(e), so sieht man, daß die Kalziumtransienten ($\Delta F/F_0$) in ihrer Amplitude zunehmen. Beim Vergleich des 5 Tage alten Tieres mit dem 10 Tage alten fällt jedoch stets eine kleinere Ausprägung der Kalziumantwort beim älteren im Vergleich mit dem jüngeren Tier unter gleichen experimentellen Konditionen auf.

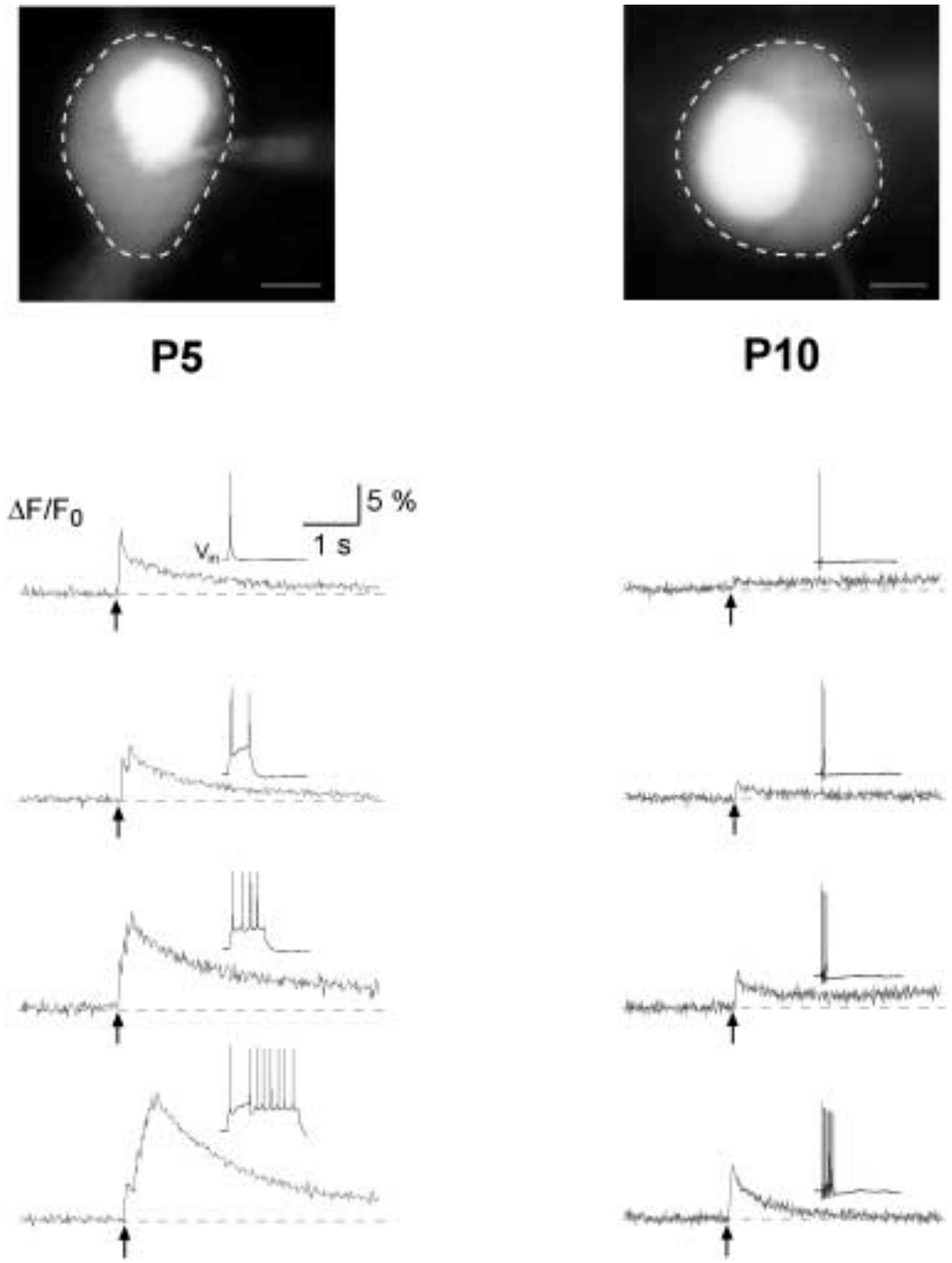


Abbildung 21: Gegenüberstellung der für Cb1-Wildtyp-Mäuse induzierbaren somatischen Kalziumtransienten in der Purkinje-Zelle des Zerebellums infolge von 1, 2, 4 und 8 Aktionspotential(en) sowohl bei einem 5 Tage wie bei einem 10 Tage alten Tier. Gleiche experimentelle Bedingungen wie in Abbildung 14. Der weiße Strich in den oberen Zellbildern entspricht jeweils 5 μm.

### III.2.3 Kalzium-Transienten bei Calbindin D28k defizienten Mäusen

Abschließend war die Ausprägung der Kalziumtransienten in Mäusen von Interesse, denen das Kalzium-bindende Protein Calbindin D28k fehlt (*knock out* Mäuse). Für diese Experimente wurden adulte Tiere herangezogen, da diese in den bisherigen Versuchen vergleichsweise kleine Kalzium-Tansienten ausbildeten und somit ein eventueller Unterschied zwischen Wildtyp- und genetisch modifizierten Tieren am besten zum Ausdruck kommen würde. Da die Entwicklung der Calbindin-defizienten Mäuse auf eine andere Wildtyp-Rasse zurückging, wurde zunächst diese untersucht im Hinblick auf die Ausprägung der somatischen Kalzium-Transienten infolge der Induktion von 1, 2, 4, 8 und 16 Aktionspotentialen. Die erzielten Ergebnisse stimmten qualitativ mit den Befunden an Ratten und Cb1-Wildtyp-Mäusen überein. Hierauf wurden die Versuche an einer 37 Tage alten Calbindin D28k defizienten Maus wiederholt (Abbildung 22). Unter Wahrung des bisherigen experimentellen Designs fand sich beim Vergleich der mit 8 Aktionspotentialen induzierbaren $\Delta F/F_0$-Werte der Kalzium-Transienten bei den Calbindin *knock out* – Tieren ein um einen gerundeten Faktor 1,9 größere Ausprägung der Kalzium-Signale als bei den Wildtyp-Tieren ($\Delta F/F_0$ = 0,077 $\pm$ 0,00875; n=4 versus $\Delta F/F_0$ = 0,04043 $\pm$ 0,0052; n=7, siehe Abbildung 23). Die Zeitkonstante $\tau$ war im gezeigten Beispiel mit 83 ms um einen gerundeten Faktor 5 kleiner im Vergleich zum Wildtyp mit 425 ms.

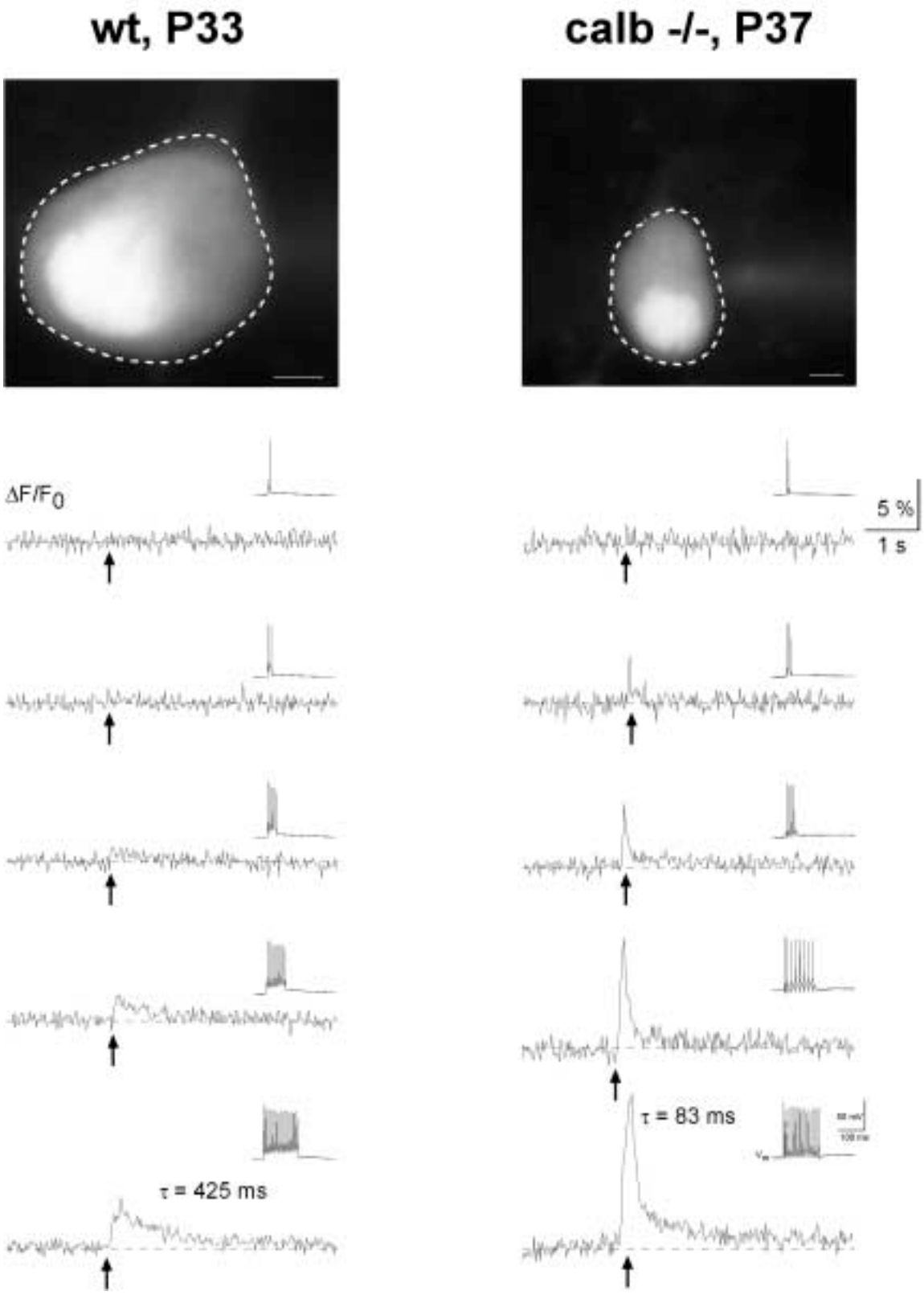


Abbildung 22: Aktionspotential-induzierte somatische Kalzium-Gradienten in erwachsenen Wildtyp (wt; P33)- wie Calbindin D28K defizienten Mäusen (calb-/-; P37). Die für verschiedene Aktionspotentialfolgen erzielten Kalzium-Gradienten sind für Wildtyp-Mäuse vergleichbar mit den Resultaten, welche für 21 Tage alte Ratten gewonnen wurden. Bei den Calbindin D28k defizienten Mäusen ist die vergrößerte Amplitude wie verkleinerte Zeitkonstante $\tau$ der Kalziumtransienten im Vergleich zum Wildtyp bemerkenswert. Der weiße Strich in den oberen Zellbildern entspricht jeweils 5 µm.

