

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Membran- und Neurophysik

Messungen von Aktionspotentialen in Dendriten von kultivierten und gentechnisch veränderten Hippocampusneuronen mit spannungssensitiven Farbstoffen

Bernd Kuhn

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. L. van Hemmen

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. P. Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann

Die Dissertation wurde am 7.2.2001 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am
23.5.2001 angenommen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Aktionspotentiale in Dendriten kultivierter Hippocampus-Neurone mit spannungssensitiven Farbstoffen untersucht.

Dazu wurde ein Meßstand aufgebaut, mit dessen Kamera eine $400\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ große Fläche aufgenommen werden kann. Die räumliche und zeitliche Auflösung beträgt dabei $4,4\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ und $0,75\text{ms}$. Es kommen die Farbstoffe BNBIQ und erstmals auch ANNINE-5 zum Einsatz. Beide sind für Messungen an Einzelzellen optimiert. Die Anfärbung der Zellen wird mit der neu entwickelten HCl-Methode stark vereinfacht und verbessert. Durch das gute Signal/Rausch-Verhältnis der Daten ist es nicht nötig mehrere Messungen zu mitteln, wie bei vielen bisherigen Arbeiten. Aktionspotentiale können auch in den empfindlichen und feinen Dendriten einzelner hippocampaler Neurone sowie kleiner Netzwerke in einem einzigen Lauf gemessen werden. Alle auflösbaren Strukturen können gleichzeitig untersucht werden und nicht wie bei Patch-Clamp Messungen an nur wenigen Stellen. Außerdem ist es jetzt auch möglich, Aktionspotentiale in Dendriten von Neuronen trotz hoher Hintergrundfluoreszenz zu detektieren, wie z.B. auf Gliarasen oder bei hoher Zelldichte. Dies ist ein erster Schritt zu Messungen im Gehirnschnitt mit Einzelzellauflösung.

Mit diesem Aufbau wird hier zwei Fragestellungen nachgegangen:

Wie pflanzen sich Aktionspotentialgruppen in Dendriten kultivierter Hippocampusneurone fort?

Aktionspotentiale bewahren im Rahmen der Meßgenauigkeit ihre Form auch im Dendriten. Vergleicht man jedoch zwei Aktionspotentiale einer Gruppe, so ist das spätere verbreitert und bildet eine Schulter. In den meisten Fällen kann keine aktivitätsabhängige Dämpfung der Aktionspotentiale wie im Gehirnschnitt gefunden werden: Das Verhältnis zweier Aktionspotentialamplituden eines Aktionspotentialzugs ist im ganzen Dendriten konstant. Nur in wenigen Messungen wird eine stärkere Dämpfung eines späteren Aktionspotentials gefunden, die etwa halb so stark wie in vergleichbaren Messungen im Gehirnschnitt ist.

Kann die Fortpflanzung der Aktionspotentiale in Dendriten mittels Gentechnik verändert werden?

Die Hippocampusneurone werden dazu mit zwei spannungsabhängigen Kaliumkanäle transfiziert und erstmals deren Auswirkung auf die Aktionspotentiale im Dendriten untersucht. Während der Kanal Kv1.4 die Re- und Hyperpolarisation des Aktionspotentials beeinflusst, steuert Kv1.3 die Aktionspotentialamplitude in zweifacher Weise: Er dämpft die Amplitude der Spikes im Dendriten und erzeugt zusätzlich eine aktivitätsabhängige Dämpfung späterer Aktionspotentiale sowohl bei Aktionspotentialgruppen als auch bei Spikes die 700ms auseinanderliegen. Es kann somit ein Kurzzeitgedächtnis des Dendritenbaums erzeugt werden.

Hiermit ist der Grundstein gelegt für weitere Untersuchungen der Signalverarbeitung in Dendriten und das gezielte Design dendritischer Eigenschaften für neuronale Netze mit spannungsabhängigen Ionenkanälen.

1. MOTIVATION	5
2. SIGNALVERARBEITUNG IM DENDRITENBAUM VON NERVENZELLEN ...	8
2.1 Grundlagen der zellulären Elektrophysiologie	8
2.2 Spannungsabhängige Ionenkanäle und Aktionspotentialformen in Dendriten	10
2.3 Backpropagation von Aktionspotentialen	14
2.3.1 Hippocampale CA1 Pyramidalzellen	14
2.3.2 Andere Nervenzelltypen	16
2.4 Aktivitätsabhängige Backpropagation	16
2.5 Auswirkungen des aktiven Dendriten	19
3. VORSTELLUNG DES SYSTEMS	20
3.1 Hippocampale Nervenzellen in Kultur	20
3.2 Gezielte Veränderungen der Nervenzelleigenschaften mittels Gentechnik	21
3.2.1 Der spannungssensitive Kaliumkanal Kv1.3	22
3.2.2 Der spannungssensitive Kaliumkanal Kv1.4	24
3.3 Spannungssensitive Farbstoffe	24
3.4 Bisherige Messungen von Aktionspotentialen in Dendriten kultivierter Neurone mit spannungssensitiven Farbstoffen	28
4. METHODEN	30
4.1 Rattenzellkultur	30
4.1.1 Substrat für neuronales Wachstum	30
4.1.2 Hippocampale Primärkulturen	30
4.2 Transfektion der Nervenzellen mit Kaliumkanälen	32
4.3 Anwendung spannungssensitiver Farbstoffe	34
4.3.1 Auswahl der Filter	34
4.3.2 Anfärbemethoden	34
4.3.3 Phototoxizität	37
4.4 Aufbau der Meßapparatur	37
4.4.1 Mechanischer Aufbau	37
4.4.2 Optisches Detektionssystem	37
4.4.3 Elektrophysiologie	40
4.4.4 Steuerung	40
4.4.5 Dokumentation	40
4.5 Meßablauf	41
4.5.1 Meßablauf bei Aktionspotentialgruppen	41
4.5.2 Meßablauf bei gentechnisch veränderten Nervenzellen	41

4.6 Datenauswertung	41
4.7 Fortschritte und Ausblick	46
5. MESSUNGEN VON AKTIONSPOTENTIALGRUPPEN IN DENDRITEN	48
5.1 Protokoll 1: AP-Train-AP	49
5.2 Protokoll 2: AP-AP-AP-AP-...	58
5.3 Protokoll 3: Messungen von zwei Aktionspotentialen eines Trains	60
5.4 Protokoll 4: Messungen eines ganzen Trains	72
5.5 Diskussion	75
6. MESSUNGEN AN GENTECHNISCH VERÄNDERTEN NERVENZELLEN ...	79
6.1 Einfluß des spannungsabhängigen Ionenkanals Kv1.3	79
6.2 Einfluß des spannungsabhängigen Ionenkanals Kv1.4	88
6.3 Diskussion	92
7. ZUSAMMENFASSUNG	94
Anhang	96
Literatur	106

Kapitel 1

Motivation

Das Gehirn ist das zentrale Steuerorgan aller höheren vielzelligen Tiere, insbesondere des Menschen. Beim Menschen besteht es aus etwa 10^{11} Nervenzellen und 10^{12} Gliazellen verschiedenster Ausprägungen und Funktionen. Die Nervenzellen (Abb.1.1) sind die morphologischen und funktionellen Einheiten des Gehirns, deren Aufgabe es ist, Informationen an andere Zellen weiterzuleiten. Die Kontaktstellen zwischen den Neuronen, die diese Übertragung bewerkstelligen, heißen Synapsen. Neurone bekommen Informationen von anderen Zellen durch Synapsen auf den Dendriten und auf dem Zellkörper (Soma) und leiten ein sich daraus ergebendes Signal über das Axon an andere Zellen weiter. Die Information ist dabei durch Depolarisationen des Zellpotentials und deren Frequenz kodiert. Diese sogenannten Aktionspotentiale (Spikes) werden im Axon nahe des Somas abhängig von den Eingangssignalen der Zelle generiert und pflanzen sich aktiv und somit unverändert im Axon bis zur nächsten Zelle fort. Interessanterweise läuft das Aktionspotential vom Entstehungsort im Axon aber auch zum Soma und in die Dendriten zurück (Backpropagation). Informationstechnisch bedeutet dies, daß der Eingang der Zelle das Ausgangsergebnis erfährt. Solche Mechanismen sind wichtige Regulatoren für Synapsenstärken und somit für das Lernen. Lange Zeit nahm man an, daß die Weiterleitung der Aktionspotentiale nur im Axon aktiv erfolgt und die Depolarisation sich in den Dendriten dagegen rein passiv ausbreitet. Durch die gleichzeitige Ableitung der Potentiale am Soma und den Dendriten einer Zelle in Gehirnschnitten konnte aber gezeigt werden, daß dies nicht so ist. Dendriten sind keine passiven Schläuche sondern komplexe Regulatoren. Ein wichtiges Beispiel für diese modulierende Funktion ist, daß die Backpropagation in Hirnschnitten des Hippocampus aktivitätsabhängig ist, d.h. bei Aktionspotentialgruppen pflanzt sich das erste fast ungedämpft im Dendriten fort, wogegen die folgenden immer stärker gedämpft werden [75][8]. Andere Neurone zeigen diese Eigenschaft aber nicht.

Wie aber entstehen überhaupt Aktionspotentiale und wie werden Modulationen wie die aktivitätsabhängige Backpropagation erzeugt? Durch unterschiedliche Ionenverteilungen innerhalb und außerhalb der Zelle und unterschiedliche Leitfähigkeiten für diese Ionen durch die Zellmembran entsteht ein negatives Ruhepotential. Die wichtigsten Ionen sind dabei Na^+ und K^+ . Sie können die Zellmembran nur durch ionenspezifische Kanäle durchdringen. Diese Kanäle sind komplexe Proteine, die unterschiedlichste Eigenschaften hinsichtlich Ionenspezifität und Leitfähigkeit besitzen. Manche dieser Kanäle sind spannungsabhängig und öffnen oder schließen bei einer Änderung des Membranpotentials. Bei einem Aktionspotential wird z.B. kurzzeitig die Leitfähigkeit für Na^+ erhöht, was zu einer Depolarisation der Zelle führt, worauf K^+ -Kanäle öffnen, bis das Ruhepotential wieder erreicht ist. Im Axon wird das Aktionspotential somit hauptsächlich durch

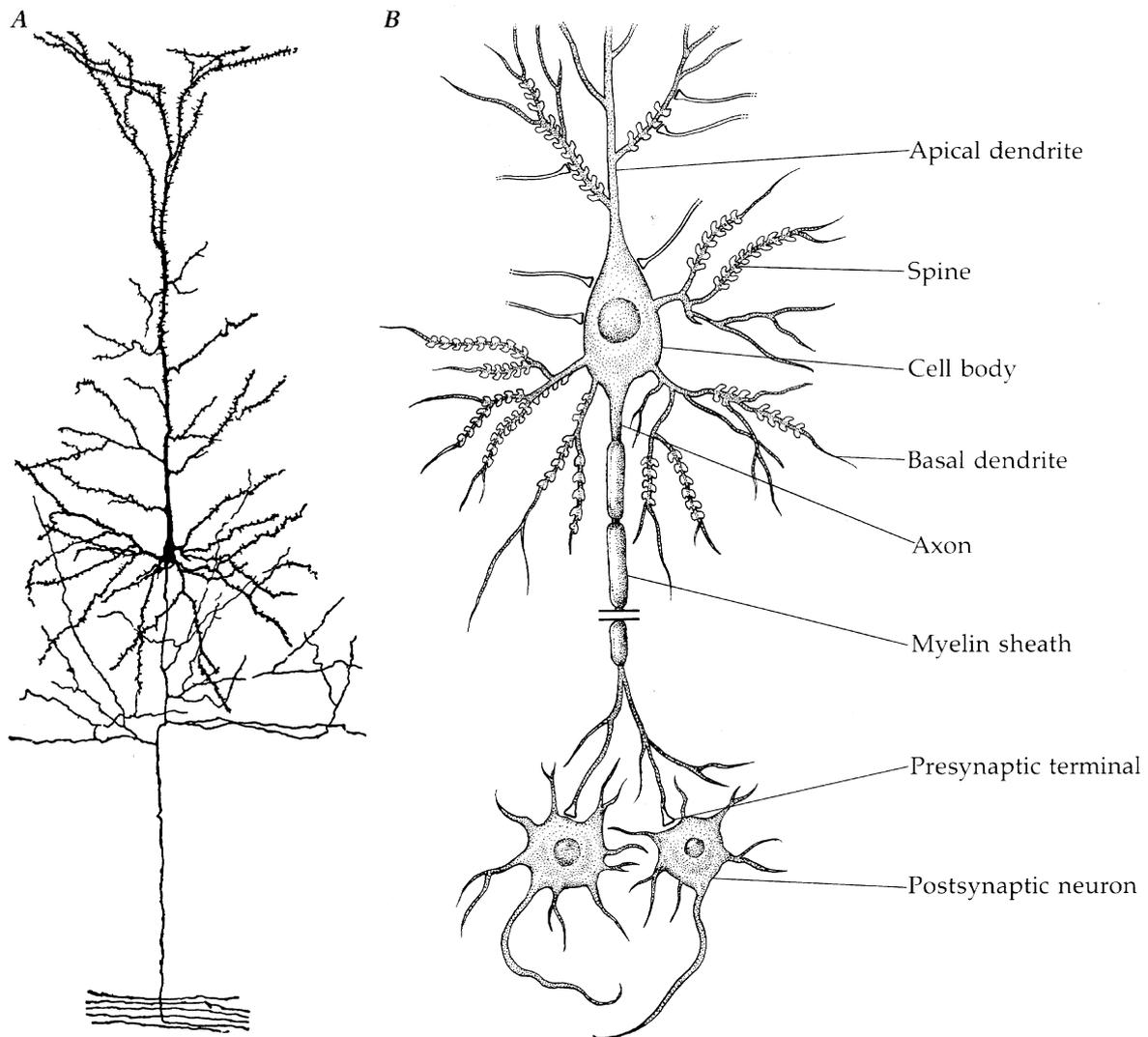


Abbildung 1.1: Pyramidalzellen des cerebralen Cortex (Großhirn). A: Zeichnung eines mit der Golgi-Färbung sichtbar gemachten Neurons [7]. B: Schematisches Neuron [53].

zwei Kanaltypen erzeugt und fortgeleitet. Es wird aber nicht weiter verändert. Dendriten besitzen dagegen eine Vielzahl von Kanälen mit nicht nur unterschiedlichen Eigenschaften, sondern auch inhomogener Verteilung und unterschiedlicher Modulation durch intrazelluläre Signalketten. Beispielsweise entsteht die aktivitätsabhängige Backpropagation in Hippocampusneuronen wahrscheinlich durch eine besondere Modulation der Na^+ Kanäle im Dendriten.

Ziel dieser Arbeit ist es nun, die Backpropagation von Aktionspotentialen in kultivierten Hippocampusneuronen zu untersuchen. Ist sie auch bei kultivierten Zellen aktivitätsabhängig oder ergeben sich Unterschiede zu den Slicemessungen? Die Untersuchungen sollen Aufschluß darüber geben, wie sich Neurone ohne die modulierenden Umweltbedingungen im Gehirn (Wachstumsfaktoren, Hormone, ...) verhalten. Ein zweites Ziel ist zu untersuchen, ob die Fortpflanzung von Aktionspotentialen im Dendriten verändert werden kann. Dazu wird versucht mit gentechnischen Methoden die Kanalzusammensetzung im Dendriten zu manipulieren, indem die Zelle veranlaßt werden, zusätzliche Kanäle in die Membran einzubauen. Werden durch einen

bestimmten Kanal die Fortpflanzungseigenschaften der Aktionspotentiale geändern, und wenn ja, wie? So kann der Einfluß dieses Kanals gezielt untersucht werden. In Zukunft kann dies aber auch dafür genutzt werden, definierte neuronale Netzwerke mit vorgegebenen Eigenschaften zu designen.

Alle oben vorgestellten Ergebnisse der Gehirnschnitte wurden mit verschiedenen elektrophysiologischen Methoden gewonnen. Trotz aller Vorteile haben sie eine starke meßtechnische Beschränkung: Es kann immer nur an wenigen Stellen einer Zelle gleichzeitig abgeleitet werden. Für Patch-Clamp Messungen liegt die Obergrenze z.Z. bei fünf gleichzeitigen Ableitungen, aber bereits zwei sind schwierig. Eine Alternative bieten hier optische Messungen mit spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoffen. Sie lagern sich in die Zellmembran ein und ändern ihre spektralen Eigenschaften in Abhängigkeit vom elektrischen Feld über der Membran. So können Spannungsänderungen, wie z.B. Aktionspotentiale, detektiert werden. In dieser Arbeit soll dafür eine Apparatur für optische Messungen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung aufgebaut werden, um die oben beschriebenen physiologischen Untersuchungen an kultivierten Hippocampusneuronen durchzuführen. Ortsabhängige Ergebnisse, die bis jetzt aus Messungen von vielen verschiedenen Zellen zusammengesetzt wurden, sollten damit an einer Zelle mit einer einzigen Messung zugänglich sein.

Im folgenden Kapitel wird zuerst die Elektrophysiologie von neuronalen Dendritenbäumen vertiefend vorgestellt. Anschließend wird das in dieser Arbeit verwendete System erläutert.

Kapitel 2

Signalverarbeitung im Dendritenbaum von Nervenzellen

2.1 Grundlagen der zellulären Elektrophysiologie

Nervenzellen findet man in fast allen vielzelligen Tieren (Metazoa). Sie werden dazu benötigt, Informationen schnell innerhalb eines Individuums weiterzuleiten und zu verarbeiten. Sie bestehen aus Dendriten, einem Soma und einem Axon (Abb. 1.1). Diese Kompartimente besitzen unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen. An den Dendriten und am Soma (Zellkörper mit Zellkern) bekommt die Zelle einen Informationsinput über Synapsen von anderen Zellen. Die Zelle, von der das Signal stammt, wird präsynaptisch genannt, die empfangende Zelle postsynaptisch. Die Signale können erregend (exzitatorisch) oder hemmend (inhibitorisch) sein. Das synaptische Eingangssignal der Dendriten breitet sich zum Soma hin aus. Dort überlagern sich alle Eingangssignale der Dendriten und des Somas. Liegt das resultierende Potential über einem bestimmten Schwellwert, wird im Axonhügel oder im Axon nahe des Somas ein Aktionspotential ausgelöst. Das Potential der Zelle ändert sich dabei sehr schnell (Größenordnung 1ms) vom negativen Ruhepotential (etwa -60mV) zu einem positiven Potential (etwa +20mV) gegenüber dem Bad. Diese Aktionspotentiale breiten sich aktiv im Axon aus. Das Axon kann sich vielfach verzweigen und über Synapsen einen Input für viele andere postsynaptische Zellen liefern. Der Dynamik der Aktionspotentialgenerierung und Fortpflanzung liegen spannungssensitive Ionenkanäle zugrunde, die nur selektiv bestimmte Ionen passieren lassen. Der Mechanismus wurde erstmals von Hodgkin und Huxley an Tintenfischaxonen untersucht und mit einem Modell beschrieben [28]. Es wird im folgenden kurz zusammengefaßt.

Das Hodgkin-Huxley Modell (Nomenklatur nach [37]) geht von Na^+ und K^+ -Ionen und zwei entsprechenden spannungssensitiven Ionenkanälen aus. Das Axon wird als ein zylindrisches Kabel mit Radius a , leitfähigem Kern (spezifische Längswiderstand r_i), spezifischer Membrankapazität c_m , spannungsabhängiger spezifischer Leitfähigkeiten durch die Membran für Na^+ (g_{Na}) und K^+ (g_{K}) und einer Leckleitfähigkeit der Membran (g_L) beschrieben (Abb.2.1). Aus den Schaltbildern ergibt sich folgende Kabelgleichung für die Stromdichte i_m :

$$i_m = -\frac{\partial i_i}{\partial x} = \frac{a}{2r_i} \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} \quad (1)$$

$$= c_m \frac{\partial V}{\partial t} + g_{\text{K}}(V, t)(V - E_{\text{K}}) + g_{\text{Na}}(V, t)(V - E_{\text{Na}}) + g_L(V - E_L) \quad (2)$$

Dabei sind V das Potential im Axon an der Stelle x zur Zeit t gegenüber dem auf 0V gesetzten Bad und

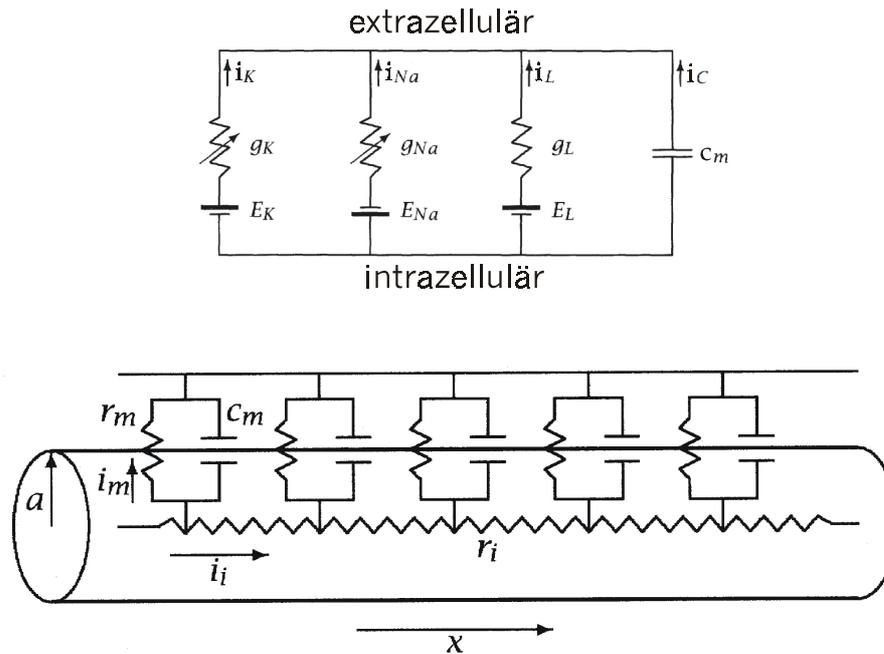


Abbildung 2.1: Membranersatzschaltbild (oben) und Kabelmodell (unten). [37]

E_i die Nernstpotentiale der einzelnen Ionen. Das Nernstpotential kommt durch die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle zustande. K^+ ist im Zellinneren überschüssig, Na^+ im Extrazellulärraum. Die spannungs- und zeitabhängigen Leitfähigkeiten der Ionenkanäle werden mit Ratengleichungen empirisch an die Meßdaten angepaßt. Es wird davon ausgegangen, daß ein Ionenkanal von mehreren unabhängigen Toren, hier Teilchen genannt, geöffnet oder geschlossen werden kann. Die beste Übereinstimmung mit den Messungen ergeben sich bei K^+ durch vier gleiche n-Teilchen und für Na^+ durch drei m-Teilchen und ein h-Teilchen. Im statistischen Mittel schließen am Ruhepotential die n-Teilchen den K^+ Kanal und die m-Teilchen den Na^+ Kanal. Das h-Teilchen ist in seinem Offen-Zustand. Bei einer Depolarisation öffnen zuerst die m-Teilchen und somit ist der Na^+ Kanal leitfähig. Na^+ strömt ein und depolarisiert die Zelle. Mit zeitlicher Verzögerung öffnen die n-Teilchen aufgrund der Depolarisation, so daß es zu einem K^+ Ausstrom und damit zu einer Absenkung des Potentials kommt. Aus dem selben Grund schließt das h-Teilchen den Na^+ Kanal. Das Potential fällt wieder bis zum Ruhepotential und wegen der Verzögerung der Teilchendynamik sogar darüber hinaus. Unterhalb oder am Ruhepotential schließen die m-Teilchen und die n-Teilchen, wogegen das h-Teilchen wieder öffnet. Der Zustand vor der Stimulation ist wieder erreicht. Formal werden die Leitfähigkeiten mit den jeweiligen Ratenkonstanten zum Öffnen $\alpha(V)$ und zum Schließen $\beta(V)$ wie folgt beschrieben:

$$g_K(V, t) = n^4 \bar{g}_K \quad (3)$$

$$\frac{dn}{n} = \alpha_n(1 - n) - \beta_n n$$

$$g_{Na}(V, t) = m^3 h \bar{g}_{Na} \quad (4)$$

$$\frac{dm}{m} = \alpha_m(1 - m) - \beta_m m$$

$$\frac{dh}{h} = \alpha_h(1 - h) - \beta_h h$$

\bar{g}_K und \bar{g}_{Na} sind die spezifischen Maximalleitfähigkeiten für K^+ und Na^+ . Die Lösungen der Differentialgleichungen für $n(t)$, $m(t)$ und $h(t)$ werden in (3) und (4) eingesetzt. Es erfolgt die oben bereits erwähnte Anpassung der spannungsabhängigen Ratenkonstanten, um den gemessenen Leitfähigkeiten zu entsprechen. Es ergibt sich für das Tintenfischaxon:

$$\alpha_n(V) = 0,01 \frac{1}{ms} (-V + 10mV) / [(e^{\frac{-V+10mV}{10mV}} - 1)mV] \quad (5)$$

$$\beta_n(V) = 0,125 \frac{1}{ms} e^{\frac{-V}{80mV}} \quad (6)$$

$$\alpha_m(V) = 0,1 \frac{1}{ms} (-V + 25mV) / [(e^{\frac{-V+25mV}{10mV}} - 1)mV] \quad (7)$$

$$\beta_m(V) = 4 \frac{1}{ms} e^{\frac{-V}{18mV}} \quad (8)$$

$$\alpha_h(V) = 0,07 \frac{1}{ms} e^{\frac{-V}{20mV}} \quad (9)$$

$$\beta_h(V) = 1 / [(e^{\frac{-V+30mV}{10mV}} + 1)ms] \quad (10)$$

Das Differentialgleichungssystem aus (1) und (5) bis (10) muß numerisch gelöst werden. Mit dieser Theorie wird das Aktionspotential im Tintenfischaxon beschrieben und auf molekulare Kanaleigenschaften zurückgeführt.

Von den Dendriten wurde lange Zeit angenommen, daß die Ausbreitung von depolarisierenden Pulsen in ihnen rein passiv, d.h. ohne spannungsabhängige Ionenkanäle, erfolgt. Messungen mit Patch-Clamp Technik zeigen aber, daß die Ausbreitung aktiv ist und viele verschiedene Kanäle mit unterschiedlichsten Eigenschaften an der Aktionspotentialweiterleitung und -modulation beteiligt sind.

2.2 Spannungsabhängige Ionenkanäle und Aktionspotentialformen in Dendriten

Nicht nur Na^+ und K^+ Ionen, sondern auch Ca^{2+} Ionen tragen zur Generierung von Aktionspotentialen im Dendriten bei. Die dafür verantwortlichen Kanäle oder Kanalfamilien sind ionenselektiv und werden anhand ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften und ihrer Pharmakologie voneinander unterschieden (Abb. 2.2). Sie aktivieren, d.h. öffnen, bei Depolarisierung. Es gibt aber auch Kanäle, die bei Hyperpolarisation aktivieren und verschiedene Ionensorten leiten. Interessant ist auch, daß manche Kanäle nicht homogen in Soma und Dendrit verteilt sind. Alle im folgenden vorgestellten Kanaltypen bzw. Ionenströme wurden in Dendriten hippocampaler Pyramidalzellen gefunden. Die Nomenklatur folgt den entsprechenden Übersichtskapiteln in [77], [71] und [37].

Na⁺ Kanäle

Natriumkanäle führen beim Öffnen zu einer Depolarisierung der Zelle und ermöglichen die Erzeugung und Fortleitung des Aktionspotentials. Sie formen aber auch synaptische Potentiale. Der zugehörige Strom $I_{Na(\text{fast})}$ wird durch geringe Konzentrationen des Kanalgifts TTX blockiert. Er zeigt eine schnelle Aktivierungs- (<1ms) und Inaktivierungskinetik (~1ms). Die Kanalleitfähigkeit beträgt etwa 15pS. Die Kanäle werden bei Potentialen >-45mV aktiviert. Die Kanaldichte ist vom Startpunkt des Axons bis 330µm

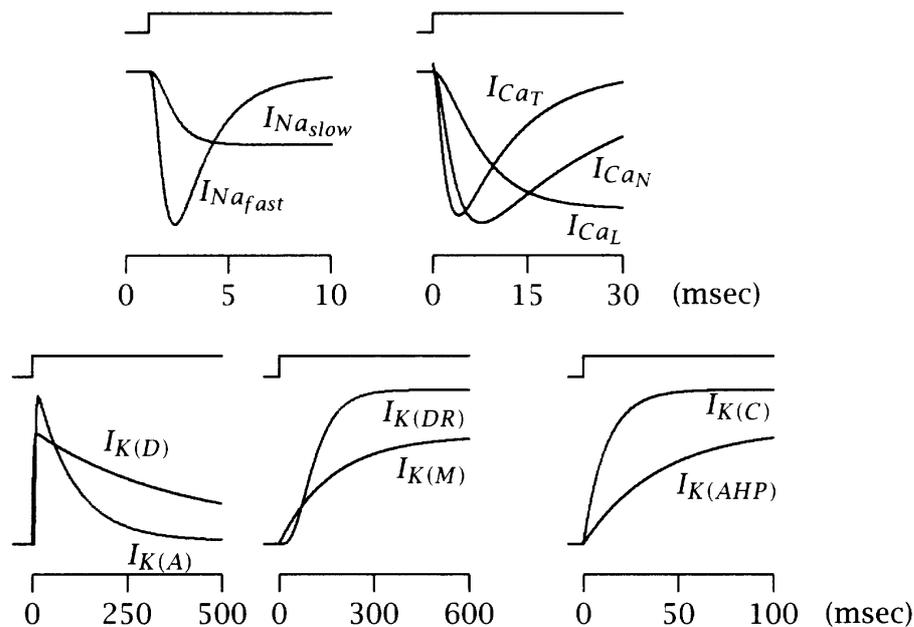


Abbildung 2.2: Vergleich von verschiedenen Strömen in Hippocampusneuronen als Antwort auf Spannungssprünge (jeweils darüber). Natrium-Ströme $I_{Na(slow)}$ und $I_{Na(fast)}$ oben links, Calcium-Ströme $I_{Ca(T)}$, $I_{Ca(N)}$ und $I_{Ca(L)}$ oben rechts, Kalium-Ströme $I_{K(D)}$, $I_{K(A)}$, $I_{K(DR)}$, $I_{K(M)}$, $I_{K(C)}$ und $I_{K(AHP)}$ unten. [76]

in den Dendriten konstant. Dieser Kanaltyp ist in Neuronen weit verbreitet.

Im Soma und den Dendriten von Hippocampuspyramidalzellen und wahrscheinlich auch im Neocortex wurde ein Na^+ Strom gefunden, der sich durch die Erholungszeit aus dem inaktivierten Zustand vom Standardnatriumstrom unterscheidet. Die vollständige Erholungszeit beträgt hier Sekunden anstatt Millisekunden beim $I_{Na(fast)}$. Diese Erholungszeit im Dendriten und im Soma ist gleich, aber der Anteil der sich langsam erholenden Na^+ Kanäle im Dendriten ist viel höher wie im Soma. Es ist noch nicht endgültig geklärt, ob diese langsame Erholung aus der Inaktivierung auf einen zweiten Na^+ Kanal zurückzuführen ist oder ob es sich um eine andere Stufe der Phosphorylierung handelt, die die Kanalleitfähigkeit moduliert. Starke Hinweise auf die Richtigkeit der zweiten Vermutung liefern die Versuche mit der Ca^{2+} abhängigen Proteinkinase PKC [13] (siehe Abschnitt 2.4).

Ein zweiter Natriumstrom $I_{Na(slow)}$ ist in CA1 Neuronen noch nicht sicher nachgewiesen. Er inaktiviert langsam oder gar nicht und spielt eine Rolle bei sich wiederholenden Aktionspotentialen und beim unterschweligen Verhalten der Zellen.

Ca²⁺ Kanäle

Ca^{2+} Kanäle gibt es in allen Neuronen und dort in verschiedenen Teilen der Zellen: Im Soma, den Dendriten und den synaptischen Endplatten. Sie tragen durch Ca^{2+} Einstrom ebenfalls zur Erregbarkeit und entscheidend zu den elektrophysiologischen Eigenschaften bei. Ca^{2+} ist aber auch ein wichtiger Second Messenger in Neuronen und somit werden durch diese Kanäle auch wichtige physiologische Funktionen gesteuert, wie z.B. Neurotransmitterausschüttung, synaptische Plastizität, Neuritenwachstum während der

Entwicklung und die Expressierung von Proteinen. Sie sind langsamer als die schnellen Na^+ Kanäle. Mit Voltage-Clamp Messungen und Ca^{2+} Imaging wurde eine Mischung aus mehreren der bekannten Ca^{2+} Kanaltypen in allen untersuchten Dendriten gefunden. Außerdem wurde festgestellt, daß sie dort ungleichmäßig verteilt sind.

Die wichtigsten Ströme, denen entsprechende Kanäle zugeordnet werden, sind der (transiente) T-Typ Strom $\mathbf{I}_{\text{Ca(T)}}$ mit niederem Aktivierungsschwellwert und kleiner Leitfähigkeit ($\sim 9\text{pS}$), der (long-lasting) L-Typ Strom $\mathbf{I}_{\text{Ca(L)}}$ mit hohem Schwellwert und großer Leitfähigkeit ($\sim 25\text{pS}$) und die N-, P/Q-,R-Typ Ströme $\mathbf{I}_{\text{Ca(N)}}$, $\mathbf{I}_{\text{Ca(P/Q)}}$, $\mathbf{I}_{\text{Ca(R)}}$. Letztere drei haben einen hohen Aktivierungsschwellwert (-20 bis -40mV), aktivieren sehr schnell ($\sim 1\text{ms}$), besitzen eine Leitfähigkeit von $\sim 15\text{pS}$ und unterscheiden sich durch ihre Inaktivierungszeiten ($\mathbf{I}_{\text{Ca(N)}}$, $\mathbf{I}_{\text{Ca(R)}}$ $\sim 50\text{ms}$, $\mathbf{I}_{\text{Ca(P/Q)}}$ mehrere 100 ms) und pharmakologisch.

Die Ca^{2+} Kanaldichte scheint insgesamt vom Soma bis $\sim 350\mu\text{m}$ im apikalen Dendrit konstant zu sein. Die Dichte ist kleiner als die der Na^+ Kanäle [49]. Die Ca^{2+} Kanaldichte setzt sich aber an unterschiedlichen Stellen, abhängig vom Abstand zum Soma, aus unterschiedlichen Typen zusammen. Im proximalen Dendrit überwiegen L- und N-Typ Kanäle und in distalen Regionen T- und R-Typ Kanäle. N- und P/Q-Typ Kanäle wurden in hoher Dichte auf abgegrenzten Dendritenabschnitten gefunden.

Ca^{2+} Kanäle werden von verschiedenen Neuromodulatoren inhibiert, z.B. durch die Aktivierung des metabotropen Glutamat Rezeptors, des GABA_B -, des Somatostatin-, des Serotonin- und des Adenosin-Rezeptors. Das sind von G-Proteinen vermittelte Modulatoren, die vor allem auf den L- und den N-Typ Kanal wirken. Nur der T-Typ Kanal scheint nicht modulierbar zu sein.

K⁺ Kanäle

Hippocampale Pyramidalzellen besitzen eine große Vielfalt an spannungssensitiven K^+ Kanälen [76] [36]. Sie erzeugen einen Auswärtsstrom und sind die Hauptregulatoren für die Erregbarkeit von Neuronen im Axon, Soma und Dendrit. Es gibt spannungsabhängige, Ca^{2+} - und spannungsabhängige als auch Ca^{2+} -abhängige K^+ Kanäle. Sie bestimmen durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften die Aktionspotentialform an verschiedenen Stellen (Abb. 2.3).

In Dendriten von CA1 Pyramidenzellen kann man die spannungsabhängigen K^+ Kanäle nach zwei Stromkomponenten unterteilen. Der transiente A-Typ Strom $\mathbf{I}_{\text{K(A)}}$ zeigt eine schnelle Aktivierung ($\sim 1\text{ms}$ ab einem Schwellwert von etwa -30mV im Soma und im proximalen Dendrit, ab etwa -40mV im distalen Dendrit, scheinbar spannungsunabhängig) und schnelle Inaktivierung ($\sim 5\text{ms}$ bei -30mV und $\sim 20\text{ms}$ bei +30mV, also spannungsabhängig). Er wird durch 4-Aminopyridin (4-AP) bei Konzentrationen $>100\mu\text{M}$ blockiert. Er trägt zur Repolarisierung der Aktionspotentiale und zur Erzeugung des Ruhepotentials bei. Durch seine schnelle Aktivierung verhindert er ein Feuern der Zelle durch eine kurze Depolarisationen. Der verzögerte Gleichrichter (Delayed Rectifier) Strom $\mathbf{I}_{\text{K(DR)}}$ entspricht dem K^+ Kanal des Hodgkin-Huxley Modells. Er aktiviert erst bei +40mV, benötigt dazu mehr als 2ms und zeigt eine sehr geringe oder keine spannungsabhängige Inaktivierung.

Zumindest im Soma von Pyramidalzellen kann man mindestens drei weitere spannungsabhängige K^+ Strö-

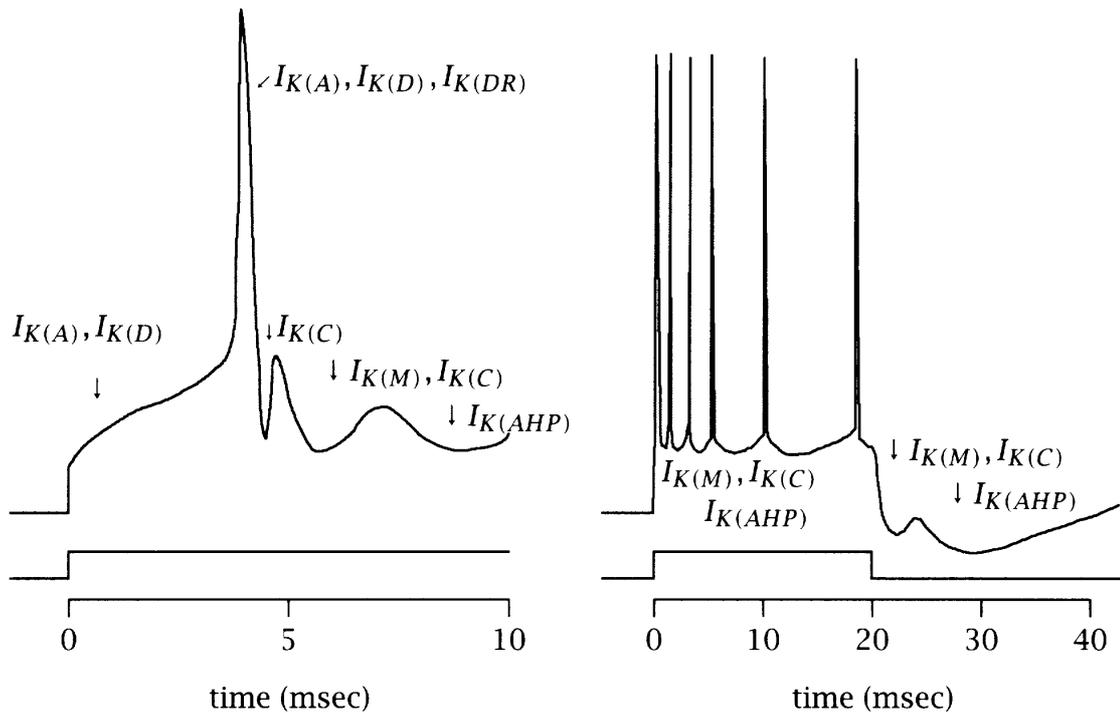


Abbildung 2.3: Stark schematisierte Einflüsse der unterschiedlichen K^+ Ströme auf die Aktionspotentialform und das Verhalten bei Aktionspotentialgruppen (Abkürzungen und Erklärungen: siehe Text). Unten sind jeweils die angelegten Stromstufen angegeben. [76]

me nachweisen. Der Strom $I_{K(D)}$ (delay) aktiviert sehr schnell und inaktiviert langsam (mehrere Sekunden) aber komplett wie der A-Typ Strom. Die Aktivierungs- und Inaktivierungskurven sind $\sim 20\text{mV}$ negativer und er reagiert sensitiver auf 4-AP ($< 100\mu\text{M}$) als $I_{K(A)}$. Er trägt nicht zur Erzeugung des Ruhepotentials bei, aber zur Repolarisierung des Aktionspotentials. Der muskarinsensitive Strom $I_{K(M)}$ ist ein nicht-inaktivierender spannungsabhängiger K^+ Kanal, der durch die Aktivierung des muskarinischen Rezeptors blockiert wird. Er aktiviert langsam ($\sim 50\text{ms}$) bei Depolarisation und beeinflusst deshalb hauptsächlich die Spikefrequenz und die Hyperpolarisation nach Aktionspotentialen. Es gibt auch noch einen spannungsabhängigen Einwärtsgleichrichter- (Inward Rectifier) Strom $I_{K(IR)}$, der bei einer Hyperpolarisation aktiviert wird und K^+ Ionen selektiv besser ein- als ausströmen läßt.

Zu Ca^{2+} abhängigen K^+ Kanälen in Dendriten gibt es bis jetzt nur wenige Messungen. Am Soma wurden mindestens drei unterschiedliche Ströme charakterisiert. Der erste Strom $I_{BK(C)}$ (Big conductance) hat eine hohe Leitfähigkeit von $100\text{-}400\text{pS}$, ist stark spannungssensitiv und Ca^{2+} unsensitiv. Erst bei Ca^{2+} Konzentrationen von etwa $0,6$ bis $10\mu\text{M}$ öffnet der Kanal. Der zweite $I_{SK(C)}$ (Small conductance) besitzt eine Leitfähigkeit von 5 bis 20pS , ist relativ spannungsunsensitiv aber stärker Ca^{2+} sensitiv ($100\text{-}600\text{nM}$). Der dritte I_{AHP} (afterhyperpolarization) hat eine noch kleinere Einzelkanalleitfähigkeit (3 bis 7pS), wird aber durch noch geringere Ca^{2+} Konzentrationen aktiviert.

Während die Na^+ und Ca^{2+} Kanäle eine relativ konstante Kanaldichte und entsprechende Stromdichte entlang des Dendriten aufweisen, ist dies beim K^+ Strom nicht so. Der $I_{K(A)}$ ist im apikalen Dendrit

(etwa $350\mu\text{m}$ vom Soma) fünfmal höher als am Soma. Aus Aktionspotentialmessungen im Dendriten kann indirekt geschlossen werden, daß der Strom I_{AHP} im distalen Dendriten sehr gering ist, weil die Hyperpolarisation nach dem Aktionspotential fehlt (Abb. 2.5). Es konnte gezeigt werden, daß BK(C) und SK(C) mit N- und L-Typ Ca^{2+} Kanälen co-lokalisiert sind und deshalb nur in sehr geringen Dichten in CA1 Pyramidenzell-Dendriten zu finden sind.

K^+ Kanal Untereinheiten besitzen viele verschiedene Phosphorylierungsstellen. Diese Phosphorylierung wird durch Kinasen bewerkstelligt. Bis jetzt weiß man, daß die Protein-Kinase A und C (PKA, PKC), die CaM Kinase und die MAP Kinase diese Kanäle modulieren können.

Molekularbiologische Untersuchungen ergeben, daß es vier verschiedene Genfamilien für spannungsabhängige Kaliumkanäle gibt (Kv1, Kv2, Kv3 und Kv4). Die Zuordnung der Sequenzen zu den Strömen steht erst am Anfang und wird durch verschiedene RNA-Splicing Möglichkeiten und Genduplikation erschwert. Von hippocampalen Pyramidalzellen weiß man, daß Kv4 Untereinheiten den A-Typ Kanal bilden [29] und der Kv2.1 Kanal einen Hauptteil zum Delayed Rectifier K^+ Strom beiträgt [59].

Einwärtsgleichrichtende Kanäle

Einwärtsgleichrichtende Kanäle bzw. ihr Strom I_h tragen zur Einstellung des Ruhepotentials und zur Membranleitfähigkeit im Ruhezustand bei. Im Soma und apikalen Dendriten von CA1 Pyramidenzellen werden sie durch eine Hyperpolarisation langsam aktiviert ($\sim 50\text{ms}$) und noch langsamer deaktiviert. 25% der Kanäle im Soma sind am Ruhepotential aktiv; im Dendriten ist das Aktivierungspotential mehr Richtung Hyperpolarisation verschoben. Es fließen sowohl Na^+ als auch K^+ Ionen durch diesen Kanal. Die Kanaldichte nimmt im distalen Dendriten ($350\mu\text{m}$ vom Soma) auf das siebenfache zu. cAMP und cGMP modulieren I_h , d.h. sie verschieben die Aktivierungskurve ins Positive und aktivieren dadurch zusätzliche Kanäle am Ruhepotential.

2.3 Backpropagation von Aktionspotentialen

2.3.1 Hippocampale CA1 Pyramidalzellen

Ein Aktionspotential, das im Axon nahe des Somas ausgelöst wird, pflanzt sich ungedämpft im Axon fort, läuft aber auch ins Soma und gedämpft in den Dendritenbaum zurück (Abb. 2.5) [79][75]. Die Dämpfung im Dendriten ist das Ergebnis der auf das fünffache ansteigenden A-Typ K^+ Kanaldichte [29], während die Na^+ Kanalkonzentration konstant bleibt (Abb. 2.4). Durch die schnelle Aktivierung und die steigende Kanaldichte der A-Typ Kanäle (1ms) wird die Amplitude des zurücklaufenden Aktionspotentials verringert. Außerdem wird die Wahrscheinlichkeit für die Generierung eines Aktionspotentials im Dendriten durch synaptischen Input reduziert. A-Typ K^+ Kanäle werden von PKA und PKC [30] moduliert, entweder direkt oder über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase MAPK [35], die von aktiver PKA und PKC aktiviert werden kann. Physiologisch erwartet man einen Anstieg von PKA und PKC durch die Aktivierung von β -adrenalinischen Rezeptoren und muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren. Die Aktivierung beider Rezeptoren und damit von PKA bzw. PKC führt zu einem Anstieg der dendritischen Aktionspo-

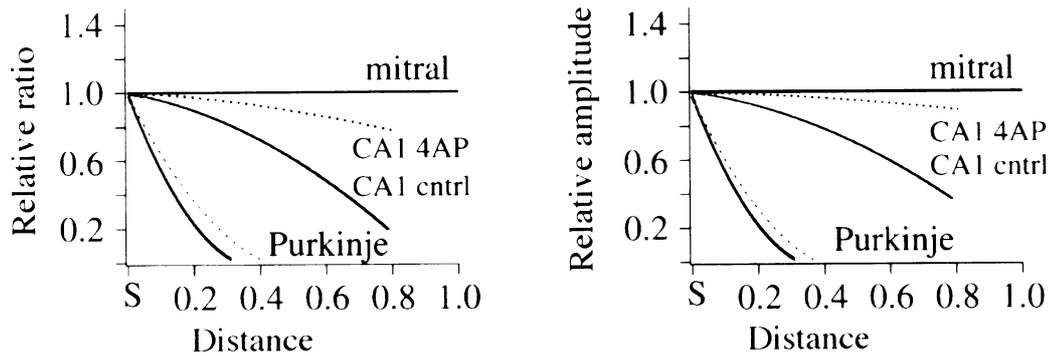


Abbildung 2.4: Verhältnis der schnellen Na^+ zu den schnellen K^+ Kanaldichten in Mitralzellen, Pyramidalzellen der CA1 Region im Hippocampus und Purkinje Zellen des Kleinhirns (links). Vergleich der sich daraus ergebenden Aktionspotentialamplituden (rechts). Die gepunkteten Linien geben die jeweiligen Verläufe nach der Vergiftung der A-Typ K^+ Kanäle mit 4-AP an. Der Abstand ist zur besseren Vergleichbarkeit auf die Gesamtlänge des jeweiligen Zelltyps normiert. [77]

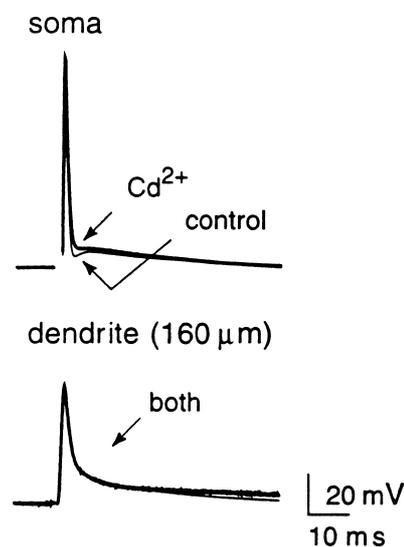


Abbildung 2.5: Aktionspotential am Soma (oben) und im Dendriten (unten). Das Aktionspotential am Soma ist deutlich höher und schmäler. Beide Messungen wurden jeweils mit und ohne $100\mu\text{M}$ Cd^{2+} Ionen durchgeführt, welche die Ca^{2+} abhängigen K^+ Kanäle blockieren. Nur am Soma wird durch die Blockierung die Aktionspotentialrepolarisierung verlangsamt und die schnelle Hyperpolarisierung nach dem Spike unterbunden. [63]

tentialamplitude [31]. Pharmakologisch ergibt sich der gleiche Effekt durch Vergiftung der A-Typ Kanäle mit 4-Aminopyridin [77]. Die Amplitude des zurücklaufenden Aktionspotentials kann aber auch durch eine geringe Depolarisierung des Dendriten z.B. durch ein Exzitatorisches Postsynaptisches Potential (EPSP) vergrößert werden: A-Typ K^+ Kanäle inaktivieren bereits bei geringer Depolarisierung vom Ruhepotential sehr schnell spannungsabhängig und erholen sich von der Inaktivierung zu 80% in 20-50ms. So wird die A-Typ Kanalkonzentration kurzzeitig gesenkt und größere Amplituden entstehen. In dieser Zeit kann es dann zu einer Paarung von zurücklaufendem Aktionspotential und EPSP kommen, was zu Long Term Potentiation (LTP) führt [36].

