
TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Neurowissenschaften

(Direktor: Prof. Dr. A. Konnerth)

Eine neue Methode zur *in vivo* Analyse
neuronaler Netzwerke mittels
Zwei-Photonen-Mikroskopie

Christoph F. H. Stosiek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth

2. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff

Die Dissertation wurde am 19.08.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.12.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	3
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	4
1. EINLEITUNG	6
1.1 METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG NEURONALER NETZWERKE.....	6
1.2 ZWEI-PHOTONEN-FLUORESZENZMIKROSKOPIE.....	8
2. MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1 INJEKTIONSPIPETTEN	11
2.2 FARBSTOFFLÖSUNGEN	11
2.3 HERSTELLUNG VON HIRNSCHNITT-PRÄPARATEN	12
2.4 GANZHIRN-PRÄPARAT	12
2.5 IN-VIVO EXPERIMENTALAUFBAU	13
2.5.1 Narkose	13
2.5.2 Präparation.....	14
2.5.3 Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes	14
2.5.4 Mechanische und elektrische Stimulation.....	15
2.6 ZWEI-PHOTONEN-LASERMIKROSKOPIE	16
3. ERGEBNISSE	18
3.1 HIRNSCHNITT-PRÄPARAT	18
3.2 GANZHIRN-PRÄPARAT	24
3.3 MESSUNG <i>IN VIVO</i>	28
4. DISKUSSION	39
5. PUBLIKATION	43
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	50
LITERATURVERZEICHNIS	51
DANKSAGUNG	55

Zusammenfassung

Es wird ein neuartiges Verfahren zur Beladung neuronaler Zellverbände mit Fluoreszenzfarbstoffen für die anschließende Untersuchung *in vivo* mittels Kalzium-*imaging* dargestellt. Kurze Zeit nach Injektion der membranpermeablen Form von kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen in Hirnschnittpräparaten wurde eine über Stunden stabile intrazelluläre Fluoreszenzintensität in Neuronen erreicht. Dies gelang in verschiedenen neuronalen Strukturen (Kortex, Hippokampus, Cerebellum) mit einer großen Zahl verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in anästhesierten juvenilen oder adulten Tieren. Es wird gezeigt, wie mit dieser Technik kortikale neuronale Netzwerke der Maus *in vivo* mit Fluoreszenzfarbstoffen beladen und mit Hilfe der Zwei-Photonen-Fluoreszenzlasermikroskopie untersucht werden können. Nach Beladung von Neuronen der kortikalen Schicht II/III des primären somatosensorischen Kortex („barrel cortex“) narkotisierter Mäuse konnte die spontane neuronale Aktivität anhand der somatischen Kalziumtransienten registriert werden. Induzierte Kalziumtransienten wurden durch Applikation von Glutamat, extrazelluläre elektrische Stimulation und durch mechanische Stimulation der kontralateralen Tastaare ausgelöst.

Verzeichnis der Abkürzungen

AM-Ester	Acetoxymethyl-Ester
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
APV	2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure (NMDA-Antagonist)
BALB/c	Stammbezeichnung des verwandten Mausmodells
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N'-Tetraessigsäure
CA3	Cornu Ammonis 3 (Subregion des Hippokampus)
Ca ⁺⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CNQX	7-Nitro-2,3-dioxo-1,4- dihydroquinoxaline-6-Carbonitril (AMPA/Kainat-Antagonist)
CO ₂	Kohlendioxid
cw	continuous wave (nicht gepulster Laser)
ΔF	Änderung der Fluoreszenzintensität
DMSO	Dimethylsulfoxid
fl	Femtoliter
fMRI	Funktionelle Magnet-Resonanztomographie
fs	Femtosekunde
G	Gauge
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
Hz	Hertz
IOS	Intrinsische optische Signale
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
λ	Lambda (Wellenlänge)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	millimolar (Konzentrationsangabe)
MΩ	Megaohm
mOsm	milliosmolar
mW	Milliwatt
n	Anzahl
nA	Nanoampere
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	NaOH
Nd:YLF	Neodym-Yttrium Lithium Fluorid
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
P	Alter in Tagen post partum
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMT	photomultiplier tube
pw	pulsed wave (gepulster Laser)
s	Sekunde
Ti:Sapphire	Titan-Saphir
μA	Mikroampere
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
W	Watt
% (w/v)	Massenprozent