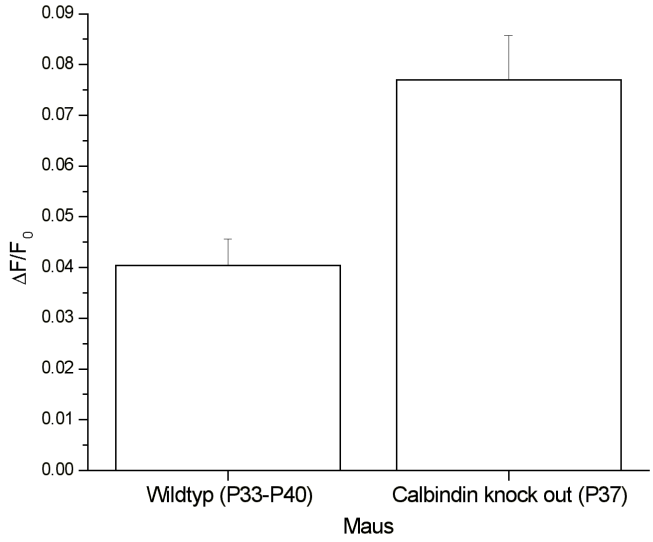


Abbildung 23: Gegenüberstellung der mit 8 Aktionspotentialen im Soma erzielbaren $\Delta F/F_0$-Kalzium-Fluoreszenzwerte in Wildtyp-Mäusen einerseits und Calbindin D28k defizienten Mäusen andererseits. Der Standardfehler ist in den Balkengraphen wiedergegeben. Der $\Delta F/F_0$-Mittelwert für die Wildtyp-Tiere liegt bei 0,04043 ± 0,0052 (n=7), der für die *knock out* - Tiere bei 0,077 ± 0,00875 (n=4). Damit ist hier das Signal bei den knock out- im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren im Mittel um einen Faktor 1,9 größer.

### III.2.4 Zusammenfassung der experimentellen Befunde

Im ersten Abschnitt vorliegender Arbeit wurde gezeigt, daß sich mit Hilfe der Programmiersprache LabVIEW® ein PC-basiertes Software-Paket entwickeln ließ, welches sich sowohl zur Aufnahme wie zur Analyse von Fluoreszenzdaten in der konfokalen *Laser Scanning* Mikroskopie einsetzen läßt. Unter dem Programmnamen *FastRecord* wurde dabei eine Anwendung entwickelt, welche sich vor allem zur *Online*-Analyse und direktem, verlustfreien Aufzeichnen großer Bilddatenmengen auf Festplatte eignet. Darüberhinaus besteht dabei erstmals die Möglichkeit, elektrophysiologische Daten direkt mit Bilddaten zu korrelieren. Das Programm *FastAnalysis* ist in der Lage, die gesamte intra- wie postexperimentelle Aufbereitung von *Imaging*-Daten im Sinne von *Brightness-versus-Time* – Analysen durchzuführen. Beide Programme bilden somit ein integriertes Softwarepaket zur Durchführung des sog. *Imagings* in der (neuro)physiologischen Forschung, welches unter Nutzung der weltweit verbreitesten Computerplattform Echtzeitdaten in Originalqualität arbeits- und kosteneffektiv intra- wie postexperimentell zur Verfügung stellt.

Im zweiten Abschnitt wurden die reifungsbedingten Veränderungen intrazellulärer Kalziumsignale von zerebellären Purkinje-Zellen in Ratten wie Mäusen untersucht, welche der Induktion von Aktionspotentialen folgten. Hier konnte zum einen gezeigt werden, daß die relative Amplitudengröße der evozierten Kalziumsignale in dem Sinne altersabhängig ist, daß bei jungen Ratten (P5-P6) die unter gleichen experimentellen Bedingungen generierten Transienten in allen untersuchten Zellkompartimenten (Soma, Nukleus, Primärdendrit) größer sind als in älteren Tieren (P19-P21). Dabei sind die im Primärdendrit gesehenen Kalziumantworten infolge einer definierten Aktionspotentialfolge am amplitudengrößten, gefolgt vom Soma und zuletzt vom Nukleus. Das Kalziumsignal wird dabei intrazytoplasmatisch im Sinne einer sich somatisch ausbreitenden Wellenfront kleiner. Alle Experimente ließen sich mit dem qualitativ gleichen Ergebnis in Wildtyp-Mäusen reproduzieren. Zur Hinterfragung *eines* denkbaren Mechanismus der beobachteten Veränderungen der intrazellulären Kalzium-Homöostase während der neuronalen Maturation wurden die Experimente unter gleichen Bedingungen in adulten Wildtyp- (P33-P40) wie Calbindin D28k defizienten (P37) Mäusen wiederholt. Es zeigte sich, daß in den Mäusen, denen das Kalzium-bindende Protein Calbindin D28k infolge eines evozierten Gendefektes fehlt (*knock out* Mäuse), sich die Kalziumsignale in jeder Weise größer und mit kleineren Zeitkonstanten $\tau$ ausbildeten, als in den unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchsreihen mit entsprechenden Wildtyp-Mäusen.

# IV. Diskussion

Die vorliegende Arbeit diente der Realisierung von zweierlei Zielen: zum einen wurde ein Software-Paket (*FastRecord* und *FastAnalysis*) entwickelt, das es gestattet, Fluoreszenzdaten der konfokalen Echtzeit Laser Scanning Mikroskopie online darzustellen bzw. als Rohdaten verlustfrei auf Festplatte abzuspeichern. Zum anderen war es mit den hier entwickelten Programmen möglich, intra- wie postexperimentell sämtliche notwendigen Datenanalysen durchzuführen. Mit dieser Software lag somit erstmals eine PC-basierte Applikation vor, mit der es ohne Einschränkungen möglich war, Echtzeitdaten ohne Qualitätsverlust *online* aufzuzeichnen und simultan zu analysieren. Im zweiten Teil ging es darum, das Entwicklungsprofil der intrazellulären Kalziumhomöostase in der Maturation zerebellärer Purkinje-Zellen von Ratten und Mäusen zu untersuchen. Hierzu wurden unter *whole cell* – Bedingungen Aktionspotentialfolgen in entsprechenden Neuronen induziert und mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie fluorimetrisch die Ausprägung der damit korrespondierenden intrazellulären Kalziumtransienten erfaßt. Zur Klärung eines Mechanismus, welcher die differentielle Ausprägung dieser Kalziumtransienten bei Nagern frühpostnatalen und adoleszenten bzw. adulten Alters erklären hilft, wurden die Experimente abschließend in genetisch modifizierten (*knock out*) Mäusen durchgeführt, denen das Kalzium-bindende Protein Calbindin D28k fehlt.

## IV.1 Erfolgreicher Einsatz eines neuen Software-Paketes zur Aufnahme und Analyse von Kalzium-Fluoreszenzdaten

Für die Aufnahme und Analyse von Fluoreszenzdaten in der konfokalen *Laser Scanning* wie Multiphotonen-Mikroskopie liegen eine Vielzahl von kommerziellen Lösungen vor, so z.B. *Image-Pro® Plus* von *Media Cybernetics* oder die *Fluoview®*-Software des gleichnamigen konfokalen Laser-Mikroskopes von *Olympus®* (Reynaud, Nogueira et al. 2001). Aus dem *Public Domain*-Bereich kommend, finden vor allem das Programm *NIH-Image®* (http://rsb.info.nih.gov/nih-image/Default.html) und dessen Derivate (*Scion Image® for Windows* und *Image/J®*) in der Verarbeitung

von - biologischen - Bilddaten Anwendung (Hiscock, Murphy et al. 2000). Die kommerziellen Lösungen bieten bei einem hohen Preis häufig nicht die gewünschten Funktionalitäten in einem einheitlichen Programm, Ausbaufähigkeit war zumeist nur auf der Ebene von Makrosprachen möglich und die innere Logik der Programme blieb das ureigenste Wissen des Herstellers (siehe Einleitung). Schnittstellen zur Software bleiben so zumeist unzugänglich, der Anschluß von eigener Hardware war oft unmöglich. *NIH Image* wird zwar vielfältig in der Auswertung biologischer Bilddaten eingesetzt – eine *Medline*-Recherche für Mai 2001 ergab 125 Veröffentlichungen, welche unter dem Einsatz von *NIH-Image®* zustande kamen – und bietet als Java-Derivat (*Image*/*J*) die Möglichkeit, eigene in der Programmiersprache Java erstellte Routinen einzufügen, dabei bleibt die Ausführungsgeschwindigkeit jedoch unbefriedigend, der Anschluß von eigener Hardware ist nicht vorgesehen und stellt so hinsichtlich Treiberdesign und programmtechnischer Implementierung ein nicht nur in zeitlicher Hinsicht großes Problem dar.

Frühzeitig wurde sich für diese und alle folgenden Software-Arbeiten für die Programmiersprache LabVIEW® entschieden, bot sie doch gleich mehrere Vorteile durch das Vorhandensein umfangreicher Programmbibliotheken, der schnellen Ausführungsgeschwindigkeit und der adäquaten Abstimmung zwischen der Programmierumgebung und der vom selben Hersteller National Instruments angebotenen Hardware in Form des für diese Arbeit benötigten *Framegrabbers* wie *DAQ*-Karte.

Mit Hilfe von LabVIEW®, dem *Framegrabber* NI PCI-1408 sowie der *DAQ*-Karte NI 6111E ließ sich PC-basiert ein *Imaging*-System entwickeln, das allen Anforderungen vorliegender wissenschaftlicher Fragestellung entsprach.

Während intraexperimentell das *Live*-Bild der interessierenden Zelle zu betrachten war, gleichzeitig eine Helligkeits-Zeitverlaufs (*Brightness-versus-Time*) - Analyse der ausgewählten ROIs auf dem Bildschirm als Kurvenzüge dargestellt wurden, war es jederzeit möglich, die Aufnahme zu starten, mit welcher verlustfrei die Bilddaten auf die Festplatte gespeichert wurden (*FastRecord*). Intra- wie postexperimentell stand mit *FastAnalysis* ein Programm zu Verfügung, mit dem die gespeicherten Daten umfassend analysiert und präsentationsreif aufgearbeitet werden konnten. Durch die Weiterentwicklung von *FastAnalysis* ist es nicht nur möglich, aus Bildsequenzen

(*movies*) *Brightness-versus-Time*-Berechnungen durchzuführen, darüberhinaus steht dieselbige Funktionalität inzwischen auch für *Linescan*-Daten z.B. der Multiphotonen-Mikroskopie zur Verfügung.
Zusammenfassend steht mit dem hier vorgestellten Software-Paket eine rein PC-basierte, in sich abgestimmte, modular-ausbaufähige, integrierte, preiswerte und durch die Verwendung des Betriebssystems MS WINDOWS einfach zu erlernende *Imaging*-Umgebung zur Verfügung, die in ihren Entwicklungsmöglichkeiten, ihrer Abgestimmtheit hinsichtlich der Hard- und Softwarekomponenten sowie ihrer Ausführungsgeschwindigkeit für diese und ähnliche Anwendungen allen bisher verfügbaren Produkten überlegen ist.