Bei der Backpropagation ändert sich aber nicht nur die Amplitude sondern auch die Dauer bzw. Breite und die anschließende Hyperpolarisation der Aktionspotentiale im Dendriten gegenüber dem Soma (Abb. 2.5) [63]. Die schnelle Hyperpolarisation nach dem Spike wird in den ersten $150\mu\text{m}$ der Dendriten fortschreitend verringert. Dies und pharmakologische Untersuchungen deuten darauf hin, daß die dafür verantwortlichen Ca^{2+} abhängigen K^+ Kanäle mit großer Leitfähigkeit (BK^+ Kanäle) ab etwa $150\mu\text{m}$ im Dendriten nicht mehr eingebaut werden. Eine solche Verlängerung des Aktionspotentials im distalen Dendriten hat weitreichende Folgen, z.B. auf NMDA-Rezeptoren, deren Blockierung aufgehoben wird, oder auf den Ca^{2+} Einstrom bei der Erzeugung von LTP.

2.3.2 Andere Nervenzelltypen

Andere Nervenzelltypen zeigen aufgrund variierender Kanaltypen, -verteilungen und -dichten andere Eigenschaften (Abb. 2.4) [77]. Die bisher besprochenen Pyramidalzellen nehmen eher eine Mittelposition hinsichtlich der auftretenden Variationsbreite ein. Als zwei Extreme sind die Mitralzellen und die Purkinje Zellen bekannt.

In Mitralzellen ist das Verhältnis der schnellen Na^+ zu den schnellen K^+ Kanälen im Soma und Dendriten relativ hoch und konstant. Ein Aktionspotential pflanzt sich somit im Dendriten wie im Axon fort und es bestehen wenig Möglichkeiten, die Amplitude zu modulieren.

Bei Purkinje Zellen des Kleinhirns nimmt die Na^+ Kanaldichte dagegen im Dendriten schnell ab und damit auch das Verhältnis von schnellen Na^+ und schnellen K^+ Kanälen. Na^+ Spikes können sich deshalb nicht aktiv fortpflanzen. In den fächerartigen Dendritenbäumen der Purkinje Zellen treten dagegen Ca^{2+} Spikes auf, die wie Na^+ Spikes von K^+ Kanälen reguliert werden.

2.4 Aktivitätsabhängige Backpropagation

Bei einem Train (Zug oder Gruppe von Aktionspotentialen) werden spätere Aktionspotentiale im Dendriten hippocampaler Pyramidalzellen frequenzabhängig stärker gedämpft (Abb. 2.6, 2.7) [75] [8]. Mit steigender Frequenz der Aktionspotentiale nimmt deren Amplitude im Dendriten schneller ab und relaxiert auf ein niedrigeres Potential (Abb. 2.8). Die Untersuchungen wurden an 13 bis 42 Tage alten Ratten durchgeführt. Die aktivitätsabhängige Backpropagation stellt eine Art Gedächtnis dar, weil sich die Eigenschaften des Dendriten in einen bestimmten Zeitbereich abhängig von der Vorgeschichte ändern. Dieses Verhalten wird auch in neocorticalen Pyramidenzellen gefunden [78], dagegen nicht in Dopamin-Neuronen in der Substantia Nigra (Abb. 2.9) [27].

Für diese Abnahme der Amplituden gibt es zwei Deutungsmöglichkeiten [57]:

- durch einen Nebenwiderstand, z.B. offen bleibende K^+ -Kanäle, fließt ein Strom nach außen oder
- durch langanhaltende Na^+ -Kanal Inaktivierung kann der Dendrit nicht mehr depolarisiert werden.

Messungen mit der 'cell-attached patch-clamp' Methode am Dendriten sprechen für eine langsame Erho-

lung aus dem inaktivierten Zustand der Na^+ Kanäle [12] [38] mit einer Zeitkonstante von 860ms [56]. Für dieses Verhalten der Na^+ Kanäle gibt es zwei mögliche Erklärungen:

- Es existieren verschiedene Typen von Na^+ Kanälen im Dendriten und im Soma. Hinweise darauf liefern immunocytochemische Untersuchungen, die unterschiedliche α -Subunit-Verteilungen des Na^+ Kanals in somatischen und dendritischen Hirnschnittbereichen zeigen [87].
- Die Na^+ Kanäle werden am Soma und in Dendriten unterschiedlich moduliert [35]. Es konnte gezeigt werden, daß durch Protein Kinase C [13] und den muscarinische Rezeptor Agonisten Carbachol (CCh) [84] die Aktivitätsabhängigkeit aufgehoben werden kann. Beim ersten wurde dies bis $280\mu\text{m}$ vom Soma getestet, beim zweiten sogar bis $350\mu\text{m}$, wobei allerdings festgestellt wurde, daß über $300\mu\text{m}$ der Dendrit auch mit CCh weiterhin aktivitätsabhängig ist.

Endgültige Aussagen sind noch nicht möglich, doch ist die regulatorische Erklärung derzeit experimentell besser abgesichert.

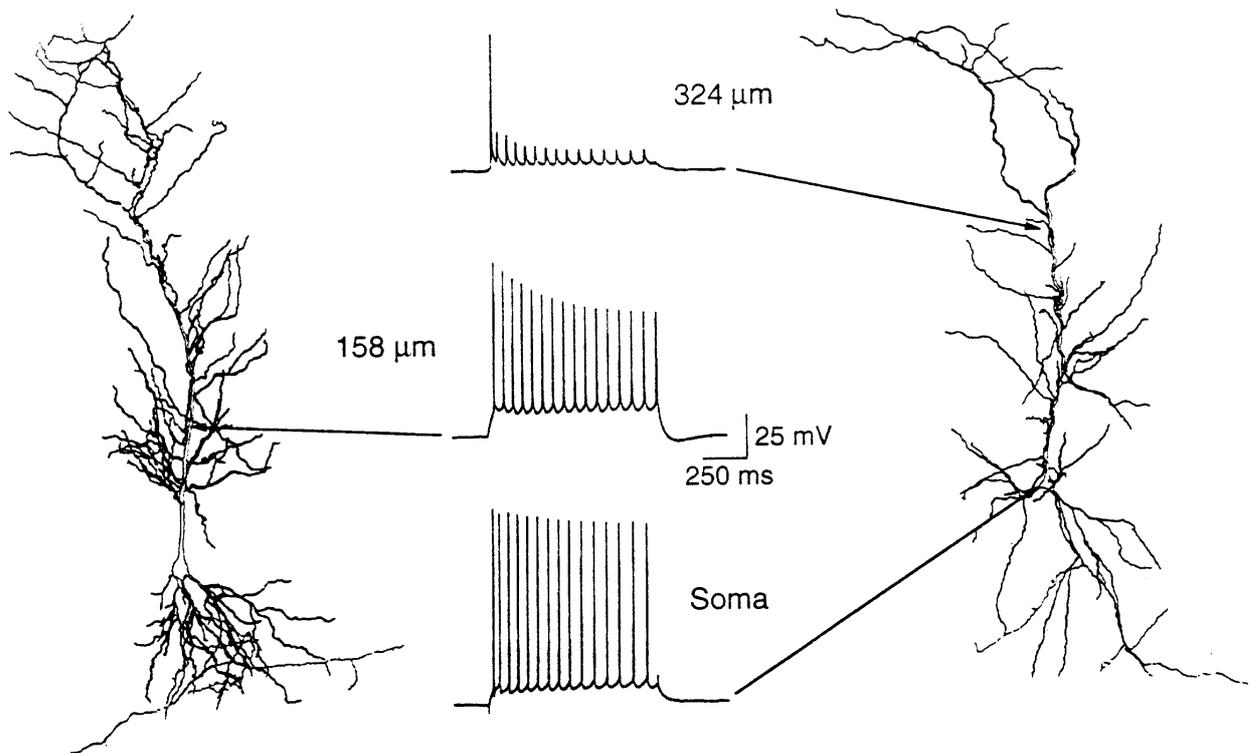


Abbildung 2.6: Aktionspotentiale laufen aktivitätsabhängig in den Dendritenbaum zurück. Die Messungen wurden mit Doppel-Patch-Clamp Technik am Soma und im Dendriten durchgeführt. Gereizt wurde am Soma. [75]

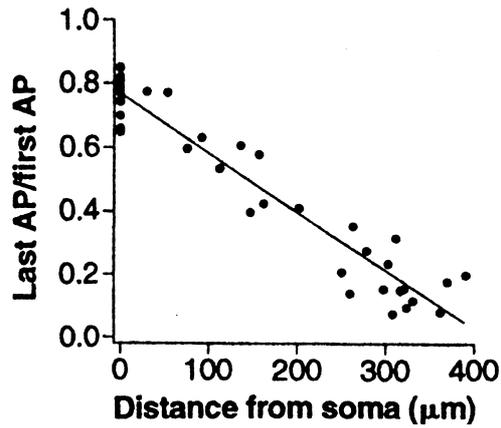


Abbildung 2.7: Verhältnis der Amplituden des letzten und ersten Aktionspotentials bei einer Aktionspotentialgruppe (train) in Abhängigkeit vom Abstand zum Soma in hippocampalen Pyramidalzellen. An einer Zelle können mit der Patch-Clamp Technik jeweils nur zwei oder drei Meßpunkte (einer am Soma und einer oder zwei im Dendriten) erhalten werden. Das Diagramm ist aus Messungen an 25 Zellen zusammengesetzt. [75]

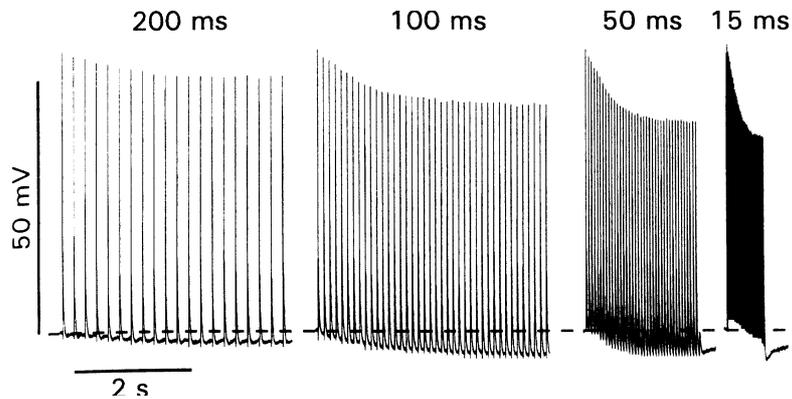


Abbildung 2.8: Frequenzabhängige Abnahme der Aktionspotentialamplituden $150\mu\text{m}$ vom Soma. Oben sind die Zeitdifferenzen zwischen zwei Aktionspotentialen angegeben. [8]

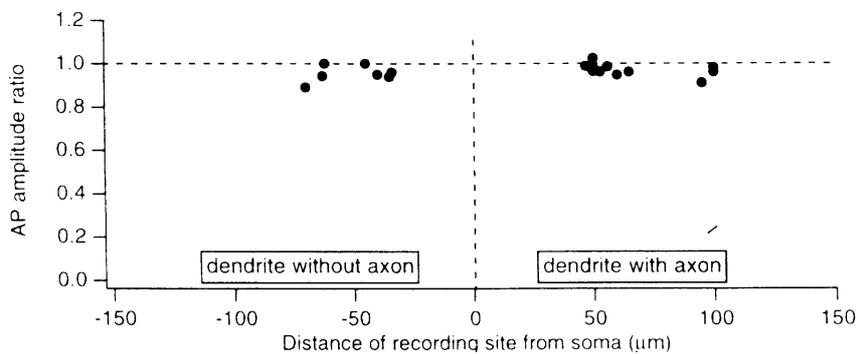


Abbildung 2.9: Verhältnis der Amplituden des letzten und ersten Aktionspotentials einer Aktionspotentialgruppe (train) in Abhängigkeit vom Abstand zum Soma in Dopamin-Neuronen der Substantia Nigra. (Zum Vergleich siehe Abb. 2.7). Bei diesen Neuronen zweigt das Axon aus einem Dendriten ab, weshalb hier zwischen Dendriten mit und ohne Axon unterschieden wird. [27]

2.5 Auswirkungen des aktiven Dendriten

Als kleiner Ausblick werden hier noch einige interessante Auswirkungen des aktiven Dendriten kurz aufgelistet:

- Die Ortsabhängigkeit vom synaptischen Input wird reduziert, weil sich das EPSP zumindest teilweise aktiv fortpflanzen kann [14].
- Es kommt zu einem Ca^{2+} Einstrom bei Backpropagation [75]. Ca^{2+} ist ein wichtiger Botenstoff und wirkt auf viele Zellabläufe regulatorisch.
- Ein aktiver Dendrit kann beliebig moduliert werden, sowohl durch die bisher bereits erwähnten Substanzen (PKA, PKC, ...), als auch durch viele weitere. Serotonin (5-HT) z.B. hyperpolarisiert den Dendriten und das Soma, erhöht die Leitfähigkeit der Membran bei gleichbleibender Aktionspotentialamplitude und dem entsprechend abgesenkten Spitzenpotential [68].
- Ab einer kritischen Spikefrequenz zwischen 60 und 200Hz werden im distalen apikalen Dendriten Ca^{2+} Aktionspotentiale ausgelöst und es kommt somit zu einem aktivitätsabhängigen Anstieg der Spikeamplituden [46][20].
- Auch Inhibitorisch Postsynaptische Potentiale (IPSP) modulieren die Backpropagation [83]. Sie verringern die Aktionspotentialamplituden wahrscheinlich durch eine Erhöhung der einsatzbereiten A-Typ K^+ Kanäle. Dies ergibt sich aus der Hyperpolarisation durch das IPSP, die das Gleichgewicht vom inaktivierten geschlossenen Zustand der Kanäle zum nur geschlossenen Zustand verschiebt.
- Überlagerungen von einem zurücklaufenden Aktionspotential und excitatorischem synaptischen Input führen zu Na^+ Bursts und Ca^{2+} Aktionspotentialen [47].
- Es können auch Aktionspotentiale im Dendriten durch starke synaptische Stimulation ausgelöst werden. Die meisten, aber nicht unbedingt alle, breiten sich bis zum Soma aus. Kommt das dendritische Aktionspotential nicht am Soma an, so führt es aber doch zu einer lokalen Inaktivierung des Dendritenabschnitts [21].

Kapitel 3

Vorstellung des Systems

In diesem Kapitel werden zuerst die in dieser Arbeit untersuchten Zellkulturen beschrieben und anschließend die K⁺ Kanäle, mit denen hier Neurone gentechnisch verändert werden. Es folgt eine Einführung in die Mechanismen spannungssensitiver Fluoreszenzfarbstoffe und eine Zusammenfassung bisheriger Messungen an Einzelneuronen mit ihnen.

3.1 Hippocampale Nervenzellen in Kultur

Alle im vorhergehenden Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden an akuten Gehirnschnitten gewonnen. Physiologisch gesehen kommt diese Methode dem Gehirn in vivo wohl recht nah, birgt aber natürlich auch ihre Gefahren. Z.B. werden Zellen beim Schneiden zerstört und beschädigt. Es dürfen also keine Zellen an der Oberfläche des Schnittes verwendet werden. Auch Unterversorgungen an Sauerstoff oder anderer Substanzen während der Präparation oder der Messung können die Ergebnisse verfälschen. Wie gut ist außerdem die Perfusion im Gewebe? Es ist nur bedingt möglich, diesen "Ausschnitt" eines so komplexen Gesamtsystems wirklich zu kontrollieren und bei der Untersuchung einzelner Zellen den Einfluß anderer auszuschließen oder auch nur konstant zu halten.

Aus dieser Problematik heraus wurden Zellkulturverfahren entwickelt. Man erhält mit nicht geringem Aufwand ein vereinfachtes System mit leichter zugänglichen und manipulierbaren Nervenzellen entweder als Slicekultur oder wie hier mit dissoziierten Zellkulturen. Bei der dissoziierten Zellkultur wird der Gehirnbereich, aus dem die Zellen stammen sollen, zu Beginn seiner Entwicklung entnommen, enzymatisch die Zellen dissoziiert und dann kultiviert. Der Zeitpunkt für die Entnahme wird so gewählt, daß die Differenzierung in Gliazellen und Neurone abgeschlossen ist. Die Nervenzellen im besonderen sind postmitotisch aber besitzen noch keine Fortsätze und keine Synapsen. Für den hier verwendeten Hippocampus der Ratte ist dies der 17. oder 18. Tag nach der Befruchtung der Eizelle, also noch während der Embryonalphase. Die Zellen behalten ihre Identität und exprimieren großteils die für den Zelltyp charakteristischen Rezeptoren und Kanäle [3]. Es ist aber mit Abweichungen vom in vivo System zu rechnen, da die modulierenden Einflüsse der Umgebung fehlen und die Morphogenese gestört ist.

Die Zellen benötigen für ihre Entwicklung in Kultur eine gewisse Reifezeit. Bei Nervenzellen wird diese Zeit benötigt um die neuronale Polarität auszubilden. Nach etwa einer Woche haben sich ein Axon und mehrere Dendriten entwickelt [15]. In den ersten zwei Wochen wächst das Soma und die Neuritendichte nimmt zu. Auch die Fähigkeit zur Generierung von Aktionspotentialen muß erst durch die Expressierung von spannungsabhängigen Ionenkanälen geschaffen werden. 'Schöne' Aktionspotentiale mit einer schnel-

IC with anti-	10–12 DIV		12–14 DIV		16–20 DIV	
	P	G	P	G	P	G
Kv1.1	x	x	x	x	x	x
Kv1.2	—	—	x	—	x	x
Kv1.3	—	—	x	x	x	x
Kv1.4	—	—	—	—	x	x
Kv1.5	—	—	x	x	x	x
Kv1.6	—	—	x	x	x	x

Abbildung 3.1: Nachweis der K^+ Kanäle Kv1.1 bis Kv1.6 in kultivierten Pyramidalzellen (P) und Granule Zellen (G) des Maus-Hippocampus in verschiedenen Entwicklungsstadien. [26]

len Depolarisation und anschließender Re- und Hyperpolarisation sind erst nach etwa 5 Tagen in Kultur (days in vitro, div) zu finden. Dies hängt mit dem Auftauchen des Delayed Rectifier Kanals Kv2.1 zusammen, der nach 5 Tagen Kulturdauer in den Neuronen nachgewiesen werden kann (mündliche Mitteilung S. Vassanelli). Spannungsabhängige Kaliumkanäle der Kv1-Genfamilie (Kv1.1 bis Kv1.6) erscheinen erstmals nach 10 div (Abb. 3.1). Dies entspricht dem Zeitpunkt des Auftauches der Kanäle in vivo. Auch die subzelluläre Kanalverteilung und die Funktionalität sind in beiden Systemen gleich. Interessanterweise ist die Expression der Kanäle von der Zellaktivität abhängig. So wird z.B. die Expression von Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.4 durch den Natriumkanalblocker Tetrodotoxin (TTX) inhibiert, die von Kv1.3, Kv1.5 und Kv1.6 dagegen nicht [26]. Nach 12-14 div steigt die Synapsendichte stark an [90]. Die Synapsen zeigen im Elektronenmikroskop die gleichen Strukturen in Kultur und Slice. Es gibt jedoch Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der Synapsen auf Spines und den dendritischen Schaft zwischen Kultur und Slice [4]. Der vorherrschende Zelltyp in hippocampalen Primärkulturen sind Pyramidalzellen. Der Anteil an Körnerzellen ist gering [3]. Sie sind kleiner als die Pyramidalzellen, eher kugelförmig, besitzen nur wenige, dünne Dendriten und ein langes, vielverzweigtes Axon [26].

Ein großer Vorteil der dissoziierten Kultur ist, daß mit sehr geringer Zelldichte kultiviert werden kann. Man hat es mit einzelnen Neuronen und Dendriten zu tun. Die Dendriten sind rein morphologisch einem Soma zuordenbar. Außerdem sind die Kulturen zweidimensional und nicht mehr dreidimensional wie im Gehirnschnitt. Diese Eigenschaften sind auch wichtig für die Anwendung spannungssensitiver Farbstoffe, die in dieser Arbeit zum Einsatz kommen.

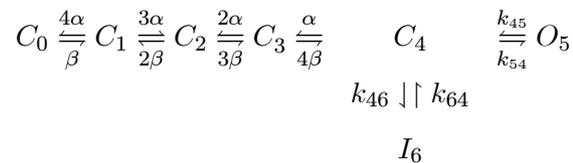
3.2 Gezielte Veränderungen der Nervenzelleigenschaften mittels Gentechnik

Wie in den Abschnitten 2.2 bis 2.5 beschrieben wurde, bestimmen spannungsabhängige Ionenkanäle entscheidend das Verhalten von Nervenzellen. Mit Hilfe der Gentechnik ist es möglich, in Zellen zusätzliche Kanäle bzw. bereits vorhandene (intrinsische) stärker zu exprimieren. Dazu benötigt man die DNA, die für den Kanal kodiert, und eine Primersequenz, die von der Zelle als Startsignal für die Expressierung des Proteins (in diesem Fall des Kanals) verstanden und der Kanal-DNA vorangesetzt wird. Diese beiden Tei-

le werden in eine geschlossene DNA-Kette, ein Plasmid, eingebaut und in die Zelle eingeschleuft. Die Zelle ist dann transformiert, d.h. sie hat neue Gene in Form isolierter DNA aufgenommen. Die Zelle exprimiert daraufhin das Protein und baut es ein. Um zu kontrollieren, ob das Protein wirklich produziert und an der richtigen Stelle eingebaut wird, ist hier an die DNA des Kanals noch die DNA des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) angehängt. Der Kanal ist dann mit GFP gelabelt und leuchtet bei einer Anregung mit blauem Licht grün. Im folgenden werden zwei K^+ Kanäle aus der Kv1 Genfamilie vorgestellt, mit denen in dieser Arbeit versucht wurde, die Dendriteneigenschaften zu verändern. Beide sind intrinsisch in Pyramidalzellen des Hippocampus vorhanden (Abb. 3.1).

3.2.1 Der spannungssensitive Kaliumkanal Kv1.3

Kv1.3 ist vom Typ ein Delayed Rectifier Kanal mit langsamer Inaktivierung (C-Typ Inaktivierung) und sehr langsamer Erholung aus der Inaktivierung. Er wurde aus dem Rattenhirn geklont [80][81]. Man findet ihn im somatodendritischen Bereich der CA3-Region des Hippocampus, er ist aber nicht die Hauptkomponente des Delayed Rectifier K^+ Stroms im Rattenhippocampus (dies ist Kv2.1, [59]). Kv1.3 wird auch in anderen somatodendritischen Gehirnbereichen [86], in T und B Lymphozyten [25][16][74] und Mikrogliazellen [10] gefunden. Kv1.3 ist besonders interessant, weil er einen deaktivierten Zustand besitzt, den er erst mit einer langen Zeitkonstante wieder verläßt. Versuche zur Aufklärung des Mechanismus und der Modulation der Inaktivierung wurden mehrfach unternommen [51][50][52]. Das mit den Messungen am besten übereinstimmende, wenn auch nicht alles erklärende Modell ist, daß der Kanal vier geschlossene, deaktivierte Zustände C_0 bis C_3 , einen geschlossenen C_4 , einen offenen O_5 und einen inaktivierten I_6 besitzt. Die Inaktivierung erfolgt aus dem geschlossenen Zustand C_4 , der dem offenen Zustand O_5 sehr ähnlichen ist:



mit den spannungsunabhängigen Ratenkonstanten $k_{45}=1/(1,2\text{ms})$, $k_{54}=1/(6,7\text{ms})$, $k_{46}=1/(40\text{ms})$ und $k_{64}=1/(10000\text{ms})$. Auch mit diesem Kanal kann es wie bei Na^+ Kanälen zu einem Gedächtniseffekt kommen, wie mit der Dynamic-Clamp Methode gezeigt wurde (Abb.3.3)[85]. Dabei wird der Strom durch den Kanal dem Modell entsprechend simuliert und einer vorgegebenen Kanaldichte entsprechend in die Zelle geschickt. Das Zellpotential ergibt sich dann aus den zelleigenen Strömen und dem zusätzlich injizierten. In diesem Fall wird durch den zusätzlichen Kanal Kv1.3 zuerst die Auslösung von Aktionspotentialen verzögert. Die Spikes führen dann aber zu einer Inaktivierung des Kanals, weshalb die Spikefrequenz steigt. Wegen der langsamen Erholung aus der Inaktivierung können auch nach einer Stimulationspause Aktionspotentiale durch einen Puls ausgelöst werden, mit dem dies zuvor nicht möglich war.

In dieser Arbeit soll der Kanal aber wirklich in die Zelle eingebaut werden. Um die transformierten Zellen zu erkennen, wird Kv1.3 mit GFP markiert. An HEK293-Zellen wurde anhand der Fluoreszenz gezeigt,

daß sich der Kanal auch mit GFP in die Zellmembran einlagert. Elektrophysiologisch ändern sich die Kanaleigenschaften durch die Fusion des Kanals mit GFP nicht (Abb. 3.2)[43]. Es wird eine Aktivierungszeitkonstante von $0,82 \pm 0,10$ ms und eine Inaktivierungszeitkonstante von 480 ± 90 ms bei einer Depolarisation auf +40mV gefunden. Um die Veränderungen durch den Kanal zu untersuchen, muß er gezielt ausgeschaltet werden können. Dazu dient bei Kv1.3 ein spezifischer Blocker. Es ist das kleine Skorpiongiftpeptid Margatoxin (MgTX). Es wirkt bereits bei Konzentrationen im nM-Bereich.

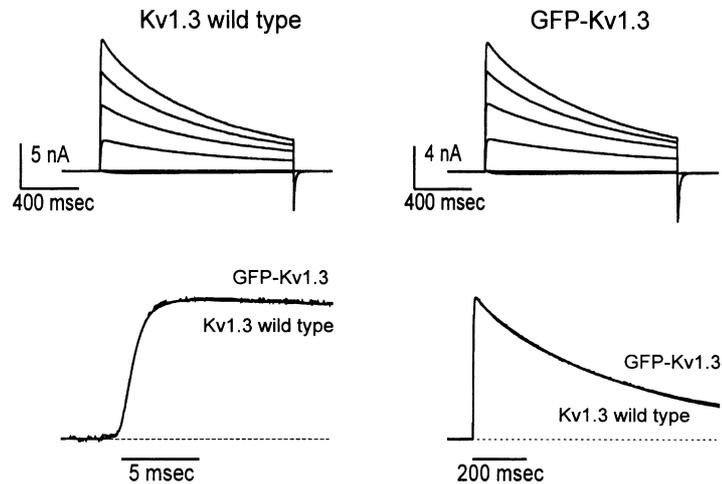


Abbildung 3.2: Elektrophysiologische Eigenschaften des Wild-Typ und des GFP-markierten Kv1.3 Kanals in HEK293 Zellen bei 1000ms Pulsen (Voltage-Clamp von -60mV bis 60mV in 20mV Schritten) (oben links, oben rechts). Superpositionierte und normalisierte Kurven zeigen keine Abweichungen zwischen Wild-Typ und GFP-markiertem Kanal (unten links, unten rechts). [43]

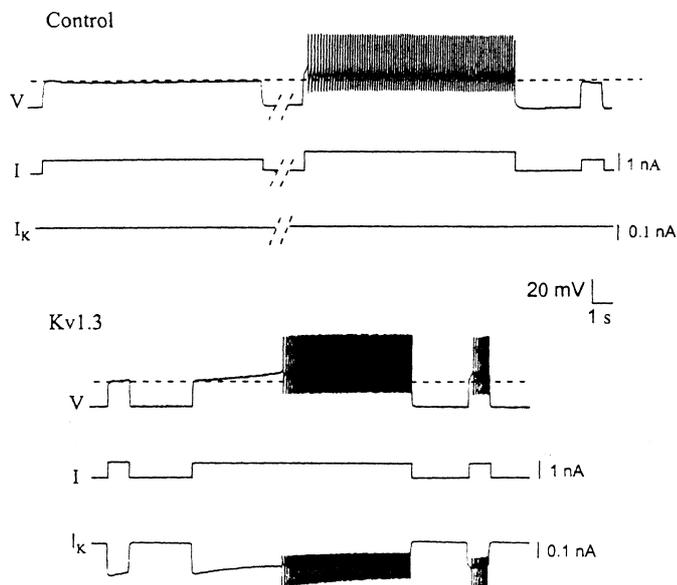


Abbildung 3.3: Die kultivierten Stomatogastrischen Ganglion Neurone werden mit drei Pulsen stimuliert (Strom I). Bei der unteren Messung wird noch zusätzlich der simulierte Kv1.3 Strom injiziert (I_k). Zuerst verhindert er das feuern der Zellen, inaktiviert dann langsam, so daß es zu Spikes kommt. Auch die Frequenz steigt. Dieser Zustand wird längere Zeit gespeichert: Beim 1. Puls werden keine Aktionspotentiale ausgelöst, beim 3. wegen der langanhaltenden Inaktivierung von Kv1.3 dagegen schon. [85]

3.2.2 Der spannungssensitive Kaliumkanal Kv1.4

Kv1.4 ist ein A-Typ K^+ Kanal mit schneller Inaktivierung (N-Typ, 'ball and chain'-Mechanismus). Er wird vor allem in Axonen von ZNS Neuronen gefunden [70], speziell auch im Hippocampus (Dentate gyrus, CA3). Die in HEK293 Zellen gemessenen Zeitkonstanten von Kv1.4 der Aktivierung und der Inaktivierung sind $0,76 \pm 0,07 \text{ms}$ und $49 \pm 11 \text{ms}$. Die Aktivierung ist also etwa gleich schnell wie von Kv1.3, die Inaktivierung dagegen um einen Faktor 10 schneller. Bei einer Markierung von Kv1.4 mit GFP lagert er sich zwar immer noch in die Membran ein, ändert aber seine Eigenschaften: Er schließt viel langsamer als ohne GFP-Anhang (Abb. 3.4) [43]. Es wird deshalb mit dem Fusionsprotein nur untersucht, ob und wo der Kanal in die Membran der Neurone eingebaut wird. Die Messungen werden dagegen an Zellen durchgeführt, bei denen GFP und Kv1.4 sich auf unterschiedlichen Plasmiden befinden. Dieses Verfahren wird Co-Expressierung genannt. Leider gibt es bis jetzt noch keinen spezifischen Blocker für Kv1.4, weshalb der allgemeine A-Typ Kanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP) verwendet werden muß.

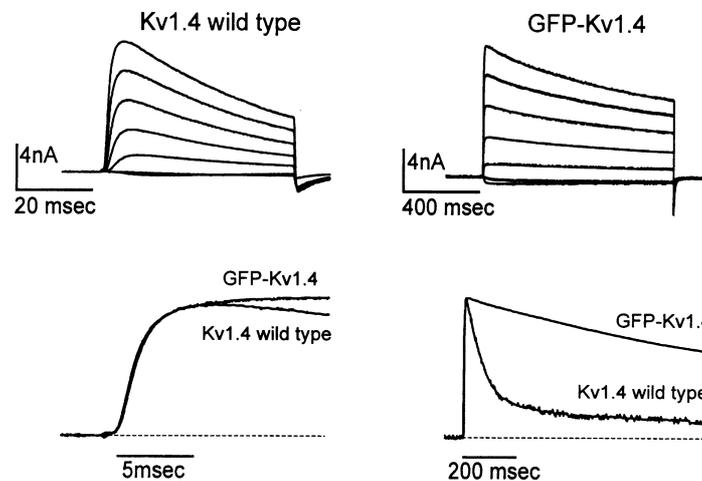


Abbildung 3.4: Elektrophysiologische Eigenschaften des Wild-Typ und des GFP-markierten Kv1.4 Kanals in HEK293 Zellen bei 1000ms Pulsen (Voltage-Clamp von -60mV bis 60mV in 20mV Schritten) (oben links, oben rechts). Superpositionierte und normalisierte Kurven zeigen große Abweichungen zwischen Wild-Typ und GFP-markiertem Kanal (unten links, unten rechts). [43]

3.3 Spannungssensitive Farbstoffe

Spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoffe (Abb.3.5) gehören zu den Hemicyaninen und bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Endbereich. Der hydrophile Teil besteht aus einer Sulfatgruppe (negativ geladen) und Pyridin (positiv geladen). Das hydrophobe Ende bilden Anilin und zwei Kohlenwasserstoffketten. Die Farbstoffe sind somit amphiphil und lagern sich in Lipidmembranen ein.

Der Chromophor als zusammenhängendes Elektronensystem wird von Pyridin und Anilin gebildet, die durch alternierende Einfach- und Doppelbindungen von Kohlenwasserstoffen miteinander verbunden sind. Die beiden Stickstoffatome sind also asymmetrisch in den Chromophor eingebunden. Bei der Anregung des Farbstoffs verschiebt sich deshalb der Ladungsschwerpunkt vom Pyridin zum Anilin hin um eine Länge $\vec{\delta}$.

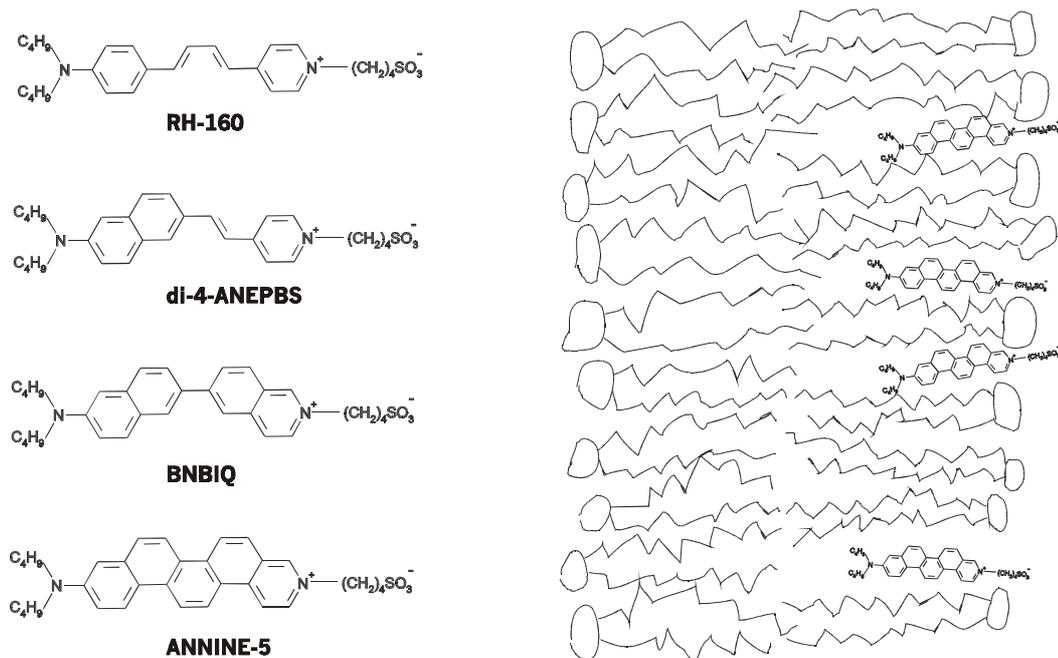


Abbildung 3.5: Spannungssensitive Fluoreszenzfarbstoffe (links, aus Analogiegründen zu ANNINE-5 werden die Strukturformeln der anderen Farbstoffe verdrillt, d.h. linearisiert dargestellt). Sie sind amphiphil und lagern sich in Lipidmembranen ein (rechts).

Diese Ladungsverschiebung führt zu folgenden Effekten:

Stark-Effekt

Befindet sich der Chromophor in einem äußeren Feld, z.B. in einer Zellmembran über der eine Spannung abfällt, so bewegt sich bei der Anregung des Farbstoffs die Ladung e_0 im äußeren elektrischen Feld \vec{E} . Durch diese Wechselwirkung verschiebt sich das Farbstoffspektrum um

$$\Delta\lambda_{Stark} = \frac{e_0 \vec{\delta} \vec{E}}{hc} \lambda^2.$$

$\Delta\lambda_{Stark}$ ist die Wellenlängenverschiebung, λ die Ausgangswellenlänge, h das Planck'sche Wirkungsquantum, c die Lichtgeschwindigkeit und $\vec{\delta}$ die Ladungsverschiebung entlang der Molekülachse. Die Orientierung des Farbstoffs im Bezug auf das elektrische Feld ist somit wichtig für die Ladungsverschiebung. Bei di-8-ANEPPS wird ein Winkel von 38° zwischen Übergangsdipolmoment und der Membrannormalen gefunden [44]. Messungen der Spektren und daran angepaßte Log-Normal Funktionen [72] ergeben, daß bei dem Farbstoff ANNINE-6 die Wellenlängenverschiebung $\Delta\lambda_{Stark}$ bei 100mV Spannungsänderung über einer 5nm dicken Zellmembran 4 bis 5nm beträgt, was bei optimaler Orientierung einer Ladungsverschiebung $\vec{\delta}$ von etwa 1nm entspricht [42]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffen sind diese Werte um einen Faktor 2 bis 3 kleiner (Messungen und Anpassungen [42], quantenchemische Berechnungen [61]) und werden durch solvatochrome Effekte überlagert.

Solvatochromie

Die Ladungsverschiebung im Farbstoff wechselwirkt auch mit dem elektrischen Feld der Solvathülle. Bei

der Anregung des Farbstoffs muß sich die Solvathülle neu ordnen, um den energetisch günstigsten Zustand anzunehmen und bei der Emission wieder zurück. Diese Relaxation geschieht auf einer Zeitskala von 10^{-12} s [66]. Dieser Effekt führt zu einer energetischen Verschiebung der Spektren gegenüber den Übergängen des Farbstoffmoleküls im Vakuum und ist stark lösungsmittelabhängig. Er kann mit dem Modell eines Monopols und eines Dipols im Zentrum einer Solvathüllenkugel beschrieben werden [17]. Ändert sich die Solvathülle, wird sich auch das Spektrum ändern. Der Farbstoff sitzt in der Membran an der Grenzfläche von hydrophilen Lipidkopfgruppen und Wasser einerseits und den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten andererseits. Leichte Verschiebungen des Farbstoffs in dieser inhomogenen Umgebung durch Änderungen des elektrischen Feldes über der Membran tragen somit ebenfalls zu spektralen Veränderungen bei.

Charakterisierung der spannungssensitiven Farbstoffe

Die Farbstoffe müssen vor ihrer Anwendung (hier Messung von Aktionspotentialen) charakterisiert werden. Dazu werden zweidimensionale Spektren gemessen. Zweidimensionale Fluoreszenzspektren geben für jede Anregungswellenlänge (1. Dimension) und jede Emissionswellenlänge (2. Dimension) die Fluoreszenzintensität an. Um spannungssensitive Farbstoffe zu charakterisieren, wurden große Blutegelneurone angefärbt und zweidimensionale Spektren bei zwei verschiedenen Zellpotentialen aufgenommen [42]. Die Differenz dieser beiden Spektren wird durch die Spannungsänderung hervorgerufen und als Fluoreszenzänderungsspektrum (ΔF) bezeichnet. Wird die Differenz auf die jeweilige Intensität normiert, ergibt sich das Empfindlichkeitsspektrum ($\Delta F/F$). Im folgenden werden die Spektren von BNBIQ und ANNINE-5 beschrieben (Abb.4.4):

Zweidimensionales Fluoreszenzspektrum

Die Maximalintensität des zweidimensionalen Spektrums ist auf 1 normiert. Es liegt für BNBIQ bei einer Anregungswellenlänge von 445nm und einer Fluoreszenzwellenlänge von 575nm. Für ANNINE-5 sind die entsprechenden Werte 430nm und 540nm. BNBIQ ist im Bereich von 400nm bis 490nm gut anregbar, ANNINE-5 von 380nm bis 470nm, wobei eine zweite Anregungsbande unterhalb von 370nm zu erkennen ist.

Zweidimensionales Fluoreszenzänderungsspektrum

Die Differenz der beiden bei unterschiedlichen Potentialen (Potentialdifferenz 100mV) aufgenommenen Spektren wird auf das Maximum des hyperpolarisierten Spektrums normiert. Die Fluoreszenzänderung gibt damit die relative Intensitätsänderung bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge zum Intensitätsmaximum bei 100mV Potentialdifferenz an. Man kann die Grenze zwischen positiver und negativer Fluoreszenzänderung sowie den Bereich maximaler Fluoreszenzänderung, also maximalem Signal, ablesen. Bei BNBIQ ist dies im positiven Bereich +6% der Maximalamplitude pro 100mV und im negativen -6%; bei ANNINE-5 entsprechend +8% und -8%. Allerdings ist die Messung von ANNINE-5 im negativen Bereich aus meßtechnischen Gründen abgeschnitten, so daß vielleicht auch -9 oder -10% erreicht werden.

Zweidimensionales Empfindlichkeitsspektrum

Das nichtnormierte Fluoreszenzänderungsspektrum wird auf das bei Hyperpolarisation aufgenommene Spek-

trum normiert. Das Empfindlichkeitsspektrum gibt die relative Intensitätsänderung bei vorgegebener Anregungs- und Emissionswellenlänge bei 100mV Potentialdifferenz an. Man kann ablesen, wo der Farbstoff seine größte Effizienz besitzt, d.h. das größte Signal bei konstanter Fluoreszenzhelligkeit liefert. Um die Phototoxizität möglichst gering zu halten, sollte man nur möglichst effiziente Spektralbereiche anregen. Deshalb ist auch das Empfindlichkeitsspektrum zur Auswahl der Filter wichtig. Die maximalen Empfindlichkeiten sind bei BNBIQ +14%/100mV und -21%/100mV und bei ANNINE-5 +21%/100mV und -14%/100mV, wobei letzteres sicher deutlich höher ist, dieser Bereich aber bei der Spektrenmessung abgeschnitten wurde.

Abhängigkeit der Empfindlichkeit vom Zelltyp

Die Empfindlichkeit der Farbstoffe ist von der Probe abhängig [48]. Dies liegt wohl vor allem an Farbstoffmolekülen, die spannungsunsensitiv gebunden sind, somit eine Hintergrundfluoreszenz erzeugen und die Empfindlichkeit verringern. Auch eine andere Lipidumgebung kann einen Einfluß haben. Deshalb wurden die Empfindlichkeitsmessungen an Zellen der Nierenzelllinie HEK293 wiederholt. Die HEK293 Zellen sind den Hippocampusneuronen näher verwandt als Blutegelneurone, die Empfindlichkeitsmessungen sind an ihnen aber deutlich schwieriger. Die Spektren sind in Anregungs- und Fluoreszenzrichtung um weniger als 10nm gegen die Blutegelmessungen verschoben, die Empfindlichkeit jedoch um einen Faktor 2 bis 3 kleiner. Deshalb ist auch bei Hippocampusneuronen mit einer geringeren Empfindlichkeit zu rechnen.

Phototoxizität

Ein Hauptproblem bei optischen Messungen mit spannungssensitiven Farbstoffen ist die Phototoxizität. Die Auswirkungen von di-4-ANEPPS wurden z.B. auf Cardiomyocyten untersucht [69]. Das Färben der Zellen änderte nichts an der Aktionspotentialform. Bei Beleuchtung jedoch verlängerte sich die Aktionspotentialdauer, Aktionspotentialschultern traten auf, das Ruhepotential verringerte sich und schließlich konnten keine Aktionspotentiale mehr ausgelöst werden.

Die Ursache der Phototoxizität ist wahrscheinlich Singulett-Sauerstoff und andere freie Radikale. Die gängige Arbeitshypothese besagt, daß angeregte Tripletzustände der Farbstoffmoleküle mit Triplett-Sauerstoff (Grundzustand des O_2) wechselwirken, dadurch in den Grundzustand kommen und den Sauerstoff in den angeregten und hochreaktiven Singulettzustand bringen. Verschiedene Methoden wurden deshalb entwickelt, um den Sauerstoffgehalt des Mediums zu reduzieren oder mit Antioxidantien, wie z.B. Astaxanthin [22], die Zellen zu schützen ([88], Chapter 4, A. Bullen et P. Saggau). Alle Methoden mildern die phototoxischen Reaktionen nur ab und sind noch keine endgültigen Lösungen.

3.4 Bisherige Messungen von Aktionspotentialen in Dendriten kultivierter Neurone mit spannungssensitiven Farbstoffen

Erste Messungen mit Farbstoffen an Dendriten wurden in [23] beschrieben. Sie wurden an den sehr großen Maus-Neuroblastoma-Zellen (Soma $\sim 100\mu\text{m}$ Durchmesser) durchgeführt. Große Zellen ($>50\mu\text{m}$ Durchmesser) mit dicken Neuriten ($>5\mu\text{m}$ Durchmesser) haben den Vorteil, daß sie bei guter Anfärbung hohe Fluoreszenzintensitäten, somit hohe Signale und hohe Zeitaufösungen, ermöglichen. Deshalb eignen sich viele Invertebratenzellen besonders gut. An Dendriten von kultivierten Neuronen des Blutegels *Hirudo medicinalis* wurden Fortpflanzungs- [67][18] und Kabeleigenschaften [19] bestimmt. Diese Methode wurde bei Zellen des Blutegels und der Wasserschnecke *Lymnaea stagnalis* mit linearem Wachstum kombiniert, um mit linearen Diodenarrays messen zu können und das System geometrisch möglichst einfach zu halten [58][64][65]. Auch bei Neuronen der Meeresschnecke (Hinterkiemer) *Aplysia* [62] und der Landschnecke *Helix aspersa* [1][89] wurden optische Signale auf dem Dendriten gemessen.