1. Einleitung

1.1 Methoden zur Untersuchung neuronaler Netzwerke

Die Untersuchung der Signalverarbeitung in neuronalen Netzwerken mit zellulärer Auflösung liefert elementare Erkenntnisse für das Verständnis höherer kognitiver Funktionen. Die Forschung auf diesem Feld wird durch die sehr hohe Zahl beteiligter Neurone und die nötige hohe zeitliche Auflösung der Registrierung erschwert. Bislang konnte die Aktivität von Neuronenverbänden *in vivo* beispielsweise durch extrazelluläre elektrische Ableitung mittels zahlreicher Elektroden untersucht werden. Der sehr hohen zeitlichen Auflösung dieser elektrischen Signale (Nicolelis und Ribeiro, 2002) steht dabei ihre begrenzte Zuordnung zur Einzelzellaktivität gegenüber. Alternative Ansätze bestehen in bildgebenden Verfahren wie funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRI) (Logothetis et al., 2002), Positronen-Emissions-Tomographie (PET) (Raichle, 1998) sowie der Messung intrinsischer optischer Signale (IOS) (Grinvald et al., 1988) oder der Registrierung der Signale spannungssensitiver Farbstoffe (Orbach et al., 1985, Shoham et al., 1999). Da bei diesen Untersuchungsverfahren oftmals nur sekundäre Signale wie Oxygenierungsgrad des Hämoglobins (fMRI), Glukosemetabolismus (PET) oder Blutflussänderungen (IOS) zur Abschätzung der neuronalen Aktivität registriert werden, weisen die Messungen eine eingeschränkte zeitliche und räumliche Auflösung auf (Logothetis et al., 2002, Roe, 2007, Tashiro et al., 2008).

Eine weitere Untersuchungsmodalität stellen fluorometrische Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Hilfe kalziumsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe dar (Mao et al., 2001, Tsien, R. Y., 1988). Dies wird im Weiteren als Kalzium-*imaging* bezeichnet. Das Prinzip dieser Untersuchungsmethode besteht darin, dass es bei neuronalen Zellen durch elektrische Aktivität in Form einer Depolarisation zu einem Ca^{++} -Einstrom durch verschiedene spannungsgesteuerte Kanäle in der Zellmembran kommt, der als zeitlich begrenzter Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Kalziumtransient) in verschiedenen Kompartimenten der Zellen registriert werden kann (Berridge et al., 2000, Tsien, R. W. und Tsien, 1990). Der Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration kann durch die sekundäre Freisetzung von Ca^{++} aus intrazellulären Speichern noch verstärkt werden (Berridge et al., 2000, Tsien, R. W. und Tsien, 1990). Diese Kalziumtransienten spielen bei der Kommunikation

zwischen Neuronen an Synapsen eine elementare Rolle (Kovalchuk et al., 2000, Neher, 1998, Südhof, 2000, Yuste, R. und Denk, 1995). Für basale Lernvorgänge und somit auch für die Gedächtnisbildung als Form von neuronaler Plastizität sind intrazelluläre Kalziumtransienten eine Grundvoraussetzung (Chittajallu et al., 1998). Viele weitere Vorgänge von Zellmigration und Ausbildung von Zellfortsätzen (Buonanno und Fields, 1999, Gomez und Spitzer, 1999, Komuro und Rakic, 1998, Spitzer et al., 2000) bis hin zum Tod von Neuronen (Berridge et al., 2000) gehen mit intrazellulären Kalziumtransienten einher.