## IV.2 Bedeutung der ontogenetisch differentiellen Kalzium-Pufferung in der Maturation des Neurons

In dieser Arbeit wurden die Aktionspotential-induzierten Kalziumveränderungen in heranreifenden Purkinje-Zellen von Ratten wie Mäusen untersucht. Eine Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in zerebellären Purkinje-Neuronen kann in Folge eines Kalzium-Einstroms durch spannungskontrollierte Kalzium-Kanäle (Llinas and Sugimori 1980), durch Kalzium-Freisetzung aus Inositol-1,4,5-Triphosphat – sensitiven intrazellulären Speichern (Khodakhah and Ogden 1995; Ogden and Khodakhah 1996) und Kalzium-induzierter Kalzium-Freisetzung (*calcium-induced calcium release*, CICR) (Llano, DiPolo et al. 1994) auftreten. Neben den vielfältigen Effekten, die Kalzium als *second messenger* intrazellulär erfüllen kann (siehe Einleitung und (Kretsinger 1979; Clapham 1995; DeCoster 1995)), ist insbesondere für das Kleinhirn gezeigt worden, daß Erhöhungen des intrazellulären Kalziumspiegels in Purkinje-Zellen weitreichende Konsequenzen für die Wichtung sowohl von eingehenden exzitatorischen (Sakurai 1990) wie inhibitorischen Synapsen (Marty and Llano 1995) hat. Die effektive Kalzium-Konzentration, welche durch intrazelluläre Kalzium-abhängige Komponenten detektiert wird, hängt, abgesehen von anderen Faktoren, von der Fähigkeit des Purkinje-Neurons ab, Kalzium-Anstiege schnell abzupuffern. Die sog. *Kalzium-Binding-Ratio* $K_s$, also das Verhältnis von Puffer-gebundenen Kalzium-Veränderungen zu freien Kalzium-Veränderungen, beschreibt die Effektivität von endogenen Puffern (Neher 1995) und

damit die Fähigkeit der Zelle, mit intrazellulären Kalzium-Anstiegen umzugehen. Purkinje-Zellen zeichnen sich durch eine im Vergleich mit anderen Zellen besonders hohe Konzentration von endogenen Puffern in Form von Kalzium-bindenden Proteinen (v.a. Calbindin D28k und Parvalbumin) (Baimbridge, Celio et al. 1992) aus, welche damit eine hohe *Kalzium-Binding-Ratio* zur Verfügung stellen (Fierro and Llano 1996; Fierro, DiPolo et al. 1998). In diesem Zusammenhang ist auffallend, daß mehrere Arten von Kalzium-bindenden Proteinen in GABA-ergen Neuronen, also auch in Purkinje-Zellen, sehr viel reichhaltiger enthalten sind als in glutamatergen Nervenzellen (Baimbridge, Celio et al. 1992). Demgegenüber lassen Studien im zerebralen Kortex wie dem Hippocampus der Ratte jedoch darauf schließen, daß sich eine Synchronizität zwischen dem Einsetzen der GABA-Expression und dem Auftreten von Kalzium-bindenden Proteinen ausschließen läßt (Bergmann, Nitsch et al. 1991; Solbach and Celio 1991).

Eine einfache modellhafte Beschreibung der hier gezeigten Kalziumdynamik ist mit Hilfe des sog. *Single-Kompartment-Modells* möglich (Neher 1998; Helmchen and Tank 1999). Setzt man die dort zugrundeliegenden Annahmen (Helmchen and Tank 1999) voraus, z.B. daß Kalziumgradienten und -diffusion im interessierenden Zeitfenster vernachlässigbar sind, so daß das zytosolische Volumen als ein einziges homogenes Kompartment behandelt werden kann, so ergeben sich schon aus rein theoretischen Überlegungen heraus wichtige Voraussagen, die nicht zuletzt durch vorliegende Experimente bestätigt wurden: Die Verdoppelung der *Kalzium-Binding-Ratio* führt z.B. zu einer Halbierung der Amplitude der intrazellulären Kalziumtransienten und zu einer Verdoppelung der Zeitabfallskonstante $\tau$ – in analoger Weise kann so auf fluorimetrisch messbare Veränderungen der intrazellulären Kalzium-Pufferkapazität geschlossen werden.

Hinsichtlich der Konzentration von Calbindin D28k in Purkinje-Zellen gibt es bisher nur Schätzungen. Fierro et al. zeigten, daß unter den von ihnen gemachten Voraussetzungen in 15 Tage alten Ratten eine Konzentration von ca. 210 $\mu$M anzunehmen ist (Fierro and Llano 1996). In der gleichen Untersuchung wurde die *Kalzium-Binding-Ratio* in 15 Tage alten Ratten im Bereich von ungefähr 2000 gefunden (Fierro and Llano 1996). Werte für $K_s$ in neuroendokrinen Zellen reichen von 40 in adrenalen chromaffinen Zellen (Zhou and Neher 1993) bis zu 100-130 in anderen Präparationen wie gonadotropen (Tse, Tse et al. 1994), melanotropen (Thomas, Surprenant et al. 1990) und GH3-Zellen (Lledo, Somasundaram et al.

1992) der Hypophyse. In Lamina V-Pyramidenzellen konnten $K_s$-Werte von 100-135 gefunden werden, für CA1-Pyramidenzellen des Hypothalamus 168-207 (Helmchen, Imoto et al. 1996). In diesem Zusammenhang ist das Kalzium-Puffervermögen der Purkinje-Zelle um eine Zehnerpotenz größer als das anderer untersuchter Zellen. Von besonderer Wichtigkeit ist dabei, daß in Purkinje-Zellen von 6 Tage alten Ratten die *Kalzium-Binding-Ratio* mit einem Wert von ca. 900 signifikant kleiner als in 15 Tage alten Ratten gefunden wurde (Fierro and Llano 1996), was auf ein auch in dieser Arbeit gezeigtes Entwicklungsprofil der Kalzium-Pufferfähigkeit hindeutet (siehe unten). Nebenbei bemerkt ist bei der hohen Pufferkapazität der Purkinje-Zelle davon auszugehen, daß die in den gezeigten Experimenten zugeführte Menge von Oregon Green® 488 BAPTA-2 mit den endogenen Puffersystemen nicht in nennenswerter Weise interferierte (Fierro, DiPolo et al. 1998).

Die in vorliegender Arbeit gezeigte Zunahme der intrazellulären Kalzium-Last in allen Zellkompartimenten mit wachsenden Aktionspotentialfolgen läßt sich vornehmlich aus dem verlängerten Einstrom von extrazellulärem Kalzium durch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle erklären (Kano, Schneggenburger et al. 1995; Callewaert, Eilers et al. 1996). Der genaue Beitrag anderer Kalziumquellen unter besonderer Berücksichtigung ihres quantitativen Beitrages zur Generierung intrazellulärer Kalzium-Amplituden, wie z.B. Kalzium-Einstrom durch ligandengesteurte Kanäle oder Kalzium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, ist dabei eher nachgeordnet, darf aber dennoch nicht aus den Augen verloren werden (Llano, DiPolo et al. 1994; Kano, Garaschuk et al. 1995).

In allen Versuchen wurde nach der Farbstoff-Ladezeit von 15 – 20 Minuten eine uneinheitliche Verteilung des Farbstoffes Oregon Green® 488 BAPTA-2 dergestalt gefunden, daß eine Akkumulation im Nukleus vorlag. Dieses Phänomen ist sowohl für andere Farbstoffe, z.B. Fura-2, als auch für andere Zellen, z.B. chromaffine Zellen, beschrieben worden und könnte auf einer Anreicherung des Farbstoffes im Zellkern oder Farbstoffentfernung aus den nicht-nukleären Teilen der Zelle beruhen (Hernandez-Cruz, Sala et al. 1990; Neher and Augustine 1992). Meßtechnisch stellt diese Beobachtung durch Verwendung einer hintergrundskorrigierten *Brightness-versus-Time*-Arithmetik kein Validitätsproblem der erhobenen Daten dar (Neher and Augustine 1992).

Klar konnte mit vorliegenden Experimenten gezeigt werden, daß die Ausbildung intrazytoplasmatischer Kalziumtransienten infolge der direkten Induktion von

Aktionspotentialen ein Entwicklungsprofil zeigt: In jungen Tieren (P5-P6) ließen sich unter gleichen experimentellen Bedingungen in allen untersuchten Zellkompartimenten (Soma, Dendrit, Nukleus) stets signifikant höhere Amplituden der Kalziumtransienten infolge einer definierten Anzahl von Aktionspotentialen erzielen als in den älteren Tieren (P19-P21). Fierro et al. haben diesen Effekt in Purkinje-Zellen auf die sich in der Zellentwicklung verändernde intrazelluläre Kalzium-Pufferung zurückgeführt (Fierro and Llano 1996). In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß in der frühen Entwicklung der Purkinje-Zelle die Menge an mRNA, welche für Calbindin kodiert, ebenso zunimmt wie die Menge an tatsächlich vorhandenen Calbindin-Molekülen (Iacopino, Rhoten et al. 1990; Kurobe, Inaguma et al. 1992). Der höchste Calbindin-Spiegel wird in der Ratte etwa am 60. postnatalen Tag erreicht und bleibt dann bis ins Alter auf einem konstant hohen Niveau (Villa, Podini et al. 1994).

Die Rolle von Kalzium-bindenden Proteinen in der Kalzium-Pufferung wird durch eine Vielzahl von biochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen gestützt (Schafer and Heizmann 1996). Die Amplitude und die Zeitabfallskonstante von depolarisationsinduzierten Kalzium-Transienten sind in sensorischen Neuronen nach der Zugabe von Calbindin D28k oder Parvalbumin durch die *Patch*-Pipette deutlich verändert (Chard, Bleakman et al. 1993). Vergleichbare Befunde lassen sich in GH3-Zellen nach Transfektion mit Calbindin finden (Lledo, Somasundaram et al. 1992). Die phasisch feuernden Neurone des Nucleus supraopticus ändern ihr Feuerverhalten in ein kontinuierliches, wenn sie mit Calbindin dialysiert werden, und kehren zu ihrem phasischen Verhalten zurück, wenn sie mit einem Anti-Calbindin Antiserum dialysiert werden (Li, Decavel et al. 1995). Für die Haarzellen des Sacculus wurde vorgeschlagen, daß eine hohe Konzentration von Kalzium-bindenden Proteinen eine Schlüsselrolle in der räumlichen Pufferung von Kalzium-Signalen spielt und damit die Enkodierung sensorischer Information reguliert (Roberts 1994). Es konnte in dieser Arbeit klar gezeigt werden, daß bei Calbindin D28k-defizienten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren die Amplitude signifikant größer und die Zeitkonstante signifikant kleiner ist beim Vergleich der unter analogen Bedingungen erzielten Aktionspotential-induzierten intrazytoplasmatischen Kalziumantworten.