Messungen an Vertebratenneuronen sind wegen ihrer geringeren Größe und ihrer Empfindlichkeit schwieriger. Es wurden kleine Netzwerke aus kultivierten Superior Cervical Ganglionneuronen mit einem 256 Pixel Photodiodenarray untersucht [11]. Hierbei wurde der Styryl Farbstoff RH423 verwendet. Er liefert eine typische Fluoreszenzänderung von 1%/100mV. Die räumliche Auflösung betrug $45\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$, weshalb immer Signale von mehreren Dendriten gleichzeitig gemessen wurden. Ähnliche Messungen wurden auch mit dem Absorptionsfarbstoff RH482 an kultivierten Hippocampuszellen der Ratte mit einem 128 Pixel Photodiodenarray durchgeführt [40]. Die räumliche Auflösung war hier mit $15\mu\text{m}$ deutlich besser, dafür mußten 16 Versuche gemittelt werden. Mit der selben Apparatur wurden auch Dendriten nach ihren Signal-Fortpflanzungseigenschaften in zwei Gruppen klassifiziert [39]: Solche mit langsamen ($0,12 \pm 0,034$ m/s) und schnellen (>1 m/s) Fortpflanzungsgeschwindigkeiten. Auch hier wurden 16 Versuche gemittelt. An hippocampalen Primärkulturen wurden mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff RH421 auch die Kabeleigenschaften der Dendriten bestimmt [55]. Das 10×10 Pixel Photodiodenarray lieferte eine räumliche Auflösung von $9\mu\text{m}$ und eine zeitliche von $0,4\text{ms}$ ohne Mittelung. Durch die geringe Kultur-dichte wurde sichergestellt, daß nicht Signale von mehreren Dendriten gleichzeitig gemessen wurden. Um allerdings mehrere $100\mu\text{m}$ lange Neuriten messen zu können, mußten mehrere Messungen mit verschobenem Abbildungsbereich zusammengesetzt werden. Die passiven Kabelparameter wurden zu $R_i=300\Omega\text{cm}$ und $R_m=40\text{k}\Omega\text{cm}^2$ bei einer maximalen Na^+ Leitfähigkeit von etwa $4,4\text{mS}/\text{cm}^2$ bestimmt. Die elektrische Längskonstante und die dynamische bei 1kHz ergaben sich zu $580\mu\text{m}$ bzw. $90\mu\text{m}$. An dendritischen Verzweigungen wurden keine Unregelmäßigkeiten festgestellt. Eine Weiterentwicklung dieser Methode war ein lineares 100 Pixel Diodenarray kombiniert mit linearem Wachstum hippocampaler Neurone [60]. Die Orts- und Zeitauflösung betragen $5\mu\text{m}$ und $0,4\text{ms}$. Die Zellen wurden wie bei [55] mit der Na-Cholat Methode angefärbt, allerdings unter Verwendung des Farbstoffes BNBIQ. Hier gelang eine Messung, die den Verdacht aufkommen lies, daß die Fortpflanzung von Aktionspotentialen in den Dendriten kultivierter hippocampaler Neurone nicht aktivitätsabhängig sein könnte. Dieser Frage wird in der vorliegenden Arbeit

unter anderem genauer nachgegangen. In einer anderen Arbeit wurden in proximalen Dendriten (bis zu $168\mu\text{m}$ vom Soma) der Neurone von organotypischen Spinal Cord Gehirnschnittkulturen die Fortpflanzung von Aktionspotentialen untersucht [45]. Das 12×12 Pixel Photodiodenarray arbeitete mit einer Sampling Frequenz von 3kHz bei einer räumlichen Auflösung von $16\mu\text{m} \times 16\mu\text{m}$. Hier wurde der Fluoreszenzfarbstoff di-8-ANEPPS verwendet.

Im folgenden werden aktuelle Methodenentwicklungen aufgelistet, die hier nicht zum Einsatz kommen, aber interessante Ansätze liefern und weiter verfolgt werden sollten:

Messungen, bei denen die Zellen intrazellulär angefärbt werden, wurden meistens an den robusteren Invertebratenzellen durchgeführt (Übersichtsartikel [24]). Erste Messungen mit dieser Methode wurden jetzt aber auch im Slice des Neocortex an Pyramidalzellen durchgeführt [2]. Hier wurde ein 464 Pixel Photodiodenarray und der Fluoreszenzfarbstoff JPW2038 verwendet. Problematisch ist das Laden der Neurone mit dem Farbstoff, die lange Diffusionszeit (bis zu 2h) in die Dendriten und eventuelle toxische Auswirkungen des Farbstoffs in der Zelle. Positiv ist die Reduktion der Hintergrundfluoreszenz. Dadurch bleibt die Signalhöhe bei 1 bis 2% / 100mV trotz einer räumlichen Auflösung von nur $14\mu\text{m} \times 14\mu\text{m}$. Das beste Signal/Rausch Verhältnis ist dabei $10/1$. Eine noch elegantere Methode wäre die Entwicklung eines spannungssensitiven Green Fluorescent Proteins (GFP), das die Zelle nach der Aufnahme eines Plasmids selbst produziert. Ergebnisse von einem angeblich spannungssensitiven GFP [73] konnten zwar nicht bestätigt werden, aber mehrere Gruppen arbeiten an dieser Problematik (z.B. von T. Knöpfel, R. Tsien, G. Miesenböck).

Der Einsatz von schnellen LASER-Scan Mikroskopen, bei denen beliebige Beobachtungspunkte mit einer Positionierungszeit von $3\text{-}5\mu\text{s}$ angesteuert werden können, liefern eine Auflösung von $2\text{-}7\mu\text{m}$, also in der Größe von hippocampalen Dendritendurchmessern [6]. Durch die Messung zweier Emissionswellenlängen nach einer Kalibrierung mit Patch-Clamp Messungen sind auch Absolutmessungen der Spannung möglich [5].

Nichtlineare-Optik-Messungen für derartige Anwendungen stehen erst am Anfang ihrer Entwicklung. Sie sind wohl vor allem für Einzelzellmessungen im Slice sehr interessant, weil der Farbstoff nur in der Fokusebene angeregt wird und somit die Hintergrundfluoreszenz stark reduziert wird. Erste Versuche an Zelllinien mit den Farbstoffen di-4-ANEPPS, di-8-ANEPPS und den chiralen Farbstoffen JPW-1259 und JPW-2080 wurden durchgeführt und können bei gleichzeitiger Messung der Fluoreszenz von Second Harmonic Generation (SHG) und Two-Photon Excited Fluorescence (TPEF) Absolutmessungen der Spannung ermöglichen, weil die SHG spannungsabhängig ist [9].

Kapitel 4

Methoden

Im folgenden wird zuerst die Rattenzellkultur beschrieben und wie die Zelleigenschaften mittels Gentechnik verändert werden können. Anschließend wird die Anwendung der spannungssensitiven Farbstoffe, die als molekulare Sonden dienen, beschrieben. Dann wird der neue Meßaufbau für optisches Recording mit 5400 Pixeln und einer Zeitauflösung von 0,75ms vorgestellt und abschließend der Meßablauf und die Datenauswertung erläutert.

4.1 Rattenzellkultur

4.1.1 Substrat für neuronales Wachstum

Nervenzellen können nicht auf unbehandeltem Glas kultiviert werden. Es muß erst eine geeignete Beschichtung aufgebracht werden. Dazu werden auf die Gläschen (Durchmesser 30mm, Dicke 1, Assistent, Sondheim) autoklavierte und getrocknete FlexiPERM Kammern (conA, Durchmesser 12mm, In Vitro Systems & Services, Osterode) aufgesetzt, die durch Adhäsionskräfte auf dem Gläschen haften. Durch die Autoklavierbarkeit sind sie zuverlässig wiederverwendbar, d.h. es treten keine Kontaminationen der Kulturen auf. Man läßt Poly-L-Lysin (10µg/ml, 200µl pro Kulturkammer, Molekulargewicht >300000, Sigma, Heidelberg) eintrocknen und anschließend Laminin (10µg/ml, 200µl, Sigma L-2020) für 4h adsorbieren. Der Überstand wird erst kurz vor dem Ausplattieren der Zellen abgenommen, damit das Laminin durch Austrocknen nicht denaturiert.

4.1.2 Hippocampale Primärkulturen

Die verwendeten Nervenzellen stammen aus dem Hippocampus (Abb. 4.1) von embryonalen Ratten. Für eine Präparation wird eine 17 (ED17) oder 18 Tage (ED18) trächtige Ratte mit CO₂ betäubt und durch Genickbruch getötet. Die Uteri mit den Embryonen werden möglichst schnell entnommen und auf Eis gelegt um den Metabolismus der Embryonen zu reduzieren. Die aus den Uteri genommenen Embryonen werden durch Dekapitation getötet und die Köpfe in eisgekühltem DISG (Anhang A) aufbewahrt. Unter einem Binokular werden die Hippocampi herauspräpariert und in eisgekühltem DISG gesammelt. Um die Zellen zu dissoziieren, wird das Gewebe enzymatisch aufgelöst. Dazu verdaut man es in 2ml Versene (4°C, Anhang A) und 1ml Papain (4°C, Anhang A) 20min bei 36,5°C an und vereinzelt dann nach dem Wechsel zu Dispergierlösung (4°C, Anhang A) die Zellen durch Auf- und Abziehen in eine 2,5ml Pipette. Die

große Öffnung der Pipette schon die Zellen. Um übriggebliebene Gewebereste und verklumpte Zellen zu entfernen, wird die Zellsuspension mit einem Nylonnetz (Maschenweite ca. $150\mu\text{m}$, Siebdruckgewebe, Hombold) filtriert. Die Zellen werden bei $300g$ 10min abzentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 10ml DMEM (4°C , Osmolarität: 338mOSMOL/kg , Anhang A) resuspendiert. Um die Gliazell-dichte zu reduzieren, wird die Suspension auf Zellkulturplatten (Durchmesser 10cm , Greiner, Solingen) für 2h bei $36,5^\circ\text{C}$ und 10% CO_2 im Brutschrank präplattiert. Die Gliazellen haften schneller und fester am Untergrund als die Nervenzellen, so daß sich im leicht geschwenkten Überstand die Nervenzellen anreichern. Diese Suspension wird wie zuvor zentrifugiert und mit DMEM (36°C) resuspendiert. Die Zelldichte wird mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt und auf 70000 bis 100000 Zellen/ml eingestellt. Davon werden je $200\mu\text{l}$ auf die beschichteten Gläschen mit FlexiPERM Kammern gegeben und mit $500\mu\text{l}$ Leibovitz L-15 Medium (36°C , Osmolarität 319mOSMOL/kg , Anhang A) aufgefüllt. Nach 2h im Brutschrank wird das Medium vorsichtig abgesaugt und durch Neurobasal (Osmolarität: 225mOSMOL/kg , Anhang A) ersetzt. Alle 3 bis 4 Tage werden $200\mu\text{l}$ des Mediums erneuert. Die Kulturdauer beträgt 7 bis 37 Tage. Dies entspricht 3 bis 33 Tage alten Ratten. Die Osmolarität wird regelmäßig kontrolliert und steigt in dieser Zeit auf 270 bis 300 mOSMOL/kg . Bei einer Überschreitung wird mehr Medium ausgewechselt.

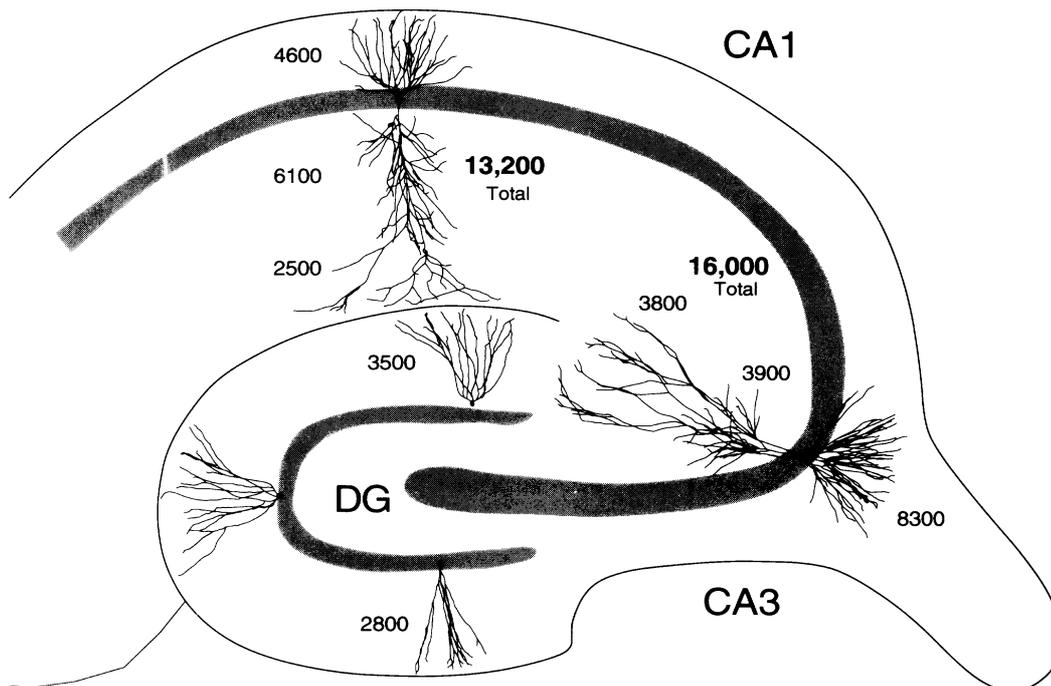


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Hippocampus. Eingezeichnet sind die Form und die Größe typischer Neurone im Dentate gyrus (Körner oder Granule Zellen im DG) und dem Hippocampus (Pyramidalzellen in CA1 und CA3). Die Zahlen geben die Gesamtlänge (aufsummiert) der dendritischen Bäume in μm an. [71]

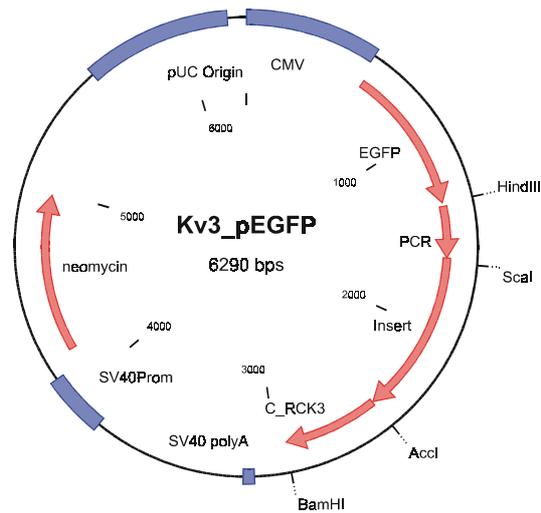


Abbildung 4.2: Plasmid für das Fusionsprotein aus Kv1.3 (alter Name Kv3) und GFP für die Expression in *S* äugerzellen. Eingezeichnet sind auch ausgewählte Enzymschnittstellen (J. Kupper).

4.2 Transfektion der Nervenzellen mit Kaliumkanälen

Das Zurücklaufen der Aktionspotentiale in den Dendritenbaum wird neben den passiven Kabeleigenschaften hauptsächlich von den exprimierten und in die Dendriten eingebauten Ionenkanälen bestimmt. Um dies gezielt zu verändern, werden zwei verschiedene Kaliumkanäle in Neuronen exprimiert und die Veränderungen der Backpropagation untersucht:

- Als Vertreter eines Delayed-Rectifier-Typ K^+ Kanals wird Kv1.3 verwendet. Um die Transfektion und den Ort der Kanäle anzuzeigen, wird ein Fusionsprotein mit Kv1.3 und GFP exprimiert (Kv1.3_GFP). Die Kanaleigenschaften ändern sich durch den GFP-Anhang nicht [43].
- Als Vertreter eines A-Typ K^+ Kanals wird Kv1.4 verwendet. Die Fusion mit GFP (Kv1.4_GFP) verändert die Kanaleigenschaften erheblich [43], weshalb das Fusionsprotein nur für die Lokalisation des Kanals zum Einsatz kommt und die Fortpflanzungsmessungen von Aktionspotentialen an Zellen mit einer Koexprimierung von Kv1.4 und GFP durchgeführt werden.

Die Plasmide können mit verschiedenen Methoden in die Zellen eingeschleust werden:

- Gen Gun. Goldkugeln werden mit dem Plasmid beschichtet und mit Druckluft auf die Zellen geschossen. So gelangt die DNA ins Zellinnere.
- Injektion. Mit einem Injektor wird das Plasmid in die Zelle injiziert.
- Ca^{2+} -Phosphat Präzipitationsmethode. Die Zellen nehmen mit dem sich bildenden Niederschlag das Plasmid auf.

Die ersten beiden Methoden haben sich als recht aufwendig und schwer reproduzierbar erwiesen, die letzte dagegen nach mehreren Testläufen als relativ zuverlässig. Für die Transfektion der gemessenen Zellen wurde nur die Ca^{2+} -Phosphat Präzipitationsmethode verwendet, die im folgenden genauer beschrieben wird:

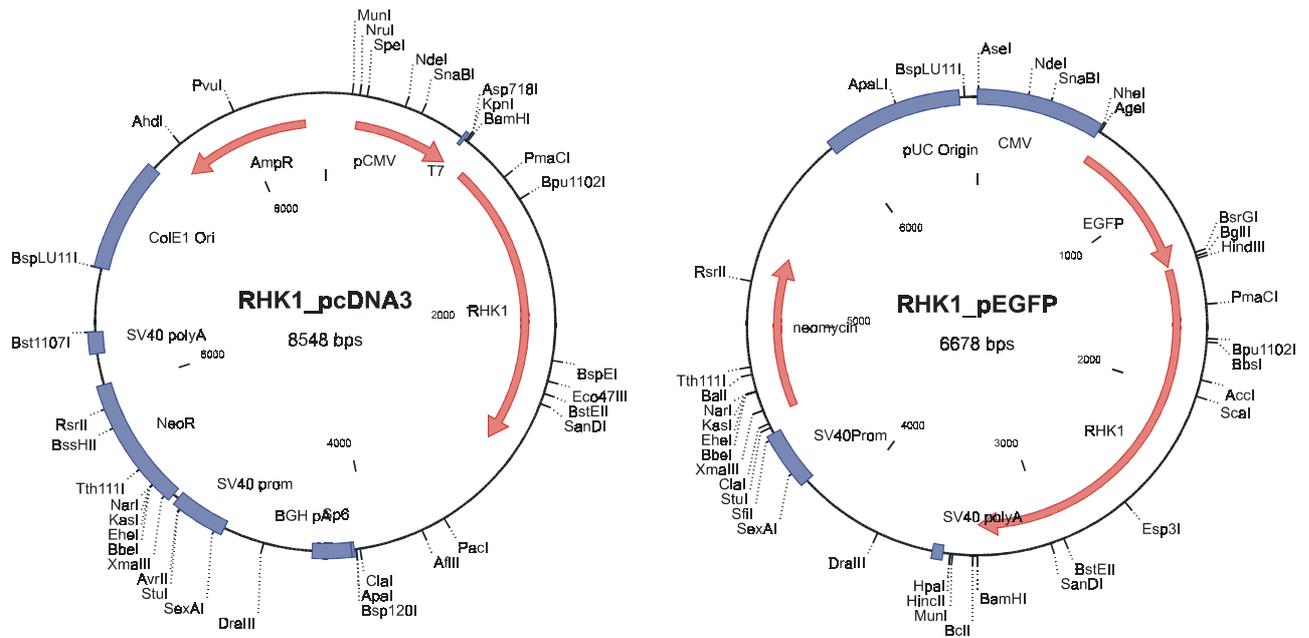


Abbildung 4.3: Plasmid für Kv1.4 (alter Name RHK1, links) und das Fusionsprotein aus Kv1.4 und GFP (rechts) für die Expression in Säugerzellen. Eingezeichnet sind ausgewählte Enzymschnittstellen (J. Kupper).

Die DNA der Kanäle und des GFPs wurden von J. Kupper in den Expressionsvektor für Säugerzellen pcDNA3 subcloniert [43] und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Abb. 4.2, 4.3). Für jedes Schälchen wird 0,4 μg DNA zu 20 μl 25mM CaCl_2 -Lösung gegeben und gut gemischt. Diese Lösung wird 5 μl -weise zu 20 μl 2xHeBs-Puffer (Anhang B) pipettiert, gut durchmischt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Es bildet sich ein Niederschlag mit DNA, dessen Kristallgröße für den Erfolg entscheidend ist. Von den Zellkulturen wird die Hälfte des Mediums (400 μl) abgenommen und im Brutschrank aufbewahrt. In jedes Schälchen werden 40 μl Lösung tropfenweise pipettiert, damit sich der Niederschlag gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Die Inkubationszeit im Brutschrank beträgt 30min. Dann wird das Medium gegen das zuvor abgenommene gewechselt. Sehr dünne und ältere Kulturen (>10d) reagieren sehr empfindlich auf solche Medienwechsel. Deshalb wurde beim Mediumwechsel nur das zuvor abgenommene verwendet und die Zellkulturstabilität durch eine Erhöhung der Zelldichte von 100000 Zellen/ml auf 150000 bis 250000 Zellen/ml verbessert. Letzteres vergrößert auch die Ausbeute an transformierten Zellen. Alle Messungen an gentechnisch veränderten Zellen werden 5h bis 18h nach dem Mediumwechsel durchgeführt.

Um die Veränderungen durch die zusätzlichen Kanäle festzustellen, werden die Kanäle nach 2 bis 3 Messungen pharmakologisch vergiftet. Für Kv1.3 existiert der spezifische Blocker Margatoxin (MgTX, verwendete Konzentration 2nM, Einwirkungszeit 5min, Bachem, Bubendorf, Schweiz). Das Peptid MgTX ist ein Bestandteil des Skorpiongifts von *Centruroides margaritatus*. Für Kv1.4 gibt es keinen spezifischen Blocker, weshalb auf 4-Aminopyridin (10mM, 5min, Sigma) zurückgegriffen werden muß. 4-Aminopyridin blockiert bei 10mM 80% aller A-Typ K^+ Kanäle und hat nur wenig Effekt auf die Delayed-Rectifier-Typ K^+ Kanäle [29].

4.3 Anwendung spannungssensitiver Farbstoffe

Für die optischen Messungen von Aktionspotentialen werden die spannungssensitiven Farbstoffe BNBIQ und erstmals auch ANNINE-5 verwendet. Sie eignen sich besonders gut aufgrund ihrer Fluoreszenzänderungsspektren, Empfindlichkeitsspektren und Anfärbe- und Ausfärbereigenschaften. Die sich aus den Spektren ergebende Wahl der Filtersätze und die Anfärbemethode werden hier beschrieben. Anschließend wird noch auf die Problematik der Phototoxizität eingegangen.

4.3.1 Auswahl der Filter

Bei der Anwendung spannungssensitiver Farbstoffe möchte man vorrangig eine maximale Fluoreszenzänderung (Abb. 4.4) bei vorgegebener Potentialänderung in der Zelle. Deshalb wird bei der Filterwahl in erster Linie ΔF maximiert (Δf Fluoreszenzänderungsdichte, λ_{Ex} Anregungswellenlänge, λ_{Em} Emissionswellenlänge):

$$\int_{\lambda_{Ex}} \int_{\lambda_{Em}} \Delta f d\lambda_{Ex} d\lambda_{Em} \stackrel{!}{=} Extremum$$

Entsprechend werden die Anregungs- und Emissionsfilter so ausgewählt, daß möglichst Spektralbereiche nur positiver oder nur negativer Fluoreszenzänderung ausgeschnitten werden. Aufgrund der Form des Fluoreszenzänderungsspektrums muß für ein positives ΔF der Farbstoff breitbandig angeregt werden und die Emissionsfilter dürfen nur das langwellige Licht passieren lassen. Für ein negatives ΔF dagegen sollte man den Farbstoff im Bereich des langwelligen Anregungsspektrum anregen und kann fast das ganze Emissionsspektrum nutzen. Bei einem gleichen Betrag von ΔF wird somit bei der negativen Flanke weniger Farbstoff angeregt (schmalbandig Anregung) als bei der positiven (breitbandige Anregung). Dadurch reduziert sich die Phototoxizität bei der Verwendung des negativen Flügels. Bei allen Messungen wird deshalb hier nur der negative Fluoreszenzänderungsbereich verwendet.

Für BNBIQ wird ein Anregungsbandpaß BP470/40, ein Farbteiler FT560 und ein Langpaß LP550 gewählt; für ANNINE-5 entsprechend ein BP450/50, ein FT515 und ein LP515 (Transmissionen siehe Anhang D). ANNINE-5 erweitert somit den Spektralbereich der zur Verfügung stehenden spannungssensitiven Farbstoffen zum Blauen hin. Er ist BNBIQ bei der Fluoreszenzänderung leicht überlegen.

4.3.2 Anfärbemethoden

Spannungssensitive Farbstoffe sollen sich in die Zellmembran einlagern und müssen deshalb amphiphil sein. Speziell für Messungen an Einzelzellen ist es wichtig, daß die Farbstoffmoleküle in der Zellmembran verbleiben und sich hydrophob verhalten. Sie lösen sich somit nicht in Wasser und die Zellen können nicht durch einfache Zugabe des Farbstoffs zum Medium angefärbt werden.

Zur Anfärbung von Zellkulturen wurden bislang mehrere Methoden entwickelt:

- Lipidvesikel-Methode [58]: Dazu werden Lipidvesikel mit eingelagerten spannungssensitiven Farbstoffen erzeugt, der Zellkultur zugegeben und durch Annäherung der Vesikel an die Zellmembran der Farbstoff übertragen. Die Methode ist ungiftig für die Zellen, erzeugt aber einen starken Fluoreszenzhinter-

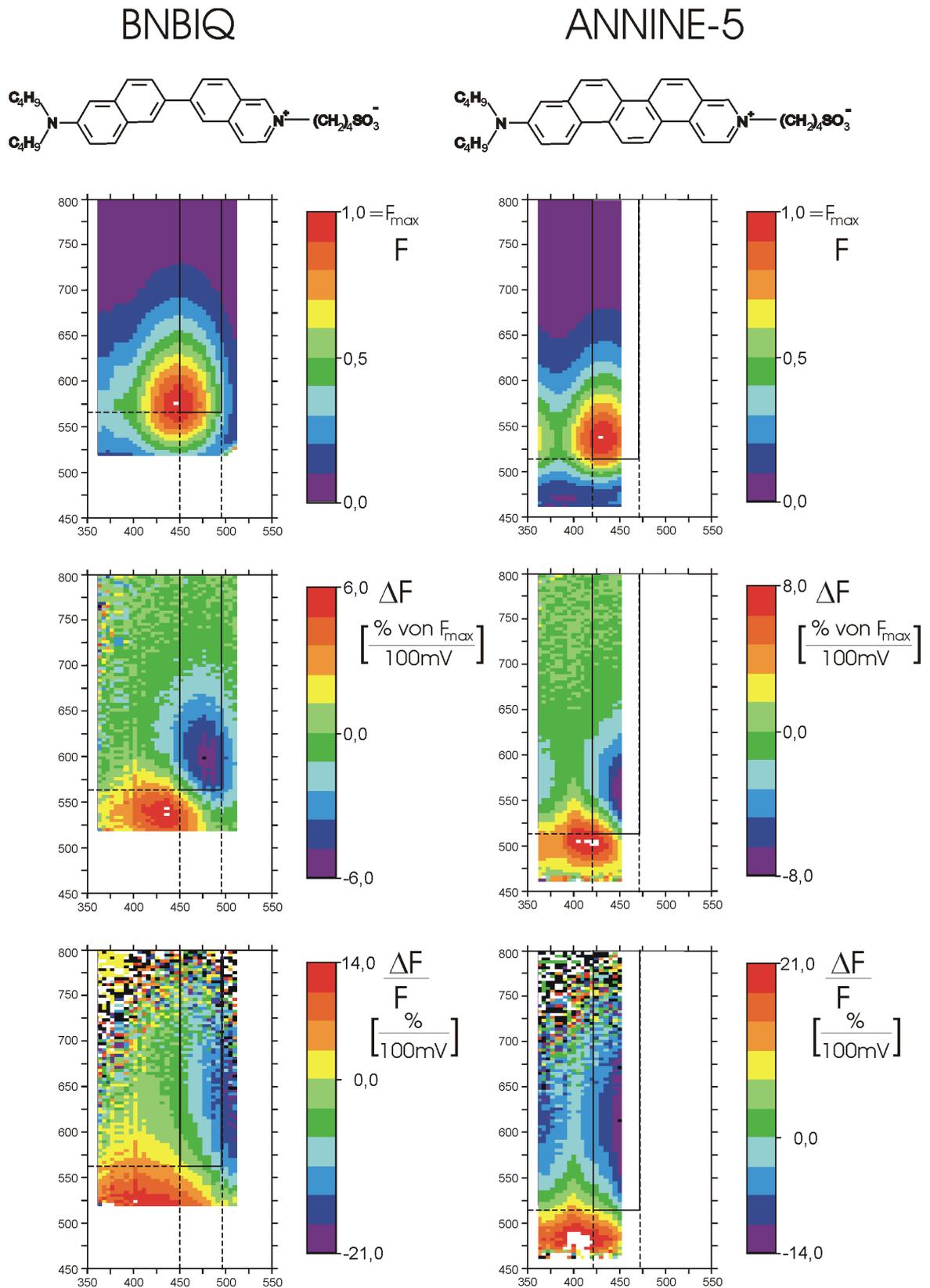


Abbildung 4.4: Struktur der spannungssensitiven Farbstoffe BNBIQ (oben links) und ANNINE V (oben rechts). Darunter jeweils das zweidimensionale Fluoreszenzspektrum (oben), Fluoreszenzänderungsspektrum (mitte) und Empfindlichkeitsspektrum (unten). Nach rechts ist jeweils die Anregungswellenlänge und nach oben die Emissionswellenlänge aufgetragen. In die Spektren sind die gemessenen Grenzen der ausgewählten Filter eingezeichnet (Linien, vgl. Anhang D). Der Fluoreszenzbereich innerhalb der durchgezogenen Linien wird für die Messungen verwendet.

grund, da sich geplatze Vesikel an Zellgewebe und Glasoberflächen anlagern.

- Albumin-Methode [65]: Hierbei übernimmt das Albumin die Rolle der Lipidvesikel, jedoch ist diese Methode weniger aufwendig in der Herstellung der Stammlösung. Die Anfärbung an sich ist aber zeitaufwendig und diffizil, weil die Anfärbeprozedur mehrfach wiederholt werden muß, um gute Fluoreszenzintensitäten zu erreichen.
- Na-Cholat Methode [55][42]: Cholat bildet oberhalb der kritischen Konzentration Mizellen, in die sich der Farbstoff einlagert. Bei Zugabe dieser mizellaren Stammlösung zur Zellkultur wird die kritische Konzentration unterschritten, die Mizellen lösen sich auf und der amphiphile Farbstoff lagert sich in die Zellmembran ein. Vorteile sind der geringe Fluoreszenzhintergrund und die schnelle und einfache Herstellung der Farbstoffstammlösung. Wenn man beim Anfärben allerdings unvorsichtig ist, wird die Zellmembran von noch nicht zerfallenen Mizellen aufgelöst oder zumindest angegriffen. Es ist somit sehr schwierig zu unterscheiden, ob Zellschädigungen nach dem Anfärben auf zu hohe Farbstoffkonzentrationen oder Cholatkonzentrationen zurückzuführen sind. Dies gilt vor allem für die empfindlichen Rattennervenzellen mit ihren feinen Dendriten.

Hier wurde eine neue Methode entwickelt und nach mehreren Testversuchen, auch im Vergleich mit den anderen Methoden, ausschließlich verwendet:

- HCl-Methode: Der spannungssensitive Farbstoff BNBIQ oder ANNINE-5 (0,2-0,4mg) wird in 200µl 0,1M HCl gelöst. Durch den Protonenüberschuß (pH1) wird die Sulfatgruppe und der Stickstoff des Anilins protoniert. Das Farbstoffmolekül ist als Dikation wasserlöslich und farblos. Zur Anfärbung werden 1 bis 3µl Stammlösung zu 800µl des gepufferten Neurobasal Mediums zugegeben. Die Salzsäure wird sofort gepuffert und der Farbstoff fällt als feiner, jetzt wieder farbiger Niederschlag aus und färbt die Zellen an. Damit der pH-Wert des CO₂ gepufferten Neurobasal konstant bleibt, wird die Kultur zum Anfärben 10 bis 20min in den Brutschrank gestellt. Anschließend wird zweimal mit extrazellulärer Lösung (Osmolarität: 290mOSMOL/kg, Anhang A) gespült und in dieser gemessen.

Die HCl-Methode erweist sich als sehr zuverlässig und schonend für die Zellen. Eine pH-Änderung kann mit dem Indikatorfarbstoff Phenolrot (verfärbt sich in sauren Lösungen gelb) nicht festgestellt werden. Bei einer Zellschädigung vor dem Belichten der Zellen kann jetzt die Anfärbemethode an sich als Ursache ausgeschlossen werden. Mit ihr ist es auch möglich, den neuen Farbstoff ANNINE-5 zu verwenden: Bei einer Anfärbung von hippocampalen Nervenzellen mit ANNINE-5 nach der Cholatmethode bricht beim Patchen der Seal zuverlässig nach dem Durchbruch zusammen ([60] und eigene Beobachtung). Die Anfärbung erfolgt sehr schnell (3-5min) und gleichmäßig, d.h. es fallen keine großen Kristalle aus. Sie ist auch bei anderen spannungssensitiven Farbstoffen (z.B. di-4-ANEPBS) anwendbar.

Beide verwendeten Farbstoffe lagern sich zuverlässig in die Zellmembran ein und verbleiben dort auch nach einem Medienwechsel für mindestens 90min. ANNINE-5 bleibt subjektiv betrachtet besser in der Membran als BNBIQ.

4.3.3 Phototoxizität

Die Beurteilung phototoxischer Effekte ist schwierig und hängt von vielen Faktoren ab: von der Vitalität, dem Zustand, dem Alter und der Größe der Zellen, der Stärke der Anfärbung, vom Farbstoff selbst, von der Beleuchtungsstärke und der Fokuseinstellung. Die folgenden Angaben sind deshalb reine Erfahrungswerte.

Die phototoxischen Effekte von BNBIQ und ANNINE-5 sind vergleichbar. Die maximale Meßzeit ohne sichtbare phototoxische Effekte bei den elektrophysiologischen Messungen beträgt 1000ms. Die Phototoxizität äußert sich durch eine irreversible Aktionspotentialverbreiterung, eine Abnahme des Ruhepotentials oder auch den Zusammenbruch des Seals bzw. Durchbrüche in der Zellmembran. Die Phototoxizität scheint im Vergleich zu typischen Meßzeiten von 100ms eher langsam zu sein: Wenn mehrere Male kurz ($<100\text{ms}$) mit langem Abstand ($>1\text{s}$) belichtet wird, beobachtet man früher Aktionspotential-Formänderungen als während einer entsprechend langen einmaligen Dauerbeleuchtung (bis etwa 600ms). Die sich anschließend ergebende Toxizität bei einer erneuten Messung ist in etwa gleich groß.

4.4 Aufbau der Meßapparatur

Messungen mit spannungssensitiven Farbstoffen stellen besondere Ansprüche an den Meßaufbau. Wichtig sind v.a. Stabilität, Schwingungsfreiheit und ein optimierter optischer Strahlengang.

4.4.1 Mechanischer Aufbau

Das Herzstück des Meßaufbaus (Abb. 4.5) ist ein inverses Mikroskop (Axiovert 135TV, Zeiss, Oberkochen). Um eine möglichst hohe Stabilität der Meßkammer zu gewährleisten, ist das Mikroskop auf Linearverschiebetischen (Spindler&Hoyer, Göttingen) in x- und y-Richtung etwa $5\ \mu\text{m}$ -genau gegen ein Gestell aus Profialuminium (Item, Sindelfingen) verfahrbar. Dieses Gestell ist fest auf einer Aluminiumplatte montiert, die auf einer schwingungsgedämpften Steinplatte aufliegt. Es trägt die Meßkammer und ein bis vier Mikromanipulatoren. Die Zellen und Mikromanipulatoren werden also auch bei einer Änderung des Beobachtungsfeldes nicht bewegt. Durch die Verwendung der Item Aluminiumschienen bleibt der Aufbau auch sehr variabel und anpassungsfähig. Z.B. kann durch Lösen weniger Schrauben die Mikroskoptischehöhe stufenlos innerhalb kurzer Zeit verstellt werden. Um den Tisch steht ein vollkommen entkoppelter Faradaykäfig mit Ablageflächen unter anderem für die Manipulator-Steuereinheiten. Der Käfig ist zur Streulichtreduzierung innen schwarz ausgestrichen.

4.4.2 Optisches Detektionssystem

Das Detektionssystem ist in Abb. 4.6 schematisch dargestellt. Das Anregungslicht wird von einer Xenon Kurzbogenlampe (XBO 75W/2, Zeiss) erzeugt. Die XBO Lampe und das zugehörige Zeiss-Netzgerät liefert die nötige Intensität und Intensitätsstabilität. (Bei der einfacher zu justierenden 150W Xenonlampe von Spindler&Hoyer müßte entweder das Netzgerät stabilisiert oder die 100Hz Schwankungen der Intensität bei der Auswertung korrigiert werden. Die in der Abteilung vorhandenen LASER (Argon-Ionen LASER, Stabillite2017, Spectra-Physics, USA und Argon-Ionen LASER, BeamLok, Spectra-Physics) rauschen im

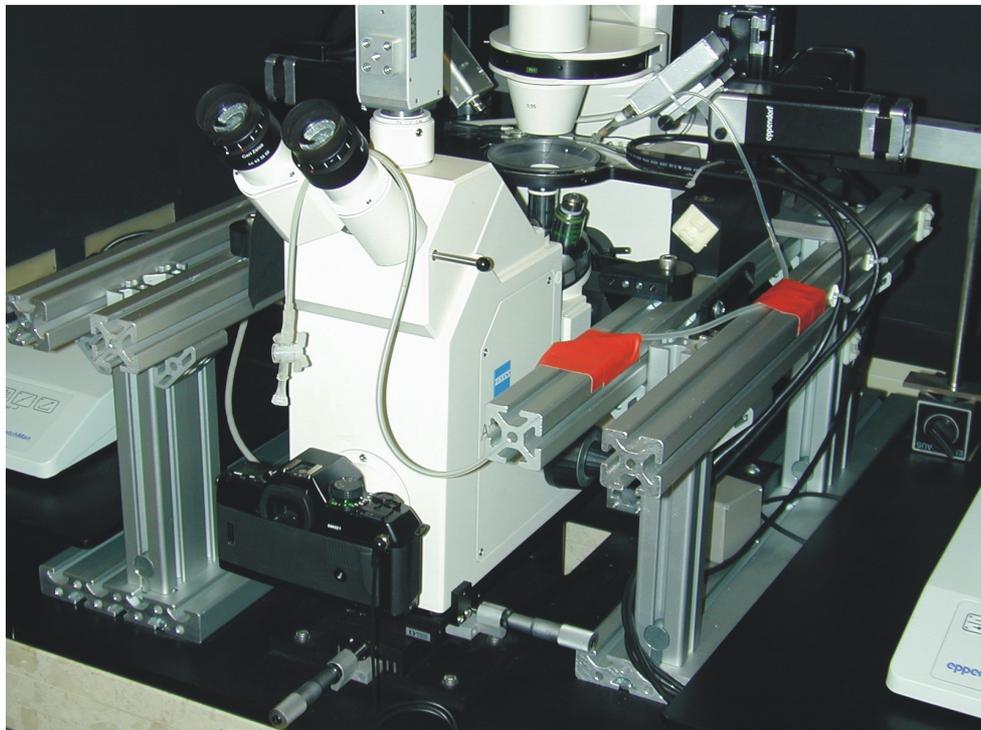
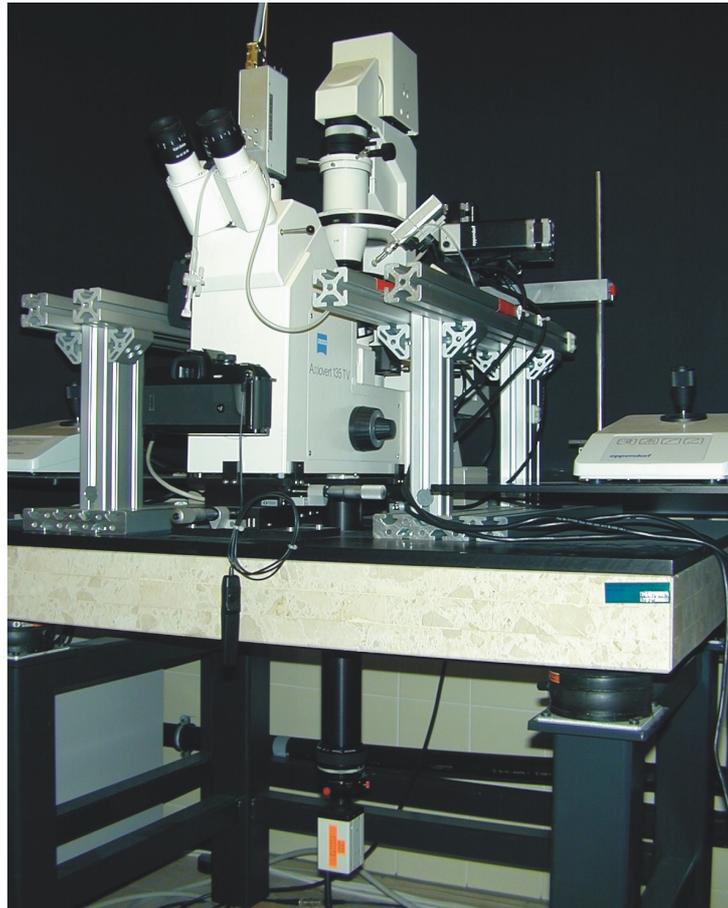


Abbildung 4.5: Meßaufbau. Das verfahrbare Mikroskop besitzt einen TV-Ausgang nach unten, an dem der Phototubus mit der MiCAM CCD-Kamera angeschlossen ist (oben). Die Manipulatoren und die Meßkammer sind auf einem Gestell aus Aluminiumschienen fest montiert (unten).

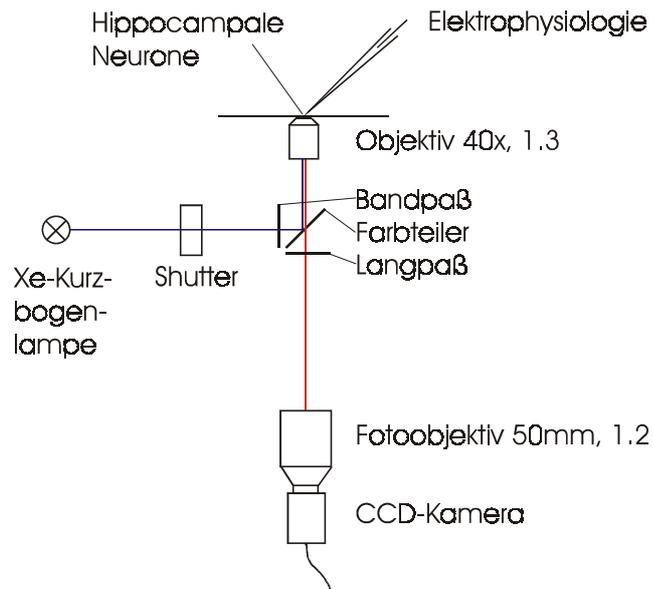


Abbildung 4.6: Schematischer Meßaufbau.

interessanten Frequenzbereich etwa 10% und sind somit unbrauchbar.) Die Beleuchtung wird durch einen Shutter gesteuert. Weil das Mikroskop und die damit fest verbundene Lichtquelle verfahrbar sind, muß der Shutter bei größeren Meßkammern mit bewegt werden, damit er zentrisch zum Lichtweg bleibt. Wenn der Meßausschnitt ausgewählt ist, muß der Shutter vom Mikroskop und der Steinplatte entkoppelt werden. Er steht dann auf Magnethalterungen der Ablageflächen.

Das gewünschte Anregungslicht wird aus dem kontinuierlichen Xenonspektrum für BNBIQ (ANNINE-5) mit einem Bandpaß BP470/40 (BP450/50) ausgefiltert und an einem Farsteiler FT560 (FT515) zur Meßkammer gespiegelt. Für die optischen Messungen wird ein 40x Ölimmersionsobjektiv, numerische Apertur 1.3, (Zeiss) verwendet. Der sichtbare Ausschnitt der Kultur hat einen Durchmesser von $500\mu\text{m}$. Das langwelligere Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv gesammelt und passiert den Farsteiler und einen Langpaß LP550 (LP515). Das 2cm große Bild entsteht am nach unten gehenden TV-Ausgang. Hierfür ist in der tragenden Alu- und Steinplatte ein genügend große Öffnung, um auch die Mikroskopverschiebungen zu ermöglichen. Das entstehene Bild ist für den kleinen CCD-Chip ($2,9\text{mm} \times 2,1\text{mm}$, 1/5 inch CCD Chip) der Kamera (MiCAM, BrainVision, SCI-Media LTD., Tokyo, Japan) zu groß, wenn ein möglichst großer Bereich für die Messung genutzt werden soll. Mit einem 340mm Tubus (Eigenbau), einem Fotoobjektiv (Nikkor 50mm/1.2, E52, Nikon) und einem Nikon/c-mount Adapter (Hama, Monheim) ist es möglich, das Bild so zu verkleinern, daß ein $400\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ großer Bereich gemessen werden kann. Die schnelle, sehr rauscharme MiCAM besitzt 90×60 Pixel, eine zeitliche Auflösung von $0,75\text{ms}$ pro Bild und mit dieser Projektion eine räumliche Auflösung von $4,4\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$. Die Kamera verwendet einen Standard CCD Chip von Sony (ICX076AL, 362×492 Pixel). Die hohe Geschwindigkeit (1333 frames/s) und das geringe Rauschen wird durch On-Chip-Binning und Interline Datentransfer erreicht [82]. Der Hauptbeitrag des noch vorhandenen Rauschens ist auf Schrotrauschen zurückzuführen. Es entsteht durch statistische Schwankungen im Photonfluß und ist durch eine Poissonverteilung beschreibbar. Das Rauschen ist gleich der Wurzel aus

der Anzahl der ausgelösten Elektronen. Die MiCAM erreicht bei etwa 75000 Elektronen/Pixel ihre Sättigung, was dann zu einem Schrotrauschen von 0,365% führt. Um das Schrotrauschen zu verringern, werden von der Software die Rohdaten räumlich und zeitlich mit folgender Gewichtung gefiltert (3D Matrix; x, y räumlich, z zeitlich):

$$\begin{array}{ccc} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{array} \quad \begin{array}{ccc} 1 & 2 & 1 \\ 2 & 4 & 2 \\ 1 & 2 & 1 \end{array} \quad \begin{array}{ccc} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{array}$$

Dadurch wird ein Signal/Rausch-Verhältnis von minimal 54dB und typisch 60dB erreicht, was 0,2% bis 0,1% Rauschen bei Kamerasättigung entspricht [82]. Das Signal/Rausch-Verhältnis wird durch Binning bei der Datenauswertung nochmals verbessert (Abschnitt 4.6). Die Kamera wurde bis jetzt nur für Slicemessungen verwendet [82][33], jedoch nicht für Einzelzellmessungen. Sie ist etwa 3 mal lichtempfindlicher als die FUJI MOS Kamera HR-Deltaron [32], mit der anfänglich ohne Erfolg zu messen versucht wurde. Bei jeder Messung werden 1364 Bilder (entspricht 1023ms) aufgenommen und vom Controller über eine PCI Interface Karte an den Computer geschickt.

4.4.3 Elektrophysiologie

Um die Zellen kontrolliert zu stimulieren, wird ein elektrophysiologisches Setup benötigt. Die zu untersuchende Zelle wird mit einer frisch gezogenen (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente, München) Borosilicatelektrode (GB150T-10, Science Products, Hofheim) in whole cell Konfiguration gepatched. Die Elektroden haben, wenn sie mit intrazellulärer Lösung (Anhang A) gefüllt werden, einen Widerstand von 2-3M Ω . Der Übergang von der Elektronenleitung des Verstärkers zur Ionenleitung des Elektrolyten erfolgt mit einer Silber/Silberchlorid Elektrode. Als Verstärker wird ein single electrode Verstärker (SEC-05L, npi-electronic, Tamm) bei einer Switching-Frequenz von 20 bis 30kHz verwendet.

4.4.4 Steuerung

Der Computer mit der in Labview (National Instruments, Austin, Texas, USA) geschriebenen Elektrophysiologiesoftware gibt über eine 12 bit Datenaufnahme Interfacekarte (AT-MIO-16E-2, National Instruments) das Steuersignal für den Patch Clamp Verstärker aus, liest die Elektrophysiologiedaten ein und triggert den auf Bereitschaft stehenden CCD-Controller und den Shutter. Ein Großteil der Software wurde übernommen [34] und an die speziellen Bedürfnisse angepaßt.

4.4.5 Dokumentation

Zur Dokumentation der Zellen werden CCD-Bilder mit 752 x 582 Pixeln Auflösung aufgenommen (HRC mit 1/2 inch Chip ICX039AL von Sony, Theta System, Gröbenzell) und über eine Framegrabber-Meßkarte (PC-EYE-1; Eltec; Mainz) und Software [41] auf dem Elektrophysiologiecomputer abgespeichert. Um den in etwa gleichen Bildausschnitt wie mit der MiCAM zu erhalten, wird das Bild durch eine 0,4x Linse (Zeiss) verkleinert. Durch die variable Belichtungszeit können mit dieser CCD-Kamera sowohl die Farbstofffluoreszenzbilder und die Durchlichtbilder als auch die z.T. lichtschwachen GFP Fluoreszenzbilder aufgenommen werden.