Das Kalzium-*imaging* ermöglicht im Prinzip die gleichzeitige Messung intrazellulärer Kalziumtransienten in einer großen Zahl von Zellen in hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung. Auf diesem Gebiet besteht bereits ein großer Erfahrungsschatz bei der Anwendung an Gewebekulturen und Hirnschnittpräparaten *in vitro*. Durch Einsatz der Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie sind bisher schon Messungen an Einzelzellen *in vivo* bis in eine Tiefe von 500 µm unter der Hirnoberfläche möglich (Svoboda et al., 1997). Beispielsweise konnten Svoboda et al (Svoboda et al., 1997, Svoboda et al., 1999) in den Dendriten von Neuronen des sogenannten „barrel cortex“ Kalziumtransienten mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie nachweisen, die spontan im Rahmen von Aktionspotentialen auftraten und auch solche, die durch sensorische Stimulation hervorgerufen wurden. Mittels eines vergleichbaren Versuchsansatzes konnten Charpak et al (Charpak et al., 2001) in den Mitral-Zellen des Bulbus olfactorius der Ratte Kalziumtransienten messen, die durch olfaktorische Stimulation hervorgerufen wurden.

Neben der Beladung einzelner Zellen existieren bereits Protokolle, um zahlreiche Zellen eines Hirnschnittes *in vitro* mit kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen zu beladen. Dazu werden die Hirnschnitte mit dem Zellmembran-permeablen AM-Ester des jeweiligen Farbstoffes inkubiert (Tsien, R. Y., 1981). Durch intrazelluläre De-Esterifizierung mittels natürlich im Zytoplasma vorhandener Esterasen reichert sich der nun Zellmembran-impermeable und kalziumsensitive Farbstoff im intrazellulären Kompartiment an. Diese Form der Beladung gelingt jedoch verlässlich nur bei Zellkulturen oder Gewebeschnitten von neugeborenen oder juvenilen Tieren. Mit Hilfe der konventionellen Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie können an derartig angefärbten Hirnschnitten Untersuchungen gleichzeitig an zahlreichen Zellen in Tiefen bis zu 200 µm durchgeführt werden (Garaschuk et al., 2000). Die Beladung des Gewebes von älteren und adulten Tieren lässt sich wegen der stärkeren

Myelinisierung auf die oben beschriebene Weise nicht durchführen (Yuste, R., Lanni, F., Konnerth, A., 2000). Auch *in vivo* ist die Beladung großer Zellverbände mit kalziumsensitiven Farbstoffen bisher nicht möglich. Die bereits gelungene Beladung einzelner Zellen *in vivo* mit Hilfe der *patch-clamp* Technik stellt wegen des hohen Aufwandes keine praktikable Alternative dar. Die ursprünglich für den Transfer von Genmaterial in Zellen benutzte Technik der Elektroporation wird seit kurzem auch für die Beladung von Zellen *in vivo* mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen benutzt (Mir, 2008, Nevian und Helmchen, 2007). Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, zelluläre Strukturen mit guter Detailauflösung zu untersuchen, wobei jedoch die Zahl der nacheinander in einem Präparat zu beladenden Zellen aufgrund des technischen Aufwandes limitiert ist.

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit ist die Entwicklung einer neuen Methode, die es ermöglicht, unabhängig vom Alter der Versuchstiere große Neuronenverbände mit kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen *in vivo* zu beladen und so Messungen an neuronalen Netzwerken mit Hilfe der Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie möglich zu machen.

1.2 Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie

Gegenüber der klassischen konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (Ein-Photonen-Anregung) weist die Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie entscheidende Vorteile bei Untersuchungen in der Tiefe von lebendem, stark lichtstreuendem Gewebe auf.