Untersucht man die Entwicklung der EF-Hand-Proteine Calretinin, Calbindin D28k und Parvalbumin im sich entwickelnden menschlichen Gehirn, so fällt bei aller nach

wie vor bestehender Unklarheit hinsichtlich ihrer speziellen Funktion auf, daß neben einem zellspezifischen Verteilungsmuster auch im maturationsbedingten Auftreten dieser Proteine Unterschiede zeigen (Yew, Luo et al. 1997). Es wurde postuliert, daß Kalzium-bindende Proteine wichtig sind für die Kontrolle der Zellteilung, dem Auswachsen von Zellfortsätzen und der Zellbewegung, nicht zuletzt weil alle diese Prozesse eng mit der intrazellulären Kalzium-Signalgebung korreliert sind (Campbell 1983; Andressen, Blumcke et al. 1993). Calmodulin, Calretinin und Parvalbumin sind darüberhinaus in den Vorgang der Mitose involviert (Rasmussen and Means 1987; Rasmussen and Means 1987; Means and Rasmussen 1988; Rasmussen and Means 1989; Rasmussen and Means 1989; Rasmussen and Means 1989; Gotzos, Schwaller et al. 1992). Im Zerebellum von Vögeln spielt Parvalbumin eine Rolle bei der Synthese von Membranbausteinen sowie dem intrazellulären Transport und der Fusion neuer Membrankomponenten in das Plasmalemm (Braun, Scheich et al. 1988). Im Zentralnervensystem von Vertebraten wurde gezeigt, daß die Expression von Calbindin D28k derjenigen von Parvalbumin vorausgeht, wohingegen im peripheren Nervensystem Parvalbumin vor Calbindin in Spinalganglien exprimiert wird (Zhang, Morita et al. 1990; Solbach and Celio 1991). Im Kleinhirn tritt Calbindin spezifisch und ausschließlich in den Purkinje-Zellen auf und ist dort auch Marker ihrer Entwicklung. Im Radioimmunassay ist es erstmals am embryonalen Tag 17 in Ratten nachweisbar, steigt während der ersten 4 postnatalen Wochen an und bleibt stabil in 30 bis 70 Tage alten Tieren, um dann ab der 30. Lebenswoche abzufallen (Thomasset, Rabie et al. 1984; Enderlin, Norman et al. 1987). Beachtung verdient bei dieser Erörterung jedoch der Umstand, daß die Expressionsmuster von einigen Kalzium-bindenden Proteinen beim Menschen sich von denen anderer Vertebraten, wie z.B. Nagern oder Hühnern, unterscheiden (Heizmann, Berchtold et al. 1982; Murthy, Pace et al. 1984; Huber, Leuthold et al. 1990; Hall, Beach et al. 1991). Diese und die vorliegende Untersuchung legen jedoch nahe, daß es im Rahmen der frühnachgeburtlichen Entwicklung von Purkinje-Zellen unter anderem zu einer massiven intrazellulären Hochregulierung des Kalzium-bindenden Proteins Calbindin D28 k kommt. Diese äußert sich – wie hier gezeigt wurde – in einer maturationsbedingt unterschiedlichen Ausprägung der intrazellulären Kalziumgradienten, wobei sich diese als Beobachtung allein nicht in spezifischer Weise mit einer bzw. mehreren bestimmten Zellfunktion(en) zwanglos verknüpfen lassen.

Nachdem mehrfach für exogene Kalzium-Puffer ihre neuronale Degenerationsprozesse modifizierende bzw. verhütende Rolle gezeigt worden ist ((Scharfman and Schwartzkroin 1989; Tymianski, Charlton et al. 1994), aber auch (Dubinsky 1993)), wurden auch endogene Kalzium-bindende Proteine immer wieder mit neuroprotektiven Funktionen in Verbindung gebracht, wiewohl die vorliegenden Ergebnisse widersprüchlich sind.

McMahon et al. (McMahon, Wong et al. 1998) weisen darauf hin, daß Calbindin PC12-Zellen widerstandsfähiger gegen Serumentzug, Glutamat und das Neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) macht und werten dies als Hinweis darauf, daß Calbindin Zellen vor Degeneration schützen kann, indem es eine Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Spiegels durch Kalzium-Einstrom reduziert. Iacopino et al. führen aus, daß eine spezifische Reduktion der Calbindin D28k-Genexpression im Alter wie bei neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Morbus Huntington vorliegt (Iacopino and Christakos 1990). In einer weiteren Studie weist der selbe Autor darauf hin, daß in MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) - behandelten Ratten eine Degeneration der dopaminergen Neurone der Substantia nigra vor allem in den Neuronen auftritt, die kein Calbindin enthalten (Iacopino, Christakos et al. 1992). Maguire-Zeiss et al. stellten fest, daß eine Reduktion von Calbindin-mRNA in der CA2-Region des Hippocampus von Alzheimer-Patienten vorliegt (Maguire-Zeiss, Li et al. 1995). In weiteren Arbeiten wird auf die neuroprotektive Rolle von Calbindin bei Ischämien und Epilepsien (Johansen, Tonder et al. 1990; Lowenstein, Miles et al. 1991; Sonnenberg, Frantz et al. 1991) sowie Veränderungen dieses Proteins beim Down-Syndrom (Kobayashi, Emson et al. 1990) hingewiesen (Heizmann and Braun 1992). Im Widerspruch zu genannten Arbeiten führen Airaksinen et al. aus, daß sich im Vergleich von Calbindin D28k-defizienten mit Wildtyp-Mäusen keine Evidenz für eine neuroprotektive Rolle in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns nach MPTP-Applikation nachweisen läßt (Airaksinen, Thoenen et al. 1997). Klapstein et al. (Klapstein, Vietla et al. 1998) weisen sogar darauf hin, daß Hippocampuszellen Calbindin-defizienter Mäuse sich resistenter gegenüber Ischämien zeigten als ihre Calbindin-tragenden Pendants. Dabei führen die Autoren aus, daß die Abwesenheit von Calbindin durch eine Verstärkung der Kalzium-abhängigen Inaktivierung von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen Nervenzellen schützen könnte, da damit der Nettoeinstrom von Kalzium während längerer Depolarisationen reduziert wäre. Auf

diese Art und Weise könnte das Vorhandensein eines mobilen zytoplasmatischen Kalziumpuffers wie Calbindin die Verteilung von Kalzium innerhalb des Zytoplasmas verbessern (Zhou and Neher 1993; Wagner and Keizer 1994), indem dieser entweder Kalzium von extrazellulär (Choi 1995) oder aus intrazellulären Speichern (Mody and MacDonald 1995) sehr viel stärker und effektiver zu den unterschiedlichsten Zellbestandteilen transportiert, wo es dann seinen potentiell negativen Effekt auf den neuronalen Funktionszustand ausüben könnte (Klapstein, Vietla et al. 1998).

Der Mechanismus, wie Calbindin D28k intrazelluläres Kalzium puffert, ist in vivo nach wie vor unbekannt, jedoch ist ein zweigleisiger Mechanismus vorstellbar. Köhr et al. zeigten eine deutlich verstärkte Kalzium-abhängige Inaktivierung von Kalziumströmen, welche durch hohe Spannungen in epileptischen Körnerzellen mit erniedrigtem Calbindin-Spiegel aktiviert wurden (Köhr, Lambert et al. 1991). Morgan und Kollegen lieferten die Evidenz, daß Calbindin eine $Ca^{2+}$-$Mg^{2+}$-ATPase in der Plasmamembran aktiviert (Morgan, Welton et al. 1986).

Wie in dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, sind die Kalziumtransienten stets im Primärdendriten quantitativ am größten, gefolgt vom Soma und abschließend dem Zellkern. Innerhalb des Somas sind die Kalziumamplituden am größten in unmittelbarer Nähe der Zellmembran und werden zum Zellinnern hin immer kleiner.

Erste Veröffentlichungen beschränkten intrazelluläre Kalzium-Signale von Purkinje-Zellen noch auf den Dendriten, ließen doch nicht zuletzt intrazelluläre Ableitungen auf eine bevorzugte Lokalisation von Kalzium-Konduktivität im Dendritenbaum schließen (Llinas and Sugimori 1980). Fluoreszenzmessungen wiesen in die gleiche Richtung, in welchen diese zwar einen depolarisationsinduzierten Kalziumeinstrom im Dendriten, nicht jedoch im Soma aufzeigten (Ross and Werman 1987; Tank, Sugimori et al. 1988; Hockberger, Tseng et al. 1989; Sugimori and Llinas 1990). Nichtsdestotrotz wiesen w*hole-cell voltage-clamp* Untersuchungen große Kalziumströme im Soma frisch dissoziierter und kultivierter Purkinje-Zellen nach (Bossu, Dupont et al. 1989; Hirano and Hagiwara 1989; Regan, Sah et al. 1991; Mintz, Adams et al. 1992; Mintz, Venema et al. 1992). Kano et al. (Kano, Schneggenburger et al. 1995) haben jedoch gezeigt, daß sich depolarisationsinduzierte somatische Kalziumsignale durch Kalziumeinstrom durch spannungskontrollierte Kanäle der somatischen Purkinje-Zellmembran erklären

lassen (Kano, Schneggenburger et al. 1995). Dabei lassen sich diese als P-Typ-Kalzium-Kanäle klassifizieren (Hillman, Chen et al. 1991; Usowicz, Sugimori et al. 1992), wobei darüber hinaus Kalzium-Diffusion aus der dendritischen in die somatische Region durch lokalisierte Kalzium-Entzugs-Versuche ausgeschlossen scheint (Kano, Schneggenburger et al. 1995). Vielmehr deutet alles darauf hin, daß es zu einer retrograden Ausbreitung des somatisch evozierten elektrischen Signals kommt, so daß im Primärdendriten der Kalzium-Transient aufgrund des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses am größten ist. In distalen dendritischen Regionen ließ sich bei den hier vorliegenden Experimenten kein oder ein im Vergleich zum Primärdendriten nur sehr kleines Kalziumsignal nachweisen.

Hinsichtlich des somatischen Kalziumsignals sahen Eilers et al. dieses nach – eher den physiologischen Bedingungen entsprechenden - Kletterfaserstimulation auf eine subplasmalemmale Schale von 2 bis 3 μm Dicke beschränkt (Eilers, Callewaert et al. 1995). Im Gegensatz hierzu konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, daß sich das intrasomatische Kalziumsignal infolge direkter somatischer Induktion von Aktionspotentialen im gesamten Soma nachweisen läßt. Hierbei wird das Signal vom unmittelbar subplasmalemmalen Bereich zum Zellinnern hin amplitudenkleiner und hinsichtlich der Zeitkonstante größer. Die Anstiegszeit *rt* (*rise time*) ist in allen untersuchten Schalen die gleiche. Für den unmittelbar subplasmalemmalen Bereich ließ sich ein am besten mit einer doppelexponentiellen Funktion beschreibbares Abfallsverhalten erheben, sodaß hier einerseits auf schnelle Extrusionsvorgänge durch zytoplasmatische Pumpen, zum anderen auf die auch in den tieferen Schichten wirkenden Umverteilungsvorgänge geschlossen werden kann.

Interessant sind sicher Überlegungen, inwiefern der in der Maturation unterschiedliche Umgang mit intrazellulären Kalziumsignalen Einfluß auf die neuronale Genexpression haben kann (Bito, Deisseroth et al. 1997; Evenas, Malmendal et al. 1998) – hier sind weitere aufschlußreiche Untersuchungen zu erwarten.

Abschließend sei bemerkt, daß sich die beobachtbaren Veränderungen im Kalzium-Signalverhalten nicht ausschließlich auf eine Aufregulierung des intrazytoplasmatischen Calbindin D28k-Spiegels zurückführen lassen – andere Mechanismen, wie z.B. eine in der Ontogenese stärkere Expression von Kalzium-Pumpen, müssen ebenfalls bei diesen Reifungsvorgängen berücksichtigt werden und bedürfen somit weiterer Beachtung.

## IV.3 Schlußfolgerung

Die in dieser Arbeit gezeigten Veränderungen des Kalzium-Signalverhaltens in der Maturation von zerebellären Purkinje-Zellen geben Anlaß zu mancherlei Spekulation hinsichtlich ihrer Bedeutung:

Die Änderungen des intrazellulären Kalziumsignalverhaltens in der Ontogenese des Neurons sind wohl Teil eines Entwicklungsprogrammes. In der frühen Entwicklung sind die für das Neuron verfügbaren Kalziumquellen noch wenig ausgeprägt bzw. verfügbar, so daß eine ausgeprägte „Gier“ nach Kalzium zu bestehen scheint, da Kalzium zum einen für die Genexpression von elementarer Bedeutung zu sein scheint, andererseits eine fundamentale Rolle in Wachstums- und Reifungsvorgängen der Zelle spielt (Bito, Deisseroth et al. 1997; Evenas, Malmendal et al. 1998) . Im Widerspruch dazu steht die strikte, in äußerst engen physiologischen Grenzen regulierte Kalzium-Homöostase der erwachsenen Nervenzelle, die schon auf geringste Störungen der Kalzium-Regulation mit Zellstörungen bis hin zum Zelltod (Farber 1981) reagiert.