4.5 Meßablauf

4.5.1 Meßablauf bei Aktionspotentialgruppen

Alle Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Anfärben und Waschen der Zellen bei möglichst geringer Beleuchtung kommen sie in extrazellulärer Lösung auf das inverse Mikroskop. Eine Zelle wird ausgewählt und gepatched. Durch die geneigten Wände der Flexiperm Kulturkammern wird dabei das Anfahren der Zelle mit der Patchpipette sehr vereinfacht. Es treten keine sterischen Probleme wie bei senkrechten Kammerwänden auf. Elektrophysiologisch wird der Schwellwert für Aktionspotentiale ermittelt und dann die optische Messung zweier etwa 700ms auseinanderliegender Aktionspotentiale durchgeführt: Zuerst wird der Shutter geöffnet, dann die Elektrophysiologiemessung und die CCD-Kamera gestartet. Das Elektrophysiologieprogramm triggert je nach Meßtyp einzelne Aktionspotentiale, Hyperpolarisationspulse oder ganze Aktionspotentialzüge (Anhang E). Die CCD Kamera nimmt 1023ms Bilder auf. Um die Zellen vor phototoxischen Reaktionen zu schützen, wird der Shutter nach 80ms geschlossen und nach 600ms noch einmal für 80ms geöffnet. Für die Messung von ganzen Aktionspotentialzügen wird der Shutter 400ms bis 500ms geöffnet. Nach den optischen Messungen werden die Bilder zur Dokumentation aufgenommen.

4.5.2 Meßablauf bei gentechnisch veränderten Nervenzellen

Bei der Messung von gentechnisch veränderten Nervenzelle muß eine GFP leuchtende Zelle vor dem Anfärben ausgewählt werden. Nach dem Anfärben ist dies nicht mehr möglich, da der Spektrenüberlapp von GFP und ANNINE-5 bzw BNBIQ zu groß ist. Außerdem ist die GFP-Fluoreszenz im Vergleich zu der sehr starken Farbstoffanfärbung zu schwach und das Anregungslicht würde bereits phototoxische Effekte auslösen. Das Wiederfinden der ausgewählten Zelle nach dem Anfärben und Spülen der Zellen erfordert wegen der hohen Zelldichte Übung. Der weitere Meßablauf ist mit der vorgenannten Train-Messung identisch.

4.6 Datenauswertung

Bei der Datenauswertung wird die hohe Pixelanzahl und Ortsauflösung ausgenutzt, um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern. Kräftige Dendriten haben einen Durchmesser in der Größenordnung der Abbildungsgröße eines Pixels ($4,4\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$). Die Auswertestrategie besteht nun darin nur signaltragende Pixel auszuwählen und benachbarte zu mitteln. Wäre die Auflösung schlechter, würde jedes Pixel mehr Hintergrundfluoreszenz beinhalten, die nichts zum Signal beiträgt. Die Auswertung der Kamerarohdaten erfolgt in sieben Schritten (Abb.4.7, 4.8, 4.9):

1. Auswahl des auszuwertenden Meßfensters

Das Rohdatenfile (1364 Frames) enthält belichtete und unbelichtete Zeitbereiche. Aus dem belichteten wird der zeitliche Abschnitt um das Aktionspotential ausgeschnitten; für ein einzelnes Aktionspotential zwischen 50 und 100 Frames, was einer Zeitdauer von 37,5 bis 75ms entspricht. Aus dem unbelichteten Abschnitt wird ein 50 Frame langes Stück für die Hintergrundkorrektur ausgeschnitten.

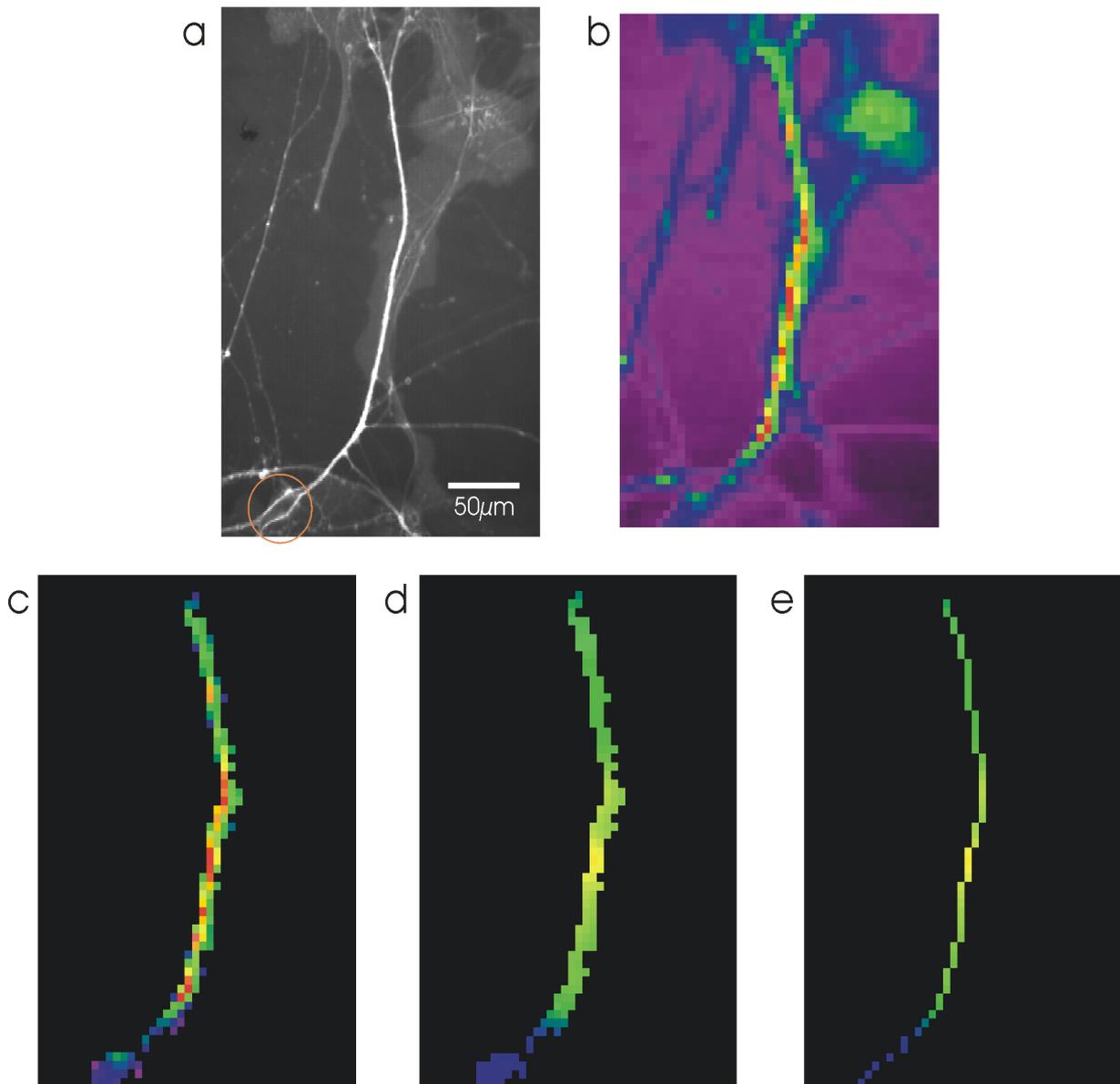


Abbildung 4.7: Datenauswertung. a: Fluoreszenzbild einer angefärbten Nervenzelle mit dickem Dendriten (mit Standard CCD Kamera aufgenommen). Das Soma ist eingekreist. b: Falschfarbenbild aufgenommen mit der schnellen MiCAM CCD-Kamera. c: Mit der Varianzanalyse ausgewählte Meßpunkte. In ihrem Zeitverlauf ist ein Signal zu erkennen (siehe Abb.4.8). d: Räumliche Filterung (Gaußfilter) der ausgewählten Punkte. e: Auswahl von Punkten zur Linearisierung des Dendriten.

2. Hintergrundkorrektur

Die 50 Frames des Hintergrundkorrekturfiles werden zeitlich gemittelt. Es entsteht somit ein 90x60 Pixel Hintergrundbild, das von jedem Frame abgezogen wird.

3. Zeitliche Varianzanalyse der zeitlich gefilterten Meßdaten zur Auswahl der signaltragenden Meßpunkte (Abb. 4.7 von b nach c)

Das hintergrundkorrigierte File wird zeitlich durch eine Mittelung von 3 bis 5 Meßpunkten gefiltert. Vom Zeitbereich während des Aktionspotentials wird die Varianz für jeden Pixelzeitverlauf berechnet. Wenn

die Varianz größer ist als ein für jede Messung einzeln festgesetzter Grenzwert, so wird der Zeitverlauf an dieser Koordinate ausgewählt. Der Grenzwert wird so gesetzt, daß nur wenige Ortspunkte mit zugehörigem Zeitverlauf ausgewählt werden, die nicht auf dem Neuron liegen. Punkte, die ausgewählt werden und nicht auf dem Neuron liegen, werden nachträglich entfernt. Für die weitere Auswertung werden die ungefilterten Zeitverläufe der ausgewählten Pixel verwendet.

4. Räumliches, gaußförmig gewichtetes Binning (Abb. 4.7 von c nach d, Abb. 4.8 von a nach b)

Jeder Meßpunkt wird räumlich mit den benachbarten Punkten gemittelt. Die Gewichtung ist gaußförmig mit $\sigma=10\mu\text{m}$. Bei einer zeitlichen Auflösung von 0,75ms der Kamera und einer Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Aktionspotentiale von mindestens 10cm/s ergibt sich eine Länge von $75\mu\text{m}$, die sich ein Aktionspotential fortpflanzt, ohne daß es von der Kamera aufgelöst werden kann. Ein σ von $10\mu\text{m}$ verändert somit nicht die Aktionspotentialform. Durch die nicht-quadratischen Kamerapixel ist der Filter in x- und y-Richtung asymmetrisch. Der zentrale Ausschnitt des Filters ergibt sich zu (noch nicht auf Integral 1 normiert):

0,03	0,06	0,10	0,13	0,15	0,13	0,10	0,06	0,03
0,07	0,14	0,23	0,31	0,34	0,31	0,23	0,14	0,07
0,13	0,25	0,42	0,56	0,62	0,56	0,42	0,25	0,13
0,18	0,36	0,60	0,80	0,89	0,80	0,60	0,36	0,18
0,21	0,41	0,67	0,91	1	0,91	0,67	0,41	0,21
0,18	0,36	0,60	0,80	0,89	0,80	0,60	0,36	0,18
0,13	0,25	0,42	0,56	0,62	0,56	0,42	0,25	0,13
0,07	0,14	0,23	0,31	0,34	0,31	0,23	0,14	0,07
0,03	0,06	0,10	0,13	0,15	0,13	0,10	0,06	0,03

Die zuvor nichtausgewählten Punkte bleiben unberücksichtigt. Das Rauschen verringert sich abhängig von der Anzahl und der Entfernung der berücksichtigten Punkte vom zentralen Pixel auf maximal 1/5 und typischerweise auf 1/2 bis 1/3 des ursprünglichen Werts.

5. Auswahl der endgültigen Punkte (Abb. 4.7 von d nach e)

Damit Aktionspotentiale in Abhängigkeit vom Abstand zum Soma untersucht werden können, muß der Dendrit linearisiert werden. Dazu werden Punkte auf dem Dendriten ausgewählt. Die Abstände zwischen den benachbarten Punkten werden trigonometrisch berechnet und durch Summation der Abstand zum Soma bestimmt.

6. Ausbleichkorrektur und $\Delta F/F$ Berechnung (Abb. 4.8 von b nach c)

Um $\Delta F/F$ zu brechnen, muß zuerst eine Exponentialfunktion, die das Ausbleichen des Farbstoffs beschreibt, an die Zeitverläufe angepaßt werden. Bei kurzen Zeitbereichen kann die Exponentialfunktion durch eine

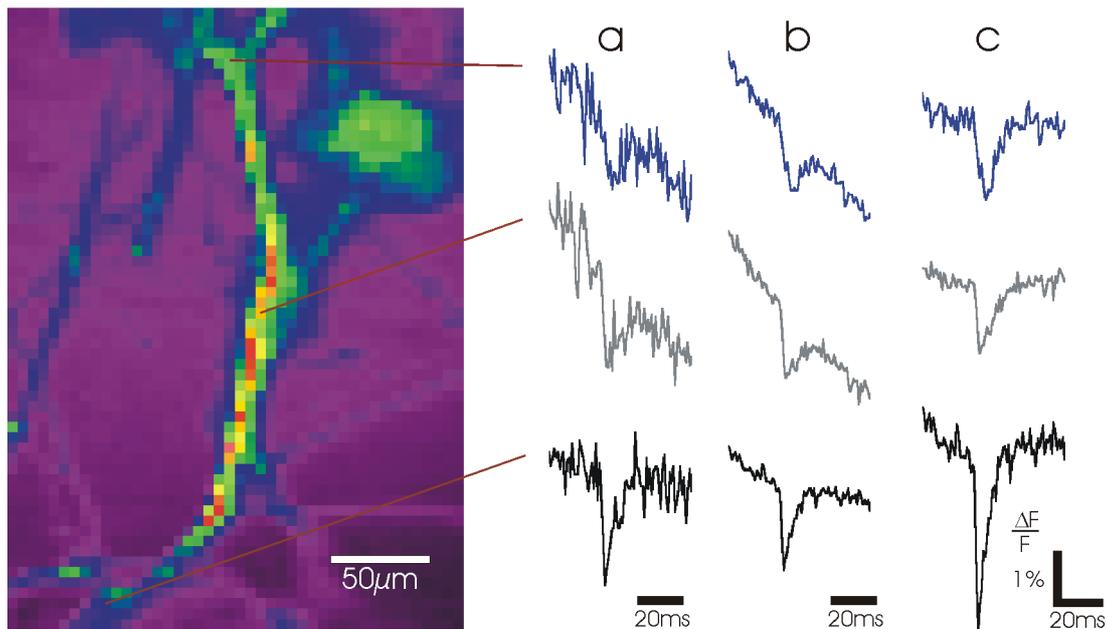


Abbildung 4.8: MiCAM CCD-Kamerabild mit den zeitlichen Verläufen dreier Pixel. Oben: $300\mu\text{m}$ vom Soma. Mitte: $150\mu\text{m}$ vom Soma. Unten: am Soma. a: Rohdaten. b: Daten nach räumlicher Filterung. c: Daten nach Ausbleichkorrektur und $\Delta F/F$ -Berechnung.

Gerade ersetzt werden. Von jedem Zeitverlauf eines Pixels werden möglichst viele Stützstellen für die Anpassung verwendet. Dieser Fit wird vom Zeitverlauf des Pixels abgezogen und diese Differenz durch den Fit geteilt:

$$\frac{\Delta F}{F}(t) = \frac{F(t) - F_{Fit}(t)}{F_{Fit}(t)}$$

Das so erhaltene $\Delta F/F$ Signal wird für die weitere Auswertung verwendet.

7. Bestimmung der Signalamplituden, der Amplitudenverhältnisse und der Fehler (Abb. 4.9)

Die Maximalamplituden der Spikes und der Hyperpolarisationen werden den $\Delta F/F$ -Daten entnommen. Zur Untersuchung der Backpropagation bei Aktionspotentialzügen wird das erste Aktionspotential mit einem nach etwa 700ms verglichen, um eventuelle Veränderungen der Aktionspotentialamplitude zu untersuchen. Dazu werden die Maxima der $\Delta F/F$ -Amplituden der beiden Aktionspotentiale herausgesucht und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Diese Verhältnisbildung ist notwendig, da Absolutmessungen des Potentials mit spannungssensitiven Farbstoffen hier nicht möglich sind. Durch Anpassung einer Geraden wird die Steigung bestimmt.

Der Fehler ergibt sich aus dem Signalrauschen. Sein Hauptbeitrag wird vom Lichtrauschen verursacht. Wegen der unterschiedlichen Intensitäten wird die Standardabweichung des Zeitverlaufs von jedem Pixel errechnet. Dazu wird ein Zeitfenster gewählt, in dem kein Aktionspotential liegt. Bei der Verhältnisbildung der Spikeamplituden wird der Fehler durch Fehlerfortpflanzung weitergegeben. Die Anpassung der Geraden und die Berechnung der dazugehörigen Fehler erfolgt nach der χ^2 -Minimierungsmethode [54]. Die

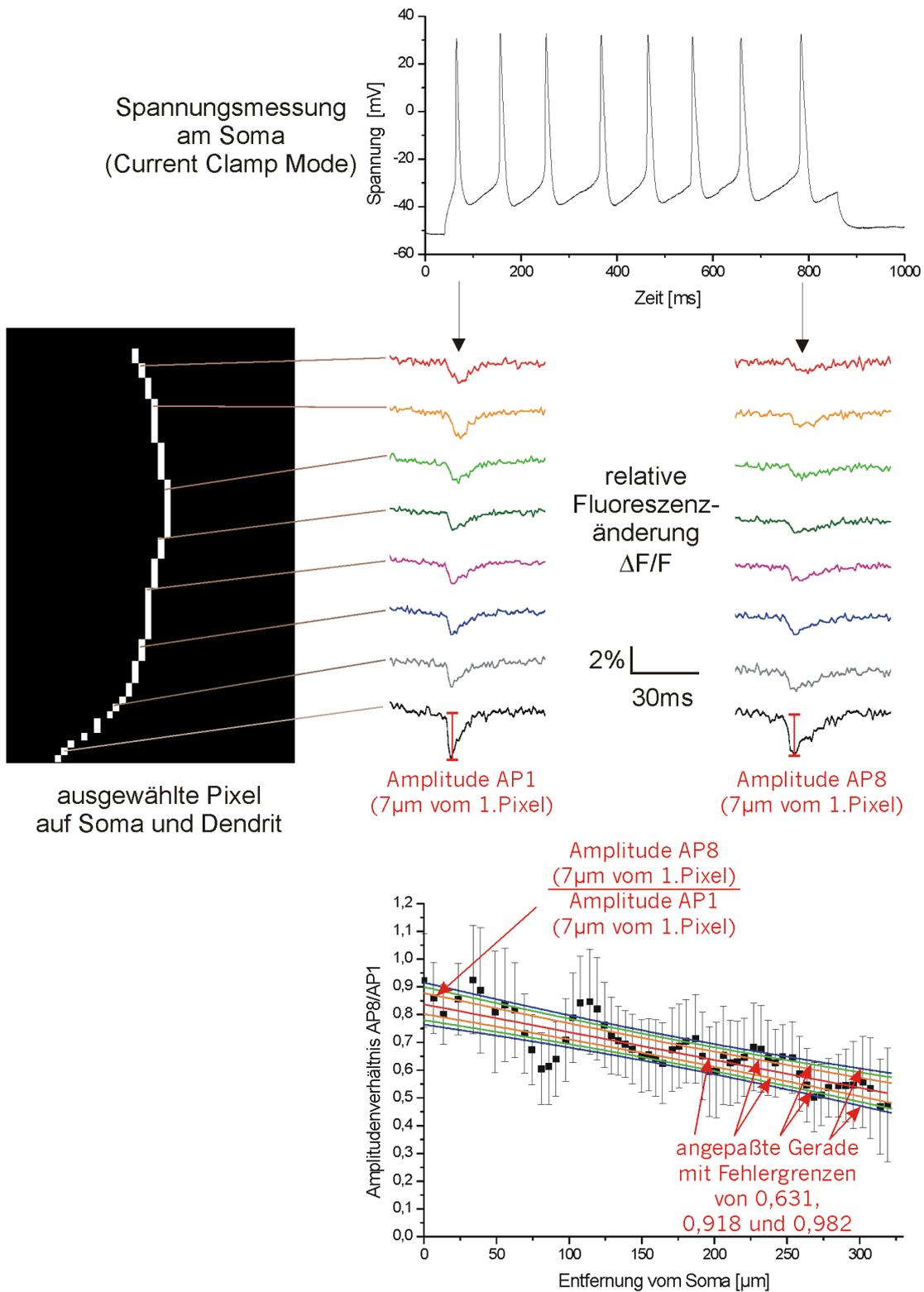


Abbildung 4.9: Die untersuchte Zelle (vgl. Abb.4.7) wird am Soma stimuliert und feuert Aktionspotentiale (Spannungsmessung oben). Zwei dieser Aktionspotentiale werden optisch gemessen. Die relativen Fluoreszenzänderungssignale $\Delta F/F$ (Mitte rechts) von den entsprechenden Pixeln (Mitte links) werden gezeigt. Mit den Maximalamplituden werden die Verhältnisse gebildet. Die Fehler der Amplituden ergeben sich aus dem Signalrauschen, pflanzen sich bei der Verhältnisbildung fort und ergeben die Fehlerparabeln der Geradensteigung. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 63,1% liegt die gesuchte Gerade innerhalb der orangen Parabel, mit 91,8% innerhalb der grünen und mit 98,2% innerhalb der blauen.

sich daraus ergebenden Fehlerparabeln geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der die gesuchte Gerade innerhalb dieser Toleranz liegt. In allen derartigen Auftragungen ist die beste Fitgerade rot dargestellt und die Fehlerparabeln für eine Wahrscheinlichkeit von 0,631 orange, von 0,918 grün und von 0,982 blau.

Auswahl der Messungen

Die Messungen werden zuerst aufgrund der elektrophysiologischen Daten vorausgewählt. Nur wenn hierbei keine Sonderbarkeiten sichtbar sind, die z.B. durch zu starke Anfärbung, schlechten Seal oder Phototoxizität verursacht sein können, wird das Signal/Rausch-Verhältnis der $\Delta F/F$ -Signale auf dem Dendriten zur weiteren Auswahl herangezogen. Das Signal/Rausch-Verhältnis sollte 2/1 nicht unterschreiten.

Die Qualität der Messungen an einer Zelle nimmt von Messung zu Messung ab. Die Ursache dafür kann Phototoxizität oder eine Abnahme des Signals durch Ausbleichen sein. Wenn bei einer Messung deutliche phototoxische Effekte auftreten, z.B. starke Aktionspotentialverbreiterung oder andere Unregelmäßigkeiten in der Aktionspotentialform, muß auch die vorhergehende Messung genau auf Auffälligkeiten untersucht werden. Im Zweifelsfall wird die Messung verworfen. Bei vielen Zellen wird deshalb nur die erste Messung berücksichtigt.

4.7 Fortschritte und Ausblick

In dieser Arbeit konnten mehrere methodische Fortschritte erzielt werden. So gelang es, die Anfärbung der Zellen mit spannungssensitiven Farbstoffen zu vereinfachen und deren Zuverlässigkeit auf nahezu 100% zu steigern. Die bisherigen Anfärbemethoden für Vertebratenneurone waren oft die Ursache für mißlungene Messungen. Mit dieser HCl-Methode kann auch der neue Farbstoff ANNINE-5 verwendet werden, der dem bisher besten Farbstoff für Einzelzellmessungen, BNBIQ, sogar noch leicht überlegen ist. Für beide Farbstoffe wurden die auszuwählenden Filtersätze optimiert. Der neue Aufbau mit der CCD-Kamera Mi-CAM in Kombination mit der hier entwickelten Auswertung liefert ein Signal/Rausch-Verhältnis, mit dem man auch $400\mu\text{m}$ vom Soma entfernt im Dendriten noch Aktionspotentiale detektieren kann. Dazu ist keine Mittelung mehrerer Messungen nötig, wie bei vielen vorhergehenden Arbeiten. Es wird eine Fläche von $400\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ bei einer räumlichen und zeitlichen Auflösung von $4,4\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ und $0,75\text{ms}$ aufgenommen. Somit können sehr gut einzelne Neurone (Kapitel 5) und kleine Netzwerke untersucht werden. Es können bis zu 500ms lange Messungen am Stück ohne sichtbare phototoxische Effekte durchgeführt werden (Abschnitt 5.4). Erstmals werden gentechnisch veränderte Neuronen mit spannungssensitiven Farbstoffen untersucht (Kapitel 6).

Zukünftige Verbesserungen müssen darauf abzielen, die Phototoxizität zu reduzieren. Dies ist z.B. durch eine Optimierung der Lichtquelle möglich. Es soll aber nicht die eingestrahelte Lichtintensität erhöht werden, sondern durch schmalbandigere Anregung im besonders empfindlichen Spektralbereich des Farbstoffs das Signal erhöht werden. Ein Fortschritt wäre sicher auch ein größerer CCD-Chip der MiCAM. Wenn anstatt eines 1/5 inch chips ein 1/2 inch chip verwendet werden könnte, wäre die Verkleinerungsoptik mit Tubus und Fotoobjektiv überflüssig. Eine einzelne 0,4x Linse würde dann zur Verkleinerung ausreichen.

Dadurch würde weniger Licht verloren gehen und somit das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert bzw. das Anregungslicht verringert werden können. Bis jetzt sind die Mechanismen der Phototoxizität noch weitgehend unklar, doch werden mit Antioxidanzien, wie z.B. Astaxanthin [22], erste Erfolge erzielt und sollten auch hier bei zukünftigen Messungen zur Anwendung kommen.

Aus neurobiologischer Sichtweise muß auch weiterhin das Ziel sein, die hier erreichten methodischen Verbesserungen auf Slicemessungen anzuwenden und auch dort Einzelzellauflösung der optischen Messungen mit spannungssensitiven Farbstoffen zu erreichen.

Kapitel 5

Messungen von Aktionspotentialgruppen in Dendriten

Messungen im Slice zeigen, daß Aktionspotentiale, die im Axon nahe des Somas entstehen, sich auch zurück in den Dendriten fortpflanzen (Backpropagation). Dendriten von manchen Nervenzellen besitzen einen Erinnerungseffekt, der darin besteht, daß bei Aktionspotentialgruppen (Trains, Züge) spätere Aktionspotentiale nur stark gedämpft in den Dendriten hineinlaufen [75]. In diesem Kapitel wird dieser Effekt bei kultivierten hippocampalen Neuronen untersucht. Dazu werden jeweils die Amplituden zweier Aktionspotentiale im ganzen Dendriten verglichen. Es wurden vier verschiedene Meßprotokolle verwendet:

- Beim ersten werden zwei einzelne Aktionspotentiale aufgenommen, zwischen denen ein 800ms langer Train ausgelöst wird (Abschnitt 5.1; Anhang E, Protokoll 1). Eine Messung nach diesem Protokoll wurde bereits in einer früheren Doktorarbeit beschrieben [60].
- Bei einer Messung werden alle Aktionspotentiale, also auch die des Aktionspotentialzugs, einzeln ausgelöst (Abschnitt 5.2, Anhang E, Protokoll 2).
- Beim dritten werden die Aktionspotentiale des Zugs direkt untersucht, d.h. das erste und ein 700-800ms späteres Aktionspotential des Trains werden gemessen und ins Verhältnis gesetzt (Abschnitt 5.3, Anhang E, Protokoll 3).
- Beim letzten wird gezeigt, daß auch ganze Aktionspotentialgruppen optisch detektiert werden können (Abschnitt 5.4, Anhang E, Protokoll 4).

In den folgenden Abschnitten 5.1 bis 5.4 werden einzelne typische Messungen der verschiedenen Meßprotokolle beschrieben.

5.1 Protokoll 1: AP-Train-AP

Bei diesem Meßprotokoll (Anhang E, Protokoll 1) werden zwei Aktionspotentiale optisch detektiert und miteinander verglichen, zwischen denen 800ms lang Aktionspotentiale ausgelöst werden. Die beiden Aktionspotentiale werden hier genau getriggert ausgelöst, weshalb kurze Belichtungszeiten möglich sind. Dies reduziert phototoxische Effekte. Außerdem starten und enden die untersuchten Aktionspotentiale am Ruhepotential. Dadurch wird die Datenauswertung erleichtert, da eine Grundlinie (= Ruhepotential) zur Berechnung von $\Delta F/F$ vorhanden ist.

Zusätzlich zur Triggerung eines Aktionspotentials wird eine Hyperpolarisation durch einen kurzen hyperpolarisierenden und einen depolarisierenden Puls erzeugt. Es entsteht eine Art Aktionspotential mit negativem Vorzeichen, das sich rein passiv ausbreitet. So kann der Unterschied zwischen aktiver und passiver Ausbreitung sichtbar gemacht werden. Anschließend wird sehr häufig noch ungewollt ein Aktionspotential ausgelöst, weil der zweite, depolarisierende Puls den ersten, hyperpolarisierenden überkompensiert. Eine genaue Anpassung der beiden aneinander durch Pulshöhe und -dauer ist nicht möglich, weil die benötigten Kompensationsströme von Messung zu Messung zu variabel sind. Die beiden Pulse werden deshalb gleich lang und gleich hoch mit unterschiedlichem Vorzeichen gewählt.

Es wurden insgesamt 11 Messungen an 5 Zellen ausgewertet. Bei diesen Messungen wird Standard-Patch-Pipettenlösung (Anhang C) verwendet. Da die Messungen innerhalb weniger Minuten nach dem Patchen durchgeführt werden, kommt es noch zu keiner Auslaugung der Zellen. Bei den Messungen in den nächsten Abschnitten werden der Pipettenlösung trotzdem zur Sicherheit energiereiche Substanzen (ATP, GTP und Phosphocreatin) zugefügt. Im folgenden werden drei typische Messungen mit gutem Signal/Rausch-Verhältnis vorgestellt:

Messung von Abbildung 5.1, 5.2 und 5.3

Das untersuchte Neuron (Abb.5.1) besitzt einen $280\mu\text{m}$ langen Dendriten mit nur wenigen feinen Abzweigungen. Morphologisch hat es somit Ähnlichkeiten mit einer Pyramidalzelle im Cortex (Abb.1.1). Im distalen Bereich hat die Zelle Kontakt zu Gliazellen und anderen Neuronen. Die Zelle wurde 8 Tage kultiviert. Das Ruhepotential liegt am Anfang bei -61mV und die maximale Depolarisation beim ersten Aktionspotential bei $+31\text{mV}$. Das zweite optisch untersuchte Aktionspotential bei 940ms startet bei -56mV und depolarisiert zu $+21\text{mV}$. Die Zelle wird zwischen diesen beiden Aktionspotentialen stimuliert und feuert mit einer Frequenz von 12Hz . Die Maximalamplituden nehmen dabei leicht von $+22\text{mV}$ auf $+16\text{mV}$ ab und das Repolarisationspotential zwischen den Spikes steigt von -48mV auf -43mV . Im Anschluß an die Hyperpolarisationen kommt es jeweils zur Auslösung eines Aktionspotentials.

Auf der gesamten Länge des Dendritenstamms können optische Signale gemessen werden. Durch die Verwendung des negativen Fluoreszenzänderungsbereichs des spannungssensitiven Farbstoffs BNBIQ führen Depolarisationen der Zelle zu einer negativen Fluoreszenzänderung, d.h. das Signal geht nach unten und bei der Hyperpolarisation nach oben. Die relative Fluoreszenzänderung am Soma beträgt 1% bei einem hohen Signal/Rausch-Verhältnis von etwa $15/1$ und entsprechend 2% im distalen Dendriten bei einem niedrigeren

Signal/Rausch-Verhältnis von etwa 6/1.

Das erste Aktionspotential ändert seine Form im Dendriten nicht signifikant (Abb.5.2). Das spätere behält auch seine Form, ist aber im Vergleich zum ersten an der fallenden Flanke verbreitert (Halbwertsbreite 67% größer als beim ersten Spike) und erreicht nicht mehr die gleiche Maximalamplitude. Wird die Amplitude des Aktionspotentials bei 940ms zum ersten ins Verhältnis gesetzt (Abb.5.3), so zeigt sich nur eine leichte Abnahme im Dendriten von $-3\%/100\mu\text{m} \pm 2,6\%/100\mu\text{m}$. Diese Zelle zeigt also kein aktivitätsabhängiges Zurücklaufen der Aktionspotentiale in den Dendriten. Die Verhältnisse der Amplituden am Soma von Elektrophysiologie und optischer Messung stimmen im Rahmen der Meßgenauigkeit überein (0,84 und 0,80).

In Abb.5.2 sind die Fluoreszenzsignale aller Pixel auf das Maximum der Aktionspotentialamplitude normiert dargestellt. Mit der Zeitaufösung der Kamera von 0,75ms ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit nicht auflösbar, ist also schneller als $280\mu\text{m}/0,75\text{ms} = 37\text{cm/s}$. Man erkennt die Dämpfung der Hyperpolarisation im Dendriten durch eine Verbreiterung der Hyperpolarisationsspitze im Vergleich zur normierten Aktionspotentialamplitude.

Messung von Abbildung 5.4, 5.5 und 5.6

Bei dieser Zelle (Abb.5.4) gehen vom Soma zwei starke Dendriten in entgegengesetzter Richtung ab. Die Zelle ist wahrscheinlich in ein Netzwerk eingebunden (morphologischer Kontakt zu dem Neuron im Bild oben). Sie wurde 7 Tage kultiviert. Die Zelle wird leicht hyperpolarisiert, um eine spontane Aktivität zu unterbinden. Das erste Aktionspotential startet bei -70mV und erreicht sein Maximum bei +16mV, das Aktionspotential nach dem Zug bei -59mV bzw. bei +20mV. Der Train hat mit 24Hz eine hohe Spikefrequenz. Die Amplituden nehmen dabei stetig von +10mV auf -3mV ab und das Repolarisationspotential steigt von -49mV auf -37mV an. Beim anschließend einzeln ausgelösten Aktionspotential kommen diese Effekte trotz des geringen Zeitabstands nicht mehr zum Tragen und werden durch die Repolarisation auf -59mV gelöscht. Die langsame Verbreiterung an der fallenden Flanke der Aktionspotentiale bleibt jedoch erhalten. Die Halbwertsbreite des Aktionspotentials steigt dabei von 4ms auf 8ms (+100%). Den Hyperpolarisationen folgt jeweils ein Aktionspotential.

Auf $240\mu\text{m}$ des Dendriten werden Signale gemessen. Das Signal/Rausch-Verhältnis liegt zwischen 20/1 am Soma und 10/1 im distalen Dendriten bei 4% bzw. 2% relativer Fluoreszenzänderung.

Die Form der beiden optisch gemessenen Aktionspotentiale (Abb.5.5) ist jeweils im ganzen Dendriten gleich. Die ins Verhältnis (Abb.5.6) gesetzten Spikeamplituden ergeben eine Steigung von $0,9\%/100\mu\text{m} \pm 1,8\%/100\mu\text{m}$ und somit keine Aktivitätsabhängigkeit. Die optisch und elektrophysiologisch gemessenen Amplitudenverhältnisse am Soma stimmen überein (0,91 und 0,92).

Die überlagerten Fluoreszenzsignale in Abb.5.5 können die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Aktionspotentiale nicht auflösen. Sie liegt somit über $240\mu\text{m}/0,75\text{ms} = 32\text{cm/s}$. Auch hier ist die stärkere Dämpfung des passiven Signals gegenüber dem Aktionspotential zu erkennen.

Messung von Abbildung 5.7, 5.8 und 5.9

Das Neuron (Abb.5.4) sitzt auf einem geschlossenen Gliarase. Das Soma ist im Vergleich zu den beiden Somata der vorherigen Zellen sehr groß. Sowohl die Gliazellen, als auch die längere Kulturzeit von 11 Tagen sind hierfür verantwortlich. Vom Soma gehen drei kräftige Dendriten ab. Der längste verzweigt sich bei $170\mu\text{m}$ vom Soma. Die elektrophysiologisch gemessenen einzelnen Aktionspotentiale sind durch den Stimulationspuls verfälscht und überhöht. Die Amplituden der Trainspikes sind relativ konstant bei +24 bis +27mV und das Repolarisationspotential steigt leicht von -30mV auf -22mV an. Die Frequenz liegt bei 22Hz. Auch hier verbreitern sich die Aktionspotentiale. Nur der ersten Hyperpolarisation folgt ein Aktionspotential.

Die Aktionspotentiale können trotz des Gliarases $360\mu\text{m}$ im Dendriten verfolgt werden. Das Signal/Rausch Verhältnis nimmt dabei von 20/1 auf 4/1 bei einer relativen Fluoreszenzänderung von 3% bzw. 1% ab.

Auch hier kann im Rahmen der Meßgenauigkeit keine Formänderung des Aktionspotentials im Dendriten festgestellt werden (Abb.5.8). Das Amplitudenverhältnis (Abb.5.9) steigt mit dem Abstand zum Soma um $4,1\%/100\mu\text{m} \pm 1,5\%/100\mu\text{m}$ leicht an, ist aber trotzdem als nicht aktivitätsabhängig zu bezeichnen. Die hier besonders auffälligen wellenförmigen Schwankungen sind auf zeitliche Untergrundschwankungen bei der Messung und anschließende Filterung bei der Datenauswertung zurückzuführen.

Bei dieser Messung kann die Ausbreitungsgeschwindigkeit mit 16cm/s angegeben werden (Abb.5.8). Der Hyperpolarisationspuls ist am Ende des Dendriten fast komplett weggedämpft.

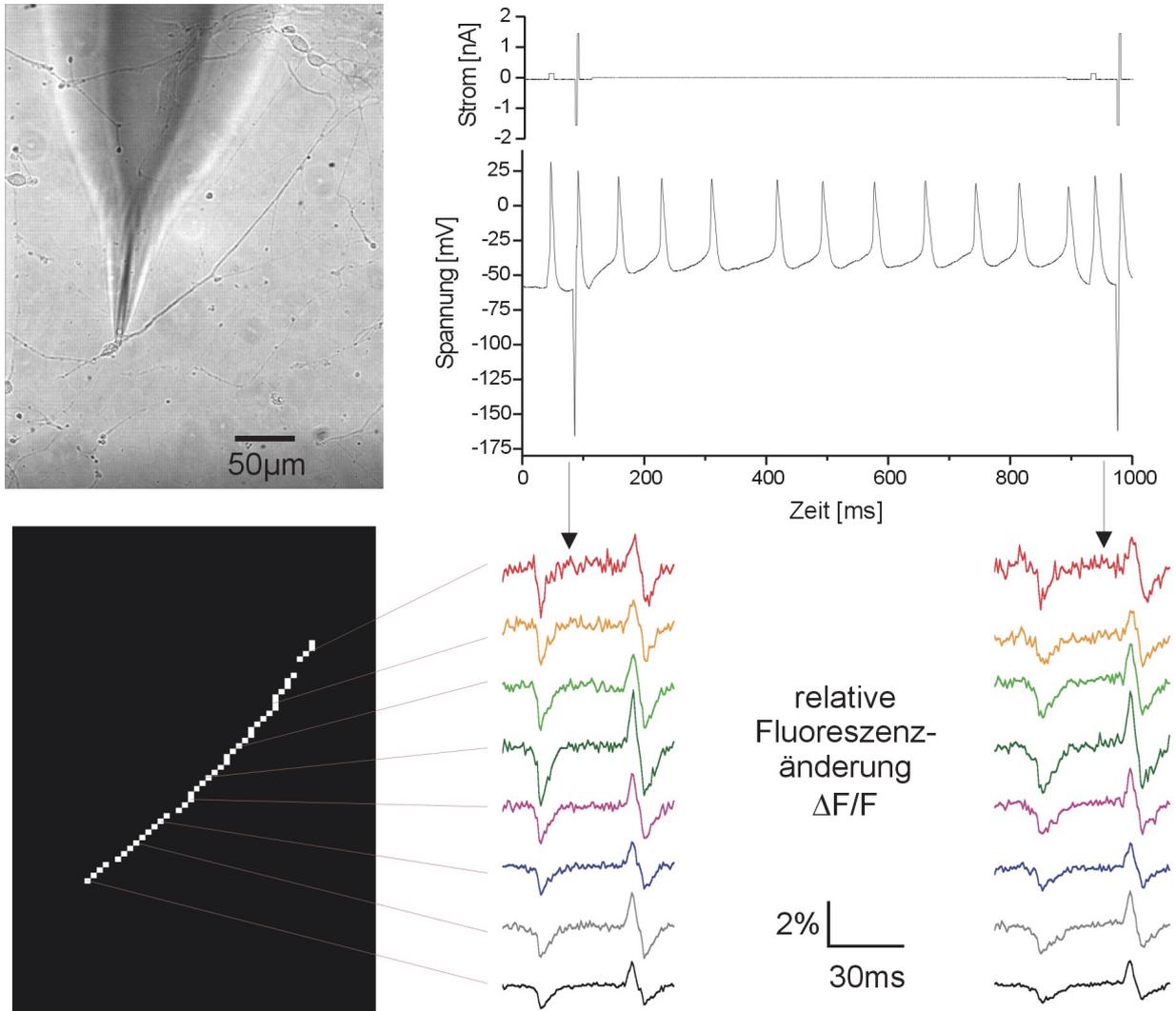


Abbildung 5.1: Die Aktionspotentiale am Soma verbreitern sich leicht an der fallenden Flanke (Zunahme der Halbwertsbreite um 67%). Diese Schulterbildung (afterdepolarization) ist im ganzen Neuriten zu beobachten. (BNBIQ, Trainfrequenz 12Hz, Kulturdauer 8d)

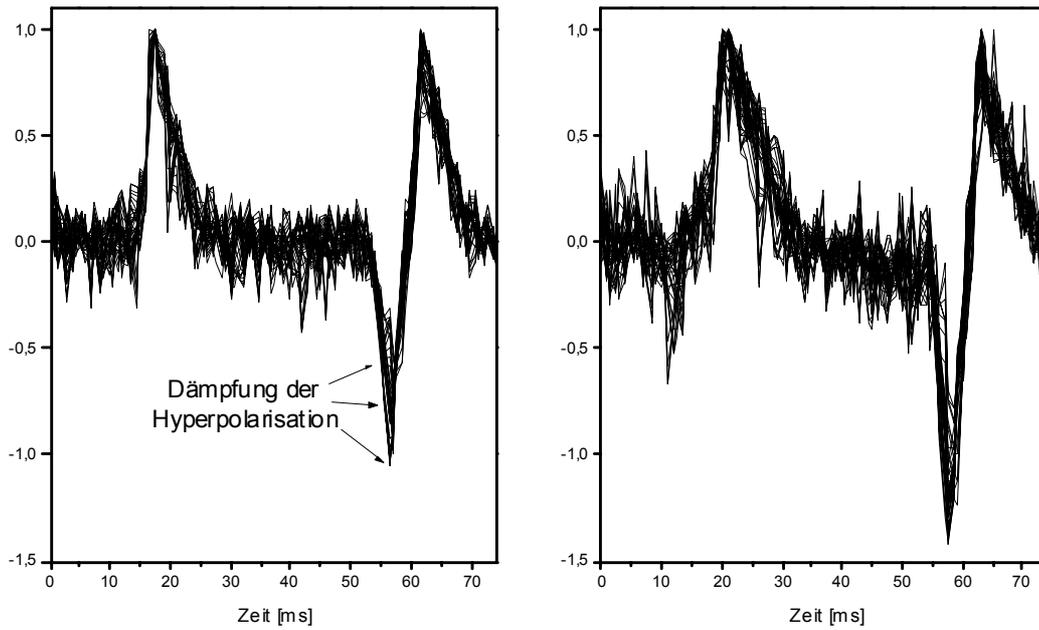


Abbildung 5.2: 1. optisches Meßfenster (links). 2. optisches Meßfenster (rechts). Die Zeitverläufe aller Pixel sind auf das Maximum des jeweils ersten Aktionspotentials normiert. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit kann nicht aufgelöst werden. Deutlich sieht man die Verbreiterung des letzten Aktionspotentials (rechts) an der fallenden Flanke im ganzen Dendriten. Die Hyperpolarisation wird stärker gedämpft als das Aktionspotential.

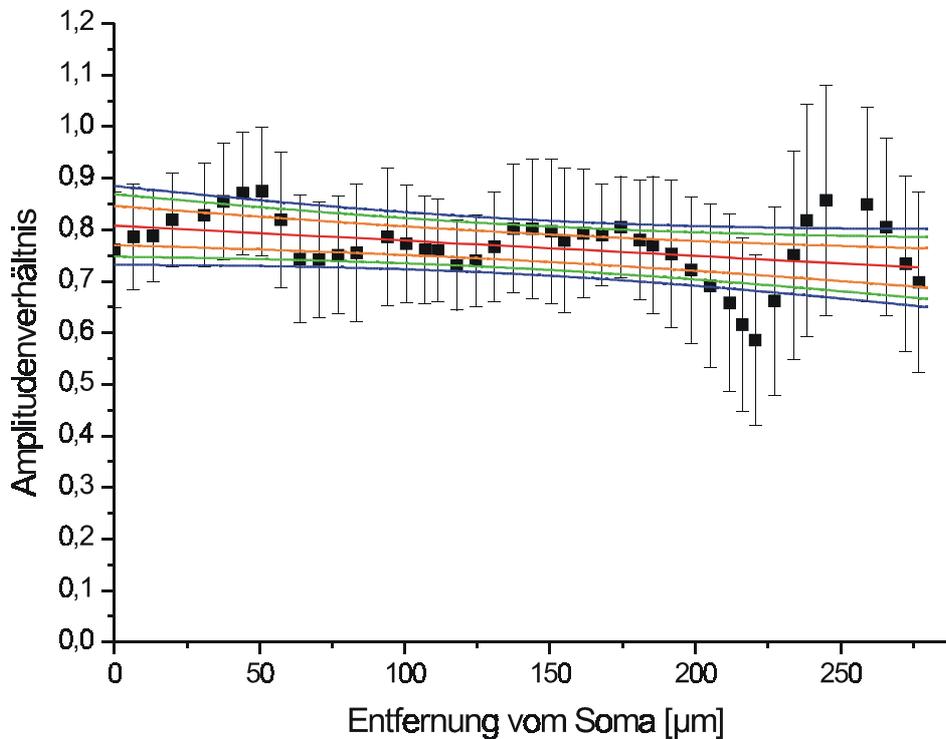


Abbildung 5.3: Diese Nervenzelle zeigt keine aktiviätsabhängige Backpropagation: Steigung $-3\%/100\mu\text{m}$ $\sigma = \pm 2,6\%/100\mu\text{m}$.