Die Zwei-Photonen-Mikroskopie benutzt im Vergleich zur konfokalen (Ein-Photonen-) Mikroskopie längerwelliges und damit energieärmeres infrarotes Anregungslicht. Während bei der Ein-Photonen-Mikroskopie die Energie eines einzelnen absorbierten Photons ausreicht, um ein Farbstoffmolekül in den angeregten Zustand zu überführen, müssen bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie zwei energieärmere Photonen vom Farbstoffmolekül gleichzeitig absorbiert werden, um das Farbstoffmolekül anzuregen (Denk et al., 1990). Diese Zwei-Photonen-Anregung, von der das Mikroskopieverfahren seinen Namen hat, tritt nur bei sehr großer Photonendichte auf. Um die nötige Photonendichte in der Fokusebene des Mikroskopes zu erreichen, verwendet man Laser, die ihr Licht nicht kontinuierlich emittieren, sondern in ultrakurzen Pulsen mit hoher Photonendichte abgeben. Die Zwei-Photonen-Anregung bietet gegenüber der Ein-Photonen-Anregung einige Vorteile: Durch die längere Wellenlänge des verwendeten Anregungslichtes ist die

Eindringtiefe in das zu untersuchende Gewebe erhöht (Oheim et al., 2001). Das längerwellige Anregungslicht führt zu weniger Gewebeschäden als kurzwelliges, somit höherenergetisches Licht. Effekte wie das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes (*photobleaching*) und Phototoxizität durch Bildung von freien Radikalen bleiben bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie auf ein kleines Volumen in der Fokalebene beschränkt (Centonze und White, 1998) (Abbildung 1). Das emittierte Fluoreszenzlicht entstammt bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie ebenfalls nur dem umschriebenen angeregten Volumen in der Fokalebene, da nur hier die Dichte der Anregungsphotonen für das simultane Auftreffen von zwei Photonen auf einen Fluorophor hoch genug ist. Bei der Ein-Photonen-Anregung findet eine Anregung hingegen nicht nur punktförmig in der Fokalebene, sondern auch entlang des Eintritts- und Austrittskonus des Anregungslichtes im untersuchten Gewebe (Abbildung 1) statt. Dieses nicht der Fokalebene entstammende Fluoreszenzlicht muss daher bei der konfokalen Mikroskopie durch eine Lochblende abgeschirmt werden, da es nicht zur Bildentstehung beitragen soll. Bei der Zwei-Photonenanregung entfällt diese Notwendigkeit, so dass die Ausbeute an Photonen aus der Fokalebene gesteigert werden kann. Diese Phänomene werden in Abbildung 1 demonstriert.



Abb. 1: Ein- und Zwei-Photonen-Anregung von Fluoreszenz im direkten Vergleich

Auf eine mit einer Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs Safranin O gefüllte Kuvette wird im oberen Anteil von rechts das grünen Anregungslicht eines cw Helium-Neon Lasers (543 nm) fokussiert. Dadurch entsteht innerhalb eines Eintritts- und eines schwächeren Austrittskonus Emissionslicht der Farbe Orange.

Auf den unteren Anteil der Kuvette wird von links kommend gepulstes Infrarot-Anregungslicht eines Nd:YLF-Lasers (1047 nm) fokussiert. Nur innerhalb eines punktförmigen Volumens wird eine ausreichend hohe Dichte an Anregungsphotonen erreicht, um durch gleichzeitige Absorption von zwei Photonen Fluoreszenz zu erzeugen (Zwei-Photonen-Effekt).

Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Brad Amos / Science Photo Library, London.

2. Material und Methoden

2.1 Injektionspipetten

Zum Einsatz kamen Kapillaren aus Borosilikatglas (Hilgenberg, Aussendurchmesser 2 mm, Wandstärke 0,3 mm). Diese wurden 4 Stunden in 70% Ethanol eingelegt, anschließend in Aqua ad injectabilia über Nacht gelagert und im Backofen getrocknet. Danach wurden die Kapillaren mit Druckluft (OP-Qualität) ausgeblasen um sie von eventuellen Glassplittern zu befreien. Mit Hilfe eines Pipettenziehgerätes (Narishige PC-10 2-stage Puller) wurden Pipetten mit einem Innendurchmesser der Spitzenöffnung von ca. 3 µm täglich neu hergestellt.

2.2 Farbstofflösungen

Verwandt wurden wässrige Lösungen von Calcium Green 1 AM, Fluo 4 AM, Oregon Green BAPTA 1 AM, Fura PE 3 AM, Fura Red AM, Indo 1 AM, Oregon Green 1 Hexapotassium Salt, Magnesium Green AM und Calcium Green 1 Dextran 3000 (alle Farbstoffe von Molecular Probes, Eugene, Oregon USA; inzwischen Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA).