Es bleibt weiteren Studien vorbehalten, die genaue Bedeutung der ontogenetisch differentiellen Kalzium-Pufferung in Nervenzellen aufzuklären.

# V. Zusammenfassung

Vorliegende Untersuchung zeigt, daß sich das durch somatisch evozierte Aktionspotentiale ausgelöste Kalzium-Signalverhalten der Purkinje-Zellen von Nagern (Ratten und Mäusen) in einem engen Zeitfenster zwischen dem 5. und 21. nachgeburtlichen Tag in signifikanter Weise in unterschiedlichen Zellkompartimenten verändert. Diese Veränderung konnte in allen Zellkompartimenten nachgewiesen werden, insbesondere im Soma, im Dendriten und im Nukleus. Einer der Mechanismen, welcher diesem ontogenetischen Wechsel im Kalzium-Signalverhalten zugrundeliegt, ist das intrazellulär lokalisierte, Kalzium-puffernde Molekül Calbindin D28k. Die intrazelluläre Konzentration von Calbindin D28k scheint von sehr niedrigen Spiegeln früh postnatal (P5-P6) zu höheren Spiegeln im adulten (P19-P21) Zerebellum hochreguliert zu werden. Der Zeitverlauf der Kalziumsignale macht jedoch deutlich, daß noch andere Mechanismen außer der Kalzium-Pufferung durch Calbindin D28k, z.B. Kalziumpumpen, zur Ausbildung der entwicklungsmäßigen Veränderungen des Kalzium-Signalverhaltens beitragen müssen. Alle die in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden mit einer eigens für diese programmierten Bildverarbeitungs-Software unter dem Namen *FastRecord* bzw. *FastAnalysis* durchgeführt. Diese gestattete es erstmals, PC-basiert Echtzeitbilder verlustfrei aufnehmen und intra- wie postexperimentell analysieren zu können. Darüberhinaus ist es mit dieser Software in komfortabler Weise möglich, elektrophysiologische mit Bilddaten in einem Programm zu erfassen und zu verarbeiten. Die modulare Programmierweise stellt dabei sicher, daß die Einzelapplikationen – *FastRecord* wie *FastAnalysis* – den jeweiligen experimentellen Bedürfnissen gemäß zügig angepasst werden können. Neue Meßfunktionen - z.B. Temperaturerfassung, Steuerung der Manipulatorpositionen und Laserkontrolle - lassen sich anwendungsorientiert relativ leicht implementieren.

# VI. Literaturverzeichnis

Aghajanian, G. K. and F. E. Bloom (1967). “The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study.” Brain Res **6**(4): 716-27.

Airaksinen, L., J. Virkkala, et al. (2000). “Lack of calbindin-D28k does not affect hearing level or survival of hair cells in acoustic trauma.” ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec **62**(1): 9-12.

Airaksinen, M. S., J. Eilers, et al. (1997). “Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene.” Proc Natl Acad Sci U S A **94**(4): 1488-93.

Airaksinen, M. S., H. Thoenen, et al. (1997). “Vulnerability of midbrain dopaminergic neurons in calbindin-D28k- deficient mice: lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP-treated and weaver mice.” Eur J Neurosci **9**(1): 120-7.

Alpers, D. H., S. W. Lee, et al. (1972). “Identification of two calcium-binding proteins in human small intestine. A preliminary report.” Gastroenterology **62**(4): 559-64.

Altman, J. (1972). “Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer.” J Comp Neurol **145**(3): 353-97.

Altman, J. (1972). “Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer.” J Comp Neurol **145**(4): 399-463.

Andressen, C., I. Blumcke, et al. (1993). “Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells.” Cell Tissue Res **271**(2): 181-208.

Arnold, B. M., M. Kuttner, et al. (1975). “Radioimmunoassay studies of intestinal calcium-binding protein in the pig. I. Identification of intestinal calcium-binding protein in blood and response to a low calcium diet.” Can J Physiol Pharmacol **53**(6): 1129-34.

Arnold, B. M., M. Kuttner, et al. (1975). “Radioimmunoassay studies of intestinal calcium-binding protein in the pig. II. The distribution of intestinal CaBP in pig tissues.” Can J Physiol Pharmacol **53**(6): 1135-40.

Augustine, G. J. (1994). “Combining patch-clamp and optical methods in brain slices.” J Neurosci Methods **54**(2): 163-9.

Augustine, G. J. and E. Neher (1992). “Neuronal Ca2+ signalling takes the local route.” Curr Opin Neurobiol **2**(3): 302-7.

Baimbridge, K. G., M. R. Celio, et al. (1992). “Calcium-binding proteins in the nervous system.” Trends Neurosci **15**(8): 303-8.

Baimbridge, K. G. and J. J. Miller (1982). “Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat.” Brain Res **245**(2): 223-9.

Baimbridge, K. G., J. J. Miller, et al. (1982). “Calcium-binding protein distribution in the rat brain.” Brain Res **239**(2): 519-25.

Belichenko, P. V. and A. Dahlstrom (1995). “Confocal laser scanning microscopy and 3-D reconstructions of neuronal structures in human brain cortex.” Neuroimage **2**(3): 201-7.

Bergmann, I., R. Nitsch, et al. (1991). “Area-specific morphological and neurochemical maturation of non- pyramidal neurons in the rat hippocampus as revealed by parvalbumin immunocytochemistry.” Anat Embryol **184**(4): 403-9.

Bito, H., K. Deisseroth, et al. (1997). “Ca2+-dependent regulation in neuronal gene expression.” Curr Opin Neurobiol **7**(3): 419-29.

Bossu, J. L., J. L. Dupont, et al. (1989). “Calcium currents in rat cerebellar Purkinje cells maintained in culture.” Neuroscience **30**(3): 605-17.

Boyde, A., M. Petran, et al. (1983). “Tandem scanning reflected light microscopy of internal features in whole bone and tooth samples.” J Microsc **132**(Pt 1): 1-7.

Brakenhoff, G. J., H. T. van der Voort, et al. (1988). “Visualization and analysis techniques for three dimensional information acquired by confocal microscopy.” Scanning Microsc **2**(4): 1831-8.

Brakenhoff, G. J., H. T. van der Voort, et al. (1986). “Three-dimensional imaging by confocal scanning fluorescence microscopy.” Ann N Y Acad Sci **483**: 405-15.

Brakenhoff, G. J., H. T. van der Voort, et al. (1988). “3-dimensional imaging of biological structures by high resolution confocal scanning laser microscopy.” Scanning Microsc **2**(1): 33-40.

Brakenhoff, G. J., H. T. van der Voort, et al. (1989). “Three-dimensional imaging in fluorescence by confocal scanning microscopy.” J Microsc **153**(Pt 2): 151-9.

Brakenhoff, G. J., E. A. van Spronsen, et al. (1989). “Three-dimensional confocal fluorescence microscopy.” Methods Cell Biol **30**: 379-98.

Braun, K., H. Scheich, et al. (1988). “Postnatal development of parvalbumin-, calbindin- and adult GABA- immunoreactivity in two visual nuclei of zebra finches.” Brain Res **475**(2): 205-17.

Brown, H. E., M. M. Garcia, et al. (1998). “A two focal plane method for digital quantification of nuclear immunoreactivity in large brain areas using NIH-image software.” Brain Res Brain Res Protoc **2**(4): 264-72.

Brunner, J., F. Krummenauer, et al. (2000). “Quantification of video-taped images in microcirculation research using inexpensive imaging software (Adobe Photoshop).” Microcirculation **7**(2): 103-7.

Bruns, M. E., A. Fausto, et al. (1978). “Placental calcium binding protein in rats. Apparent identity with vitamin D-dependent calcium binding protein from rat intestine.” J Biol Chem **253**(9): 3186-90.

Bruns, M. E., V. Wallshein, et al. (1982). “Regulation of calcium-binding protein in mouse placenta and intestine.” Am J Physiol **242**(1): E47-52.

Bucher, O. and H. Wartenberg (1989). Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, Hans Huber Verlag.

Budai, D. (1994). “A computer-controlled system for post-stimulus time histogram and wind-up studies.” J Neurosci Methods **51**(2): 205-11.

Budai, D., L. J. Kehl, et al. (1993). “An iconographic program for computer-controlled whole-cell voltage clamp experiments.” J Neurosci Methods **48**(1-2): 65-74.

Cahalan, M. and E. Neher (1992). “Patch clamp techniques: an overview.” Methods Enzymol **207**: 3-14.

Callewaert, G., J. Eilers, et al. (1996). “Axonal calcium entry during fast 'sodium' action potentials in rat cerebellar Purkinje neurones.” J Physiol **495**(Pt 3): 641-7.

Campbell, A. K. (1983). Intracellular calcium: its universal role as regulator. New York, Wiley.

Carafoli, E. (1991). “Calcium pump of the plasma membrane.” Physiol Rev **71**(1): 129-53.

Carafoli, E. (1991). “The calcium pumping ATPase of the plasma membrane.” Annu Rev Physiol **53**: 531-47.

Celio, M. R. (1990). “Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system.” Neuroscience **35**(2): 375-475.

Chard, P. S., D. Bleakman, et al. (1993). “Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones.” J Physiol **472**: 341-57.

Cheng, B., S. Christakos, et al. (1994). “Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis.” Neuron **12**(1): 139-53.

Chevlin, D. H. and J. Jorgens, 3rd (1996). “Software requirements: definition and specification.” Biomed Instrum Technol **30**(2): 150-2.

Choi, D. W. (1988). “Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system.” Neuron **1**(8): 623-34.

Choi, D. W. (1995). “Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death.” Trends Neurosci **18**(2): 58-60.

Christ, O. P. (1994). “Software validation: requirements for programmable electronic medical systems, how to comply with the essential requirements of the EC Directives, part II.” Med Device Technol **5**(6): 22-6.

Christakos, S., C. Gabrielides, et al. (1989). “Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology.” Endocr Rev **10**(1): 3-26.

Christakos, S. and A. W. Norman (1978). “Vitamin D3-induced calcium binding protein in bone tissue.” Science **202**(4363): 70-1.

Clapham, D. E. (1995). “Calcium signaling.” Cell **80**(2): 259-68.

Das, G. D. and H. O. Nornes (1972). “Neurogenesis in the cerebellum of the rat: an autoradiographic study.” Z Anat Entwicklungsgesch **138**(2): 155-65.

Davidovits, P. and M. D. Egger (1969). “Scanning laser microscope.” Nature **223**(208): 831.

DeCoster, M. A. (1995). “Calcium dynamics in the central nervous system.” Adv Neuroimmunol **5**(3): 233-9.

Dubinsky, J. M. (1993). “Effects of calcium chelators on intracellular calcium and excitotoxicity.” Neurosci Lett **150**(2): 129-32.

Dudel, Menzel, et al. (1996). Neurowissenschaft: vom Molekül zur Kognition. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag.

Duffin, J. (2000). “Simulation of cross-correlograms resulting from synaptic connections between neurons.” J Neurosci Methods **99**(1-2): 65-70.

Edwards, F. A., A. Konnerth, et al. (1989). “A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system.” Pflugers Arch **414**(5): 600-12.

Egger MD, P. M. (1967). “New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells.” Science (United States) **157**(786): 305-307.