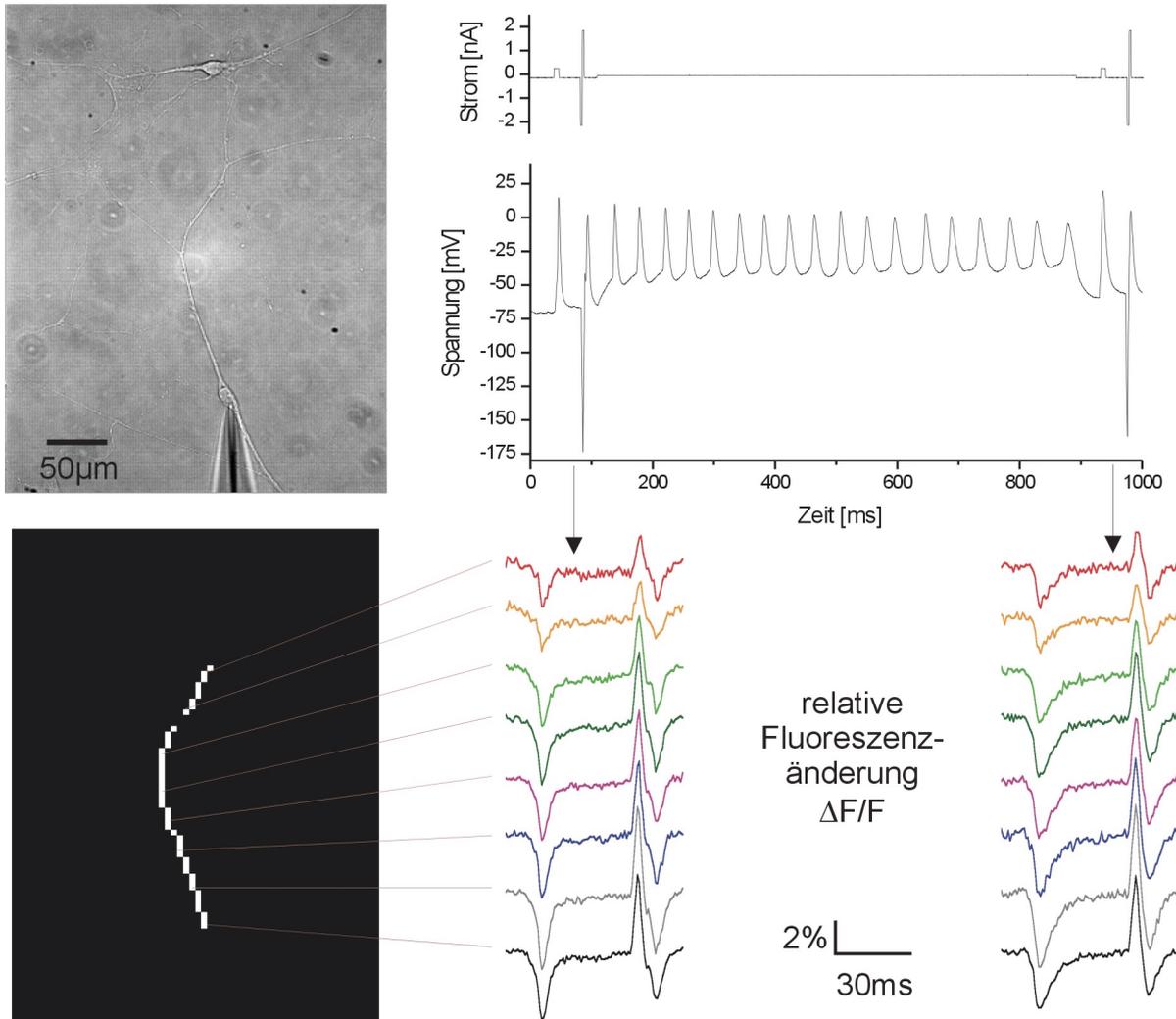


Abbildung 5.4: Die Maximalamplituden der Aktionspotentiale am Soma während des Trains nehmen leicht ab und ebenfalls das Repolarisationspotential. Man erkennt eine Verbreiterung (+100% im Vergleich zum ersten Aktionspotential) des letzten Aktionspotentials im ganzen Dendriten. (BNBIQ, Trainfrequenz 24Hz, Kulturdauer 7d)

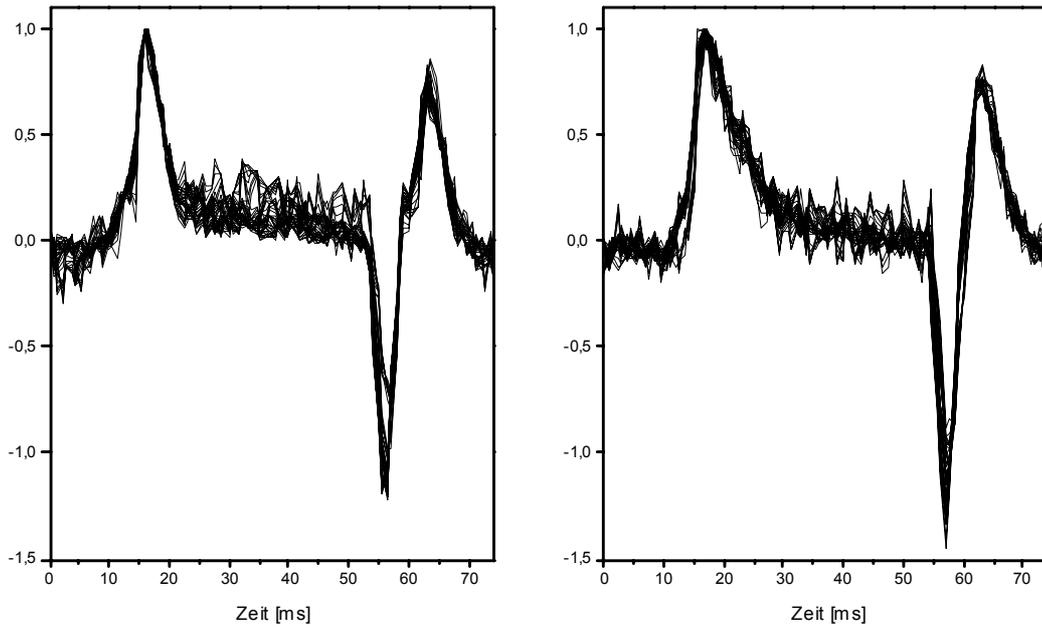


Abbildung 5.5: 1. optisches Meßfenster (links). 2. optisches Meßfenster (rechts). Die Zeitverläufe aller Pixel sind auf das Maximum des Aktionspotentials normiert. Die Steigung der fallenden Flanke des letzten Aktionspotentials ist im ganzen Dendriten deutlich flacher. Die Hyperpolarisation wird im Dendriten gedämpft.

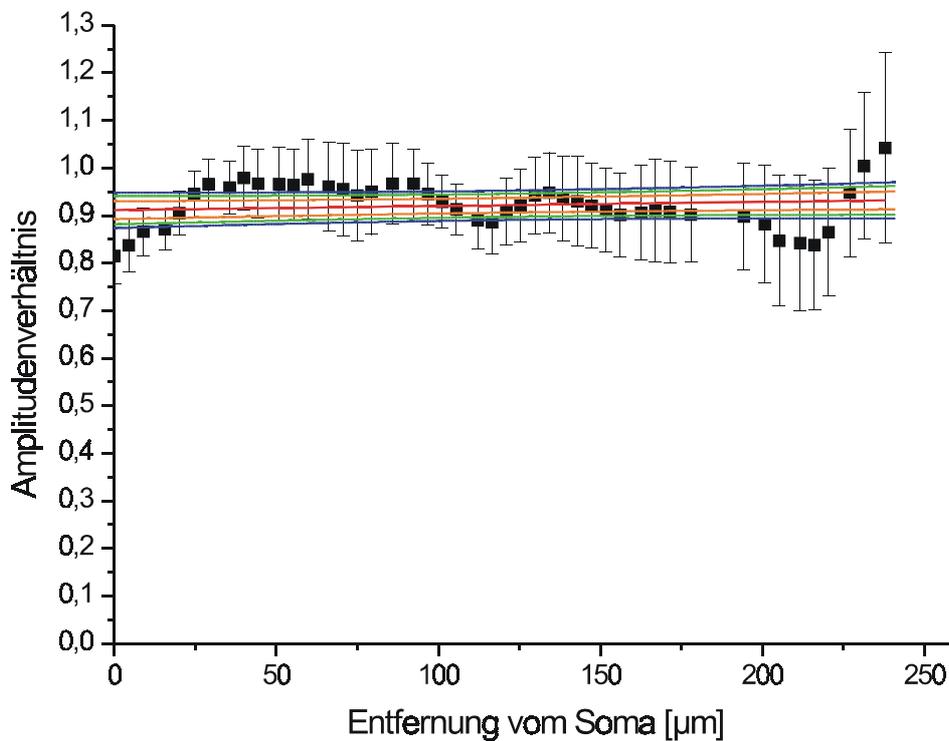


Abbildung 5.6: Die Steigung beträgt $0,9\%/100\mu\text{m}$ $\sigma = \pm 1,8\%/100\mu\text{m}$; somit zeigt dieses Neuron keine aktivitätsabhängige Backpropagation.

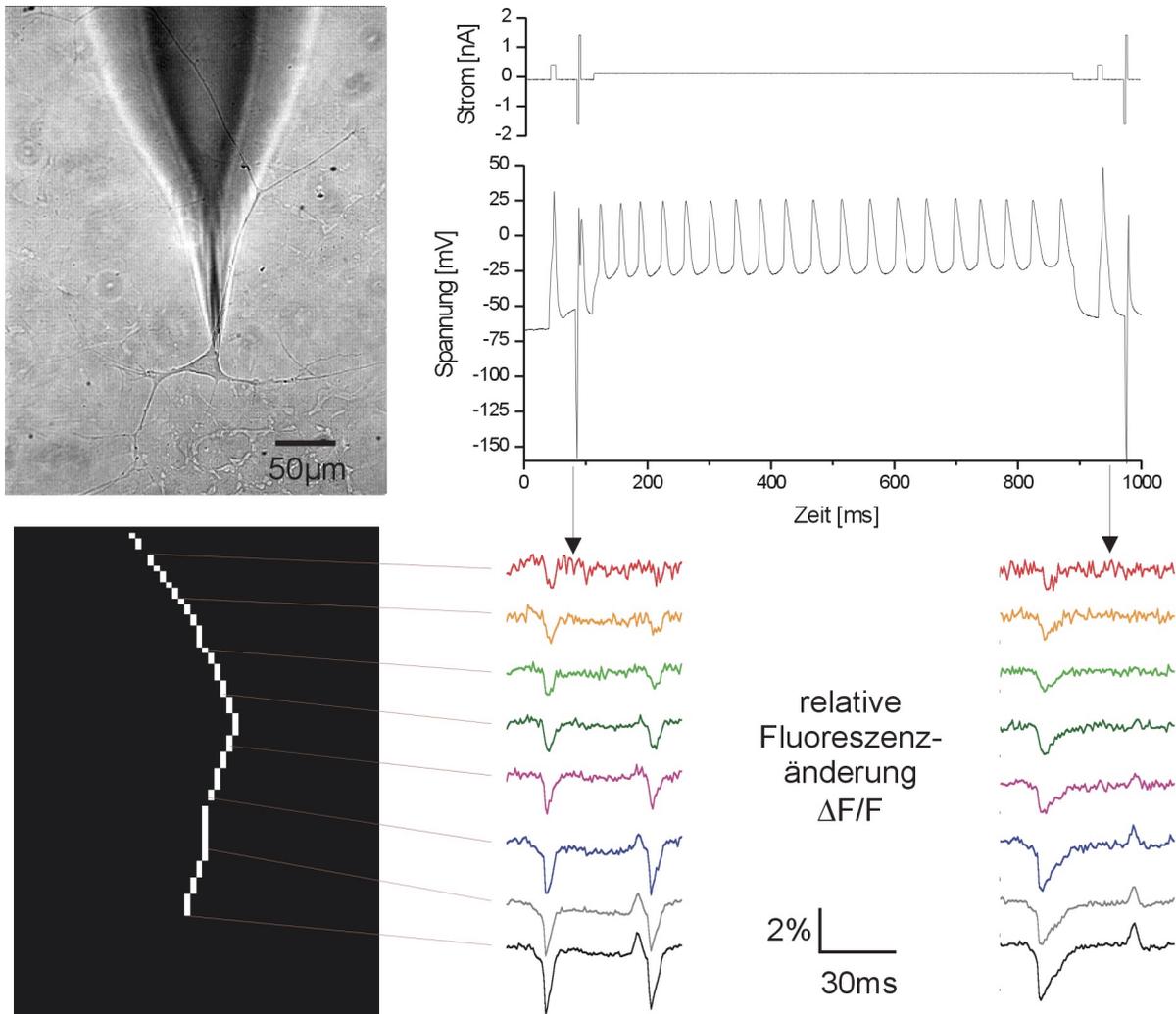


Abbildung 5.7: Die Aktionspotentiale während des Trains am Soma sind gleich hoch und werden breiter. Die Frequenz nimmt leicht ab. (BNBIQ, Trainfrequenz 22Hz, Kulturdauer 11d)

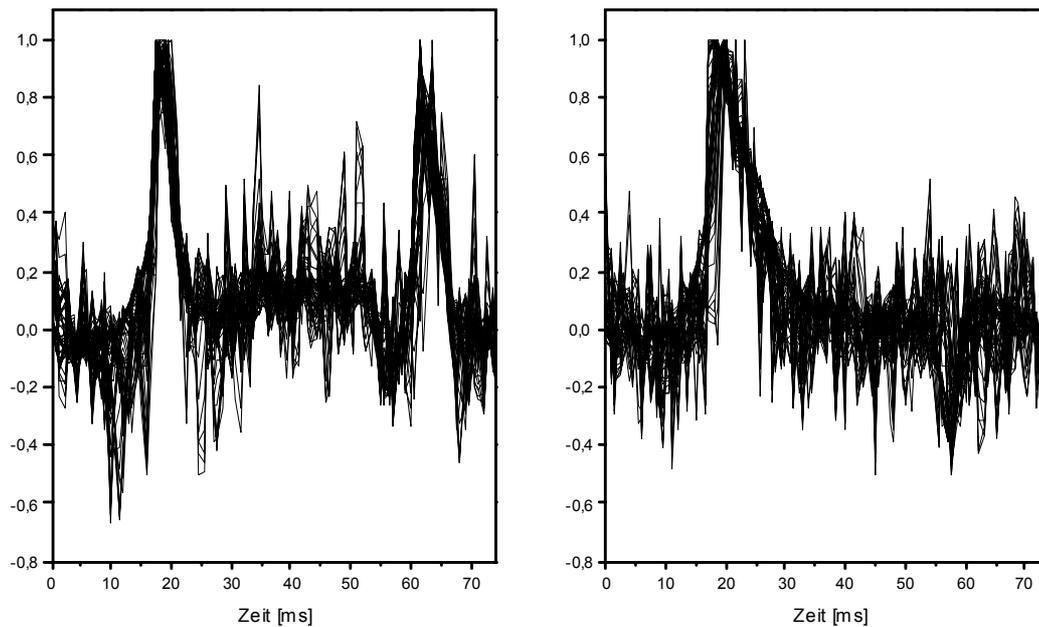


Abbildung 5.8: 1. optisches Meßfenster (links). 2. optisches Meßfenster (rechts). Die Zeitverläufe aller Pixel sind auf das Maximum des Aktionspotentials normiert. Auch bei dieser Messung verbreitert sich das Aktionspotential. Man erkennt eine ausbreitungsbedingte Verzögerung der Aktionspotentialmaxima und die Dämpfung der Hyperpolarisation.

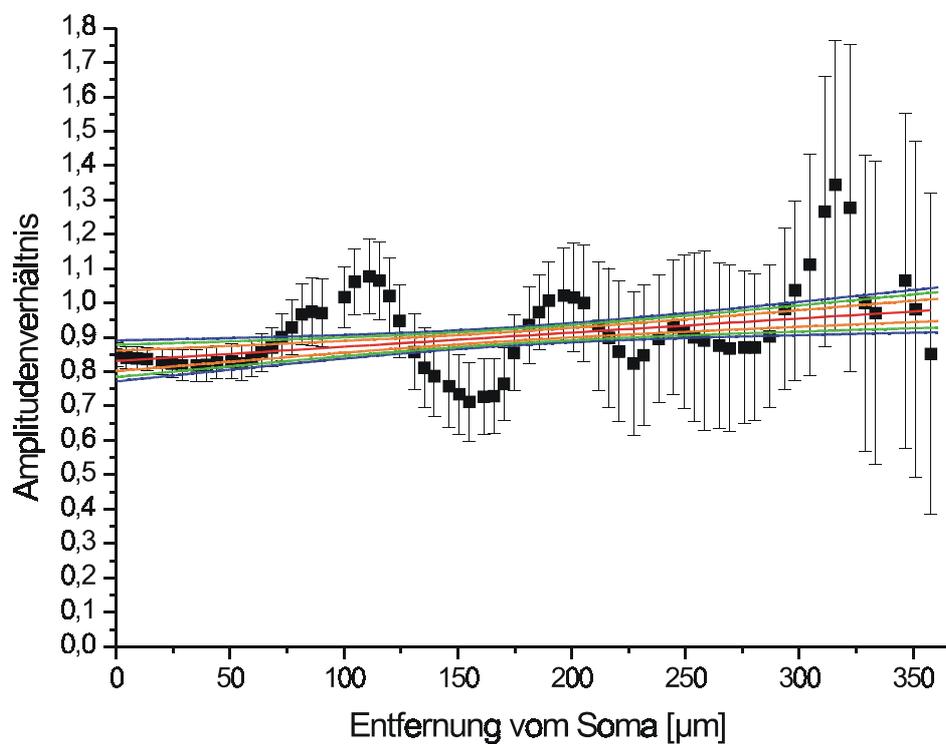


Abbildung 5.9: Auch hier ist keine Aktivitätsabhängigkeit zu erkennen. Steigung $4,1\%/100\mu\text{m}$
 $\sigma = \pm 1,5\%/100\mu\text{m}$.

5.2 Protokoll 2: AP-AP-AP-AP-...

Bei diesem Protokoll (Anhang E, Protokoll 2) werden nicht nur die optisch gemessenen Aktionspotentiale einzeln ausgelöst, sondern auch die Aktionspotentiale dazwischen und zwar alle 50ms. Das Neuron kann sich so nicht durch eine lange Strominjektion aufladen und alle Aktionspotentiale starten und enden am Ruhepotential. Bei kultivierten und mit spannungssensitiven Farbstoffen angefärbten Neuronen ist es allerdings schwierig, zuverlässig einzelne Aktionspotentiale auszulösen. Bei der Auswertung ist außerdem darauf zu achten, daß die Aktionspotentialamplitude und nicht ein eventueller Stimulationsartefakt ausgewertet wird.

Eine Messung wurde ausgewertet und wird im folgenden vorgestellt. Als intrazelluläre Lösung wurde die Patchpipettenlösung nach Spruston et al. [38] (Anhang C) verwendet.

Messung von Abbildung 5.10

Das ANNINE-5-Fluoreszenzbild zeigt, daß das untersuchte Neuron auf einem Gliarase sitzt und in Berührung mit Neuriten anderer Neurone steht. Die Kulturzeit beträgt 37 Tage. Das erste Aktionspotential startet von -46mV und erreicht seine Maximalamplitude bei $+34\text{mV}$; das Aktionspotential bei 750ms entsprechend von -35mV bzw. bei $+26\text{mV}$. Die Amplituden der dazwischen getriggerten Spikes nehmen leicht von $+30\text{mV}$ auf $+26\text{mV}$ ab. Nach beiden Hyperpolarisationen wird ein Aktionspotential ausgelöst.

Vom ganzen, $330\mu\text{m}$ langen Dendritenstamm können Signale gemessen werden. Das Signal/Rausch-Verhältnis fällt von 20/1 am Soma auf 8/1 im distalen Dendriten bei einer relativen Fluoreszenzänderung von 2,5% bzw. 1,5% ab.

Die optischen Messungen zeigen, daß sich die Aktionspotentialform im Dendriten nicht ändert, das spätere Aktionspotential an der fallenden Flanke aber leicht verbreitert ist. Werden die Amplituden ins Verhältnis gesetzt, so ergibt sich eine Steigung von $-5,6\%/100\mu\text{m} \pm 1,3\%/100\mu\text{m}$. Das Signal/Rausch (S/N)-Verhältnis ist groß genug um eine wenn auch leichte Aktivitätsabhängigkeit zu attestieren. Die Verhältnisse der elektrophysiologischen und optischen Amplituden am Soma stimmen mit 0,76 und 0,75 sehr gut überein.

Aufbau des ganzseitigen Bildes

Oben links:	Fluoreszenzbild der Nervenzelle
Oben rechts:	Elektrophysiologische Messung am Soma (Current-Clamp-Mode)
Mitte links:	Ausgewählte Pixel auf Soma und Dendrit (linearisiert)
Mitte rechts:	$\Delta F/F$ -Signal an den durch Linien angezeigten Pixeln von den durch Pfeile markierten Aktionspotentialen der Elektrophysiologie
Unten:	Verhältnis der beiden Aktionspotentialamplituden (späteres AP/erstes AP) aller ausgewählten Pixel; die Fehlerbalken der Verhältnisse sind 1σ -Fehler. Die rote Gerade ist der beste Fitwert nach der χ^2 -Methode. Die Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Gerade innerhalb der orangen Parabeln als Einhüllende liegt, ist 0,631, innerhalb der grünen 0,918 und innerhalb der blauen 0,982.

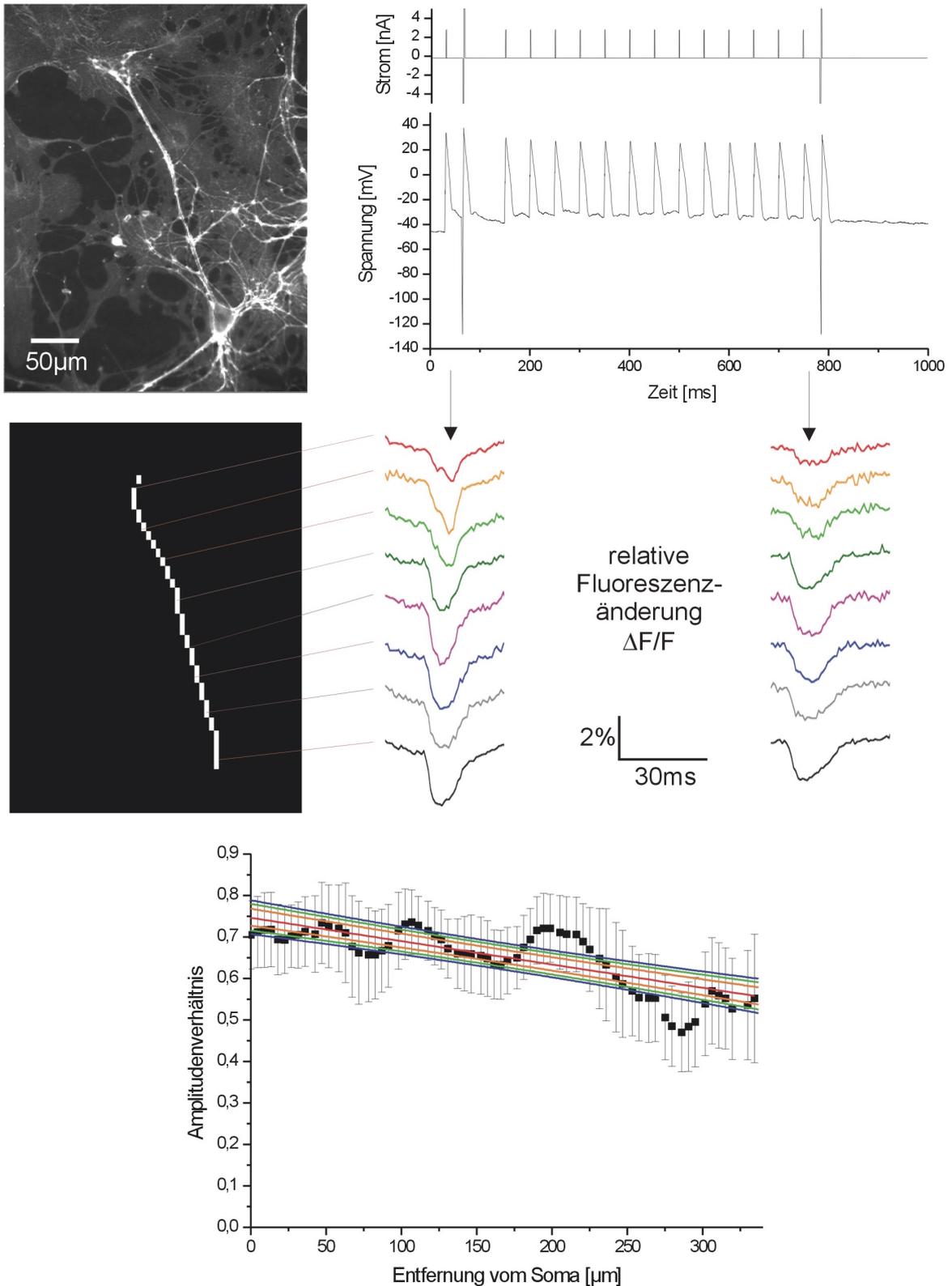


Abbildung 5.10: Die Signale zeigen ein sehr gutes S/N-Verhältnis. Die Aktionspotentiale verbreitern sich und es ist eine leicht negative Aktivitätsabhängigkeit festzustellen. (ANNINE-5, Trainfrequenz 20Hz, Steigung $-5,6\%/100\mu\text{m}$ $\sigma = \pm 1,3\%/100\mu\text{m}$, Kulturdauer 37d)

5.3 Protokoll 3: Messungen von zwei Aktionspotentialen eines Trains

Bei diesem Protokoll (Anhang E, Protokoll 3) wird ein Zug von Aktionspotentialen ausgelöst. Um photo-toxische Effekte möglichst gering zu halten, wird nur am Anfang des Trains und nach etwa 700ms optisch gemessen. Die Länge des Meßzeitfensters ist so gewählt, daß je ein Spike in diesem Zeitraum ausgelöst wird. Durch die Messung von Aktionspotentialen eines zusammenhängenden Zugs wird verhindert, daß durch eine Pause zwischen Zug und gemessenem Aktionspotential die Aktivitätsabhängigkeit vielleicht verloren geht.

Durch die Dauerstimulation werden die Neurone vom Ruhepotential depolarisiert und repolarisieren meist nicht bis zum Ruhepotential. Die Änderungen der Fluoreszenz werden dadurch geringer, und die Messung und Auswertung entsprechend schwieriger. Ein besonderes Problem der Auswertung ist das Finden einer Grundlinie zur Berechnung von $\Delta F/F$. Für die Auswertung des ersten Aktionspotential wird sie durch Meßpunkte kurz vor dem Train und solchen zwischen dem ersten und zweiten Aktionspotential gewählt. Für das spätere Aktionspotential werden die kurzen Intervalle vor und nach dem Spike zur Berechnung verwendet.

Es wurde die Intrazelluläre Lösung nach Spruston et al. [38] (Anhang C) verwendet.

Es wurden 25 Messungen von 16 Zellen ausgewertet. Davon werden im folgenden 9 charakteristische vorgestellt:

Messung von Abbildung 5.11

Die 16 Tage kultivierte Nervenzelle sitzt auf einem geschlossenen Gliarase. Viele Neurite anderer Neurone kreuzen seine Dendriten. Das Neuron besitzt einen ausgeprägten $400\mu\text{m}$ langen Dendritenstamm, von dem mehrere feine Fortsätze abzweigen. Morphologisch ähnelt dieses Neuron somit einer Pyramidalzelle (vgl. Abb. 1.1). Die Spikemaxima steigen zuerst von $+14\text{mV}$ auf $+18\text{mV}$ an und fallen dann langsam auf $+15\text{mV}$ wieder ab. Es entwickelt sich eine ausgeprägte Schulter, was zu einer Verzögerung der Repolarisation führt. Die Halbwertsbreite der Spikes wächst von $3,5\text{ms}$ auf $7,0\text{ms}$ an. Möglicherweise dadurch bedingt steigt der zeitliche Abstand zwischen den Aktionspotentialen von 48ms auf 145ms .

Auf der ganzen Länge des $400\mu\text{m}$ langen Dendriten (mit kleinen Lücken) können Signale gemessen werden. Das Signal/Rausch-Verhältnis fällt von $11/1$ am Soma auf $2/1$ in $400\mu\text{m}$ Entfernung davon bei einer relativen Fluoreszenzänderung von 2% bzw. 1% ab.

Die oben beschriebene Schulterbildung kann im ganzen Dendriten verfolgt werden. Bei der Verhältnisbildung der Amplituden ($8 \cdot \text{Spikeamplitude} / 1 \cdot \text{Spikeamplitude}$) ergibt sich bei einer Steigung von $1,5\%/100\mu\text{m} \pm 2,1\%/100\mu\text{m}$ keine Aktivitätsabhängigkeit.

Messung von Abbildung 5.12

Dieses Neuron besitzt zwei kräftige Dendriten. Es sitzt größtenteils auf dem beschichteten Glas und hat Kontakte zu Glia- und Nervenzellen. Die Form der Aktionspotentiale und deren Entwicklung ist der vor-

herigen Messung sehr ähnlich. Die Maximalamplitude nimmt von +18mV auf +21mV leicht zu, es bildet sich eine Schulter und die Spikefrequenz nimmt ab.

Das Signal/Rausch-Verhältnis liegt zwischen 12/1 und 3/1, wobei es durch eine Verbreiterung am Ende des Dendriten nochmals auf 6/1 ansteigt. Die relativen Fluoreszenzänderungen liegen zwischen 1% und 2%.

Bei der Verhältnisbildung der Spikeamplituden (6.AP-Amplitude / 1.AP-Amplitude) ergibt sich eine positive Steigung von $+7,0\%/100\mu\text{m} \pm 5,2\%/100\mu\text{m}$ und somit eine leicht positive Aktivitätsabhängigkeit. Ein späteres Aktionspotential wird im Dendriten also weniger stark gedämpft als das erste.

Messung von Abbildung 5.13

Das ANNINE-5 Fluoreszenzbild zeigt, daß die Nervenzelle in ein Netzwerk eingebunden ist. Die Kulturzeit betrug 15 Tage. Die Spikeamplituden am Soma nehmen bei einer leicht unregelmäßigen Frequenz von etwa 8Hz von +30mV auf +23mV ab. Bei dieser Messung ist bereits beim ersten Aktionspotential eine Schulter vorhanden und es folgt eine kurze und starke Repolarisation. Die Breite der Spikes bleibt fast konstant (das letzte hat eine um 12% größere Halbwertsbreite), nur die Amplitude nimmt ab. Dies ist auch beim optischen Recording im ganzen Dendriten festzustellen. Beim Amplitudenverhältnis des 6. zum 1. Aktionspotential ergibt sich eine Steigung von $-1,0\%/100\mu\text{m} \pm 2,4\%/100\mu\text{m}$. Die Backpropagation ist hier somit nicht aktivitätsabhängig.

Das Signal/Rausch-Verhältnis nimmt von 28/1 am Soma auf 2/1 in 350 μm Entfernung davon ab. Die entsprechenden relativen Fluoreszenzänderungen sind 5% bzw. 0,5%.

Messungen von Abbildung 5.14, 5.15 und 5.16

Alle drei Zellen wurden 15 Tage kultiviert. Sie unterscheiden sich aber stark in ihren Umweltbedingungen: Die Zellen von Abb. 5.11 und 5.13 sitzen auf Gliazellen in engem Kontakt mit anderen Neuronen, wogegen die Zelle von Abb. 5.12 eine Einzelzelle auf dem beschichteten Gläschen ist. Auch die Spikefrequenzen variieren stark von 8Hz bis 24Hz. In Abb. 5.11 nimmt die Spikeamplitude innerhalb der ersten vier Aktionspotentiale stark ab, während sie in Abb. 5.13 leicht aber stetig zunimmt. Werden aber die Amplitudenverhältnisse (Amplitude des Spikes bei etwa 700ms nach Trainbeginn zur ersten Spikeamplitude) gebildet, so ergeben sich bei allen drei Zellen Steigungen, die im Rahmen der Meßgenauigkeit keine Aktivitätsabhängigkeit anzeigen. Die Messungen sind mit leichten Schwankungen an einer Zelle reproduzierbar: Auch die jeweils 2. Messung zeigt keine Aktivitätsabhängigkeit.

Messung von Abbildung 5.17

Das 19 Tage kultivierte Neuron ist stark verzweigt und liegt auf dem beschichteten Gläschen auf. Derartig lange Kulturzeiten ohne Gliazellen sind sehr schwierig zu erreichen. Die Spikes sind verglichen mit anderen Messungen schnell. Die Spikemaxima gehen von +23mV leicht auf +17mV zurück. Die Aktionspotentialfrequenz fällt leicht ab und beträgt etwa 20Hz. Werden die Amplituden der relativen Fluoreszenzänderung des 15. Aktionspotentials zum 1. ins Verhältnis gesetzt, ergibt der Fit eine Steigung von $-7,7\%/100\mu\text{m} \pm 4,7\%/100\mu\text{m}$ und somit eine leicht negative Aktivitätsabhängigkeit.

Das Signal/Rausch-Verhältnis fällt von 12/1 am Soma auf 3/1 im Dendriten 250 μ m vom Soma ab. Die relative Fluoreszenzänderung bleibt dabei konstant bei etwa 1%.

Messung von Abbildung 5.18

Das pyramidalförmige Neuron sitzt auf Gliazellen. Es besitzt einen kräftigen 320 μ m langen Dendritenstamm, der aber nicht überdurchschnittlich stark ist (anderer Bildmaßstab!). Sowohl die Maximalamplituden der Spikes (+32mV) als auch die Frequenz (10Hz) sind relativ gleichmäßig. Die Spikes entwickeln im zeitlichen Verlauf eine Schulter an der fallenden Flanke. Im ganzen Dendriten werden schöne Signale gemessen (Signal/Rausch-Verhältnis zwischen 16/1 und 8/1). Die relativen Fluoreszenzänderungen betragen 4% bis 2%. Werden die Amplituden des 8. Aktionspotentials zu denen des 1. ins Verhältnis gesetzt, ergibt sich eine deutliche negative Aktivitätsabhängigkeit von $-10,0\%/100\mu\text{m} \pm 2,1\%/100\mu\text{m}$.

Messung von Abbildung 5.19

Das 37 Tage kultivierte Neuron besitzt einen stark verzweigten Dendritenbaum. Die Spikes sind im Vergleich zu den anderen Messungen extrem schnell (Halbwertsbreite 1,4ms bis 1,7ms). Das Neuron in Abb. 5.14 mit seinen ebenfalls weit verästelten Dendriten zeigt vergleichbar schnelle Spikes. Die Repolarisation, der Potentialverlauf zwischen den Spikes und die relative Konstanz der Aktionspotentialform ist mit der Messung von Abb. 5.10 vergleichbar. Werden Amplitudenverhältnisse gebildet, ergibt sich auch hier, wie in Abb. 5.15 ersichtlich, eine negative Aktivitätsabhängigkeit von $-10,3\%/100\mu\text{m} \pm 3,3\%/100\mu\text{m}$.

Das Signal/Rausch-Verhältnis nimmt von 12/1 auf 8/1 bei einer relativen Fluoreszenzänderung von etwa 1% ab.

Aufbau der ganzseitigen Bilder

Oben links:	Phasenkontrast- oder Fluoreszenzbild der Nervenzelle; bei den Phasenkontrastbildern sieht man die Patchpipette
Oben rechts:	Elektrophysiologische Messung am Soma (Current-Clamp-Mode)
Mitte links:	Ausgewählte Pixel auf Soma und Dendrit (linearisiert)
Mitte rechts:	$\Delta F/F$ -Signal an den durch Linien angezeigten Pixeln von den durch Pfeile markierten Aktionspotentialen der Elektrophysiologie
Unten:	Verhältnis der beiden Aktionspotentialamplituden (späteres AP/erstes AP) aller ausgewählten Pixel; bei manchen Zellen werden die Ergebnisse von zwei aufeinander folgenden Messungen gezeigt. Die Fehlerbalken der Verhältnisse sind 1σ -Fehler. Die rote Gerade ist der beste Fit nach der χ^2 -Methode. Die Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Gerade innerhalb der orangen Parabeln als Einhüllende liegt, ist 0,631, innerhalb der grünen 0,918 und innerhalb der blauen 0,982.

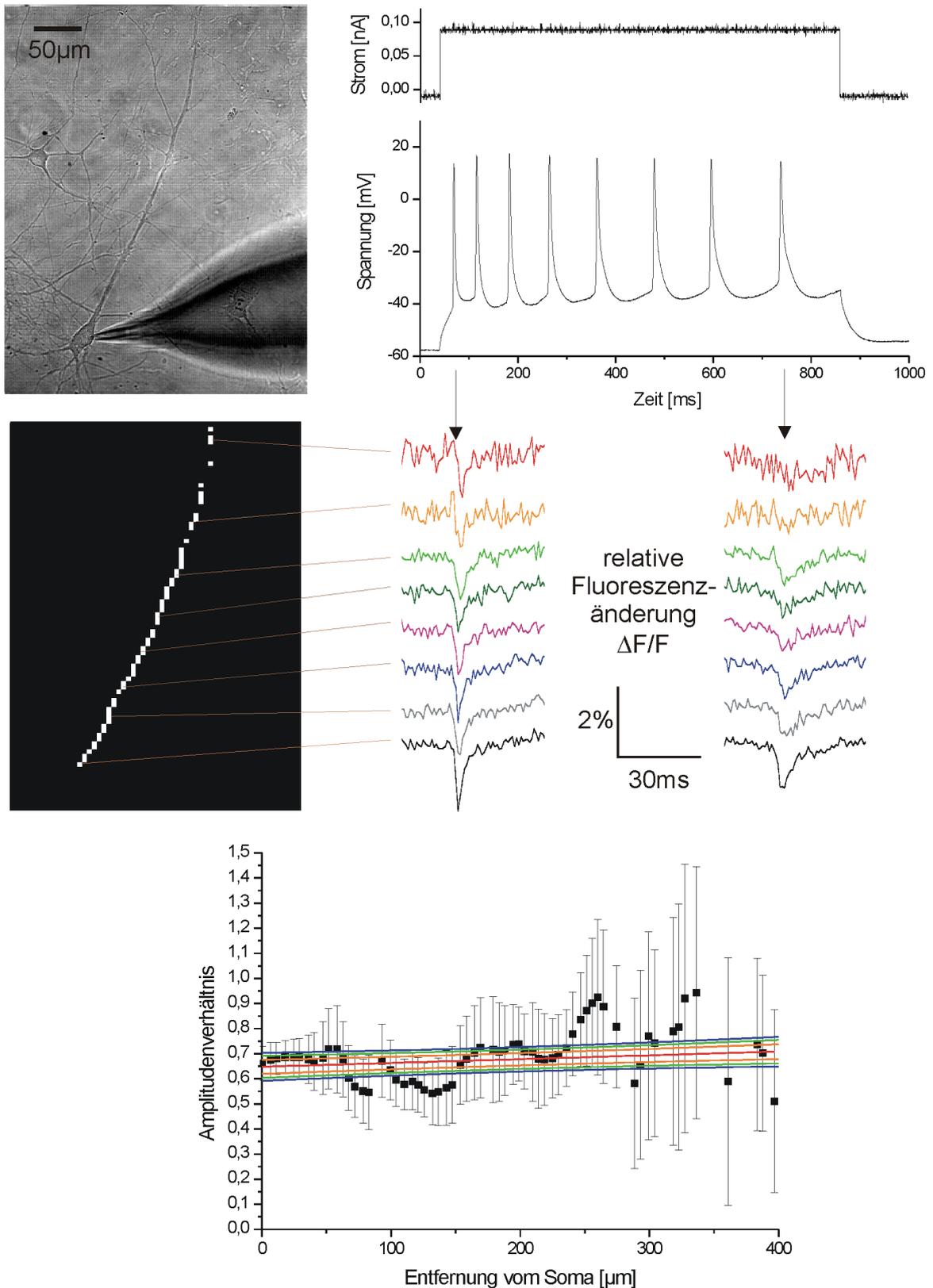


Abbildung 5.11: Morphologisch ist dies eine typische Pyramidalzelle (ein apikaler und viele basale Dendriten, vgl. Abb.1.1). Die Frequenz des Trains nimmt stetig ab. Die Aktionspotentiale verbreitern sich ebenfalls stetig (Halbwertsbreite steigt von 3,5ms auf 7,0ms), auch im Dendriten. Keine Aktivitätsabhängigkeit der Amplitude. (ANNINE-5, Steigung 1,5%/100µm $\sigma = \pm 2,1\%/100\mu\text{m}$, Kulturdauer 16d)

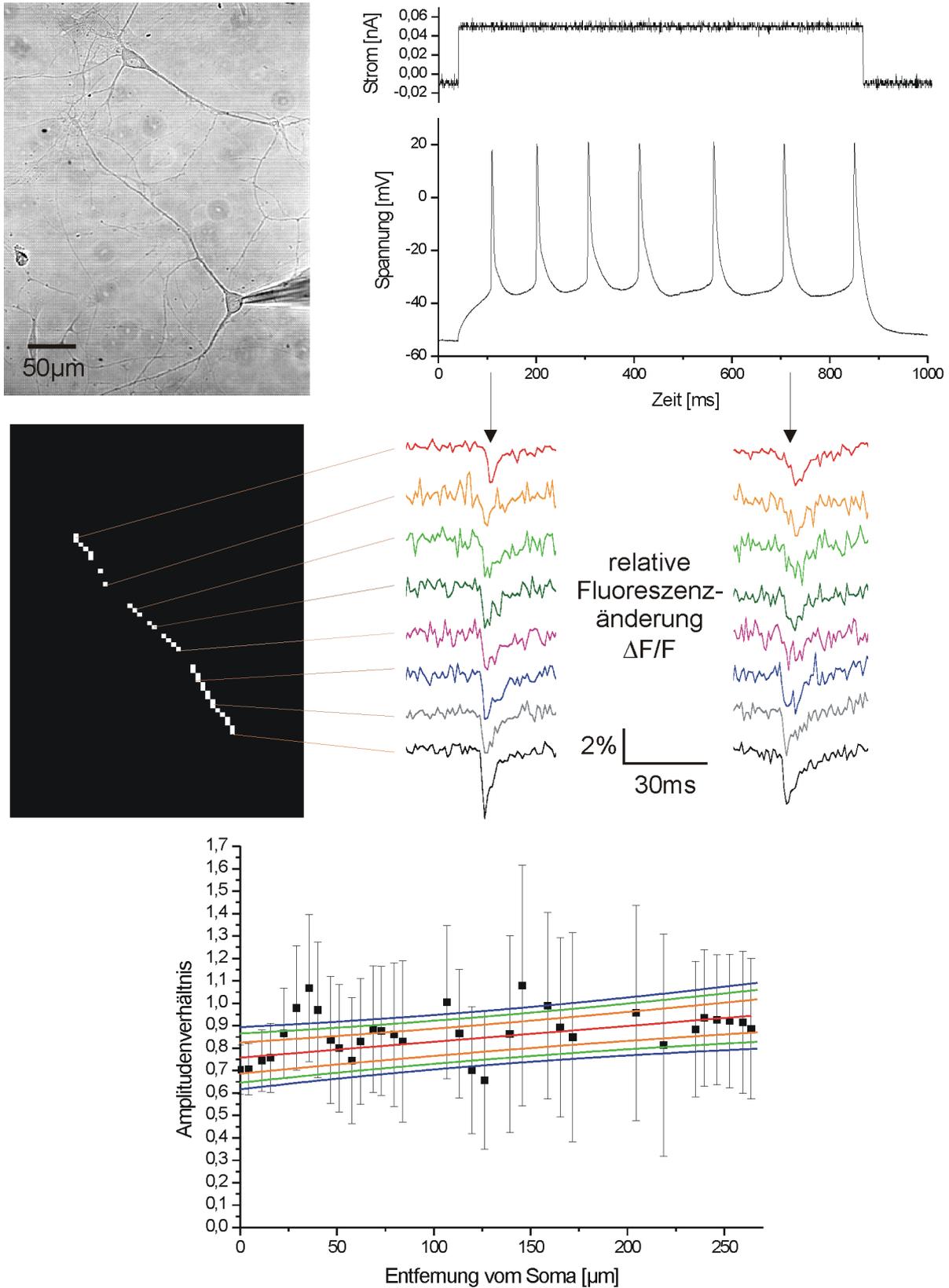


Abbildung 5.12: Die Frequenz nimmt während des Trains ab und die Aktionspotentialbreite bei leichter positiver Aktivitätsabhängigkeit stetig zu. (ANNINE-5, Steigung 7%/100µm $\sigma = \pm 5,2\%/100\mu\text{m}$, Kulturdauer 14d, zweite Messung)

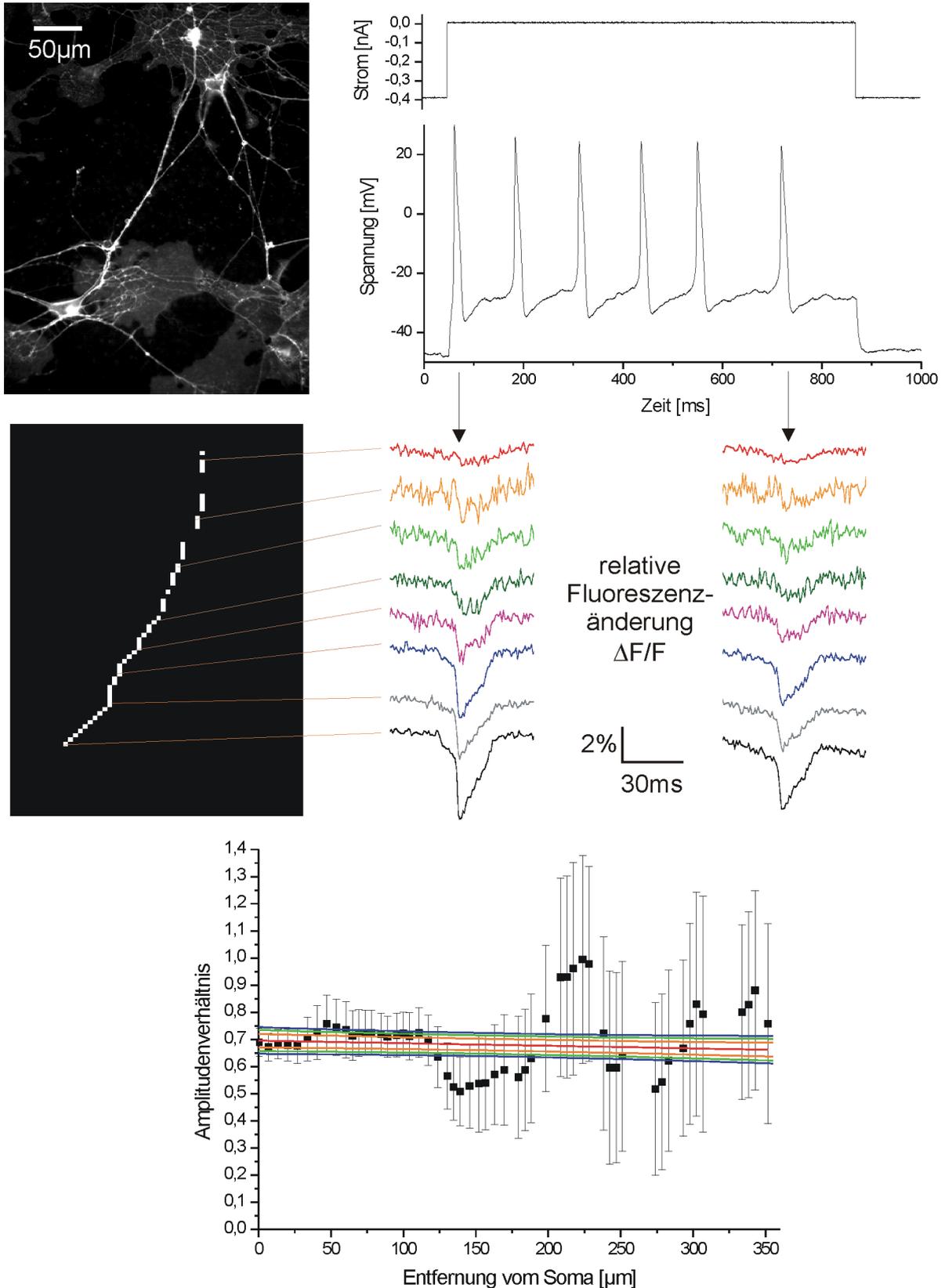


Abbildung 5.13: Gleichmäßige Aktionspotentialform während des Bursts im ganzen Dendriten, eine deutliche Schulter und eine anschließend starke Hyperpolarisation sind zu erkennen. Die Zelle zeigt keine Aktivitätsabhängigkeit der Spikeamplituden. (ANNINE-5, Trainfrequenz 8Hz, Steigung $-1\%/100\mu\text{m}$ $\sigma = \pm 2,4\%/100\mu\text{m}$, Kulturdauer 15d)