Aus Gründen der Löslichkeit wurden zunächst 10 mM Stocklösungen der lipophilen Farbstoffe in Dimethylsulfoxid (+20 % (w/v) Pluronic F-127) hergestellt. Diese Stammlösung wurde anschließend auf die Zielkonzentration mit Kalzium-freier Lösung (150 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, mit NaOH auf pH 7,3 titriert, 300 mOsm/kg H₂O) verdünnt. Calcium Green – 1 Dextran 3000 wurde mit dieser Lösung auf eine Konzentration von 12,5 % (w/v) eingestellt.

Die Zielkonzentration der Farbstofflösungen für die schnelle Einbringung ausreichender Farbstoffmengen in das Gewebe betrug 1 mM.

Alle verdünnten Farbstofflösungen wurden filtriert durch Ultrafree MC Zentrifugenfilter (Duro pore Membran, 0,45 µm Porendurchmesser, low affinity, No. UFC30HV25, Millipore Corporation, Bedford, MA USA). Die täglich frisch zubereitete Pipettenlösung wurde bei Raumtemperatur gelagert, da es bei Lagerung auf Eis zur Kristallisation des Farbstoffes und Okklusion der Injektionspipetten kommen kann. Nach mehrstündiger Lagerung der Farbstofflösung wurden diese jeweils vor Anwendung erneut sorgfältig durchmischt.

2.3 Herstellung von Hirnschnitt-Präparaten

Für Vorversuche wurden Hirnschnitt-Präparate nach einem etablierten Protokoll (Edwards, F. A. et al., 1989) (Konnerth, 1990) hergestellt. Hierzu wurden die Tiere (P 1 bis P 16) dekapitiert und der Kopf unmittelbar in 4°C kalte Lösung getaucht. Das Gehirn wurde zusammenhängend entfernt und in 4°C Ringerlösung eingebracht (125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM Glucose), welche mit Carbogen begast wurde (Mischung aus 95 % O₂ und 5 % CO₂, dadurch pH = 7,4). Mit einer Rasierklinge wurden die Hemisphären im Bereich der Fissura longitudinalis cerebri voneinander getrennt und anschließend in der Frontalebene ein kleiner Teil des Gehirnes abgetrennt. Hierdurch wurde eine Auflagefläche geschaffen, um die Hemisphäre nun mit Cyanoacrylat-Klebstoff (Fa. Uhu, Bühl, Deutschland) auf dem vorgekühlten Präparatehalter eines Vibratoms zu befestigen. Nach Füllen der Schneidwanne des Gerätes mit oben genannter kalter Lösung wurden Schnitte von 300 bis 400 µm Dicke hergestellt. Die Hirnschnitte wurden anschließend bei 34 °C in mit Carbogen begaster Lösung in oben genannter Zusammensetzung bis zu ihrer Verwendung gelagert. Hierfür wurde in ein Becherglas ein speziell angefertigter, mit einem feinen Netz bespannter Kunststoffring eingesetzt. Innerhalb des Becherglases wurde mittels der Carbogen-Begasung ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom erzeugt, welcher die Hirnschnitte räumlich fixierte und zudem half, die geschädigten obersten Zelllagen des Präparates abzulösen. Für die Untersuchungen wurden die Hirnschnitte in spezielle Untersuchungskammern überführt und dort mit Hilfe von flachen U-förmigen Platinklammern fixiert, zwischen denen feine Nylonfäden gespannt waren. Diese Nylonfäden lagen auf dem Präparat und hielten es mit geringem Druck fest. Während der Untersuchungen wurde die Untersuchungskammer kontinuierlich mit begaster, auf 32 °C temperierter Lösung perfundiert.