Eilers, J., G. J. Augustine, et al. (1995). “Subthreshold synaptic Ca2+ signalling in fine dendrites and spines of cerebellar Purkinje neurons.” Nature **373**(6510): 155-8.

Eilers, J., G. Callewaert, et al. (1995). “Calcium signaling in a narrow somatic submembrane shell during synaptic activity in cerebellar Purkinje neurons.” Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10272-6.

Eilers, J., D. Hof, et al. (1997). “The flaginserter: a simple device for automatically marking events in video recordings.” J Neurosci Methods **78**(1-2): 151-6.

Eilers, J., T. Plant, et al. (1996). “Localized calcium signalling and neuronal integration in cerebellar Purkinje neurones.” Cell Calcium **20**(2): 215-26.

Enderlin, S., A. W. Norman, et al. (1987). “Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system.” Anat Embryol **177**(1): 15-28.

Endo, T., K. Takazawa, et al. (1986). “Immunochemical and immunohistochemical localization of parvalbumin in rat nervous tissues.” J Neurochem **46**(3): 892-8.

Essick, J. (1998). Advanced LabVIEW Labs, Prentice Hall.

Evenas, J., A. Malmendal, et al. (1998). “Calcium.” Curr Opin Chem Biol **2**(2): 293-302.

Farber, J. L. (1981). “The role of calcium in cell death.” Life Sci **29**(13): 1289-95.

Feher, J. J. (1983). “Facilitated calcium diffusion by intestinal calcium-binding protein.” Am J Physiol **244**(3): C303-7.

Feldman, S. C. and S. Christakos (1983). “Vitamin D-dependent calcium-binding protein in rat brain: biochemical and immunocytochemical characterization.” Endocrinology **112**(1): 290-302.

Fierro, L., R. DiPolo, et al. (1998). “Intracellular calcium clearance in Purkinje cell somata from rat cerebellar slices.” J Physiol **510**(Pt 2): 499-512.

Fierro, L. and I. Llano (1996). “High endogenous calcium buffering in Purkinje cells from rat cerebellar slices.” J Physiol **496**(Pt 3): 617-25.

Flicker, C., R. L. Dean, et al. (1983). “Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat.” Pharmacol Biochem Behav **18**(6): 973-81.

Friede, R. L. (1963). “The relationship of body size, nerve cell size, axon length and glial density in the cerebellum.” Proc. Nat. Acad. Sci. USA **49**: 187-193.

Fullmer, C. S. and R. H. Wasserman (1975). “Isolation and partial characterization of intestinal calcium-binding proteins from the cow, pig, horse, guinea pig, and chick.” Biochim Biophys Acta **393**(1): 134-42.

German, D. C., M. C. Ng, et al. (1997). “Calbindin-D28k in nerve cell nuclei.” Neuroscience **81**(3): 735-43.

Gilbert, D. S. and B. J. Newby (1975). “Neurofilament disguise, destruction and discipline.” Nature **256**(5518): 586-9.

Goldowitz, D. and K. Hamre (1998). “The cells and molecules that make a cerebellum.” Trends Neurosci **21**(9): 375-82.

Gotzos, V., B. Schwaller, et al. (1992). “Expression of the calcium binding protein calretinin in WiDr cells and its correlation to their cell cycle.” Exp Cell Res **202**(2): 292-302.

Greenough, W. T., J. W. McDonald, et al. (1986). “Environmental conditions modulate degeneration and new dendrite growth in cerebellum of senescent rats.” Brain Res **380**(1): 136-43.

Grossmann, M. and M. H. Skinner (1996). “A simple computer based system to analyze Morris water maze trials on- line.” J Neurosci Methods **70**(2): 171-5.

Grynkiewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). “A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties.” J Biol Chem **260**(6): 3440-50.

Gulotta, M. (1995). “Teaching computer interfacing with virtual instruments in an object-oriented language.” Biophys J **69**(5): 2168-73.

Haishi, T. and K. Kose (1998). “Real-time image reconstruction and display system for MRI using a high- speed personal computer.” J Magn Reson **134**(1): 138-41.

Hall, C. A., G. G. Beach, et al. (1991). “Monoclonal antibody for avian thymic hormone.” Hybridoma **10**(5): 575-82.

Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). “Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.” Pflugers Arch **391**(2): 85-100.

Haugland, R. P. (1996). Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes.

Heizmann, C. W. (1992). “Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications.” Gen Physiol Biophys **11**(5): 411-25.

Heizmann, C. W., M. W. Berchtold, et al. (1982). “Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles.” Proc Natl Acad Sci U S A **79**(23): 7243-7.

Heizmann, C. W. and K. Braun (1992). “Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders.” Trends Neurosci **15**(7): 259-64.

Heizmann, C. W. and W. Hunziker (1991). “Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights.” Trends Biochem Sci **16**(3): 98-103.

Helmchen, F., K. Imoto, et al. (1996). “Ca2+ buffering and action potential-evoked Ca2+ signaling in dendrites of pyramidal neurons.” Biophys J **70**(2): 1069-81.

Helmchen, F. and D. W. Tank (1999). A Single-compartment Model of Calcium Dynamics in Nerve Terminals and Dendrites. Imaging Neurons. R. Yuste, F. Lanni and A. Konnerth, Cold Spring Harbour Laboratory Press**:** 33.1-33.11.

Hermsdorf, C. L. and F. Bronner (1975). “Vitamin D-dependent calcium-binding protein from rat kidney.” Biochim Biophys Acta **379**(2): 553-61.

Hernandez-Cruz, A., F. Sala, et al. (1990). “Subcellular calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltage-clamped vertebrate neuron.” Science **247**(4944): 858-62.

Hillman, D., S. Chen, et al. (1991). “Localization of P-type calcium channels in the central nervous system.” Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7076-80.

Hirano, T. and S. Hagiwara (1989). “Kinetics and distribution of voltage-gated Ca, Na and K channels on the somata of rat cerebellar Purkinje cells.” Pflugers Arch **413**(5): 463-9.

Hiscock, J. J., S. Murphy, et al. (2000). “Confocal microscopic estimation of GABAergic nerve terminals in the central nervous system.” J Neurosci Methods **95**(1): 1-11.

Hitchman, A. J., M. K. Kerr, et al. (1973). “The purification of pig vitamin D-induced intestinal calcium binding protein.” Arch Biochem Biophys **155**(1): 221-2.

Hockberger, P. E., H. Y. Tseng, et al. (1989). “Fura-2 measurements of cultured rat Purkinje neurons show dendritic localization of Ca2+ influx.” J Neurosci **9**(7): 2272-84.

Hortovanyi, E., S. Varbiro, et al. (2001). “Connexin 43 expression in rat aortic smooth muscle after ovariectomy and hormonal replacement.” Pathol Res Pract **197**(2): 109-12.

Hounsgaard, J. and J. Midtgaard (1989). “Synaptic control of excitability in turtle cerebellar Purkinje cells.” J Physiol **409**: 157-70.

Hubbard, M. J. and N. J. McHugh (1995). “Calbindin28kDa and calbindin30kDa (calretinin) are substantially localised in the particulate fraction of rat brain.” FEBS Lett **374**(3): 333-7.

Huber, S., M. Leuthold, et al. (1990). “Human tumor cell lines express low levels of oncomodulin.” Biochem Biophys Res Commun **169**(3): 905-9.

Hunziker, W. (1986). “The 28-kDa vitamin D-dependent calcium-binding protein has a six-domain structure.” Proc Natl Acad Sci U S A **83**(20): 7578-82.

Hunziker, W. and S. Schrickel (1988). “Rat brain calbindin D28: six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbindin D28.” Mol Endocrinol **2**(5): 465-73.

Iacopino, A., S. Christakos, et al. (1992). “Calbindin-D28K-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity.” Brain Res Mol Brain Res **13**(3): 251-61.

Iacopino, A. M. and S. Christakos (1990). “Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin- D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases.” Proc Natl Acad Sci U S A **87**(11): 4078-82.

Iacopino, A. M., W. B. Rhoten, et al. (1990). “Calcium binding protein (calbindin-D28k) gene expression in the developing and aging mouse cerebellum.” Brain Res Mol Brain Res **8**(4): 283-90.

Inoue, T. and N. Gliksman (1998). “Techniques for optimizing microscopy and analysis through digital image processing.” Methods Cell Biol **56**: 63-90.

Intrator, S., J. Elion, et al. (1985). “Purification, immunological and biochemical characterization of rat 28 kDa cholecalcin (cholecalciferol-induced calcium-binding proteins). Identity between renal and cerebellar cholecalcins.” Biochem J **231**(1): 89-95.

Isaacs, K. R., M. E. Wolpoe, et al. (2000). “Vulnerability to calcium-induced neurotoxicity in cultured neurons expressing calretinin.” Exp Neurol **163**(2): 311-23.

Ito, M. (1984). The cerebellum and neural control. New York, Raven Press.

Jackson, M. E. and J. W. Gnadt (1999). “Numerical simulation of nonlinear feedback model of saccade generation circuit implemented in the LabView graphical programming language.” J Neurosci Methods **87**(2): 137-45.

Jamal, R. and R. Heinze (2001). Virtuelle Instrumente der Praxis 2001 - Automation -, VDE Verlag.

Jamal, R. and H. Jaschinsky (2001). Virtuelle Instrumente in der Praxis: Begleitband zum Kongress VIP 2001, Hüthig.

Jamal, R. and P. Krauss (1998). LabVIEW: Das Grundlagenbuch, Prentice Hall.

Jamal, R. and H. Pichlik (1999). LabVIEW: Programmiersprache der vierten Generation, Prentice Hall.

Jande, S. S., L. Maler, et al. (1981). “Immunohistochemical mapping of vitamin D-dependent calcium-binding protein in brain.” Nature **294**(5843): 765-7.

Johansen, F. F., N. Tonder, et al. (1990). “Short-term changes of parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the rat hippocampus following cerebral ischemia.” Neurosci Lett **120**(2): 171-4.

Johnson, G. W. (1997). LabVIEW Graphical Programming : Practical Applications in Instrumentation and Control, McGraw-Hill Companies, Inc.

Kaelin-Lang, A. and L. G. Cohen (2000). “Enhancing the quality of studies using transcranial magnetic and electrical stimulation with a new computer-controlled system.” J Neurosci Methods **102**(1): 81-9.

Kalkman, C. J. (1995). “LabVIEW: a software system for data acquisition, data analysis, and instrument control.” J Clin Monit **11**(1): 51-8.

Kano, M., O. Garaschuk, et al. (1995). “Ryanodine receptor-mediated intracellular calcium release in rat cerebellar Purkinje neurones.” J Physiol **487**(Pt 1): 1-16.

Kano, M., U. Rexhausen, et al. (1992). “Synaptic excitation produces a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in cerebellar Purkinje cells.” Nature **356**(6370): 601-4.

Kano, M., R. Schneggenburger, et al. (1995). “Depolarization-induced calcium signals in the somata of cerebellar Purkinje neurons.” Neurosci Res **24**(1): 87-95.

Kaufman, A. (1998). “Visualizing nerve cells with VolVis.” Pac Symp Biocomput: 165-76.

Khodakhah, K. and D. Ogden (1995). “Fast activation and inactivation of inositol trisphosphate-evoked Ca2+ release in rat cerebellar Purkinje neurones.” J Physiol **487**(Pt 2): 343-58.

Klapstein, G. J., S. Vietla, et al. (1998). “Calbindin-D28k fails to protect hippocampal neurons against ischemia in spite of its cytoplasmic calcium buffering properties: evidence from calbindin-D28k knockout mice.” Neuroscience **85**(2): 361-73.