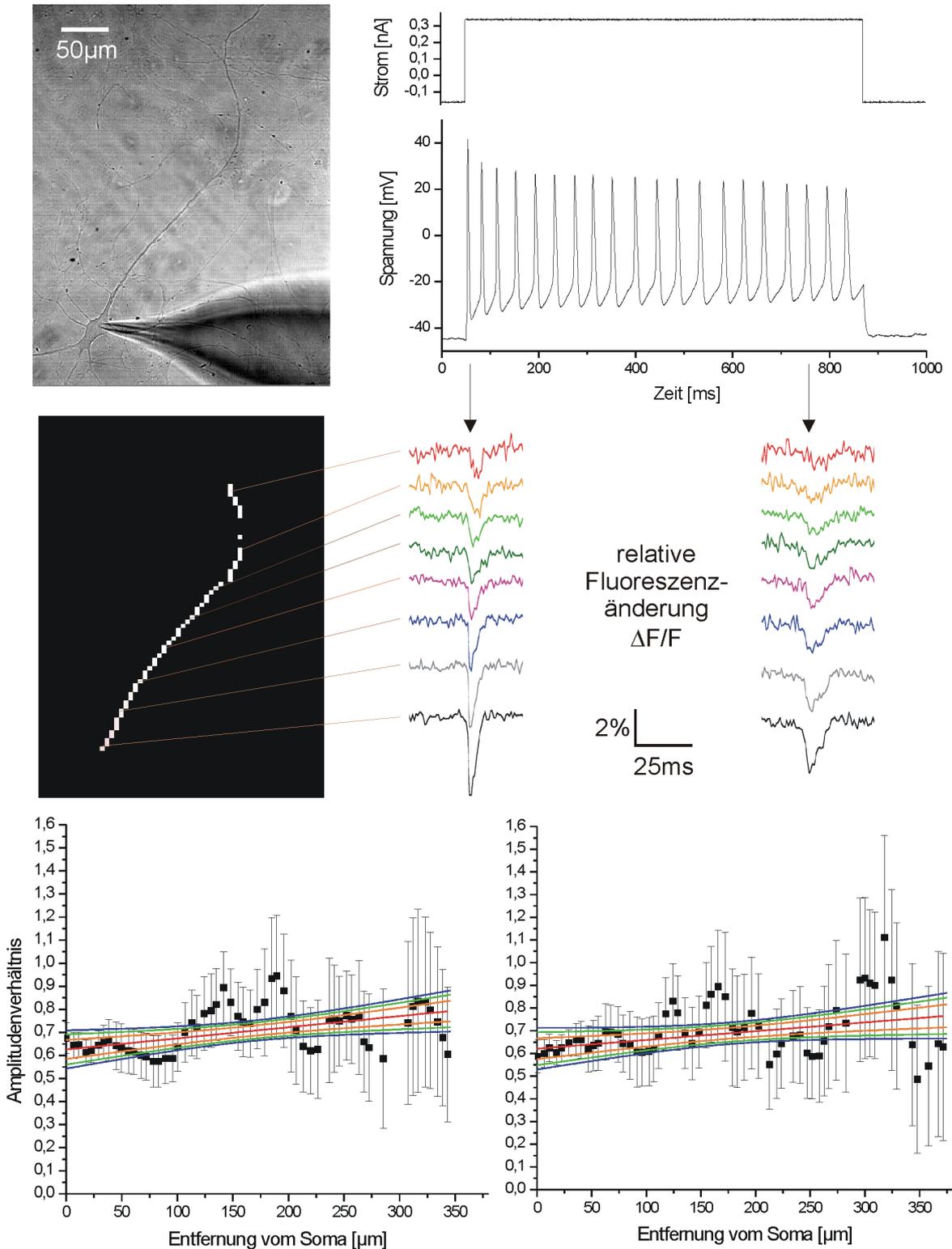


Abbildung 5.14: Morphologisch ist dies eine typische Pyramidalzelle (vgl. Abb. 1.1). Am Soma nimmt die Spike-Amplitude während der ersten drei Aktionspotentiale ab. Die Frequenz bleibt konstant. Im ganzen Dendriten verbreitert sich das Aktionspotential (die Halbwertsbreite steigt um 133%). Eine leichte positive Aktivitätsabhängigkeit der Spikeamplitude ist zu erkennen. (ANNINE-5, Trainfrequenz 24Hz, Steigung Messung 1 unten links 4,8%/100µm $\sigma = \pm 2,1\%/100\mu\text{m}$, Messung 2 unten rechts 3,9%/100µm $\sigma = \pm 2,1\%/100\mu\text{m}$, zeitlicher Abstand der beiden Messungen 1min, Kulturdauer 15d)

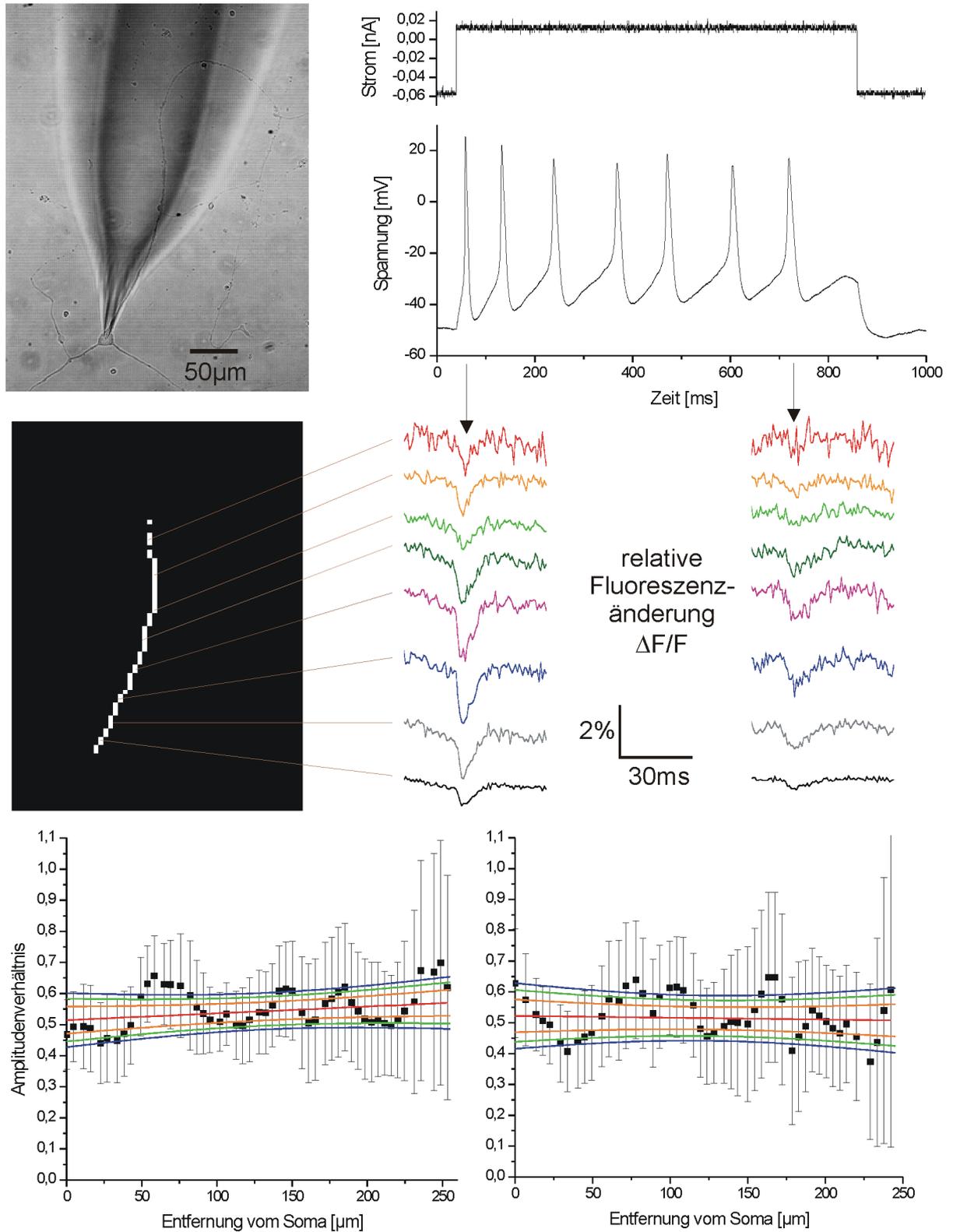


Abbildung 5.15: Die Messung zeigt eine leichte Breitenzunahme, eine Amplitudenabnahme und eine zurückgehende Hyperpolarisation der Aktionspotentiale und keine Aktivitätsabhängigkeit der Amplituden bei geringer Spike-Frequenz (8Hz). (BNBIQ, Trainfrequenz 9Hz, Steigung Messung 1 unten links 2,2%/100μm $\sigma = \pm 3,2\%/100\mu\text{m}$, Messung 2 unten rechts -0,6%/100μm $\sigma = \pm 3,8\%/100\mu\text{m}$, zeitlicher Abstand der beiden Messungen 30s, Kulturdauer 15d)

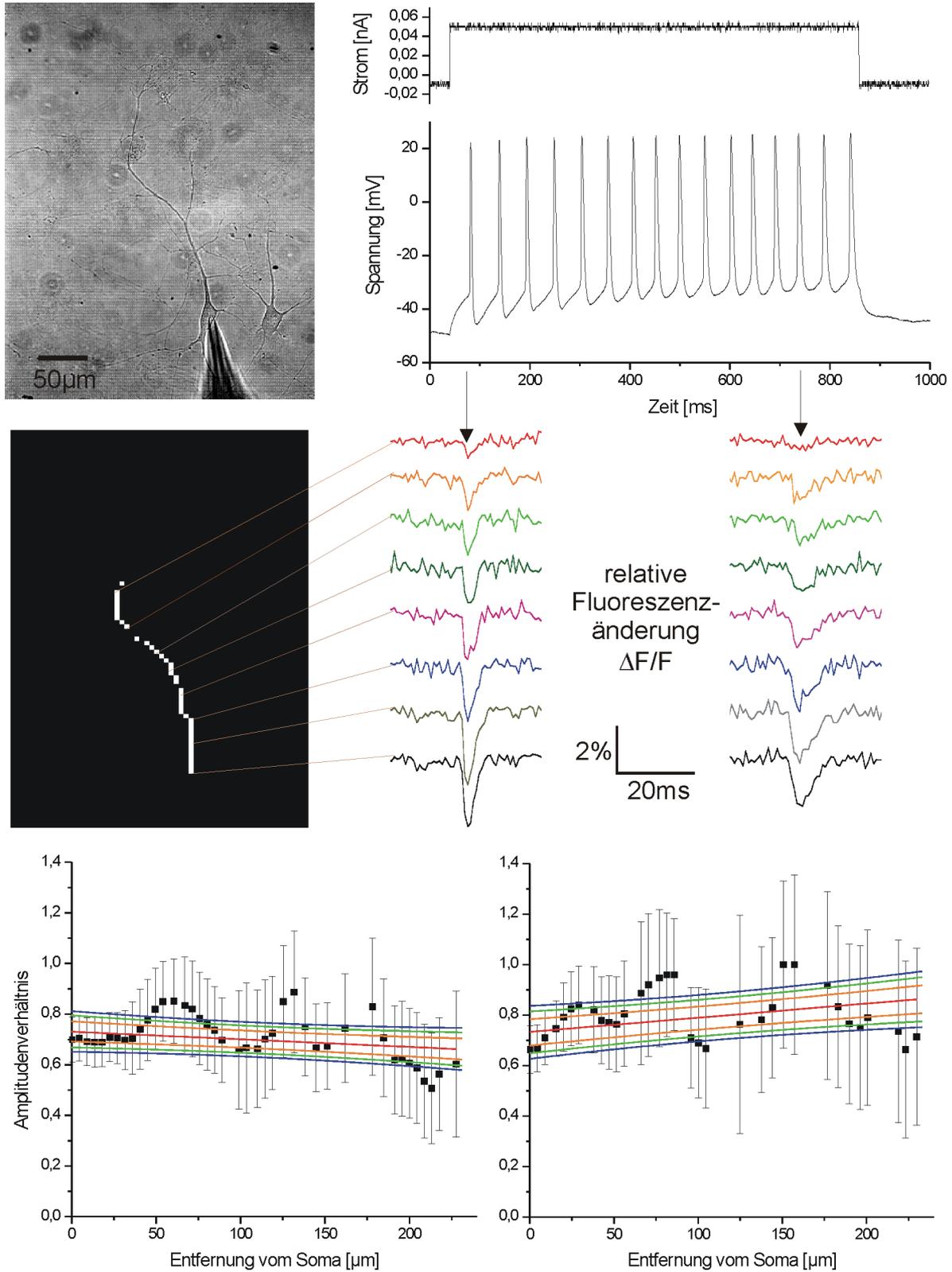


Abbildung 5.16: Man erkennt eine leichte Aktionspotentialverbreiterung bei hoher, gleichmäßiger Spike-Frequenz (18Hz), langsam zurückgehender Hyperpolarisation und keine Aktivitätsabhängigkeit. (BN-BIQ, Trainfrequenz 18Hz, Steigung Messung 1 unten links $-3\%/100\mu\text{m}$ $\sigma = \pm 3,7\%/100\mu\text{m}$, Messung 2 unten rechts $5,6\%/100\mu\text{m}$ $\sigma = \pm 5,7\%/100\mu\text{m}$, zeitlicher Abstand der beiden Messungen 30s, Kulturdauer 15d)

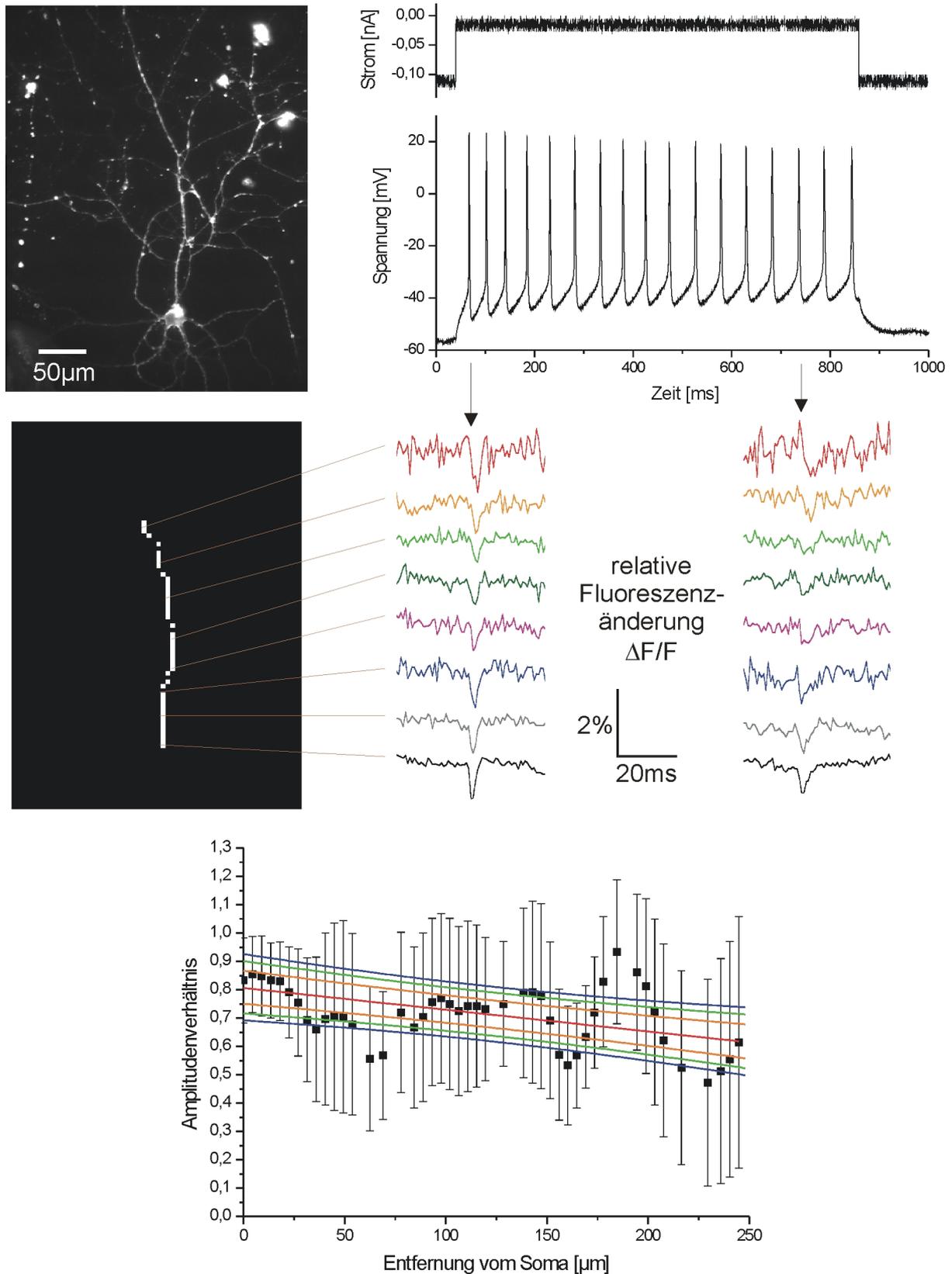


Abbildung 5.17: Relativ gleichmäßige und schnelle Aktionspotentiale im ganzen Dendriten mit hoher, leicht fallender Frequenz (20Hz) und leicht negative Aktivitätsabhängigkeit der Amplituden sind zu erkennen. (BNBIQ, Trainfrequenz 20Hz, Steigung $-7,7\%/100\mu\text{m}$ $\sigma = \pm 4,7\%/100\mu\text{m}$, Kulturdauer 19d)

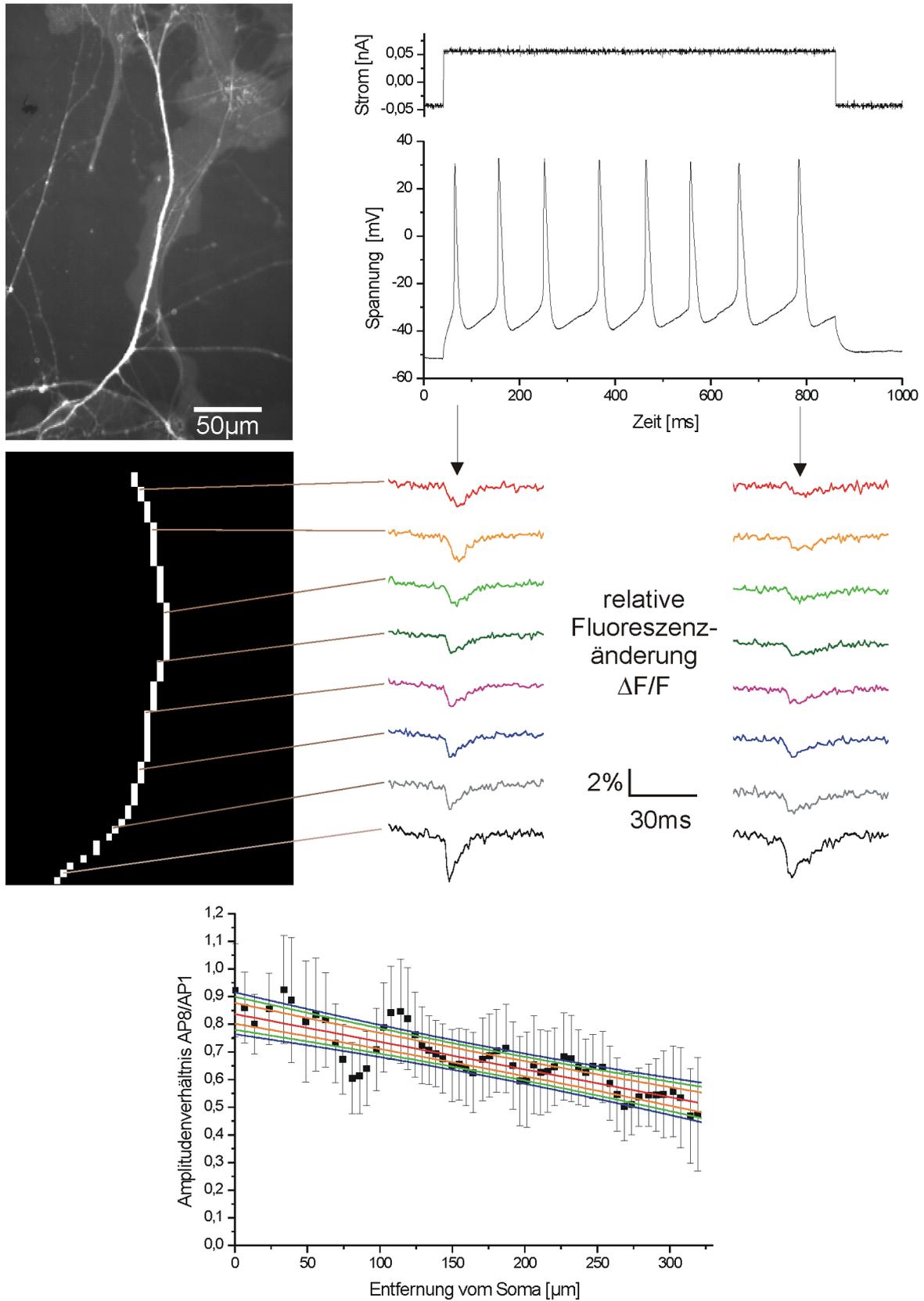


Abbildung 5.18: Die $\Delta F/F$ Signale der Messung zeigen ein sehr gutes S/N-Verhältnis, eine leichte Aktionspotentialverbreiterung bei einer Frequenz von 10Hz und eine negative Aktivitätsabhängigkeit der Spikeamplituden. (ANNINE-5, Trainfrequenz 10Hz, Steigung $-10\%/100\mu\text{m}$ $\sigma = \pm 2,1\%/100\mu\text{m}$, Kulturdauer 15d)

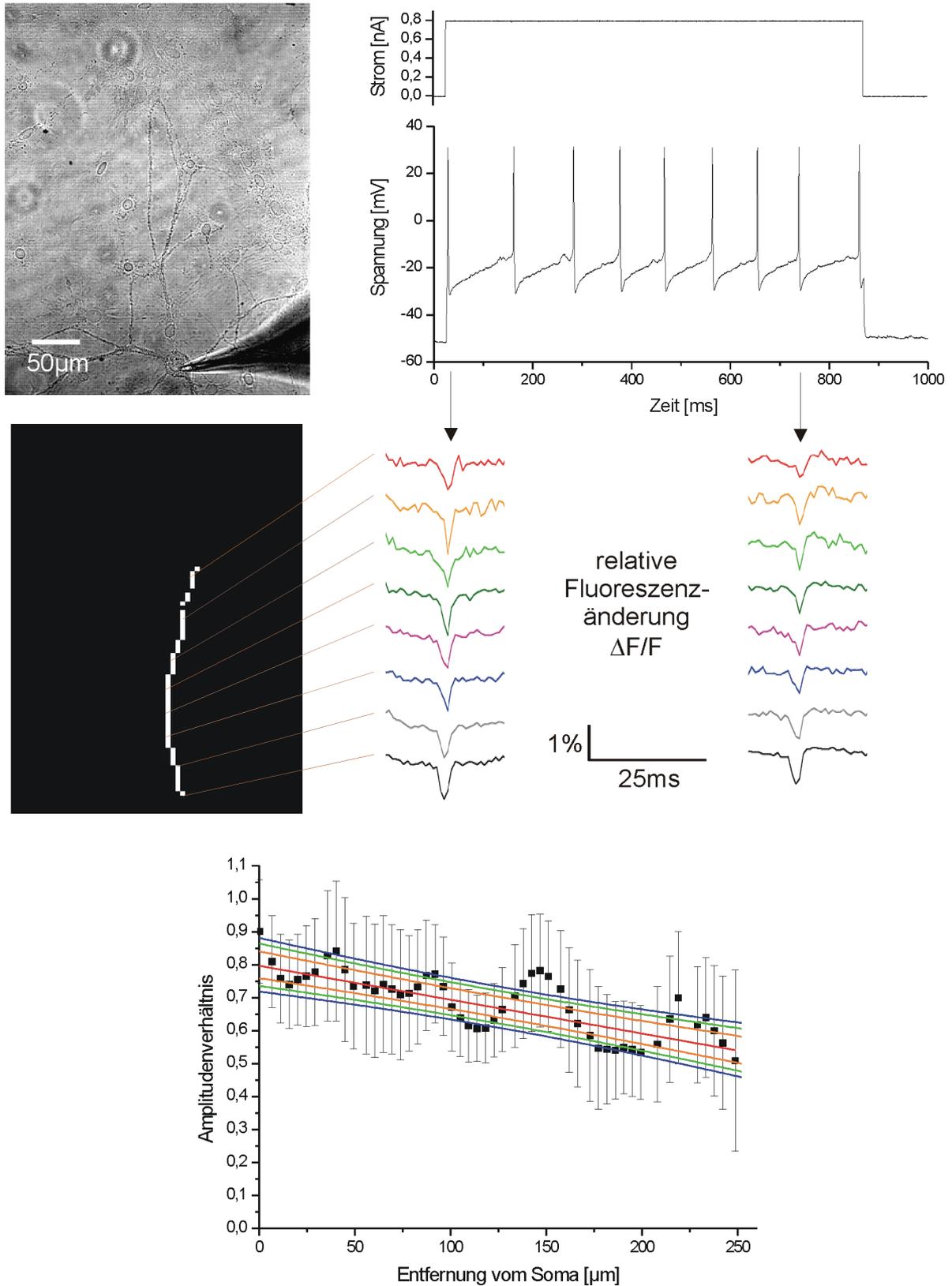


Abbildung 5.19: Die Zelle feuert sehr schmale Aktionspotentiale (Halbwertsbreite des ersten Spikes 1,4ms) mit starker Hyperpolarisation und nur geringer Verbreiterung (21%). Die Frequenz schwankt (~10Hz) und eine negative Aktivitätsabhängigkeit der Amplituden ist zu erkennen. (ANNINE-5, Trainfrequenz 10Hz, Steigung $-10,3\%/100\mu\text{m}$ $\sigma = \pm 3,3\%/100\mu\text{m}$, Kulturdauer 37d)

5.4 Protokoll 4: Messungen eines ganzen Trains

Bei diesem Protokoll (Anhang E, Protokoll 4) wird eine ganze Aktionspotentialgruppe gemessen. Die Zellen werden dabei 340ms bzw. 430ms stimuliert und entsprechend 400ms bzw. 500ms optisch gemessen. Somit können Variationen zwischen einzelnen Spikes eines Zugs erkannt werden. Durch die lange Belichtungszeit muß besonders auf phototoxische Effekte geachtet werden.

Die intrazelluläre Lösung mit ATP, GTP und Phosphocreatin (Anhang C) wurde für die Messungen verwendet.

Es wurden zwei Messungen ausgewertet. Sie werden im folgenden beschrieben:

Messung von Abbildung 6.20

Das Neuron wurde 22 Tage kultiviert. Es sitzt auf Gliazellen und hat einen kräftigen, $200\mu\text{m}$ langen Dendriten. Das erste Aktionspotential erreicht eine Maximalamplitude von $+4\text{mV}$, die nachfolgenden nur noch -4mV . Die Form der Spikes ist abgesehen vom schmalen ersten bei allen anderen gleich. Die Spikefrequenz ist mit 24Hz relativ hoch.

Das relative Fluoreszenzänderungsbild zeigt deutlich die 8 Aktionspotentiale. Es treten keine größeren Unregelmäßigkeiten über der Meßfehlergrenze zwischen den einzelnen Spikes auf. Bei der Verhältnisbildung von der 8. zur 1. Spikeamplitude ergibt sich eine Steigung von $+4,7\%/100\mu\text{m} \pm 4,3\%/100\mu\text{m}$ und somit keine Aktivitätsabhängigkeit. Die lokalen Schwankungen der relativen Fluoreszenzänderung wird durch die Inhomogenität des Gliarasens verursacht.

Messung von Abbildung 6.21

Das Soma der Nervenzelle liegt auf Glia und der $260\mu\text{m}$ lange Dendrit nur auf dem beschichteten Glas. Die 5 Spikes haben eine konstante Maximalamplitude von $+24\text{mV}$. Sie verbreitern sich stetig und die Frequenz nimmt ab.

Bei der optischen Messung ist die Verbreiterung der Spikes im ganzen Dendriten zu erkennen. Auch hier ergibt die Verhältnisbildung keine Aktivitätsabhängigkeit (Steigung $3,1\%/100\mu\text{m} \pm 3,6\%/100\mu\text{m}$). Die Fluoreszenzänderung ist im ganzen Dendriten relativ konstant bei ungefähr 2% . Dies ergibt sich aus dem Fehlen von Gliazellen als Untergrund.

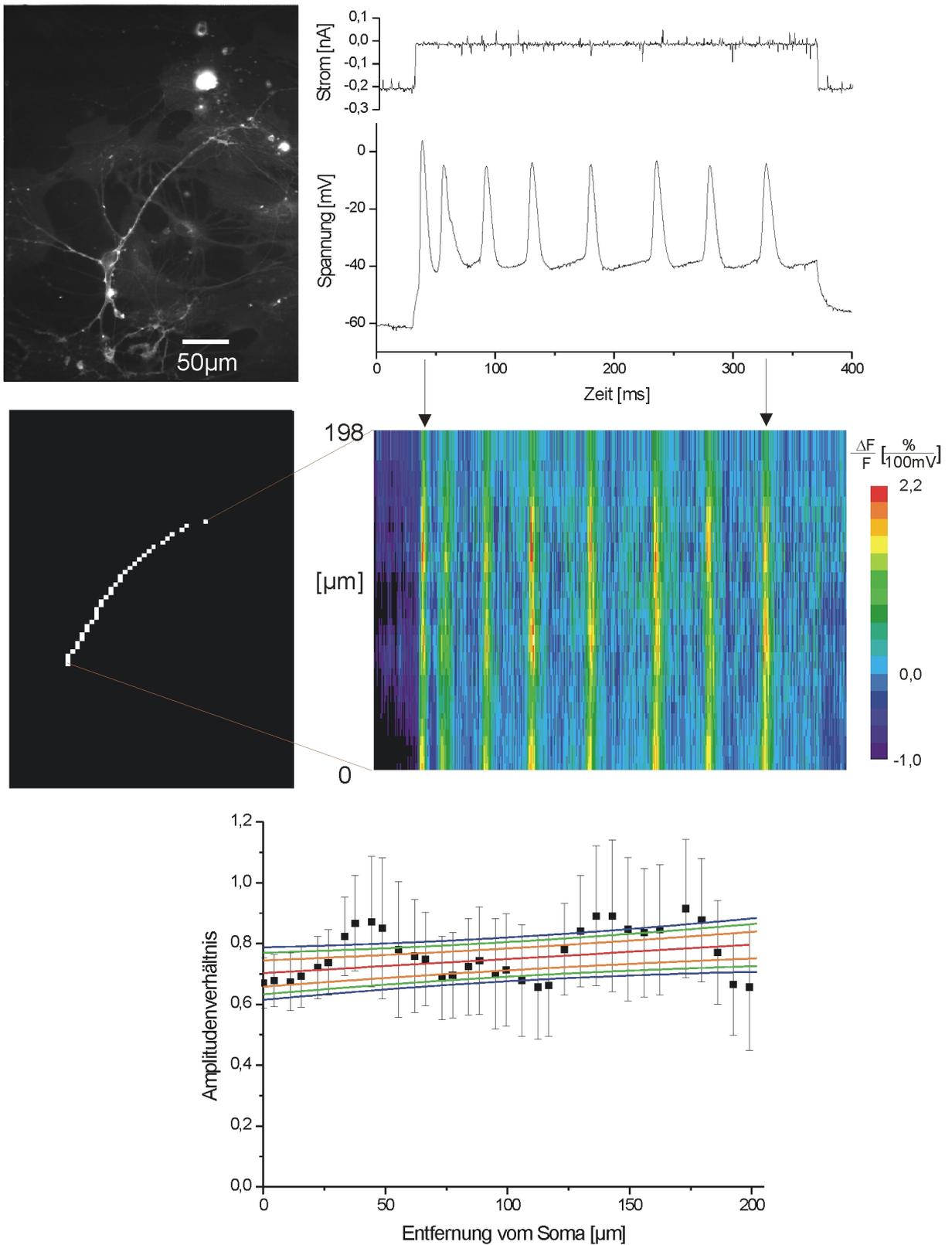


Abbildung 5.20: Das erste Aktionspotential ist höher, alle anderen sind von der Form sehr gleichmäßig. Die Frequenz schwankt leicht bei hoher Frequenz (24Hz). Die Zelle zeigt keine Aktivitätsabhängigkeit der Spikedämpfung. Es sind keine Phototoxizitätseffekte während der Messung erkennbar. (BNBIQ, Steigung 4,7%/100 μ m $\sigma = \pm 4,3\%/100\mu$ m, Kulturdauer 22d)

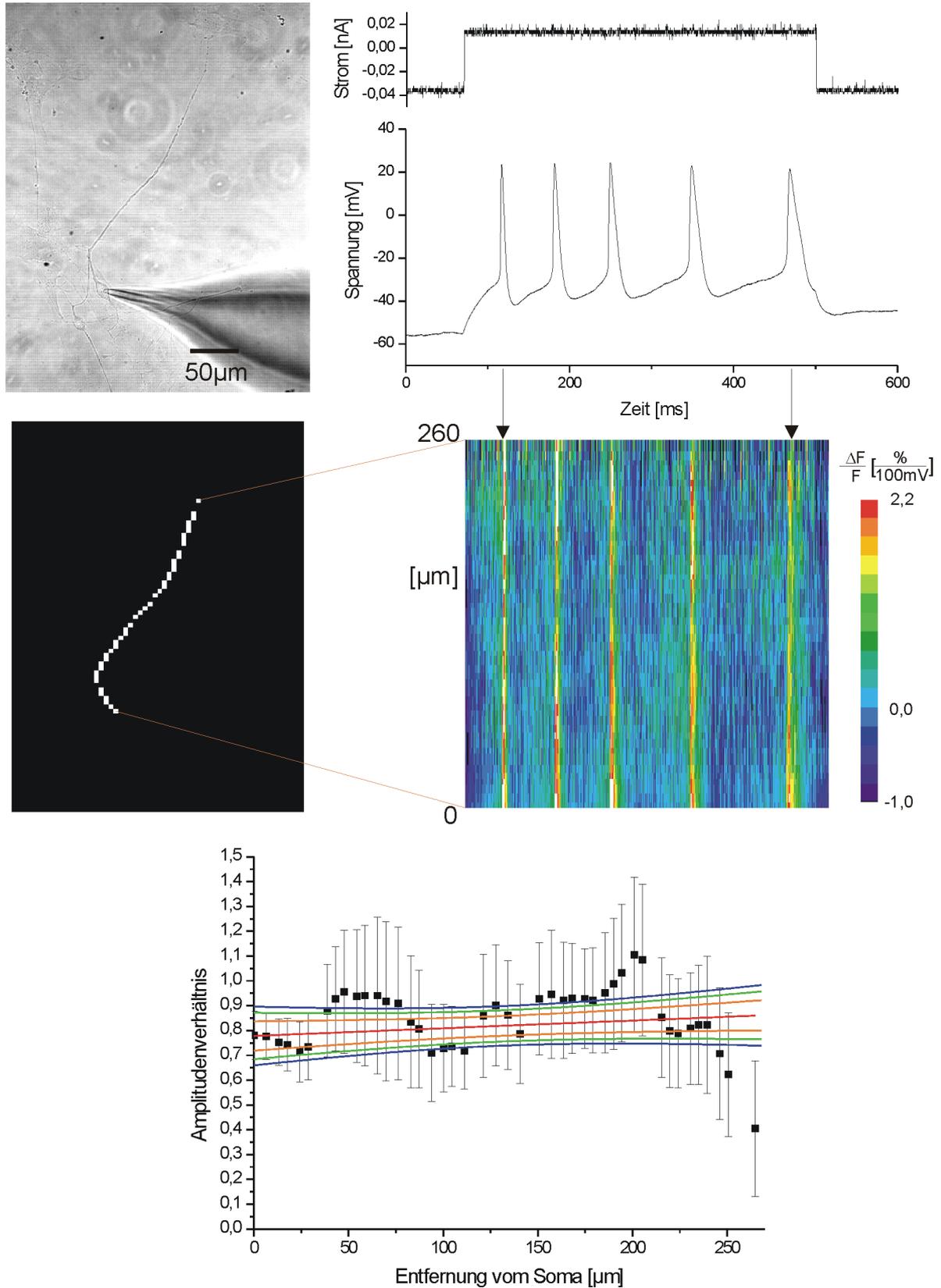


Abbildung 5.21: Die Spikes verbreitern sich leicht bei fallender Frequenz. Die Fortpflanzung der Aktionspotentiale ist Aktivitätsunabhängig. (ANNINE-5, Trainfrequenz ~15Hz, Steigung 3,1%/100µm $\sigma = \pm 3,6\%/100\mu\text{m}$, Kulturdauer 13d)

5.5 Diskussion

In diesem Kapitel wurden Gruppen von Aktionspotentialen in Dendriten von kultivierten Hippocampusneuronen untersucht. Dabei kann folgendes festgestellt werden:

Vitale Neurone

Die dissoziierten Primärkulturen wurden 7 bis 37 Tage kultiviert. Dies entspricht einem Alter von 4 bis 34 Tage alten Jungtieren. Die meisten Neurone in diesen Kulturen sind Pyramidalzellen [3]. Durch die Dissoziation zeigen aber nur manche Zellen die typische Morphologie. Die kleineren Körnerzellen mit ihren dünnen Dendriten werden nicht für Messungen ausgewählt. Fast alle untersuchten Zellen standen im Kontakt mit anderen Nerven- und Gliazellen, wie die Bilder zeigen. Die Existenz von Synapsen bzw. synaptischen Vesikeln wurde in Vorversuchen mit Synaptophysin-Antikörpern nachgewiesen (Abb.5.22, Anhang F). Sowohl die Synapsen als auch Neuron/Glia-Kontakte sind wichtig für die Stabilität der Kulturen und damit für die Vitalität der Neurone.

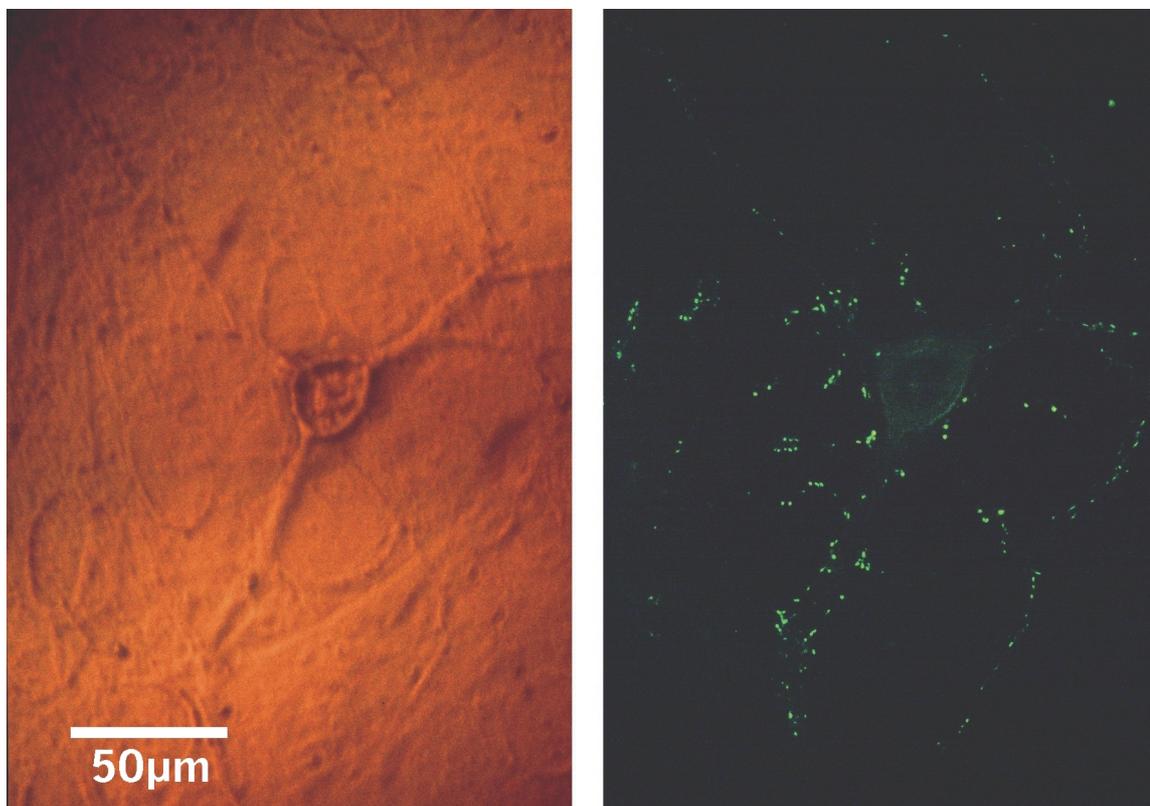


Abbildung 5.22: Fixiertes hippocampales Neuron im Phasenkontrast (links) und in Fluoreszenz mit Synaptophysin-Antikörpern, die über Anti-IgG mit FITC gelabelt sind (rechts). Synaptophysin ist ein integrales Protein der synaptischen Vesikel. (Kulturzeit 25d)

Variable Kanalexpression oder -modulation zwischen den Zellen

Elektrophysiologische Messungen wurden am Soma mit Patch-Clamp Technik und in den Dendriten mit spannungssensitiven Farbstoffen durchgeführt. Die Aktionspotentialformen und Train-Charakteristika va-

riieren dabei deutlich zwischen den Zellen. Die Spikes zeigen vor allem unterschiedliche Re- und Hyperpolarisationen an der fallenden Flanke und damit unterschiedliche Breiten und Schultern. Die Aktionspotentialfrequenz bei Dauerstimulation liegt zwischen 8Hz und 24Hz. In manchen Fällen ist sie nicht konstant und nimmt schnell ab (Abb.5.11, 5.12). Dies deutet auf unterschiedliche Kanalexpressionen und/oder -modulationen hin. Auch die Kulturzeit spielt hier eine wichtige Rolle. Neurone, die weniger als 10 Tage kultiviert werden, feuern bei einer langen Stimulation oft nur ein Aktionspotential und bleiben dann in einem stabilen Zustand. Alte Zellen (>20div) zeigen dagegen oft schnelle Spikes mit starken Hyperpolarisationen. Beides spricht für einen Reifungsprozeß der kultivierten Neurone, in dem sich die Kanaldichte und -verteilung einstellt.

Aktionspotentialform im Dendriten

Die Form der Aktionspotentiale im Dendriten ist im Rahmen der Meßgenauigkeit der im Soma bis auf einen Skalierungsfaktor gleich (Abb.5.1, 5.4 und 5.7). Dies spricht für eine relativ homogene Kanalverteilung in Soma und Dendrit. Da Absolutmessungen hier mit spannungssensitiven Farbstoffen nicht möglich sind, kann eine Dämpfung der Aktionspotentiale im Dendriten nicht ausgeschlossen werden. Eine Verbreiterung der Spikes im Dendriten wie im Slice ([63], Abb. 2.5) wird nicht gefunden.

Aktivitätsabhängige Spikeverbreiterung

Bei allen Messungen kommt es im Verlauf des Zugs zu einer Verbreiterung der Aktionspotentiale an der fallenden Flanke (afterdepolarization potential, ADP). Diese Verbreiterung ist nicht nur am Soma bei den elektrophysiologischen Messungen erkennbar, sondern auch bei den optischen Messungen im ganzen Dendriten; besonders gut in Abb.5.2, 5.5 und 5.8. Die Halbwertsbreite der Aktionspotentiale erhöht sich dabei um 12% (Abb. 5.13 und 5.19) bis +140% (Abb. 5.4, 5.11 mit je +100%, 5.14 mit +133%). Von dieser Verbreiterung erholt sich die Zelle zwischen zwei Messungen wieder. Sie ist somit reproduzierbar und kein phototoxischer Effekt.

Keine aktivitätsabhängige Amplitudenänderung der Aktionspotentiale

Bei den meisten Messungen kann keine Aktivitätsabhängigkeit der Backpropagation festgestellt werden (Abb. 5.23). Dies gilt vor allem für die Messungen, bei denen das AP-Train-AP Protokoll angewandt wurde (Abschnitt 5.1, Abb. 5.24), aber auch für fast alle Messungen nach den anderen Protokollen (Abschnitt 5.2, 5.3, 5.4, Abb. 5.25). Wird von jeder Zelle jeweils nur die erste Messung berücksichtigt, so zeigen nur 4 der 24 Zellen eine Steigung von etwa -10%/100 μ m (Abb. 5.26). Bei 3 der 4 Messungen liegt die Hypothese der Aktivitätsunabhängigkeit außerhalb der 2σ -Grenzen. Somit ist hier von einer Aktivitätsabhängigkeit auszugehen. Verglichen mit der Aktivitätsabhängigkeit im hippocampalen Slice von -20%/100 μ m, ist sie aber schwach. Es kann keine Frequenzabhängigkeit, bzw. Korrelation von Spikefrequenz und Aktivitätsabhängigkeit, beobachtet werden. Auch zwischen den Ausbreitungssignalen der Aktionspotentiale innerhalb eines Trains können keine signifikanten Variationen jenseits der Meßfehlergrenzen gefunden werden (Abschnitt 5.4).

Es besteht außerdem keine Korrelation zwischen Aktivitätsabhängigkeit und Kulturdauer (Abb. 5.27). Die

Neurone wurden nach 7 bis 37div untersucht. Dies entspricht 4 bis 34 Tage alten Jungtieren. Die Ratten der Slice-Messungen hatten ein Alter von 13 bis 42 Tagen. Es besteht somit ein ausreichend großer zeitlicher Überlapp. Von anderen Kanälen (Kv1-Familie, [26]) ist bekannt, daß sie in vivo und in vitro gleichzeitig exprimiert werden und die Expressierung mancher Kanäle durch bestimmte Neurotoxine verhindert werden kann. Wenn es sich bei den für diesen Effekt verantwortlichen Na⁺ Kanälen genauso verhält, so gibt es die zwei möglichen Erklärungen (Abschnitt 2.4): Der Na⁺ Kanal wird zwar exprimiert aber nicht wie im Slice moduliert oder es gibt noch einen anderen Na⁺ Kanal, der nicht exprimiert wird, weil ein äußerer Stimulus fehlt. Das Train-Backpropagationsverhalten von kultivierten Hippocampusneuronen entspricht damit eher dem von Dopamin Neuronen der Substantia Nigra ([27], Abb. 2.9) wie dem von hippocampalen Pyramidalzellen.

Bei der Untersuchung der Aktivitätsabhängigkeit der Spikeamplituden zeigt sich besonders schön der Vorteil der optischen Messungen. So ist das mit Patch-Clamp-Methode gewonnene Diagramm aus Messungen an 25 Zellen zusammengesetzt. Mit spannungssensitiven Farbstoffen kann ein solches Diagramm von einem Neuron mit besserer Ortsauflösung gewonnen werden.

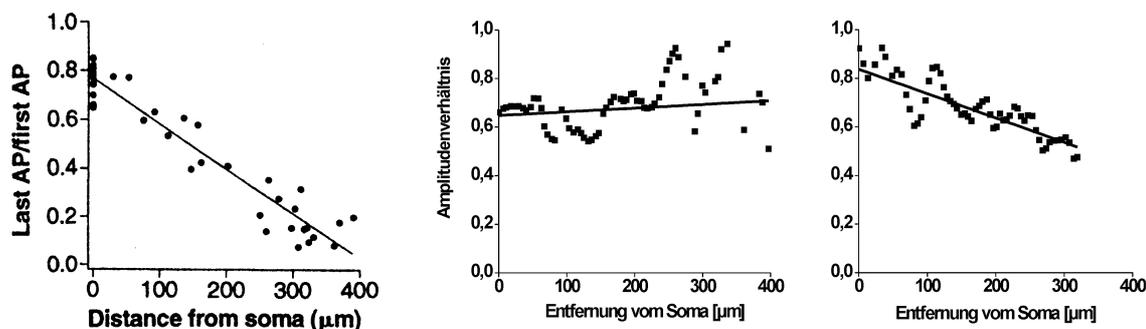


Abbildung 5.23: Untersuchung der Aktivitätsabhängigkeit der Aktionspotentialausbreitung. Im Slice findet man einen starken Rückgang ([75], links), in kultivierten Neuronen dagegen typischerweise keinen (vgl. Abb. 5.11, Mitte) und maximal einen geringen (vgl. Abb. 5.18, rechts). Die linke Abbildung ist aus Messungen an 25 Neuronen zusammengesetzt, wogegen die beiden anderen je eine Messung an einem Neuron zeigen.

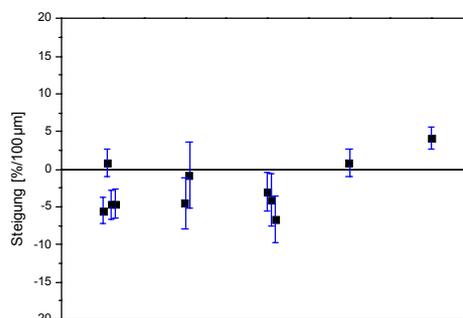


Abbildung 5.24: Ergebnisse der Messungen von Abschnitt 5.1. Steigungen der Amplitudenverhältnisse der 12 Messungen an 5 Zellen (gruppierte Messungen gehören zu jeweils einer Zelle und zeigen die Variabilität zeitlich aufeinanderfolgender Messungen). Es wurde Standard-Patch-Pipettenlösung verwendet.