2.4 Ganzhirn-Präparat

Wir verwendeten Tiere einer Kolonie BALB/c Mäuse im Alter von P0 (entsprechend dem ersten Lebenstag) bis P13. Die Tiere wurden dekapitiert, der Kopf sofort in 4°C kalter Lösung gekühlt. Das Gehirn wurde zusammenhängend entfernt und in 4°C Ringerlösung eingebracht (125mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM Glucose; begast mit Carbogen). Anschließend wurde das Hirnpräparat 10 Minuten in der begasten Lösung bei 34°C

inkubiert und schließlich in der Untersuchungskammer in der gewünschten Lage mit kleinen Nadeln aus Edelstahl fixiert. Als Kammer eigneten sich Zellkulturschalen, die mit Silikon gefüllt wurden (30 g RTV 615A, 2,7 g RTV 615 B, beide GE Bayer Silicones BV, Bergen op Zoom, Niederlande). Aus der Silikonschicht wurden nach Aushärtung Aussparungen für das zu untersuchende Präparat sowie die Zu- und Ableitungswege der Perfusionslösung herausgeschnitten.

Im Experimentalaufbau wurde das Präparat kontinuierlich mit einer ebenfalls mit Carbogen begasten Ringerlösung (125 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM Glucose; pH 7,3) bei Raumtemperatur perfundiert. Die Flussrate betrug 2 ml / min.

2.5 In-Vivo Experimentalaufbau

Die Versuche wurden unter Beachtung der Tierschutzbestimmungen mit Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt.

Ein großes technisches Problem bei der Untersuchung an narkotisierten Mäusen stellt die mechanisch stabile Fixierung im Experimentalaufbau dar. Zu diesem Zweck verwendeten wir Zellkulturschalen, in die eine dem Krümmungsradius der Schädel der zu untersuchenden Mäuse angepasste Öffnung geätzt wurde. Diese Schälchen konnten in die Standard-Objektaufnahme im Kreuztisch des Mikroskops fest eingesetzt werden.

2.5.1 Narkose

Die Mäuse wurden durch Injektion einer Mischung aus Ketamin und Xylazin (0,1/0,01 mg/g Körpergewicht) oder einer Urethan-Lösung (1,9 mg/g Körpergewicht, alle Narkotika Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) narkotisiert.

Die Lösungen wurden intraperitoneal injiziert und anschließend angemessene Zeit auf das Einsetzen der Wirkung gewartet. Die Narkosetiefe wurde durch Ausbleiben des Stellreflexes bei Lagerung der Tiere auf den Rücken und des Abwehrreflexes bei schmerzhaftem Reiz im Bereich der Pfoten überprüft. Den Tieren wurde Sauerstoff zur Inhalation angeboten. Die Spontanatmung der Tiere blieb erhalten, so dass eine Beatmung nicht erforderlich wurde. Am Versuchsende wurde das Versuchstier noch in Narkose durch Dekapitieren getötet.

2.5.2 Präparation

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde die Haut über dem Zielareal des Kortex entfernt und der bei jungen Tieren noch nicht verknöcherte Schädel mit feinen Fräsköpfen vorsichtig ausgedünnt und mit einem Filzpolierkopf (Dr. Ihde Dental, München) zur Verbesserung der optischen Eigenschaften geglättet. Diese Schritte wurden unter einem Dissektionsmikroskop durchgeführt, wobei das Tier auf einer regulierbaren Wärmeplatte gelagert wurde. Im nächsten Schritt wurde mittels Cyanoacrylat-Klebstoff eine mit einer Öffnung versehene Zellkulturschale (siehe unter 2.5) auf den Kopf des Tieres geklebt. Das Tier konnte nun in den Experimentalaufbau gesetzt werden. Weiterhin wurde Sauerstoff angeboten, das Tier auf einer Wärmeplatte gelagert und die Temperatur zwischen Tier und Wärmeplatte laufend überwacht. Das Zellkulturschälchen wurde mit Lösung gefüllt (mit Carbogen begaste Ringerlösung mit 125 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM Glucose; pH 7,3), welche auf 37 °C temperiert wurde.