Kling-Petersen, T., R. Pascher, et al. (1998). “3D-brain 2.0--narrowing the gap between personal computers and high end workstations.” Stud Health Technol Inform **50**: 234-9.

Kling-Petersen, T. and K. Svensson (1993). “A simple computer-based method for performing and analyzing intracranial self-stimulation experiments in rats.” J Neurosci Methods **47**(3): 215-25.

Kobayashi, K., P. C. Emson, et al. (1990). “Cerebral cortical calbindin D28K and parvalbumin neurones in Down's syndrome.” Neurosci Lett **113**(1): 17-22.

Kodosky, J. and R. Dye (1989). “Programming with pictures.” Comp. Language(Jan. issue): 61-69.

Köhr, G., C. E. Lambert, et al. (1991). “Calbindin-D28K (CaBP) levels and calcium currents in acutely dissociated epileptic neurons.” Exp Brain Res **85**(3): 543-51.

Köhr, G. and I. Mody (1991). “Endogenous intracellular calcium buffering and the activation/inactivation of HVA calcium currents in rat dentate gyrus granule cells.” J Gen Physiol **98**(5): 941-67.

Konnerth, A., J. Dreessen, et al. (1992). “Brief dendritic calcium signals initiate long-lasting synaptic depression in cerebellar Purkinje cells.” Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 7051-5.

Kosaka, T., K. Kosaka, et al. (1993). “Axons and axon terminals of cerebellar Purkinje cells and basket cells have higher levels of parvalbumin immunoreactivity than somata and dendrites: quantitative analysis by immunogold labeling.” Exp Brain Res **93**(3): 483-91.

Kretsinger, R. H. (1979). “The informational role of calcium in the cytosol.” Adv Cyclic Nucleotide Res **11**: 1-26.

Kriete, A. and T. Schwebel (1996). “3-D TOP-A software package for the topological analysis of image sequences.” J Struct Biol **116**(1): 150-4.

Kurobe, N., Y. Inaguma, et al. (1992). “Developmental and age-dependent changes of 28-kDa calbindin-D in the central nervous tissue determined with a sensitive immunoassay method.” J Neurochem **58**(1): 128-34.

Lasser-Ross, N., H. Miyakawa, et al. (1991). “High time resolution fluorescence imaging with a CCD camera.” J Neurosci Methods **36**(2-3): 253-61.

Legrand, C., M. Thomasset, et al. (1983). “Calcium-binding protein in the developing rat cerebellum. An immunocytochemical study.” Cell Tissue Res **233**(2): 389-402.

Lev-Ram, V., H. Miyakawa, et al. (1992). “Calcium transients in cerebellar Purkinje neurons evoked by intracellular stimulation.” J Neurophysiol **68**(4): 1167-77.

Li, Z., C. Decavel, et al. (1995). “Calbindin-D28k: role in determining intrinsically generated firing patterns in rat supraoptic neurones.” J Physiol **488**(Pt 3): 601-8.

Lim, I., R. Walkup, et al. (1992). “Rapid prototyping of interactive software for automated instrumentation in rehabilitative therapy.” Biomed Instrum Technol **26**(3): 209-14.

Llano, I., R. DiPolo, et al. (1994). “Calcium-induced calcium release in cerebellar Purkinje cells.” Neuron **12**(3): 663-73.

Llano, I., A. Marty, et al. (1991). “Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices.” J Physiol **434**: 183-213.

Lledo, P. M., B. Somasundaram, et al. (1992). “Stable transfection of calbindin-D28k into the GH3 cell line alters calcium currents and intracellular calcium homeostasis.” Neuron **9**(5): 943-54.

Llinas, R. and M. Sugimori (1980). “Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices.” J Physiol **305**: 197-213.

Lowenstein, D. H., M. F. Miles, et al. (1991). “Up regulation of calbindin-D28K mRNA in the rat hippocampus following focal stimulation of the perforant path.” Neuron **6**(4): 627-33.

Maguire-Zeiss, K. A., Z. W. Li, et al. (1995). “Calbindin D28k mRNA in hippocampus, superior temporal gyrus and cerebellum: comparison between control and Alzheimer disease subjects.” Brain Res Mol Brain Res **30**(2): 362-6.

Majewska, A., G. Yiu, et al. (2000). “A custom-made two-photon microscope and deconvolution system.” Pflugers Arch **441**(2-3): 398-408.

Marty, A. and I. Llano (1995). “Modulation of inhibitory synapses in the mammalian brain.” Curr Opin Neurobiol **5**(3): 335-41.

Mattson, M. P., B. Rychlik, et al. (1991). “Evidence for calcium-reducing and excito-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons.” Neuron **6**(1): 41-51.

McMahon, A., B. S. Wong, et al. (1998). “Calbindin-D28k buffers intracellular calcium and promotes resistance to degeneration in PC12 cells.” Brain Res Mol Brain Res **54**(1): 56-63.

Means, A. R. and C. D. Rasmussen (1988). “Calcium, calmodulin and cell proliferation.” Cell Calcium **9**(5-6): 313-9.

Melamed, N. and R. Rahamimoff (1991). “Confocal microscopy of the lizard motor nerve terminals.” J Basic Clin Physiol Pharmacol **2**(1-2): 63-85.

Metuzals, J., H. Pant, et al. (1988). “In vitro polymorphism and phase transitions of the neurofilamentous network isolated from the giant axon of the squid (Loligo pealei L.).” Cell Tissue Res **252**(2): 249-62.

Miale, I. L. and R. L. Sidman (1961). “An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum.” Exp. Neurol. **4**: 277-296.

Middleton, F. A. and P. L. Strick (1998). “The cerebellum: an overview.” Trends Neurosci **21**(9): 367-9.

Minsky (1988). “Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope.” Scanning **10**: 128-138.

Mintz, I. M., M. E. Adams, et al. (1992). “P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons.” Neuron **9**(1): 85-95.

Mintz, I. M., V. J. Venema, et al. (1992). “P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA.” Nature **355**(6363): 827-9.

Mody, I. and J. F. MacDonald (1995). “NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca2+ release.” Trends Pharmacol Sci **16**(10): 356-9.

Morgan, D. W., A. F. Welton, et al. (1986). “Specific in vitro activation of Ca,Mg-ATPase by vitamin D-dependent rat renal calcium binding protein (calbindin D28K).” Biochem Biophys Res Commun **138**(2): 547-53.

Morrissey, R. L., T. J. Bucci, et al. (1975). “Calcium-binding protein: its cellular localization in jejunum, kidney and pancreas.” Proc Soc Exp Biol Med **149**(1): 56-60.

Mounier, F., N. Hinglais, et al. (1987). “Ontogenesis of 28 kDa vitamin D-induced calcium-binding protein in human kidney.” Kidney Int **31**(1): 121-9.

Murthy, K. K., J. L. Pace, et al. (1984). “Localization and distribution by age and species of an avian thymus- specific antigen.” Thymus **6**(1-2): 43-55.

Neher, E. (1992). “Cell physiology. Controls on calcium influx.” Nature **355**(6358): 298-9.

Neher, E. (1995). “The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes.” Neuropharmacology **34**(11): 1423-42.

Neher, E. (1998). “Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of Ca++ signals.” Cell Calcium **24**(5-6): 345-57.

Neher, E. and G. J. Augustine (1992). “Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells.” J Physiol **450**: 273-301.

NI (1998). G Programming Reference Manual, National Instruments Corporation.

NI (2000). Getting Started with LabVIEW, National Instruments Corporation.

NI (2000). LabVIEW Data Acquisition Basics Manual, National Instruments Corporation.

Nordstrom, M. A., E. A. Mapletoft, et al. (1995). “Spike-train acquisition, analysis and real-time experimental control using a graphical programming language (LabView).” J Neurosci Methods **62**(1-2): 93-102.

Numberger, M. and A. Draguhn (1996). Patch-Clamp-Technik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Ogden, D. and K. Khodakhah (1996). “Intracellular Ca2+ release by InsP3 in cerebellar Purkinje neurones.” Acta Physiol Scand **157**(3): 381-94.

Paddock, S. W. (2001). “Principles and practices of laser scanning confocal microscopy.” Mol Biotechnol **16**(2): 127-49.

Paddock, S. W., E. J. Hazen, et al. (1997). “Methods and applications of three-color confocal imaging.” Biotechniques **22**(1): 120-2, 124-6.

Palay, S. L. and V. Chan-Palay (1974). Cerebellar Cortex, Springer-Verlag.

Parmentier, M., J. J. De Vijlder, et al. (1989). “The human calbindin 27-kDa gene: structural organization of the 5' and 3' regions, chromosomal assignment, and restriction fragment length polymorphism.” Genomics **4**(3): 309-19.

Parmentier, M., M. Ghysens, et al. (1987). “Calbindin in vertebrate classes: immunohistochemical localization and Western blot analysis.” Gen Comp Endocrinol **65**(3): 399-407.

Pasteels, J. L., R. Pochet, et al. (1986). “Ultrastructural localization of brain 'vitamin D-dependent' calcium binding proteins.” Brain Res **384**(2): 294-303.

Petran, M., M. Hadravsky, et al. (1986). “In vivo microscopy using the tandem scanning microscope.” Ann N Y Acad Sci **483**: 440-7.

Pfitzinger, E. (1995). DIN EN ISO 9000 in der Software- Entwicklung, Beuth, Bln.

Poindessault, J. P., C. Beauquin, et al. (1995). “Stimulation, data acquisition, spikes detection and time/rate analysis with a graphical programming system: an application to vision studies.” J Neurosci Methods **59**(2): 225-35.

Rasmussen, C. D. and A. R. Means (1987). “Calmodulin as a regulator of cell growth and gene expression.” Soc Gen Physiol Ser **42**: 287-93.

Rasmussen, C. D. and A. R. Means (1987). “Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation.” Embo J **6**(13): 3961-8.

Rasmussen, C. D. and A. R. Means (1989). “Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis.” Embo J **8**(1): 73-82.

Rasmussen, C. D. and A. R. Means (1989). “Calmodulin, cell growth and gene expression.” Trends Neurosci **12**(11): 433-8.

Rasmussen, C. D. and A. R. Means (1989). “The presence of parvalbumin in a nonmuscle cell line attenuates progression through mitosis.” Mol Endocrinol **3**(3): 588-96.

Regan, L. J., D. W. Sah, et al. (1991). “Ca2+ channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin.” Neuron **6**(2): 269-80.

Reisner, P. D., S. Christakos, et al. (1992). “In vitro enzyme activation with calbindin-D28k, the vitamin D-dependent 28 kDa calcium binding protein.” FEBS Lett **297**(1-2): 127-31.

Reynaud, K., D. Nogueira, et al. (2001). “Confocal microscopy: principles and applications to the field of reproductive biology.” Folia Histochem Cytobiol **39**(2): 75-85.

Roberts, W. M. (1994). “Localization of calcium signals by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells.” J Neurosci **14**(5 Pt 2): 3246-62.

Robinson, T., L. Thomsen, et al. (2000). “LabPatch, an acquisition and analysis program for patch-clamp electrophysiology.” Am J Physiol Cell Physiol **278**(5): C1055-61.

Rogers, J., S. F. Zornetzer, et al. (1981). “Senescent pathology of cerebellum: Purkinje neurons and their parallel fiber afferents.” Neurobiol Aging **2**(1): 15-25.

Ross, W. N. and R. Werman (1987). “Mapping calcium transients in the dendrites of Purkinje cells from the guinea-pig cerebellum in vitro.” J Physiol **389**: 319-36.