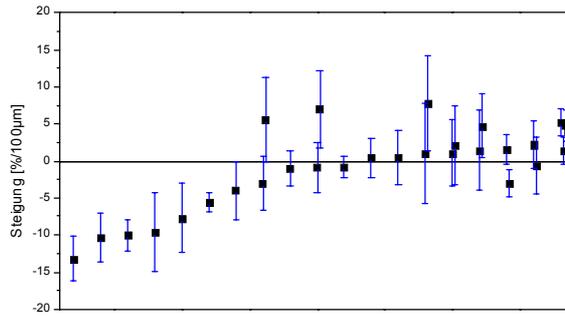


Abbildung 5.25: Ergebnisse der Messungen von Abschnitt 5.2, 5.3 und 5.4. Steigungen der Amplitudenverhältnisse der 29 Messungen an 19 Zellen (gruppierte Me ßpunkte gehören jeweils zu einer Zelle). Es wurde Patch-Pipetten-Lösung mit ATP, GTP und Phosphocreatin verwendet.

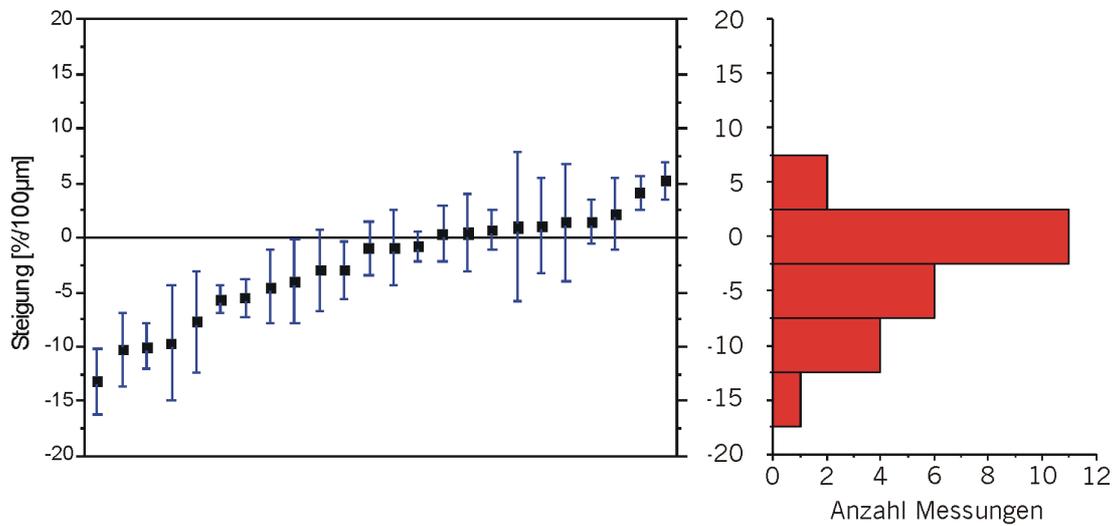


Abbildung 5.26: Steigungen aller Amplitudenverhältnisse von Abschnitt 5.1 bis 5.4 (links). Es wird jeweils nur die 1. Messung von jeder der 24 Zellen berücksichtigt. Histogramm der gemessenen Steigungen (rechts).

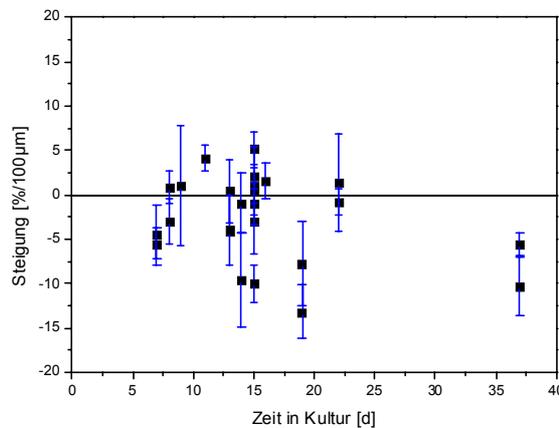


Abbildung 5.27: Steigungen der Amplitudenverhältnisse über der Kulturzeit der Zellen. Es wird jeweils nur die 1. Messung aller 24 Nervenzellen gezeigt.

Kapitel 6

Messungen an gentechnisch veränderten Nervenzellen

Die passiven Eigenschaften und die verschiedenen Ionenkanäle der Membran bestimmen das Ausbreitungsverhalten von Aktionspotentialen. Im folgenden wird untersucht, ob und wenn ja, wie sich die Ausbreitungseigenschaften im Dendriten durch die zusätzliche Expressierung von zwei Kaliumkanälen ändern.

Zuerst werden Messungen an Neuronen mit dem zusätzlich exprimierten Delayed Rectifier Kanal Kv1.3 vorgestellt und anschließend solche mit dem A-Typ Kanal Kv1.4.

6.1 Einfluß des spannungsabhängigen Ionenkanals Kv1.3

Das Fusionsprotein Kv1.3_GFP ist schon wenige Stunden nach der Transfektion im ganzen Dendritenbaum zu finden. Es lagert sich aber inhomogen ein und reichert sich an dendritischen Verzweigungen an (Abb.6.1, 6.2).

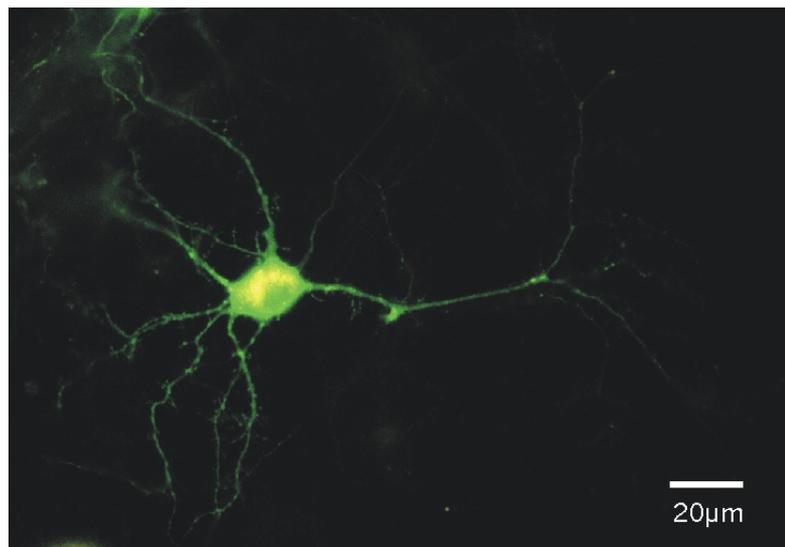


Abbildung 6.1: Transformiertes hippocampales Neuron exprimiert das Fusionsprotein Kv1.3_GFP. Man erkennt leichte Inhomogenitäten der GFP-Fluoreszenz, die auf Kanalcluster hindeuten.

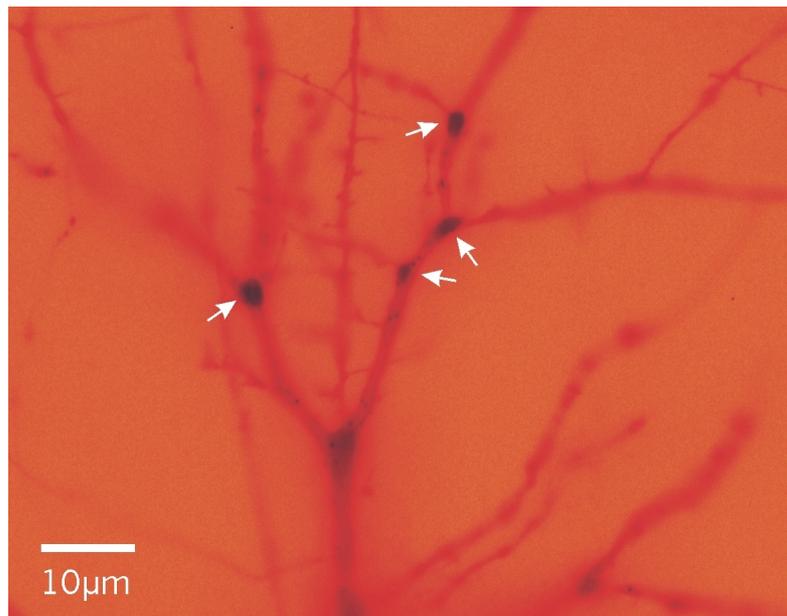


Abbildung 6.2: *Negativbild der GFP-Fluoreszenz. Das Fusionsprotein Kv1.3_GFP lagert sich verstärkt in Verzweigungsstellen von Dendriten ein (Pfeile).*

Änderungen im Backpropagationsverhalten

Die hier gezeigten Messungen wurden nach Protokoll 5 (Anhang E) durchgeführt. Es wird der Einfluß des Kanals auf die Maximalamplitude des Aktionspotentials im Dendriten untersucht. Da mit spannungsensitiven Farbstoffen keine Absolutmessungen möglich sind, benötigt man eine Referenzmessung. Dazu dient ein hyperpolarisierender Puls, der sich passiv ausbreitet und somit unabhängig von den exprimierten Kanälen ist. Bei der Auswertung wird die Amplitude des Aktionspotentials mit der entsprechenden Hyperpolarisationsamplitude an diesem Ort ins Verhältnis gesetzt. Um den Einfluß des Kv1.3 Kanals zu bestimmen, wird dieser spezifisch mit Margatoxin (MgTX) vergiftet. Der Kanal ist mit GFP markiert, um seine räumliche Verteilung innerhalb der Zelle anzuzeigen und um transformierte Zellen zu erkennen.

Messung von Abbildung 6.3

Das Neuron besitzt drei kräftige Dendriten. Die GFP Fluoreszenz ist sowohl am Soma als auch in den Dendriten sehr hell. Der Kanal wird zumindest am Soma überexprimiert, d.h. es werden mehr Kanäle produziert als in die Membran eingebaut werden, so daß sie im Cytoplasma der Zelle angereichert werden. Die Zelldichte ist sehr hoch, wie im Phasenkontrastbild und noch besser in der ANNINE-5 Fluoreszenz zu erkennen ist. Trotz der hohen Zelldichte können zumindest auf zwei Dendriten, die sich im Fokus befinden, Signale gemessen werden; beim längeren bis zu 125µm vom Soma.

Bei der Messung mit Kv1.3 startet das Aktionspotential bei -43mV und erreicht seine Maximalamplitude bei -7mV. Die Hyperpolarisation startet bei -40mV und erreicht am Soma -88mV. Bei der ersten Messung nach der Vergiftung der Kanäle beginnt der Spike bei -45mV und erreicht -9mV. Die Hyperpolarisation reicht von -45mV bis -140mV. Durch den Hyperpolarisationspuls wird kein Spike ausgelöst. Bei der zwei-

ten Messung nach der Vergiftung sind die entsprechenden Werte -56mV bis -12mV für den Spike und -56mV bis -147mV für die Hyperpolarisation. Genauere Analysen der Aktionspotentiale sind hier nicht möglich, weil sich das Ruhepotential zwischen den Messungen stark ändert und andere Stimulationsströme gewählt werden müssen.

Das Verhältnis von Spike- zu Hyperpolarisationsamplitude im 125 μ m langen Dendriten ist mit Kv1.3 konstant (Steigung 2%/100 μ m), d.h. die Aktionspotentialamplitude nimmt im Dendriten wie die eines passiven Pulses ab. Nach der Blockierung von Kv1.3 aber breitet sich das Aktionspotential weniger gedämpft aus und die Steigung beträgt 26%/100 μ m und dann sogar 49%/100 μ m. Die Verhältnisse am Soma, elektrophysiologisch und optisch gemessen, stimmen gut überein (1. Messung 0,75 und 0,71; 2.Messung 0,38 und 0,5; 3.Messung 0,48 und 0,45).

Messung von Abbildung 6.4

Bei diesem Neuron ist der Kanal noch nicht so überexprimiert wie im vorherigen. Kv1.3 ist trotzdem in den Dendriten eingelagert. Die Zelldichte ist auch hier sehr hoch. Bei den für die Auswertung ausgewählten Pixeln ist zu erkennen, daß nach der Blockierung des Kanals deutlich mehr signaltragende Pixel gefunden werden als zuvor.

Das Aktionspotential mit Kv1.3 startet bei -50mV und erreicht sein Maximum bei +5mV. Nach der Vergiftung aber reicht es von -45mV bis +35mV und die Zelle hat anschließend Schwierigkeiten zu repolarisieren. Wahrscheinlich durch eine leichte Verstopfung der Patch-Elektrode wird ein Maximalpotential von -210mV bzw. -250mV für die Hyperpolarisation gemessen. Dieses Potential wurde im Soma wahrscheinlich nicht erreicht. Bei der ersten Messung wird nach der Hyperpolarisation kein Spike ausgelöst.

Auch bei dieser transformierten Zelle breitet sich der Spike wie ein Hyperpolarisationspuls aus. Die Amplitudenverhältnisse ergeben im 150 μ m langen Dendriten eine Steigung von 10%/100 μ m. Nach der Zugabe von MgTX steigt das Verhältnis dagegen mit 120%/100 μ m an.

Bildlegende zu den beiden folgenden ganzseitigen Abbildungen:

oben links:	GFP-fluoreszierende Zelle
oben rechts:	Phasenkontrastbild
Mitte links:	ANNINE-5 Fluoreszenz
Mitte rechts:	vier Bilder, davon:
	oben links: zur Auswertung ausgewählte Pixel
	unten links: endgültig ausgewählte Pixel nach der Auswertung
	oben rechts: zur Auswertung ausgewählte Pixel, Messung nach der Zugabe von Margatoxin (MgTX)
	oben links: endgültig ausgewählte Pixel nach der Auswertung, Messung nach der Zugabe von MgTX
unten links:	elektrophysiologische Messungen vor (oben) und nach (darunter) der Zugabe von MgTX
unten rechts:	Verhältnis des Aktionspotentialamplituden-Betrags zur Hyperpolarisationsamplitude vor (schwarz) und nach (rot, grün) der Zugabe von MgTX

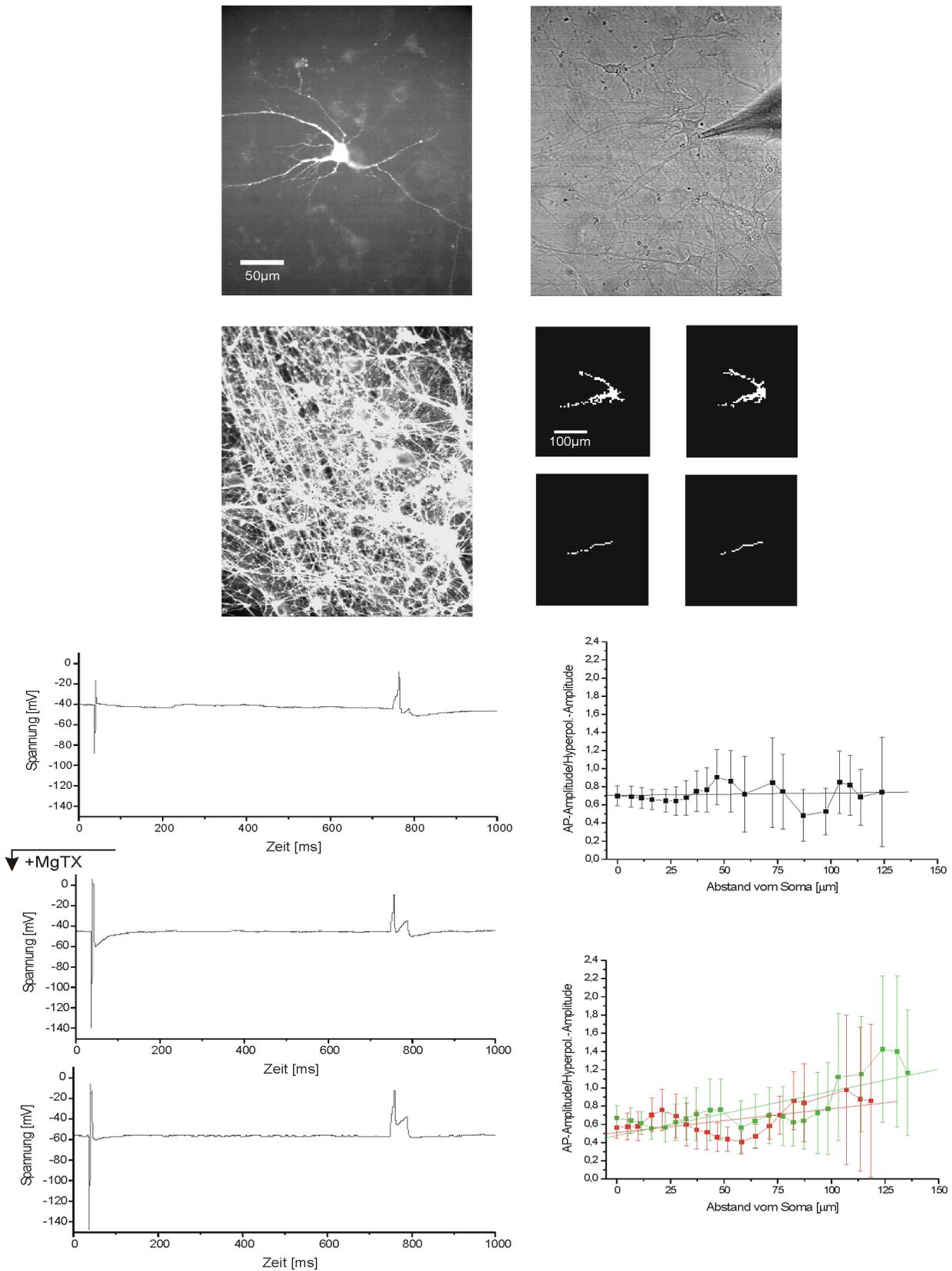


Abbildung 6.3: Durch die GFP-Fluoreszenz (oben links) ist die Zelle trotz hoher Zelldichte (Mitte links) gut zu erkennen. Vor der Zugabe von Margatoxin wird das Aktionspotential wie die Hyperpolarisation gedämpft (unten links, Messung 1: Steigung 2%/100µm); nach der Kv1.3 Blockierung läuft das AP weniger gedämpft in den Dendriten (unten rechts rot, Messung 2: Steigung 26%/100µm, unten rechts grün, Messung 3: Steigung 49%/100µm). (Kulturdauer 18d)

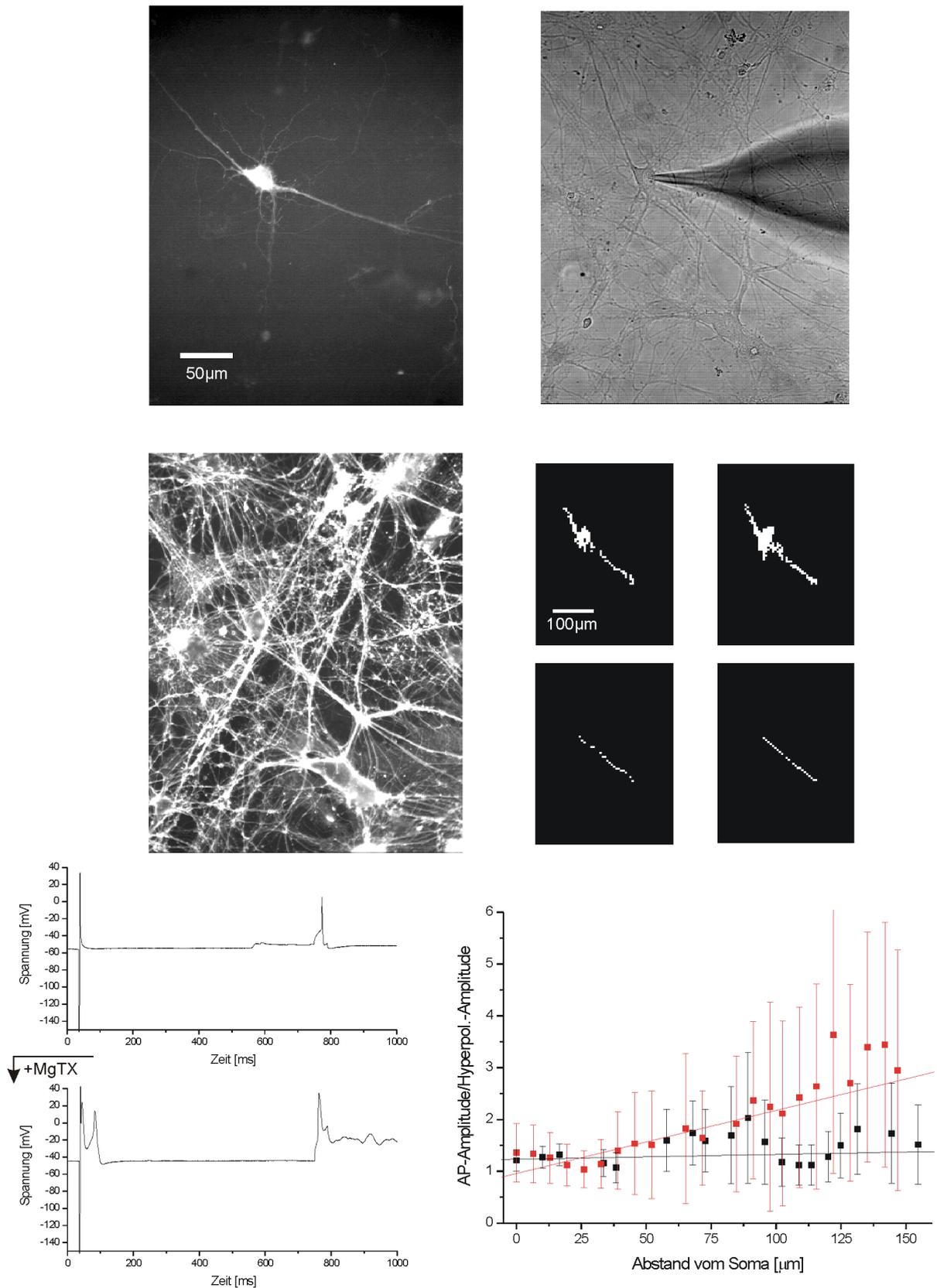


Abbildung 6.4: Deutlich ist die Amplitudenzunahme des Aktionspotentials und die fehlende Repolarisation nach der Blockierung von Kv1.3 zu sehen (unten links). Durch die höhere Amplitude werden mehr signaltragende Pixel gefunden (Mitte rechts). Die Steigung (unten rechts) vor der Zugabe von MgTX beträgt 10%/100µm (schwarz), danach 120%/100µm (rot). (Kulturdauer 18d)

Untersuchung der aktivitätsabhängigen Backpropagation mit Kv1.3

Zur Auswertung der Aktivitätsabhängigkeit stehen Messungen von nur einer Zelle zur Verfügung, die im folgenden beschrieben werden. Es werden zwei verschiedene Protokolle verwendet.

Abbildung 6.5

Das Neuron überexprimiert das Fusionsprotein Kv1.3_GFP am Soma. Es besitzt einen sehr kräftigen 200 μ m langen Dendriten. Dieser zeigt in diesem Bereich keine starken Verzweigungen, an denen Kv1.3 verstärkt eingebaut wird. Die Zelldichte ist sehr hoch. Auch hier werden bei der Auswertung der Messungen nach der Kanalblockierung viel mehr signaltragende Pixel gefunden als zuvor.

Messungen von Abbildung 6.6

Hier wird das Protokoll 5 (Anhang E) verwendet, bei dem zuerst eine Hyperpolarisation und 710ms später ein Spike ausgelöst wird. In der Messung vor und auch nach der Zugabe von MgTX löst der Hyperpolarisationspuls ein direkt anschließendes Aktionspotential aus. Es können somit die Ausbreitungen beider Spikes im Verhältnis zur Hyperpolarisation untersucht werden.

Bei der Messung mit Kv1.3 starten beide Aktionspotentiale (unmittelbar nach der Hyperpolarisation und 710ms danach) bei -52mV und erreichen ihr Maximum bei +13mV. Nach der Vergiftung mit MgTX dagegen reichen die Spikes am Soma von -52mV bis +31mV. Werden die Amplitudenverhältnisse gebildet, so ergibt sich für den Spike mit Kv1.3 unmittelbar nach der Hyperpolarisation zum Hyperpolarisationspuls eine Steigung von 10%/100 μ m, für das 710ms spätere dagegen ein Abfall von -110%/100 μ m. Dieser Effekt der starken Dämpfung des späteren Aktionspotentials verschwindet nach der Blockierung von Kv1.3: Für den ersten Spike ergibt sich eine Steigung von 30%/100 μ m und für den zweiten 30%/100 μ m. Beide Steigungen sind größer wie die entsprechenden der ersten Messung. Vor der Blockierung sind die Aktionspotentialsignale optisch nur 130 μ m weit in den Dendriten zu verfolgen, danach fast 200 μ m. Dies wird durch die höhere Spike-Amplitude und der geringeren Dämpfung der Aktionspotentiale im Dendriten nach der Blockierung verursacht.

Messungen von Abbildung 6.7

Auch Züge von Aktionspotentialen können optisch nach Protokoll 3 (Anhang E) gemessen werden. Die Spikefrequenz ist in allen drei Messungen konstant. Sie beträgt zuerst 24Hz und nach der Vergiftung nur noch bei 12Hz. Die Spikemaxima nehmen bei der Messung mit Kv1.3 von +23mV auf +19mV leicht ab. Nach der Zugabe von MgTX erreicht das erste Aktionspotential +40mV und die folgenden +34mV. Bei allen drei Trains wird das erste Aktionspotential im Vergleich zu den folgenden sehr schnell ausgelöst. Die Halbwertsbreite steigt vor der Blockierung nur unwesentlich von 1,6ms auf 1,7ms, danach von 2,9ms auf 3,4ms bzw. von 2,8ms auf 3,8ms bei der dritten Messung. Die Breite der Spikes bleibt also vor der Blockierung fast konstant, verdoppelt sich danach fast und nimmt während des Aktionspotentialzugs zu.

Um die Aktivitätsabhängigkeit zu untersuchen, werden hier die Amplitudenverhältnisse der Spikes gebildet. Für die Messung mit Kv1.3 ergibt sich, wenn man den 18. Spike zum 1. ins Verhältnis setzt, eine Steigung

von $-24\%/100\mu\text{m} \pm 12,8\%/100\mu\text{m}$. Trotz des großen Fehlers muß hier von einer Aktivitätsabhängigkeit der Backpropagation durch Kv1.3 ausgegangen werden, zumal in den beiden folgenden Messungen mit vergiftetem Kv1.3 Steigungen von nurmehr $1,2\%/100\mu\text{m} \pm 10,9\%/100\mu\text{m}$ bzw. $-7,6\%/100\mu\text{m} \pm 10,4\%/100\mu\text{m}$ gefunden werden.

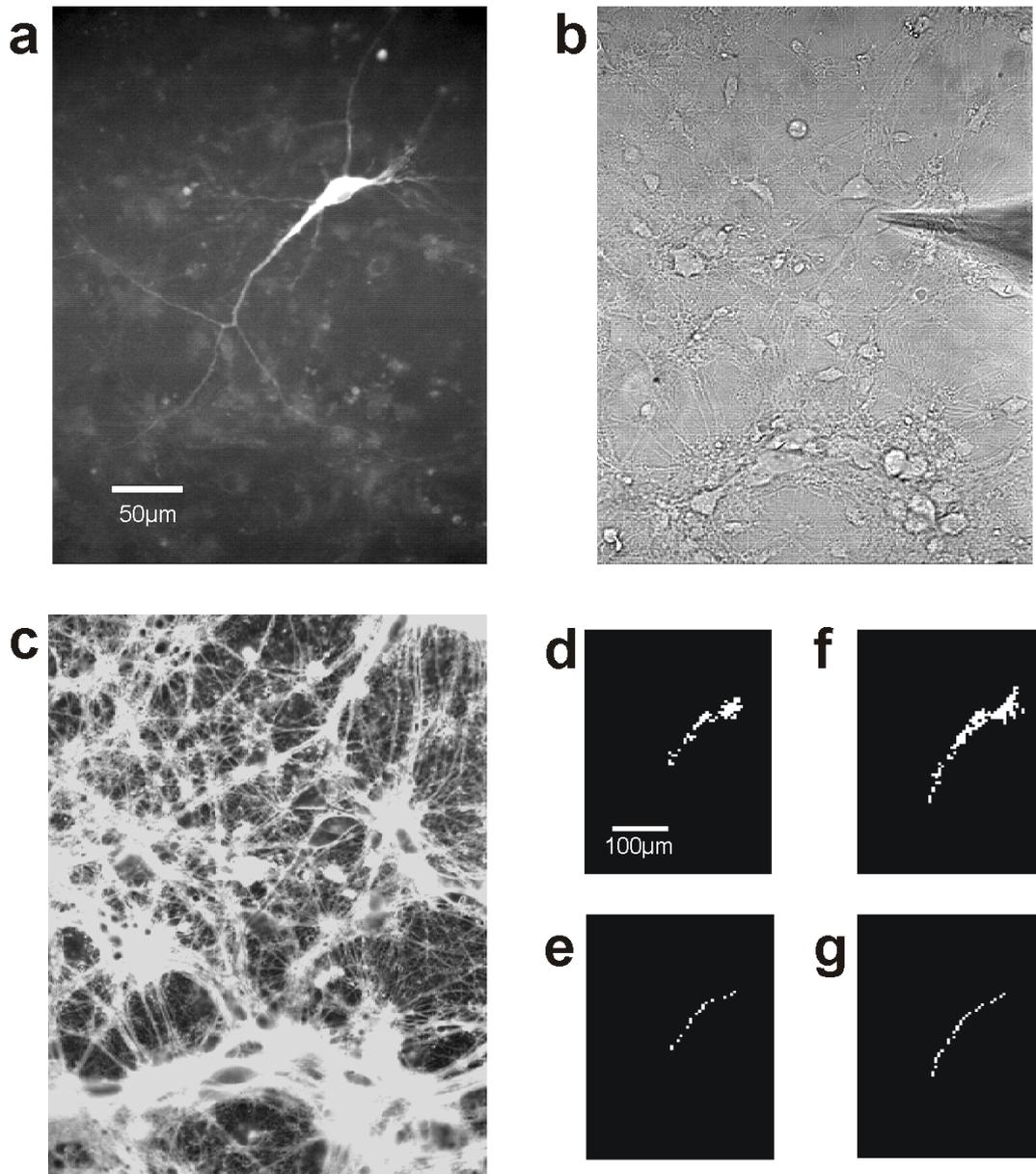


Abbildung 6.5: GFP-Fluoreszenzbild (a), Phasenkontrastbild (b), ANNINE-5 Fluoreszenzbild (c) und die ausgewählten Pixel (unten rechts); dabei für die Auswertung ausgewählte Pixel vor (d) und nach (f) der Zugabe von MgTX und ausgewählte Pixel nach der Auswertung entsprechend darunter (e, g). Bei den Messungen mit blockierten Kv1.3 Kanälen wurden deutlich mehr signaltragende Pixel gefunden. (Kulturdauer 17d)

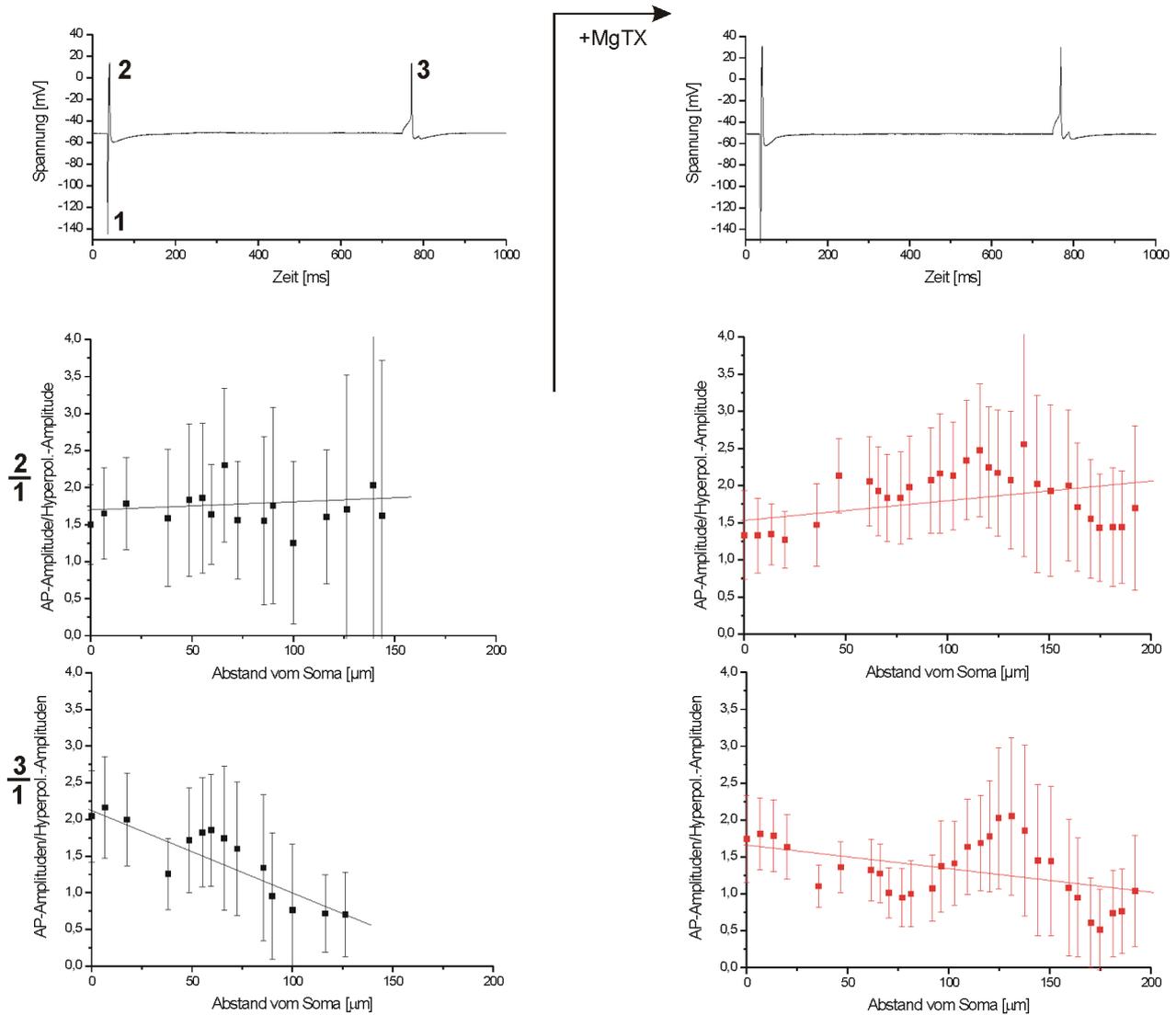


Abbildung 6.6: Elektrophysiologie vor (oben links) und nach (oben rechts) der Blockierung der Kv1.3 Kanäle mit MgTX. Verhältnis der AP-Amplitude kurz nach der Hyperpolarisation zur Hyperpolarisation (Mitte, links vor und rechts nach MgTX, Steigungen: schwarz 10%/100µm, rot 30%/100µm). Verhältnis der AP-Amplituden 720ms nach dem 1.AP zur Hyperpolarisation (unten, links vor und rechts nach MgTX, Steigungen: schwarz -110%/100µm, rot -30%/100µm). Die Aktionspotential-Amplitude am Soma nimmt nach der Vergiftung stark zu. Innerhalb der Messungen sind sie aber konstant. Vor der Blockierung kann das Aktionspotential ~150µm in den Dendriten verfolgt werden, danach ~200µm.

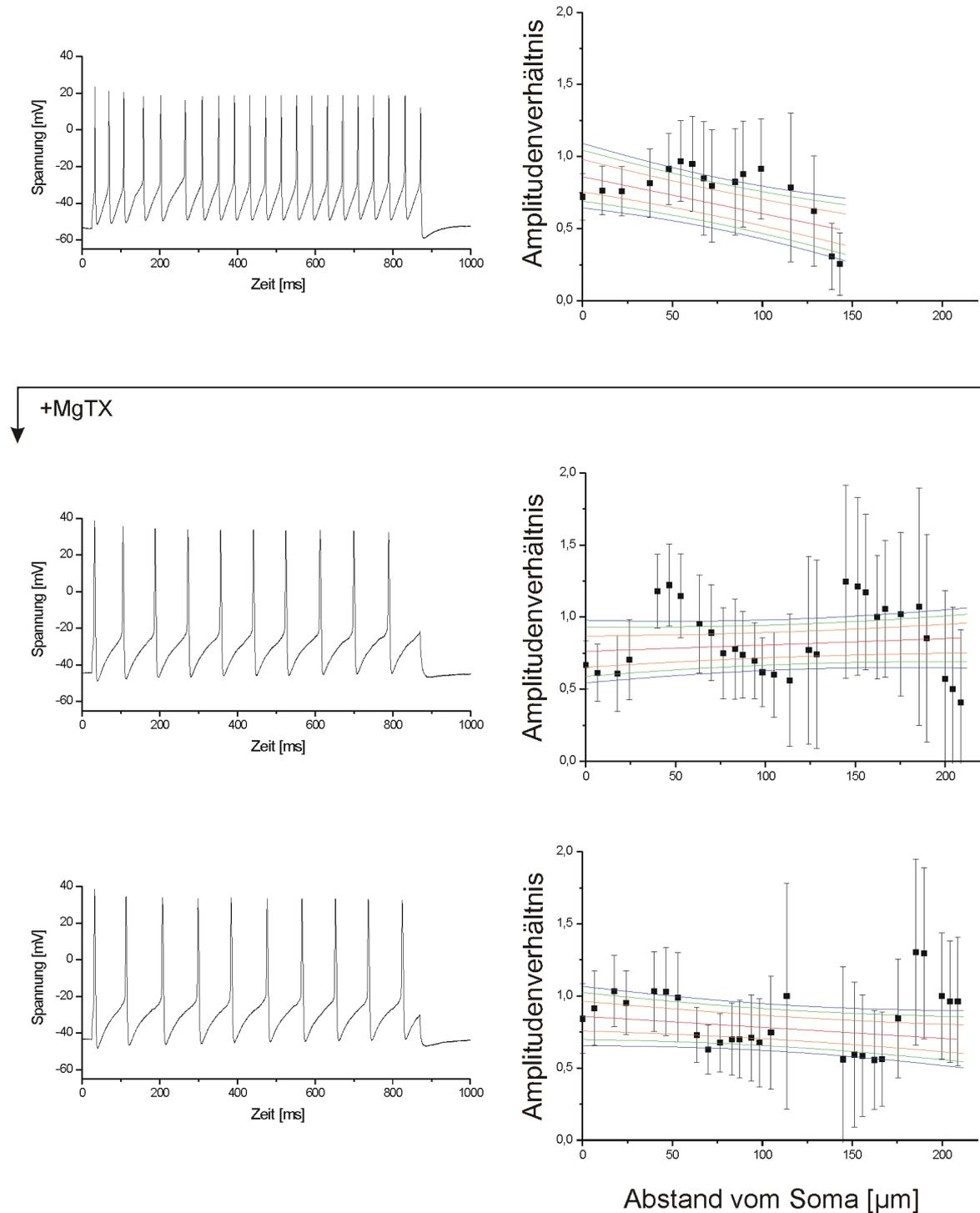


Abbildung 6.7: Backpropagation eines Aktionspotentialzugs mit Kv1.3 vor (oben, Stimulationsstrom 0,3nA) und nach (Mitte, unten, Stimulationsstrom jeweils 0,4nA) der Zugabe von MgTX. Links jeweils Elektrophysiologie, rechts Amplitudenverhältnisse 18.AP zu 1.AP (oben, Steigung -24,8%/100µm $\sigma = \pm 12,8\%/100\mu\text{m}$), 10.AP zu 1.AP (Mitte, Steigung 1,2%/100µm $\sigma = \pm 10,9\%/100\mu\text{m}$), 10.AP zu 1.AP (unten, Steigung -7,6%/100µm $\sigma = \pm 10,4\%/100\mu\text{m}$). Spike-Frequenz oben 24Hz, mitte und unten 12Hz. Die Hyperpolarisation ist bei allen APs sehr stark und schnell. Die Aktionspotentialamplitude ist vor der Blockierung um fast 20mV kleiner. Die Amplitude nimmt bei den drei Messungen innerhalb der ersten 200ms leicht ab. Das erste AP unterscheidet sich in allen drei Messungen stark von den folgenden durch die schnelle Auslösung. (Stimulationsstrom 0,3nA, 0,4nA und 0,4nA)

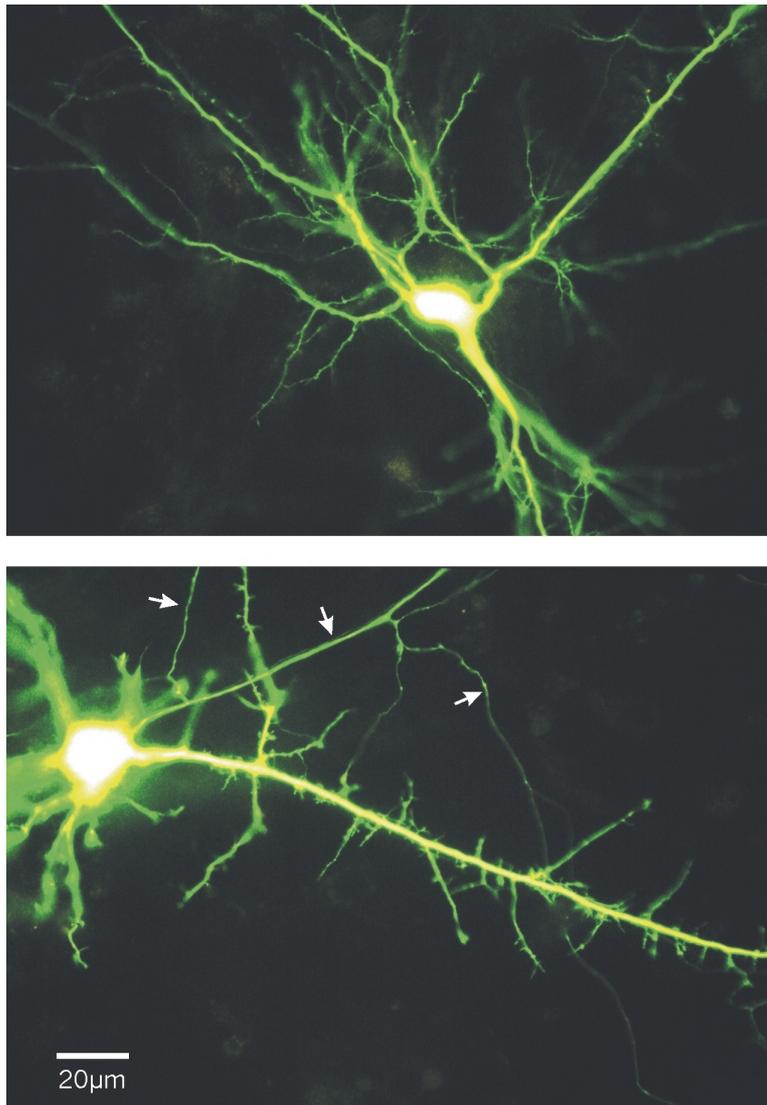


Abbildung 6.8: Koexprimierung von *Kv1.4* und GFP in hippocampalen Neuronen. Im unteren Bild ist das im Vergleich zu den Dendriten dünnere und glattere Axon schön zu sehen (Pfeile).

6.2 Einfluß des spannungsabhängigen Ionenkanals *Kv1.4*

Um das Ausbreitungsverhalten von Spikes in Dendriten mit dem eingelagerten Ionenkanal *Kv1.4* zu untersuchen, wird hier wieder Protokoll 5 (Anhang E) verwendet. Dabei wird ein Hyperpolarisationspuls und ein Aktionspotential optisch gemessen und dann die Maximalamplituden ins Verhältnis gesetzt. Es werden Messungen von zwei Zellen vorgestellt.

Der Kanal *Kv1.4* wird mit GFP koexprimiert (Abb.6.8) und mit 4-Aminopyridin (4-AP) vergiftet, das hauptsächlich A-Typ K^+ Kanäle blockiert. Zur Kontrolle der Kanalverteilung wird bei anderen Versuchen auch das Fusionsprotein *Kv1.4_GFP* exprimiert. Die Fluoreszenz ist deutlich schwächer als beim *Kv1.3_GFP* Fusionsprotein und nur schwer zu photographieren (Abb.6.9). Der Kanal wird aber in das Soma und die Dendriten eingebaut.

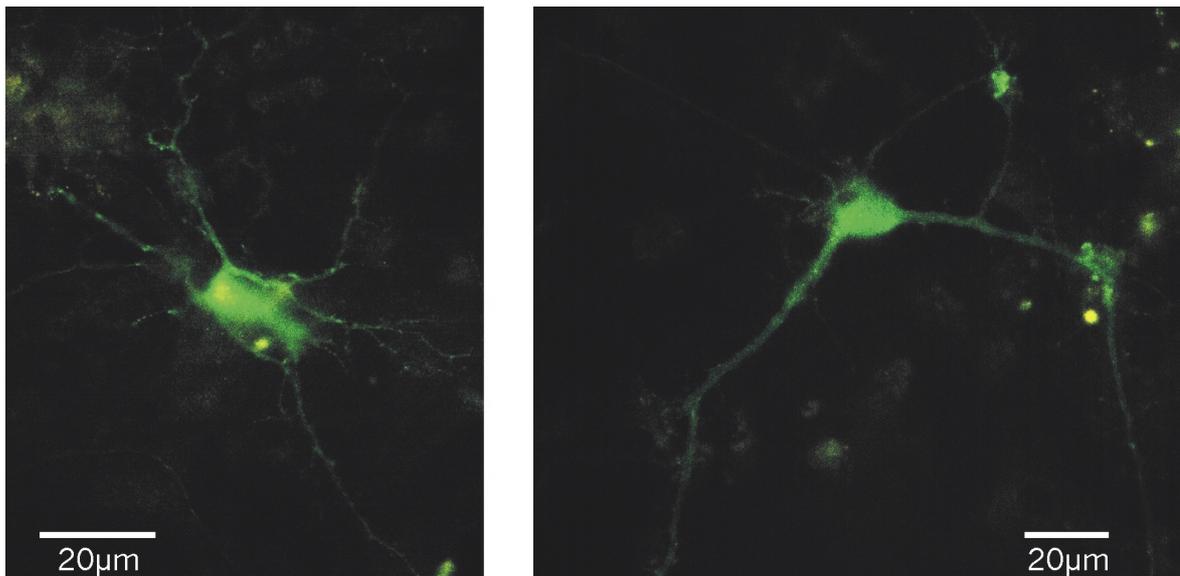


Abbildung 6.9: Schwache Fluoreszenz des Kv1.4_GFP Fusionsproteins. Der Kanal ist im Soma und den Dendriten zu finden. Körner Zelle (links), Pyramidalzelle (rechts).

Messungen von Abbildung 6.10

Das Neuron besitzt einen langen und mehrere kurze Dendriten. Die Kulturdichte ist im Vergleich zu den anderen Messungen an transformierten Zellen eher gering und mit den Messungen in Kapitel 5 vergleichbar.

Das Ruhepotential liegt bei -49mV . Das Aktionspotential mit Kv1.4 am Soma ist sehr schmal, erreicht sein Maximum bei $+21\text{mV}$ und es folgt eine starke Hyperpolarisation. Der Hyperpolarisationspuls erreicht -125mV und löst ein anschließendes Aktionspotential aus. Werden die A-Typ Kanäle und damit auch Kv1.4 mit 4-AP vergiftet, bildet sich eine ausgeprägte Schulter an der fallenden Flanke des Spikes, die Maximalamplitude steigt auf $+34\text{mV}$ und die Hyperpolarisation verschwindet.

Werden nun die Spikeamplituden zu den Hyperpolarisationsamplituden ins Verhältnis gesetzt, ergeben sich keine Unterschiede zwischen vor und nach der Kv1.4-Vergiftung: Die Steigungen liegen bei $-4\%/100\mu\text{m}$ bzw. $-6\%/100\mu\text{m}$ und $6\%/100\mu\text{m}$. Die Aktionspotentiale können hier $190\mu\text{m}$ weit im Dendriten untersucht werden.

Messungen von Abbildung 6.11

Bei dieser Messung ist die Zelldichte sehr hoch. Trotzdem können Signale auf einer Länge von $160\mu\text{m}$ des Dendritenstamms gemessen werden. Auch hier steigt die Spikeamplitude nach der Zugabe von 4-AP: von zuerst -45mV bis $+24\text{mV}$ auf -52mV bis $+30\text{mV}$. Auch die Breite nimmt wieder zu und es tritt keine Hyperpolarisation mehr auf.