2.5.3 Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes

Mit Hilfe einer feinen Kanüle (30 G) wurde unter vierfacher Vergrößerung durch Abheben des Knorpels eine kleine Öffnung in der Kalotte geschaffen. Die vorbereitete, mit 4 µl Farbstofflösung befüllte Injektionskanüle wurde mit Hilfe eines elektrischen Mikromanipulators (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) in einem Winkel von ca. 30 bis 45 Grad entlang der Längsachse der Injektionspipette in die gewünschte Tiefe in das Hirnparenchym vorgeschoben. Diese betrug im Bereich des Kortex etwa 300 µm. Für die gewünschte Zeitdauer (20 Sekunden bis 1 Minute) wurde an die Farbstoff - Injektionspipette durch ein Druckapplikationsgerät (Picospritzer II, General Valve, Fairfield, New Jersey, USA) 0,7 bar Druck angelegt. Anschließend wurde die Injektionspipette wieder entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine erkennbare Blutung auftrat.

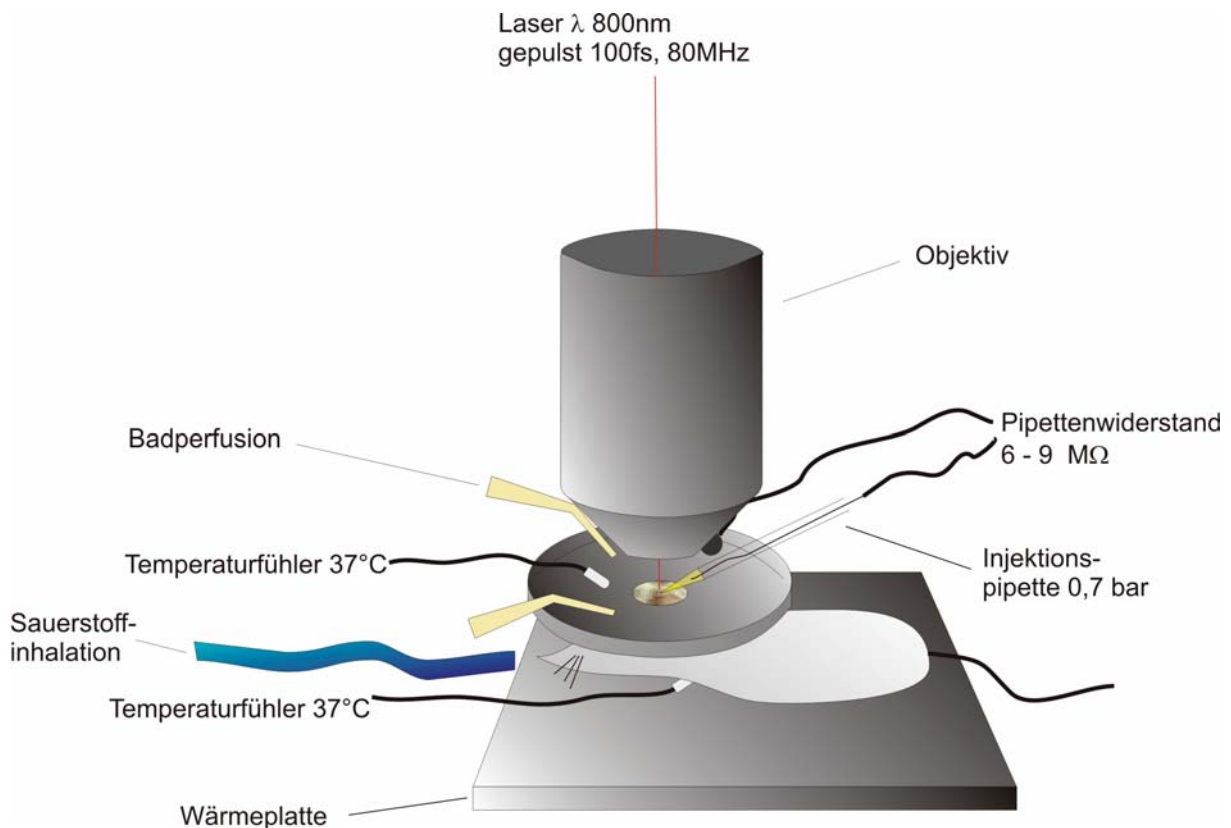


Abb. 2: Experimentalaufbau im Überblick.