Ruehlmann, D. O., C. H. Lee, et al. (2000). “Asynchronous Ca(2+) waves in intact venous smooth muscle.” Circ Res **86**(4): E72-9.

Sakurai, M. (1990). “Calcium is an intracellular mediator of the climbing fiber in induction of cerebellar long-term depression.” Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3383-5.

Schafer, B. W. and C. W. Heizmann (1996). “The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology.” Trends Biochem Sci **21**(4): 134-40.

Scharfman, H. E. and P. A. Schwartzkroin (1989). “Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation.” Science **246**(4927): 257-60.

Schmidt, R. F. (1992). Physiologie. Weinheim; Basel; Cambridge; New York, VCH.

Schneeberger, P. R., A. W. Norman, et al. (1985). “Parvalbumin and vitamin D-dependent calcium-binding protein (Mr 28,000): comparison of their localization in the cerebellum of normal and rachitic rats.” Neurosci Lett **59**(1): 97-103.

Sharp, J. A. (1992). Data Flow Computing: Theory and Practice, Greenwood Publishing Group, Inc.

Shaw, S. L., E. D. Salmon, et al. (1995). “Digital photography for the light microscope: results with a gated, video-rate CCD camera and NIH-image software.” Biotechniques **19**(6): 946-55.

Sheng, M., G. McFadden, et al. (1990). “Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB.” Neuron **4**(4): 571-82.

Sigworth, F. J. (1986). “The patch clamp is more useful than anyone had expected.” Fed Proc **45**(12): 2673-7.

Sigworth, F. J. (1995). “Design of the EPC-9, a computer-controlled patch-clamp amplifier. 1. Hardware.” J Neurosci Methods **56**(2): ES/*ME2.

Sigworth, F. J., H. Affolter, et al. (1995). “Design of the EPC-9, a computer-controlled patch-clamp amplifier. 2. Software.” J Neurosci Methods **56**(2): 203-15.

Sloviter, R. S. (1989). “Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity.” J Comp Neurol **280**(2): 183-96.

Solbach, S. and M. R. Celio (1991). “Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system.” Anat Embryol **184**(2): 103-24.

Sonnenberg, J., V. N. Luine, et al. (1986). “1,25-Dihydroxyvitamin D3 treatment results in increased choline acetyltransferase activity in specific brain nuclei.” Endocrinology **118**(4): 1433-9.

Sonnenberg, J., A. R. Pansini, et al. (1984). “Vitamin D-dependent rat renal calcium-binding protein: development of a radioimmunoassay, tissue distribution, and immunologic identification.” Endocrinology **115**(2): 640-8.

Sonnenberg, J. L., G. D. Frantz, et al. (1991). “Calcium binding protein (calbindin-D28k) and glutamate decarboxylase gene expression after kindling induced seizures.” Brain Res Mol Brain Res **9**(3): 179-90.

Steyger, P. (1999). “Assessing confocal microscopy systems for purchase.” Methods **18**(4): 435-46.

Stricker, S. A. and M. Whitaker (1999). “Confocal laser scanning microscopy of calcium dynamics in living cells.” Microsc Res Tech **46**(6): 356-69.

Sugimori, M. and R. R. Llinas (1990). “Real-time imaging of calcium influx in mammalian cerebellar Purkinje cells in vitro.” Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 5084-8.

Takechi, H., J. Eilers, et al. (1998). “A new class of synaptic response involving calcium release in dendritic spines.” Nature **396**(6713): 757-60.

Tank, D. W., M. Sugimori, et al. (1988). “Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slice.” Science **242**(4879): 773-7.

Taylor, A. N. and R. H. Wasserman (1967). “Vitamin D3-induced calcium-binding protein: partial purification, electrophoretic visualization, and tissue distribution.” Arch Biochem Biophys **119**(1): 536-40.

Terry, R. D. (1980). “Some biological aspects of the aging brain.” Mech Ageing Dev **14**(1-2): 191-201.

Thomas, P., A. Surprenant, et al. (1990). “Cytosolic Ca2+, exocytosis, and endocytosis in single melanotrophs of the rat pituitary.” Neuron **5**(5): 723-33.

Thomasset, M., C. O. Parkes, et al. (1982). “Rat calcium-binding proteins: distribution, development, and vitamin D dependence.” Am J Physiol **243**(6): E483-8.

Thomasset, M., A. Rabie, et al. (1984). “Vitamin D-dependent calcium-binding protein in the cerebellum: a marker of Purkinje cell development.” Dev Pharmacol Ther **7**(Suppl 1): 6-10.

Thompson, P. D. and B. L. Day (1993). “The anatomy and physiology of cerebellar disease.” Adv Neurol **61**: 15-31.

Tse, A., F. W. Tse, et al. (1994). “Calcium homeostasis in identified rat gonadotrophs.” J Physiol **477**(Pt 3): 511-25.

Tymianski, M., M. P. Charlton, et al. (1994). “Properties of neuroprotective cell-permeant Ca2+ chelators: effects on [Ca2+]i and glutamate neurotoxicity in vitro.” J Neurophysiol **72**(4): 1973-92.

Usowicz, M. M., M. Sugimori, et al. (1992). “P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells.” Neuron **9**(6): 1185-99.

Uzman, L. L. (1960). “The histogenesis of the mouse cerebellum as studied by its tritiated thymidine uptake.” J. Comp. Neurol. **114**: 137-159.

van der Voort, H. T., G. J. Brakenhoff, et al. (1989). “Three-dimensional visualization methods for confocal microscopy.” J Microsc **153**(Pt 2): 123-32.

Van Eldik, L. J., J. G. Zendegui, et al. (1982). “Calcium-binding proteins and the molecular basis of calcium action.” Int Rev Cytol **77**: 1-61.

Varghese, S., S. Lee, et al. (1988). “Analysis of rat vitamin D-dependent calbindin-D28k gene expression.” J Biol Chem **263**(20): 9776-84.

Vecellio, M., B. Schwaller, et al. (2000). “Alterations in Purkinje cell spines of calbindin D-28 k and parvalbumin knock-out mice.” Eur J Neurosci **12**(3): 945-54.

Villa, A., P. Podini, et al. (1994). “Cytosolic Ca2+ binding proteins during rat brain ageing: loss of calbindin and calretinin in the hippocampus, with no change in the cerebellum.” Eur J Neurosci **6**(9): 1491-9.

Voogd, J. and M. Glickstein (1998). “The anatomy of the cerebellum.” Trends Neurosci **21**(9): 370-5.

Wagner, J. and J. Keizer (1994). “Effects of rapid buffers on Ca2+ diffusion and Ca2+ oscillations.” Biophys J **67**(1): 447-56.

Wassef, M., J. P. Zanetta, et al. (1985). “Transient biochemical compartmentalization of Purkinje cells during early cerebellar development.” Dev Biol **111**(1): 129-37.

Wasserman, R. H. and A. N. Taylor (1966). “Vitamin D3 induced Calcium binding protein in chick intestinal mucosa.” Science **152**: 791-793.

Wasserman, R. H. and A. N. Taylor (1971). “Evidence for a vitamin D 3-induced calcium-binding protein in new world primates.” Proc Soc Exp Biol Med **136**(1): 25-8.

Weber, H. (1998). Laser. München, C.H. Beck Wissen.

Weiss, G. M. and J. J. Pysh (1978). “Evidence for loss of Purkinje cell dendrites during late development: a morphometric Golgi analysis in the mouse.” Brain Res **154**(2): 219-30.

Wessel, I. (1998). GUI- Design, Carl Hanser Verlag.

Winsky, L. and J. Kuznicki (1995). “Distribution of calretinin, calbindin D28k, and parvalbumin in subcellular fractions of rat cerebellum: effects of calcium.” J Neurochem **65**(1): 381-8.

Yew, D. T., C. B. Luo, et al. (1997). “Differential expression of calretinin, calbindin D28K and parvalbumin in the developing human cerebellum.” Brain Res Dev Brain Res **103**(1): 37-45.

Young, S. R., R. K. Wong, et al. (2000). “Simultaneous intracellular recording and calcium imaging in single neurons of hippocampal slices.” Methods **21**(4): 373-83.

Yuste, R. and D. W. Tank (1996). “Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal.” Neuron **16**(4): 701-16.

Zhang, J. H., Y. Morita, et al. (1990). “Ontological study of calbindin-D28k-like and parvalbumin-like immunoreactivities in rat spinal cord and dorsal root ganglia.” J Comp Neurol **302**(4): 715-28.

Zhou, Z. and E. Neher (1993). “Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells.” J Physiol **469**: 245-73.

## Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. med. Arthur Konnerth am I. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes in Homburg, am Physiologischen Institut der Technischen Universität München sowie zuletzt am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Herrn Professor Konnerth gilt mein Dank für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und Hilfsbereitschaft während dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch allen Kollegen und Freuden in der Arbeitsgruppe von Prof. Konnerth für die gute Zusammenarbeit, für die vielen anregenden Diskussionen und die kontinuierliche Unterstützung. Herrn PD Dr. Jens Eilers (*MPI für Hirnforschung, Frankfurt*) verdanke ich meine ersten experimentellen Einsichten in die Elektrophysiologie wie das Kalzium-*Imaging*. Zusammen mit Dr. Detlef Hof (*Universität des Saarlandes*) wurde die erste Version von *FastAnalysis* entwickelt und dieser ist damit einer der Urväter des hier weitergeführten Software-Projektes. Herr Dr. Michael Meyer (*MPI für Neurobiologie, Martinsried*) stellte freundlicherweise die in dieser Arbeit verwendeten Calbindin D28k defizienten Mäuse zur Verfügung. Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Karl Kafitz für die überaus wertvollen Hinweise während der Niederschrift dieser Dissertation.

Dank gilt auch den „Gurus“ der LabVIEW-Gemeinde weltweit, die mir durch ihre Ratschläge über viele Hürden der Programmierung hinweggeholfen haben – unter den vielen sind vor allem zu nennen Greg McKaskle (*National Instruments*) und Bruce Ammons (*Ammons Engineering*).

# Lebenslauf

**Persönliche Angaben**

| | |
|---|---|
| Familienstand: | ledig |
| Staatsangehörigkeit: | Deutscher |
| Geburtsdatum: | 21.10.1969 |
| Geburtsort: | Homburg |

**Ausbildung**

| | |
|---|---|
| 1976 - 1980 | Besuch der Grundschule Hemmersdorf |
| 1980 - 1989 | Besuch des Staatlichen Gymnasiums Dillingen |
| 1989 | Abitur |
| 1989 - 1997 | Studium der Humanmedizin an den Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg |
| 1992 - 1998 | MA-Zweitstudiengang der Philosophie, Neueren Deutschen Literaturwissenschaft und Mathematik an der FU Hagen |
| 1997 | 3. Staatsexamen der Medizin |
| 1999 | Aufbaustudium “Medizinische Ethik” an der FU Hagen |
| 10.03.2000 | Approbation als Arzt |

**Berufstätigkeit**

| | |
|---|---|
| 02.02.98 – 19.02.99 | Tätigkeit als Arzt im Praktikum am I. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. Arthur Konnerth) als |
| 02.02.98 – 31.05.99 | Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs „Zelluläre Regulation und Wachstum” |
| 22.02.99 – 21.02.00 | Tätigkeit als Arzt im Praktikum an der II. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. med. Martin Zeitz) der Universitätskliniken des Saarlandes |
| 22.02.00 – 31.12.00 | Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologischen Institut der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Arthur Konnerth) |
| 01.01.01 - | Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Arthur Konnerth) |