Bei der Verhältnisbildung ändert sich auch hier nichts durch die Blockierung der A-Typ Kanäle. Die Steigungen schwanken nur unbedeutend ($-3\%/100\mu\text{m}$ vor bzw. $-8\%/100\mu\text{m}$ und $10\%/100\mu\text{m}$ danach).

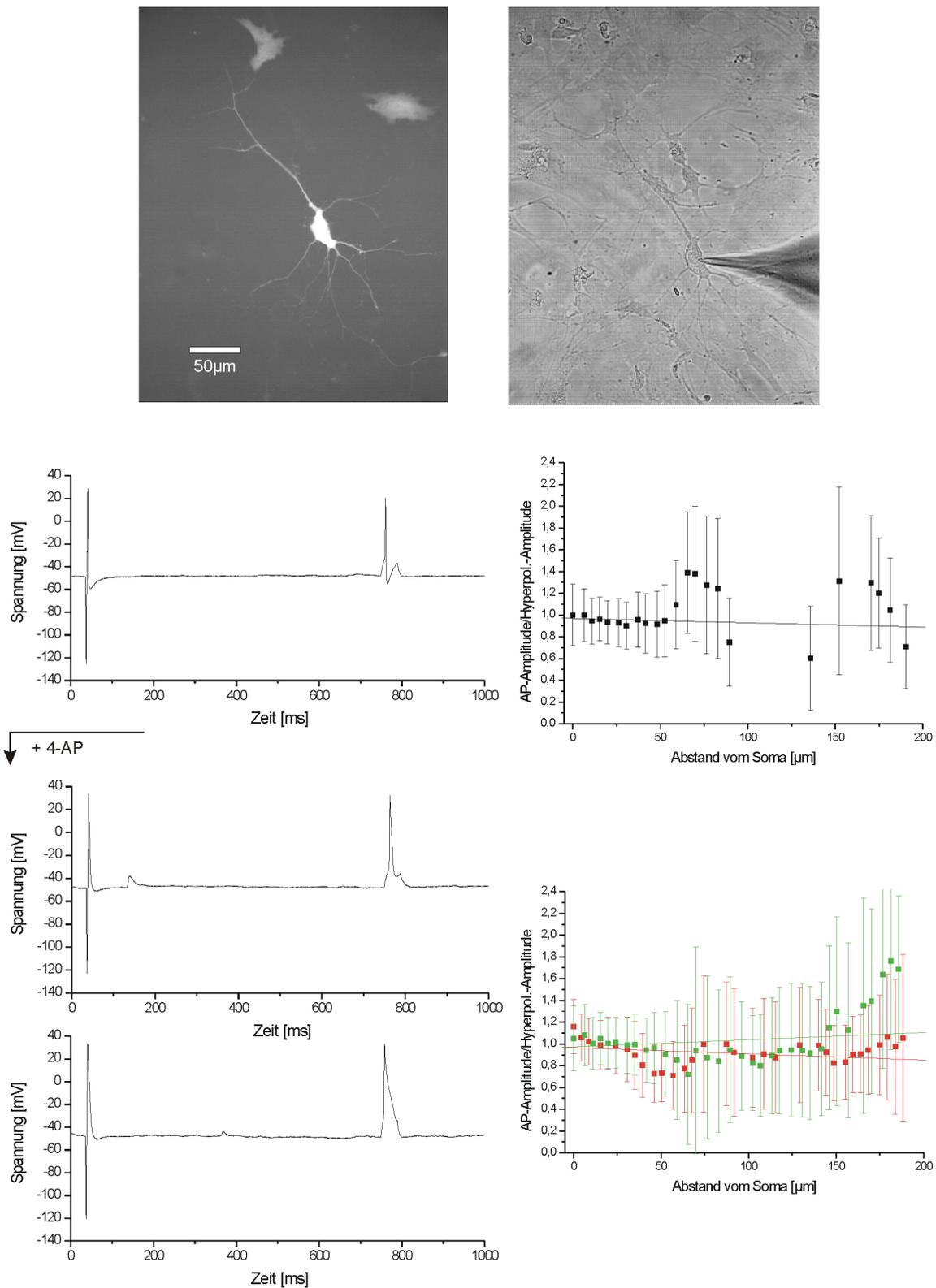


Abbildung 6.10: GFP-Fluoreszenz (oben links) und Phasenkontrast-Bild (oben rechts). Elektrophysiologie vor (Mitte links) und nach der Zugabe von 4-Aminopyridin (2 Messungen unten links); sie führt zu einer starken Schulterbildung des Aktionspotentials bei gleichbleibender Amplitude und zum Verschwinden der Hyperpolarisation. Das Verhältnis der Spike Amplituden (700ms nach der Hyperpolarisation) zur Hyperpolarisationsamplitude ändert sich aber nicht (Steigungen: schwarz -4%/100 μ m, rot -6%/100 μ m, grün 6%/100 μ m). (Kulturdauer 19d)

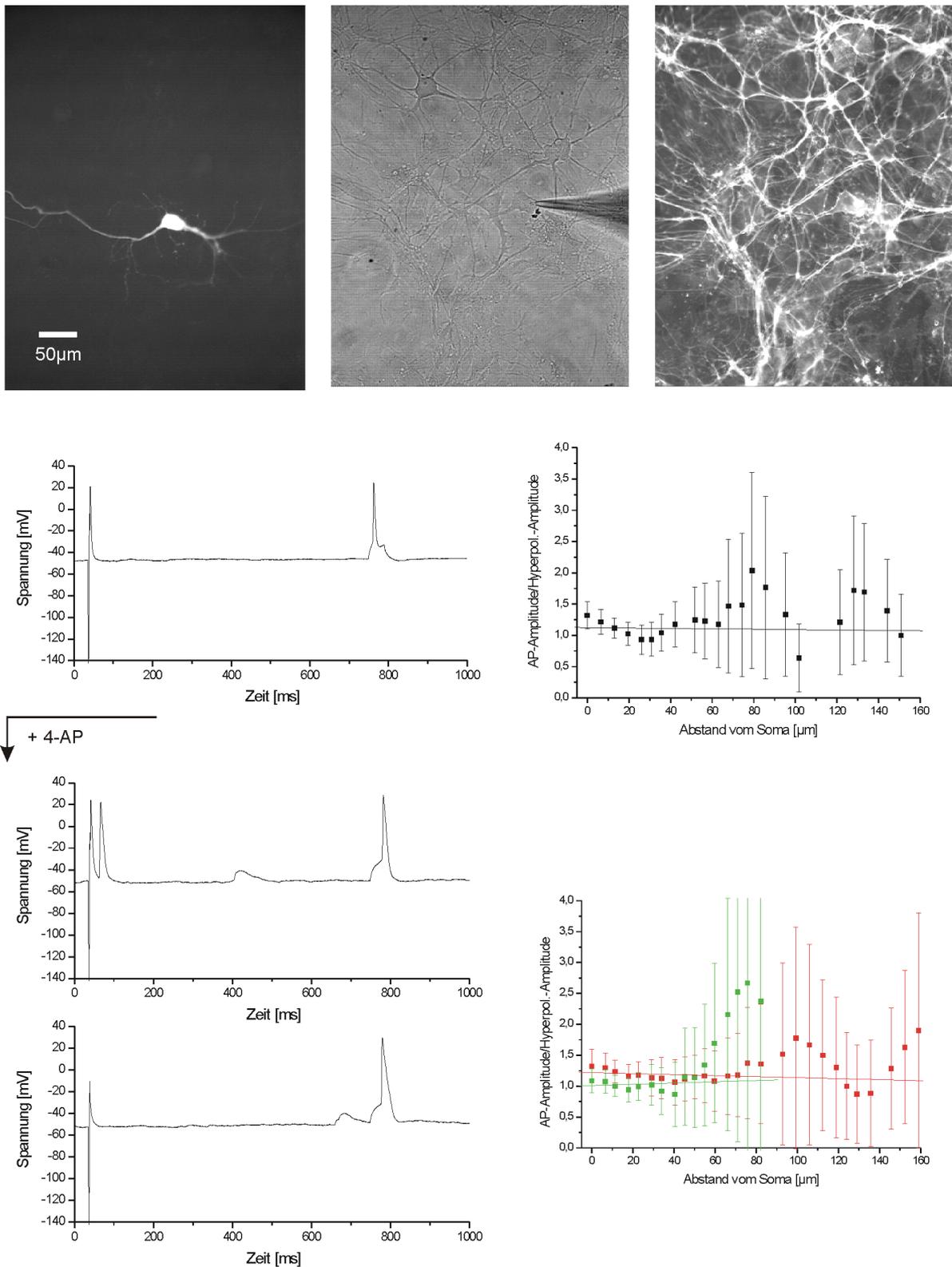


Abbildung 6.11: GFP-Fluoreszenz (oben links), Phasenkontrast-Bild (Mitte oben) und ANNINE-5 Fluoreszenz (oben rechts). Elektrophysiologie vor (Mitte links) und nach der Zugabe von 4-Aminopyridin (2 Messungen unten links). Die Aktionspotentiale verbreitern sich durch die Blockierung, die Backpropagationsamplituden verändern sich aber im Vergleich zu den Hyperpolarisationsamplituden nicht (Steigungen: schwarz $-3\%/100\mu\text{m}$, rot $-8\%/100\mu\text{m}$, grün $10\%/100\mu\text{m}$). Die Aktionspotentialamplitude am Soma bleibt konstant. (Kulturdauer 19d)

wird der inaktivierte Zustand I_6 bei den vorliegenden Messungen nur vernachlässigbar besetzt. Eine mögliche Deutung ist, daß der Kanal bei der ersten Depolarisierung durch ein Aktionspotential geöffnet wird (Zustand O_5) und nach der Repolarisation erst langsam aus dem geschlossenen Zustand C_4 in die deaktivierten Zustände C_3 bis C_0 relaxiert. Bei einer erneuten Depolarisation befinden sich somit noch viele Kanäle im Zustand C_4 , der sehr schnell in den Zustand O_5 wechseln kann und somit der Depolarisation entgegenwirkt bzw. das Aktionspotential dämpft. Daß diese Dämpfung hauptsächlich im Dendriten wirkt, spricht für eine inhomogene Verteilung oder eine inhomogene Modulierung des Kv1.3 Kanals im Soma und Dendriten. Erst weitere Experimente können mehr Klarheit in dieses sehr interessante Verhalten bringen.

Kanal Kv1.4

Die transformierten Hippocampusneurone exprimieren Kv1.4 bei gleicher DNA-Zugabe und Transfektionszeit schwächer als Kv1.3. Der Kanal wird im Soma eingebaut und in die Dendriten transportiert. Intrinsisch wird Kv1.4 im Soma nur in kultivierten Zellen und nicht im Gehirnschnitt gefunden. Es gibt noch keinen spezifischen Blocker für Kv1.4. Deshalb muß auf den A-Typ Kanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP) zurückgegriffen werden. Von 4-AP werden alle A-Typ K^+ Kanäle blockiert, nicht nur Kv1.4. Eindeutige Zuschreibungen auftretender Effekte sind deshalb schwierig.

Die Reizschwelle für Aktionspotentiale wird durch Kv1.4 nicht verändert. Nach der Zugabe von 4-AP kommt es aber zu starken Schulterbildungen der Spikes. Die Zellen haben teilweise Schwierigkeiten, ihr Ruhepotential wieder zu erreichen. Die zuvor starke Hyperpolarisation wird komplett unterbunden. Die Aktionspotentialamplituden am Soma und im Dendriten vor und nach der Vergiftung der A-Typ K^+ Kanäle ändern sich dagegen nicht. Die Aktionspotentiale können, im Gegensatz zu den Zellen mit Kv1.3, deshalb in beiden Fällen gleich weit in den Dendriten verfolgt werden. Kv1.4 trägt somit hauptsächlich zur Repolarisation und zur Hyperpolarisation der Zellen bei, aber nichts zur Modulation der Spikemaximalamplitude.

Kapitel 7

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Aktionspotentiale in Dendriten kultivierter Hippocampus-Neurone mit spannungssensitiven Farbstoffen untersucht.

Dazu wurde ein Meßstand aufgebaut, mit dessen Kamera eine $400\mu\text{m} \times 300\mu\text{m}$ große Fläche aufgenommen werden kann. Die räumliche und zeitliche Auflösung beträgt dabei $4,4\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ und $0,75\text{ms}$. Es kommen die Farbstoffe BNBIQ und erstmals auch ANNINE-5 zum Einsatz. Beide sind für Messungen an Einzelzellen optimiert. Die Anfärbung der Zellen wird mit der neu entwickelten HCl-Methode stark vereinfacht und verbessert. Durch das gute Signal/Rausch-Verhältnis der Daten ist es nicht nötig mehrere Messungen zu mitteln, wie bei vielen bisherigen Arbeiten. Aktionspotentiale können auch in den empfindlichen und feinen Dendriten einzelner hippocampaler Neurone sowie kleiner Netzwerke in einem einzigen Lauf gemessen werden. Alle auflösbaren Strukturen können gleichzeitig untersucht werden und nicht wie bei Patch-Clamp Messungen an nur wenigen Stellen. Außerdem ist es jetzt auch möglich, Aktionspotentiale in Dendriten von Neuronen trotz hoher Hintergrundfluoreszenz zu detektieren, wie z.B. auf Gliarasen oder bei hoher Zelldichte. Dies ist ein erster Schritt zu Messungen im Gehirnschnitt mit Einzellaufklärung.

Mit diesem Aufbau wird hier zwei Fragestellungen nachgegangen:

Wie pflanzen sich Aktionspotentialgruppen in Dendriten kultivierter Hippocampusneurone fort?

Aktionspotentiale bewahren im Rahmen der Meßgenauigkeit ihre Form auch im Dendriten. Vergleicht man jedoch zwei Aktionspotentiale einer Gruppe, so ist das spätere verbreitert und bildet eine Schulter. In den meisten Fällen kann keine aktivitätsabhängige Dämpfung der Aktionspotentiale wie im Gehirnschnitt gefunden werden: Das Verhältnis zweier Aktionspotentialamplituden eines Aktionspotentialzugs ist im ganzen Dendriten konstant. Nur in wenigen Messungen wird eine stärkere Dämpfung eines späteren Aktionspotentials gefunden, die etwa halb so stark wie in vergleichbaren Messungen im Gehirnschnitt ist.

Kann die Fortpflanzung der Aktionspotentiale in Dendriten mittels Gentechnik verändert werden?

Die Hippocampusneurone werden dazu mit zwei spannungsabhängigen Kaliumkanäle transfiziert und erstmals deren Auswirkung auf die Aktionspotentiale im Dendriten untersucht. Während der Kanal Kv1.4 die Re- und Hyperpolarisation des Aktionspotentials beeinflusst, steuert Kv1.3 die Aktionspotentialamplitude in

zweifacher Weise: Er dämpft die Amplitude der Spikes im Dendriten und erzeugt zusätzlich eine aktivitätsabhängige Dämpfung späterer Aktionspotentiale sowohl bei Aktionspotentialgruppen als auch bei Spikes die 700ms auseinanderliegen. Es kann somit ein Kurzzeitgedächtnis des Dendritenbaums erzeugt werden.

Hiermit ist der Grundstein gelegt für weitere Untersuchungen der Signalverarbeitung in Dendriten und das gezielte Design dendritischer Eigenschaften für neuronale Netze mit spannungsabhängigen Ionenkanälen.

Anhang

Anhang A: Materialien für die Zellkultur

Anhang B: Materialien für die Transfektion von Neuronen

Anhang C: Materialien für die elektrophysiologischen Messungen

Anhang D: Lampenspektrum und Transmission der verwendeten Filter

Anhang E: Meßprotokolle

Anhang F: Synaptophysin Immunofluoreszenz-Anfärbung

Anhang A

Materialien für die Zellkultur

Zellkulturschalen zum Preplattieren: NUNC (Nunclon TM Surface)

Sterile Einmalpipetten: Greiner

Gläschen: 30mm Assistent

Silikonkammern: MCB-Kammern (Innendurchmesser 12mm) Flexiperm, IN VITRO, Osterode

DISG

NaCl	Sigma S-5886	135mM	7,9g/l
KCl	Sigma P-5405	5,4mM	0,4g/l
Na ₂ HPO ₄	Sigma S-5136	0,25mM	35mg/l
KH ₂ PO ₄	Merck 1.04873	0,25mM	32mg/l
Glucose	Sigma G-7021	5,6mM	1,0g/l
Saccharose	Merck 7654	60mM	20g/l

DISG wird mit NaOH auf pH 7,0 bis pH 7,2 (schwach gepuffert) eingestellt.

Versene

NaCl	Sigma S-5886	155mM	9g/l
EGTA	Sigma E-4378	0,53mM	0,20g/l

pH wird mit NaOH auf 7,2 eingestellt.

Papain

0,5mg/ml (Sigma P-4762) in PBS 25mM mit 3% BSA

Dispergierlösung

MEM	Biochrom T038-01		9,67g/l
Hepes	Sigma H-9136	15,75mM	3,75g/l
Glucose	Sigma G-7021	33,30mM	6,00g/l
FBS	Gibco 10106		100ml/l

Der pH wird vor der Zugabe von FBS auf 7,2 eingestellt; dann wird sterilfiltriert und die 10% FBS zugegeben.

DMEM

DMEM mit Glutamax	Gibco 61965-026		
FBS	Gibco 10106-078	10%	
Penicillin/Streptomycin	Gibco 15140-114	1%	

L-15 Medium

L-15 (Leibovitz 15) mit Glutamax Gibco 31415-029
FBS Gibco 10106-078 5%

Neurobasal

Neurobasal Medium Gibco 21103-049
B27 Supplement Gibco 17504-036 2%
Glutamax I Gibco 35050-038 1%

Anhang B

Materialien für die Transfektion von Neuronen

2x HeBs-Puffer

NaCl	Sigma S-5886	274mM	16g/l
KCl	Sigma P-5405	10mM	750mg/l
Na ₂ HPO ₄	Sigma S-5136	1,4mM	200mg/l
Glucose	Sigma G-7021	15mM	2,7g/l
HEPES	Sigma H-9136	42mM	10g/l

Der Puffer wird mit NaOH auf pH 7,05 eingestellt.

Anhang C

Materialien für die elektrophysiologischen Messungen

Extrazelluläre Lösung

NaCl	Sigma S-5886	135mM	7,9g/l
KCl	Sigma P-5405	5,4mM	0,4g/l
CaCl ₂	Merck 2388	1,8mM	0,34g/l
MgCl ₂ *6H ₂ O	Sigma M-2393	1mM	0,2g/l
Glucose	Sigma G-7021	10mM	1,8g/l
Hepes	Sigma H-9136	5mM	1,2g/l

Mit KOH wird pH7,4 eingestellt.

Intrazelluläre Lösung

Standard-Patch-Pipettenlösung

KCl	Sigma P-5405	140mM	10,4g/l
MgCl ₂ *6H ₂ O	Sigma M-2393	2mM	0,4g/l
EGTA	Sigma E-4378	1mM	0,38g/l
Hepes	Sigma H-9136	5mM	1,2g/l

Mit KOH wird pH7,3 eingestellt.

Patch-Pipettenlösung nach Spruston et al. [38]

Kalium-Gluconat	Sigma G-4500	115mM	26,9g/l
KCl	Sigma P-5405	20mM	1,49g/l
EGTA	Sigma E-4378	10mM	3,8g/l
Hepes	Sigma H-9136	10mM	2,38g/l
Natrium-Phosphocreatin	Sigma P-7936	10mM	2,55g/l
MgATP	Sigma A-9187	4mM	2,03g/l
NaGTP	Sigma G-8877	0,3mM	157mg/l

pH 7,3 mit KOH.

Natrium-Phosphocreatin, MgATP und NaGTP sind in wässriger Lösung nicht lange haltbar. Deshalb werden sie trocken eingewogen, 100-fach konzentriert mit eiskalter Stammlösung (Pipettenlösung ohne diese Zusätze) angesetzt, tagesrationsweise abgefüllt und möglichst schnell eingefroren. Die Pipettenlösung wird täglich aus Stammlösung und dem Konzentrat frisch angesetzt und immer auf Eis aufbewahrt.

Anhang D

Lampenspektrum und Transmissionen der verwendeten Filter

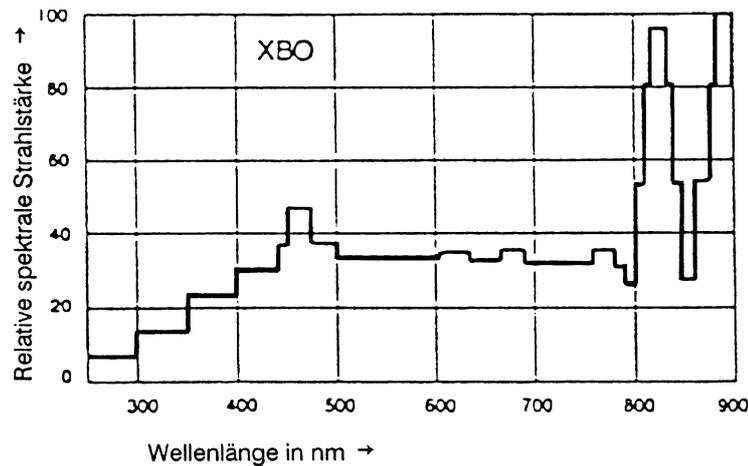


Abbildung 7.1: Spektrum der XBO-Lampe (Datenblatt Mikroskopleuchte mit XBO 75, Zeiss, Jena)

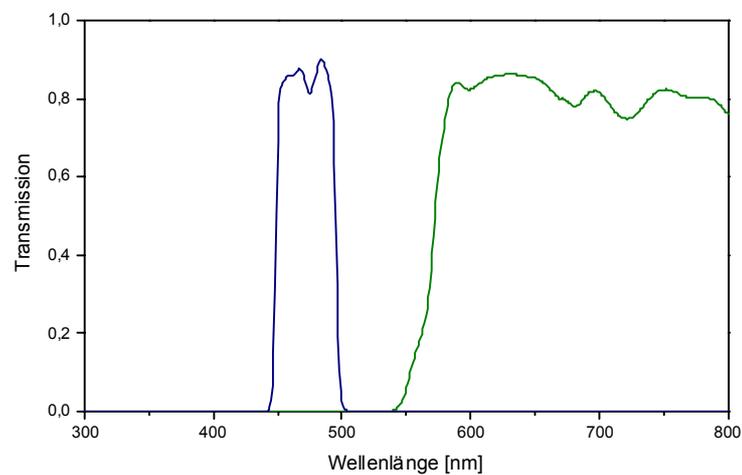


Abbildung 7.2: Filtersatz für BNBIQ: Anregungsbandpaß BP470/40 (blau), Farbteiler FT560 und Langpaß LP550 (FT und LP zusammen gemessen ergibt LP565, grün).

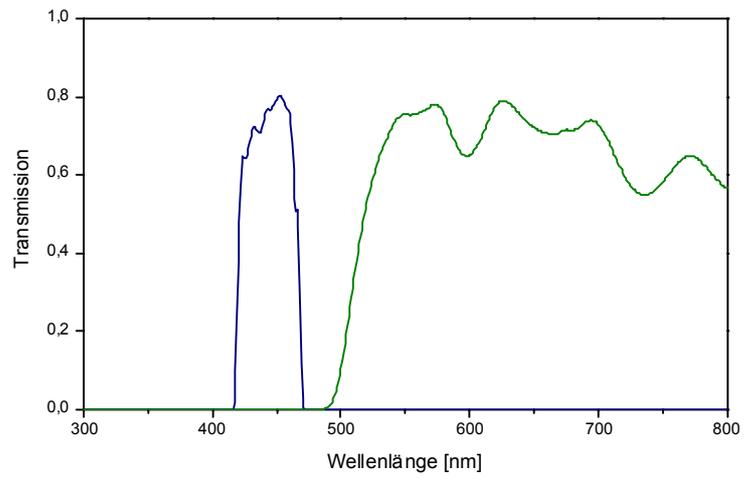


Abbildung 7.3: Filtersatz für ANNINE V: Anregungsbandpaß BP450/50 (blau), Farbteiler FT515 und Langpaß LP515 (FT und LP zusammen gemessen ergibt LP515, grün).

Anhang E

Meßprotokolle

Protokoll 1: Messungen von zwei einzelnen Aktionspotentialen zwischen denen ein 800ms Train ausgelöst wird

Elektrophysiologisches Meßprotokoll im Current-Clamp-Mode:

- 40ms Ruhepotential oder leichtes Klemmen der Zelle auf ein Potential zwischen -60mV bis -70mV, um Spontanaktivität zu unterdrücken und einen Train sicherer auszulösen
- 8ms Strominjektion zum Auslösen eines Aktionspotentials
- 35ms Ruhepotential oder leichtes Klemmen der Zelle
- 3ms negativer Strompuls führt zur Hyperpolarisation der Zelle
- 3ms positiver Strompuls führt zur Repolarisation der Zelle zum Ruhepotential
- 21ms Ruhepotential oder leichtes Klemmen der Zelle
- 780ms Strominjektion zur Auslösung eines Trains
- 40ms Ruhepotential oder leichtes Klemmen der Zelle
- 8ms Strominjektion zur Auslösung eines Aktionspotentials
- 35ms Ruhepotential oder leichtes Klemmen der Zelle
- 3ms negativer Strompuls führt zur Hyperpolarisation der Zelle
- 3ms positiver Strompuls führt zur Repolarisation der Zelle zum Ruhepotential
- 21ms Ruhepotential oder leichtes Klemmen der Zelle

Protokoll 2: Messungen zweier Aktionspotentiale zwischen denen Aktionspotentiale einzeln ausgelöst werden

Elektrophysiologisches Meßprotokoll in Current-Clamp-Mode:

- 29ms Ruhepotential bei -45mV
- 1ms Strompuls um ein Aktionspotential auszulösen
- 33ms Ruhepotential
- 2ms hyperpolarisierender Puls

-
- 2ms repolarisierender Puls
 - 82ms Ruhepotential
 - 1ms Strompuls um ein Aktionspotential auszulösen
 - 49ms Ruhepotential, 1ms Strompuls um ein Aktionspotential auszulösen, 12 mal wiederholt
 - 33ms Ruhepotential
 - 2ms hyperpolarisierender Puls
 - 2ms repolarisierender Puls
 - 213ms Ruhepotential

Protokoll 3: Messungen von zwei Aktionspotentialen eines Trains

Elektrophysiologisches Meßprotokoll im Current-Clamp-Mode:

- 40ms Ruhepotential oder leichte Strominjektion zur Vermeidung von Spontanaktivität
- 820ms Strominjektion zur Aulösung eines Trains
- 140ms Ruhepotential oder leichte Strominjektion

Protokoll 4: Messung eines ganzen Trains

Das elektrophysiologische Meßprotokoll entspricht dem von Protokoll 3, nur wird die Trainedauer auf 340ms bzw 430ms reduziert. Die optischen Gesamtmeßzeiten (Shutter offen) waren 400ms bzw. 500ms.

Protokoll 5: Hyperpolarisation und Aktionspotential

Elektrophysioloisches Meßprotokoll im Current-Clamp-Mode:

- 35ms Ruhepotential
- 2ms hyperpolarisierender Puls
- 2ms repolarisierender Puls
- 710ms Ruhepotential
- 50ms Strominjektion um ein Aktionspotential auszulösen
- 211ms Ruhepotential

Anhang F

Synaptophysin Immunofluoreszenz-Anfärbung

- Medium von den Zellen absaugen
- 1x kurz mit PBS waschen und wieder absaugen
- Ethanol (-20°C) zu den Zellen zugeben und 10 min im Gefrierschrank (-20°C) fixieren
- Ethanol abgießen und Schälchen mit fixierten Zellen trocknen lassen
- zur Permeabilisierung der Zellmembranen 10min in PBS+3% TritonX100 (6683, Roth, Karlsruhe) inkubieren
- 2x mit PBS waschen
- Unspezifische Bindungen des Antikörpers werden durch 30min Blockierung mit PBS+3%BSA (Bovin Serum Albumin, A-9771, Sigma) bei Raumtemperatur verringert
- Absaugen, einmal mit PBS waschen, absaugen und trocknen lassen
- Monoclonalen Anti-Synaptophysin (mouse IgG, S-5768, Sigma) entsprechend der Titerangabe (working dilution) 1:200 mit PBS (250µl pro Schälchen) verdünnt auf die Zellen geben
- Schälchen wird abgedichtet (feuchte Kammer) und über Nacht im Kühlschrank inkubiert
- 1x mit PBS spülen
- 3x je 10min mit PBS auf Wippe waschen
- 1x mit Wasser abspülen und trocknen lassen
- 2. Antikörper Anti-IgG mouse, der mit FITC markiert ist, (F-5897, Sigma) 1:125 mit PBS (250µl proSchälchen) verdünnt zugeben und 30 min im Brutschrank inkubieren (ab diesem Schritt sollten die Schälchen möglichst vor Licht geschützt werden)
- 1x mit PBS spülen
- 3x je 10min mit PBS auf Wippe waschen
- 1x kurz mit Wasser waschen und trocknen lassen

Literatur

- [1] Antic S., Zecevic D., *Optical signals from neurons with internally applied voltage-sensitive dyes*, J.Neurosci. **15(2)** (1995), 1392–1405.
- [2] Antic S., Major G., Zecevic D., *Fast optical recordings of membrane potential changes from dendrites of pyramidal neurons*, J.Neurophysiol. **82** (1999), 1615–1621.
- [3] Banker G., Goslin K., *Culturing nerve cells, second edition*, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts and London, England, 1998.
- [4] Boyer C., Schikorski T., Stevens C.F., *Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain*, J.Neurosci. **18(14)** (1998), 5294–5300.
- [5] Bullen A., Saggau P., *High-speed, random-access fluorescence microscopy: II. Fast quantitative measurements with voltage-sensitive dyes*, Biophys.J. **76** (1999), 2272–2287.
- [6] Bullen A., Patel S.S., Saggau P., *High-speed, random-access fluorescence microscopy: I. High-resolution optical recording with voltage-sensitive dyes and ion indicators*, Biophys.J. **73** (1997), 477–491.
- [7] S.R. y Cajal, *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres, vol.2*, Maloine, Paris, 1911.
- [8] Callaway J.C., Ross W.N., *Frequency-dependent propagation of sodium action potentials in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons*, J.Neurosci **74** (1995), 1395–1403.
- [9] Campagnola P.J., Wei M., Lewis A., Loew L.M., *High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by harmonic generation*, Biophys.J. **77** (1999), 3341–3349.
- [10] Cayabyab F.S., Khanna R., Jones O.T., Schlichter L.C., *Suppression of the rat microglia Kv1.3 current by scr-family tyrosine kinases and Oxygen/Glucose deprivation*, Eur.J.Neurosci. **12(6)** (2000), 1949–1960.
- [11] Chien C.-B. , Pine J., *Voltage-sensitive dye recording of action potentials and synaptic potentials from symathetic microcultures*, Biophys.J. **60** (1991), 697–711.
- [12] Colbert C.M. , Magee J.C., Hoffman D.A., Johnston D., *Slow recovery from inactivation of Na⁺ channels underlies the activity-dependent attenuation of dendritic action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons*, J.Neurosci. **17(17)** (1997), 6512–6521.
- [13] Colbert C.M. , Johnston D., *Protein kinase C activation decreases activity-dependent attenuation of dendritic Na⁺ current in hippocampal CA1 pyramidal neurons*, J.Neurophysiol. **79** (1998), 491–495.
- [14] Cook E.P., Johnston D., *Active dendrites reduce location-dependent variability of synaptic input trains*, J.Neurophysiol. **78** (1997), 2116–2128.
- [15] Craig A.M., Banker G., *Neuronal polarity*, Annu.Rev.Neurosci. **17** (1994), 267–310.

-
- [16] Douglass J., Osborn P.B., Cai Y.C., Wilkinson M., Christie M.J., Adelman J.P., *Characterization and functional expression of a rat genomic DNA clone encoding a lymphocyte potassium channel*, *J.Immunol.* **144** (1990), 4841–4850.
- [17] P. Fromherz, *Monopol-dipol model for symmetrical solvatochromism of hemicyanine dyes*, *J.Phys.Chem.* **99(18)** (1995), 7188–7192.
- [18] Fromherz P., Vetter T., *Propagation of voltage transients in arborized neurites of Retzius cells of the leech in culture*, *Z.Naturforsch.* **46c** (1991), 687–696.
- [19] Fromherz P., Vetter T., *Cable properties of arborized Retzius cells of the leech in culture as probed by a voltage-sensitive dye*, *Proc.Natl.Acad.Soc.USA* **89** (1992), 2041–2045.
- [20] Golding N.L., Jung H.-Y., Mickus T., Spruston N., *Dendritic calcium spike initiation and repolarization are controlled by distinct potassium channel subtypes in CA1 pyramidal neurons*, *J.Neurosci.* **19(20)** (1999), 8789–8798.
- [21] Golding N.L., Spruston N., *Dendritic sodium spikes are variable triggers of axonal potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons*, *Neuron* **21** (1998), 1189–1200.
- [22] Gonzalez J.E., Tsien R.Y., *Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer*, *Chemistry and Biology* **4** (1997), 269–277.
- [23] Grinvald A., Ross W.N., Farber I., *Simultaneous optical measurements of electrical activity from multiple sites on processes of cultured neurons*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **78** (1981), 3245–3249.
- [24] Grinvald A., Salzberg B.M., Lev-Ram V., Hildesheim R., *Optical recording of synaptic potentials from processes of single neurons using intracellular potentiometric dyes*, *Biophys.J* **51** (1987), 643–651.
- [25] Grissmer S., Dethlefs B., Wasmuth J.J., Goldin A.L., Gutman G.A., Cahalan M.D., Chandy K.G., *Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K channel gene*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87** (1990), 9411–9415.
- [26] Grosse G., Draguhn A., Höhne L., Tapp R., Veh R.W., Ahnert-Hilger G., *Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: Development and activity-dependent regulation*, *J.Neurosci.* **20(5)** (2000), 1869–1882.
- [27] Häusser M., Stuart G., Racca C., Sakmann B., *Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons*, *Neuron* **15** (1995), 637–647.
- [28] Hodgkin A.L., Huxley A.F., *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*, *J.Physiol.* **117** (1952), 500–544.
- [29] Hoffman D.A., Magee J.C., Colbert C.M., Johnston D., *K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons*, *nature* **387** (1997), 869–875.
- [30] Hoffman D.A., Johnston D., *Downregulation of transient K⁺ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC*, *J.Neurosci.* **18(10)** (1998), 3521–3528.

- [31] Hoffman D.A., Johnston D., *Neuromodulation of dendritic action potentials*, J.Neurophysiol. **81** (1999), 408–411.
- [32] Ichikawa M., Iijima T., Matsumoto G., *Real-time optical recording of neural activities in the brain*, Oxford University Press, New York, 1993.
- [33] Iwasato T., Datwani A., Wolf A., Nishiyama H., Taguchi Y., Tonegawa S., Knöpfel T., Erzurumlu R.S., Itohara S., *Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex*, nature **406** (2000), 726–731.
- [34] M. Jenkner, *Hybride Netzwerke aus Neuronen von Lymnaea stagnalis und Silizium-Chips*, Doktorarbeit, Technische Universität München, 1999.
- [35] Johnston D., Hoffman D.A., Colbert C.M., Magee J.C., *Regulation of back-propagating action potentials in hippocampal neurons*, Curr.Op.Neurobiol. **9** (1999), 288–292.
- [36] Johnston D., Hoffman D.A., Magee J.C., Poolos N.P., Watanabe S., Colbert C.M., Migliore M., *Topical review: Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons*, J.Physiol. **525.1** (2000), 75–81.
- [37] Johnston D., Wu S.M., *Foundations of cellular neurophysiology*, MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 1999.
- [38] Jung H.-Y., Mickus T., Spruston N., *Prolonged sodium channel inactivation contributes to dendritic action potential attenuation in hippocampal pyramidal neurons*, J.Neurosci. **17(17)** (1997), 6639–6646.
- [39] Kawaguchi H., Fukunishi K., *Dendrite classification in rat hippocampal neurons according to signal propagation properties*, Exp.BrainRes. **122** (1998), 378–392.
- [40] Kawaguchi H., Tokioka R., Murai N., Fukunishi K., *Multichannel optical recording of neuronal network activity and synaptic potentiation in dissociated cultures from rat hippocampus*, Neurosci.Lett **19** (1996), 177–180.
- [41] K. Kottig, *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie an Lipidvesikeln auf oxidiertem Silizium*, Doktorarbeit, Technische Universität München, 2000.
- [42] B. Kuhn, *Modulation zweidimensionaler Fluoreszenzspektren durch das elektrische Feld in einer Nervenmembran*, Diplomarbeit, Universität Ulm, 1996.
- [43] J. Kupper, *Functional expression of GFP-tagged Kv1.3 and Kv1.4 channels in HEK 293 cells*, Eur.J.Neurosci. **10** (1998), 3908–3912.
- [44] Lambacher A., Fromherz P., *Orientation of hemicyanine dye in lipid membrane measured by fluorescence interferometry on a silicon chip*, J.Phys.Chem **105(2)** (2001), 343–346.
- [45] Larkum M.E., Rioult M.G., Lüscher H.-R., *Propagation of action potentials in the dendrites of neurons from rat spinal cord slice cultures*, J.Neurophysiol. **75** (1996), 154–170.

-
- [46] Larkum M.E., Kaiser K.M.M., Sakmann B., *Calcium electrogenesis in distal apical dendrites of layer 5 pyramidal cells at a critical frequency of back-propagating action potentials*, PNAS **96** (1999), 14600–14604.
- [47] Larkum M.E., Zhu J.J., Sakmann B., *A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers*, nature **398** (1999), 338–341.
- [48] Loew L.M., Cohen L.B., Salzberg B.M., Obaid A.L., Bezanilla F., *Charge-shift of aminostyrylpyridinium dyes on the squid giant axon*, Biophys.J. **47** (1985), 71–77.
- [49] Magee J.C., Johnston D., *Characterization of voltage-gated Na⁺ and Ca⁺ channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons*, J.Physiol. **487.1** (1995), 67–90.
- [50] Marom S., Abbott L.F., *Modeling state-dependent inactivation of membrane currents*, Biophys.J **67** (1994), 515–520.
- [51] Marom S., Goldstein S.A.N., Kupper J., Levitan I.B., *Mechanism and modulation of inactivation of the Kv3 potassium channel*, Receptors and channels **1** (1993), 81–88.
- [52] Marom S., Levitan I.B., *State-dependent inactivation of the Kv3 potassium channel*, Biophys.J. **67** (1994), 579–589.
- [53] J.H. Martin, *Neuroanatomy*, Elsevier, New York, Amsterdam, London, 1989.
- [54] S.L. Meyer, *Data analysis for scientists and engineers*, ch. 32, pp. 359–376, J. Wiley & Sons, Inc., 1975.
- [55] Meyer E., Müller C.O., Fromherz P., *Cable properties of dendrites in hippocampal neurons of the rat mapped by a voltage-sensitive dye*, Europ.J.Neurosci. **9** (1997), 778–785.
- [56] Mickus T., Jung H.-Y., Spruston N., *Properties of slow, cumulative sodium channel inactivation in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons*, Biophys.J. **76** (1999), 846–860.
- [57] M. Migliore, *Modeling the attenuation and failure of action potentials in the dendrites of hippocampal neurons*, Biophysical Journal **71** (1996), 2394–2403.
- [58] C.O. Müller, *Spannungsprofile linearer Neurite: Messungen mit Fluoreszenzfarbstoffen an Neuronen von Hirudo medicinalis*, Doktorarbeit, Universität Ulm, 1994.
- [59] Murakoshi H., Trimmer J. S., *Identification of the Kv2.1 K⁺ channel as a major component of the delayed rectifier K⁺ current in rat hippocampal neurons*, J.Neurosci **19(5)** (1999), 1728–1735.
- [60] W. Novak, *Aktivitätsabhängige Signalausbreitung an linear gewachsenen Dendriten, gemessen mit spannungssensitiven Farbstoffen*, Doktorarbeit, Technische Universität München, 1998.
- [61] G. Ostertag, *Stark-Spektroskopie von Hemicyaninfarbstoffen in viskoser polarer Matrix*, Doktorarbeit, Universität München, 1998.

- [62] Parsons T.D., Kleinfeld D., Raccaia-Behling F., Salzberg B.M., *Optical recording of the electrical activity of synaptically interacting Aplysia neurons in culture using potentiometric probes*, Biophys.J. **56** (1989), 213–221.
- [63] Poolos N.P., Johnston D., *Calcium-activated potassium conductances contribute to action potential repolarization at the soma but not the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons*, J.Neurosci. **19**(13) (1999), 5205–5212.
- [64] A.A. Prinz, *Optische Detektion der elektrischen Signalausbreitung in Neuronen*, Diplomarbeit, Universität Ulm, 1996.
- [65] A.A. Prinz, *Towards defined networks: Guided growth, cable transmission and electrical synapses of cultured snail neurons*, Doktorarbeit, Technische Universität München, 2000.
- [66] Röcker C., Heilemann A., Fromherz P., *Time-resolved fluorescence of a hemicyanine dye: Dynamics of rotamerism and resolution*, J.Phys.Chem. **100**(30) (1996), 12172–12177.
- [67] Ross W.N., Arechiga H., Nicholls J.G., *Optical recording of calcium and voltage transients following impulses in cell bodies and processes of identified leech neurons in culture*, J.Neurosci. **7**(12) (1987), 3877–3887.
- [68] Sandler V.M., Ross W.N., *Serotonin modulates spike backpropagation and associated $[Ca^{2+}]_i$ changes in the apical dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons*, J.Neurophysiol. **81** (1999), 216–224.
- [69] Schaffer P., Ahammer H., Müller W., Koidl B., Windisch H., *Di-4-ANEPPS causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes*, Pflügers Arch. **426** (1994), 548–551.
- [70] Sheng M., Tsaur M.L., Jan Y.N., Jan L.Y., *Subcellular segregation of two A-type K^+ channel proteins in rat central neurons*, Neuron **9**(2) (1992), 271–284.
- [71] G.M. Shepherd, *The synaptic organization of the brain*, Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [72] Siano D.B., Metzler D.E., *Band shapes of the electronic spectra of complex molecules*, J.Chem.Phys. **51** (1969), 1856–1861.
- [73] Siegel M.S., Isacoff E.Y., *A genetically encoded optical probe of membrane voltage*, Neuron **19** (1997), 735–741.
- [74] Spencer R.H., Chandy K.G., Gutman G.A., *Immunological identification of the shaker-related $Kv1.3$ potassium channel protein in T and B lymphocytes, and detection of related proteins in flies and yeast*, Biochem.Biophys.Res.Com. **191**(1) (1993), 201–206.
- [75] Spruston N., Schiller Y., Stuart G., Sakmann B., *Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites*, Science **268** (1995), 297–300.
- [76] J.F. Storm, *Potassium currents in hippocampal pyramidal cells*, Progress in Brain Research **83** (1990), 161–187.

-
- [77] Stuart G., Spruston N., Häusser M., *Dendrites*, Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [78] Stuart G., Schiller J., Sakmann B., *Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons*, J.Physiol. **505.3** (1997), 617–632.
- [79] Stuart G.J., Sakmann B., *Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites*, nature **367** (1994), 69–72.
- [80] Stühmer W., Ruppersberg J.P., Schroter K.H., Sakmann B., Stocker M., Giese K.P., Perschke A., Baumann A., Pongs O., *Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain*, EMBO J. **8(11)** (1989), 3235–3244.
- [81] Swanson R., Marshall J., Smith J. S., Williams J. B., Boyle M.B., Folander K., Luneau C.J., Antanavange J., Oliva C., Buhrow S.A. et Al., *Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain*, Neuron **4(6)** (1990), 929–939.
- [82] Takashima I., Ichikawa M., Iijima T., *High-speed CCD imaging system for monitoring neural activity in vivo and in vitro, using a voltage-sensitive dye*, J.Neurosci.Methods **91** (1999), 147–159.
- [83] Tsubakawa H., Ross N., *IPSPs modulate spike backpropagation and associated $[Ca^{2+}]_i$ changes in the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons*, J.Neurophysiol. **76** (1996), 2896–2906.
- [84] Tsubokawa H., Ross W.N., *Muscarinic modulation of spike backpropagation in the apical dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons*, J.Neurosci. **76** (1997), 2896–2906.
- [85] Turrigiano G.G. , Marder E., Abbott L.F., *Cellular short-term memory from a slow potassium conductance*, J.Neurophysiol. **75** (1996), 963–966.
- [86] Veh R.W., Lichtinghagen R., Sewing S., Wunder F., Grumbach I.M., Pongs O., *Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: Contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain*, Eur.J.Neurosci. **7** (1995), 2189–2205.
- [87] Westenbroek R., Merrick D., Catterall W., *Differential subcellular localization of the RI and RII Na^+ channel subtypes in central neurons*, Neuron **3** (1989), 695–704.
- [88] Windhorst U., Johansson H., *Modern techniques in neuroscience research*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1999.
- [89] D. Zecevic, *Multiple spike-initiation zones in single neurons revealed by voltage-sensitive dyes*, nature **381** (1996), 322–325.
- [90] Ziv N.E., Smith S.J., *Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation*, Neuron **17** (1996), 91–102.

Danksagung

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Fromherz für die herausfordernde und vielschichtige Themenstellung, seine unermüdliche Unterstützung und die gleichzeitig gewährten Freiheiten bei der Verwirklichung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Sackmann für die Übernahme des Zweitberichts.

Thomas Knöpfel und seinen Mitarbeitern für die herzliche Aufnahme in Japan und die vielen wissenschaftlichen und kulturellen Erlebnisse!

Gerd Hübener, Birgit Haringer und Michaela Morawetz für die Synthese der Farbstoffe und den nicht enden wollenden Vorrat an Cola-Fläschchen :-)

den Mechanikern Erich Neusser und Walter Wagner, sowie dem Elektroniker Wolfgang Emmert für die ständige Hilfsbereitschaft und die perfekte Realisierung des Meßstands.

Doris Eckerlein für die Präparation der Nervenzellen und die Einführung in die Kunst der Zellkultur.

Jürgen Kupper und Simone Schätzle für die Plasmide und den 'Grundkurs Gentechnik'.

Matthias Merz, Reinhard Kuhn, Karsten Kottig und Andrea Konrad für das gewissenhafte Probelesen dieser Arbeit.

meinem Zimmerkollegen in frühen Tagen dieser Arbeit, Georg Ostertag, für so manche tiefgehende und vergnügliche Diskussion.

Martin Jenkner, Astrid Prinz und Andreas Hub nicht nur für die Hilfe bei so manchem LabVIEW-Problem!

Karsten Kottig, dem wandelnden C'T-Lexikon, für den Support in allen Computerfragen und die vielen, vielen aufmunternden Plaudereien.

allen anderen Mitarbeitern der Abteilung für die familiäre und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

und nicht zuletzt Ingrid, meinen Eltern und allen anderen, die durch ihre unermüdliche Unterstützung während der gesamten Zeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Bernd Kuhn

geboren am 13. April 1970 in Günzburg, Bayern

Staatsangehörigkeit deutsch
Eltern Christine Kuhn, geb. Imminger, und Reinhard Kuhn
Familienstand ledig

Schulausbildung

1976-1980 Grundschule auf der Bleiche in Günzburg
1980-1981 Maria-Theresia Hauptschule in Günzburg
1981-1990 Dossenberger Gymnasium in Günzburg

Studium

1990-1996 Studium der Physik an der Universität Ulm
1993 Zwischenprüfungen für das Lehramt an Gymnasien in Mathematik und Physik an der
 Universität Ulm
1995-1996 Externe Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. P. Fromherz
 in der Abteilung Membran- und Neurophysik
 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München
 Thema: *Modulation zweidimensionaler Fluoreszenzspektren durch das elektrische Feld
 in einer Nervenmembran*
seit 1996 Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Membran- und Neurophysik des
 Max-Planck Instituts für Biochemie in Martinsried bei München
6.-8.1999 Forschungsaufenthalt bei Herrn Dr. Dr. habil. T. Knöpfel
 in der Abteilung Neuronal Circuit Dynamics am Brain Science Institute
 des RIKEN (Institute of Physical and Chemical Research) in Wako-shi bei Tokyo, Japan