Das narkotisierte Tier liegt auf einer regulierten Wärmeplatte. Der Schädel ist an eine Zellkulturschale mit Öffnung fixiert, die in den Kreuztisch eingesetzt wird. O₂ wird per Inhalationem zugeführt. Die Zellkulturschale wird von temperierter Nährlösung durchspült. Mittels Mikromanipulator wird – lichtmikroskopisch kontrolliert – die Farbstofflösung in den Kortex injiziert.

2.5.4 Mechanische und elektrische Stimulation

Zur mechanischen Reizung der Schnurrhaare der Tiere wurden mit dem Picospritzer II und einer Glaskapillare kurze Druckluftpulse (0,5 s; 0,7 bar) auf die kontralateralen Schnurrhaare abgegeben in kaudal-rostraler Richtung.

Für die iontophoretische Applikation von Glutamat (10 mM in unter 2.5.2 angegebener Lösung) wurde das MVCS-C01 Iontophorese-System (NPI Electronic, Tamm, Deutschland; -10 μ A, 500 ms Pulsdauer) verwendet. Gefüllt wurden Glaskapillaren mit einem Widerstand von 10-12 M Ω . Ein Haltestrom von 20 nA wurde angelegt, um ungewollte Glutamatfreisetzung zu verhindern.

Für die Messung von Membranpotentialen mittels *patch-clamp* (Durchführung dieser Messungen durch Prof. Olga Garaschuk) wurde ein EPC-9 *patch-clamp*-Verstärker (Fa. HEKA, Lambrecht, Deutschland) benutzt. Pipetten mit einem Widerstand von 4-5 M Ω wurden mit intrazellulärer Lösung befüllt (140 mM KCl, 10 mM NaCl, 4 mM

MgATP, 0,4 mM NaGTP, 10 mM HEPES, pH 7,3 mit KOH titriert). Der Serienwiderstand betrug 12-16 M Ω .

2.6 Zwei-Photonen-Lasermikroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem speziell angepassten Zwei-Photonen-Laser-Fluoreszenzmikroskop durchgeführt (Majewska et al., 2000). Dazu wurde ein gepulstes Nahinfrarot-Lasersystem (800 nm Wellenlänge, 80 MHz Pulsfrequenz, < 100 fs Pulsdauer, Ti:Sapphire, Tsunami, Spectra Physics, Mountain View, CA, USA und 10 W Festkörper Pumplaser Millennia Xs, Spectra Physics, Mountain View, CA) über ein Laser-Scanning System (Olympus Fluoview, Olympus, Tokyo) an ein aufrechtes Mikroskop (BX50WI, Olympus, Tokyo, Japan) angekoppelt. Dabei fanden folgende Wasserimmersionsobjektive Verwendung: 10 x, 0,3 numerische Apertur (NA); 20 x, 0,95 NA; 40 x, 0,8 NA; 60 x, 0,9 NA der Firma Olympus, Tokyo sowie 60x, 1.0 NA (Fluor 60, Nikon, Tokyo). Durchschnittlich wurde das Präparat während der Messungen mit weniger als 70 mW Laserleistung bestrahlt.

Im Anschluss an die Experimente wurden an den aufgezeichneten Bilddaten die Fluoreszenzänderungen ausgewählter Regionen offline mit einer LabView - basierten Software (National Instruments, Austin, Texas, USA) berechnet. Ebenfalls wurde die Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) verwendet. Nach der Subtraktion des Hintergrundrauschens wurden die gemittelten Helligkeitswerte der analysierten Regionen mit der Software Igor (WaveMetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) ausgewertet. Je nach verwendetem Kalzium-Indikator kam es mit steigender Kalzium-Konzentration unter Anregung mit Laserlicht zur Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenzintensität. Die Messwerte wurden dargestellt als Verhältnis der Fluoreszenzänderung (ΔF) über der Ausgangshelligkeit der gemessenen Region (F).

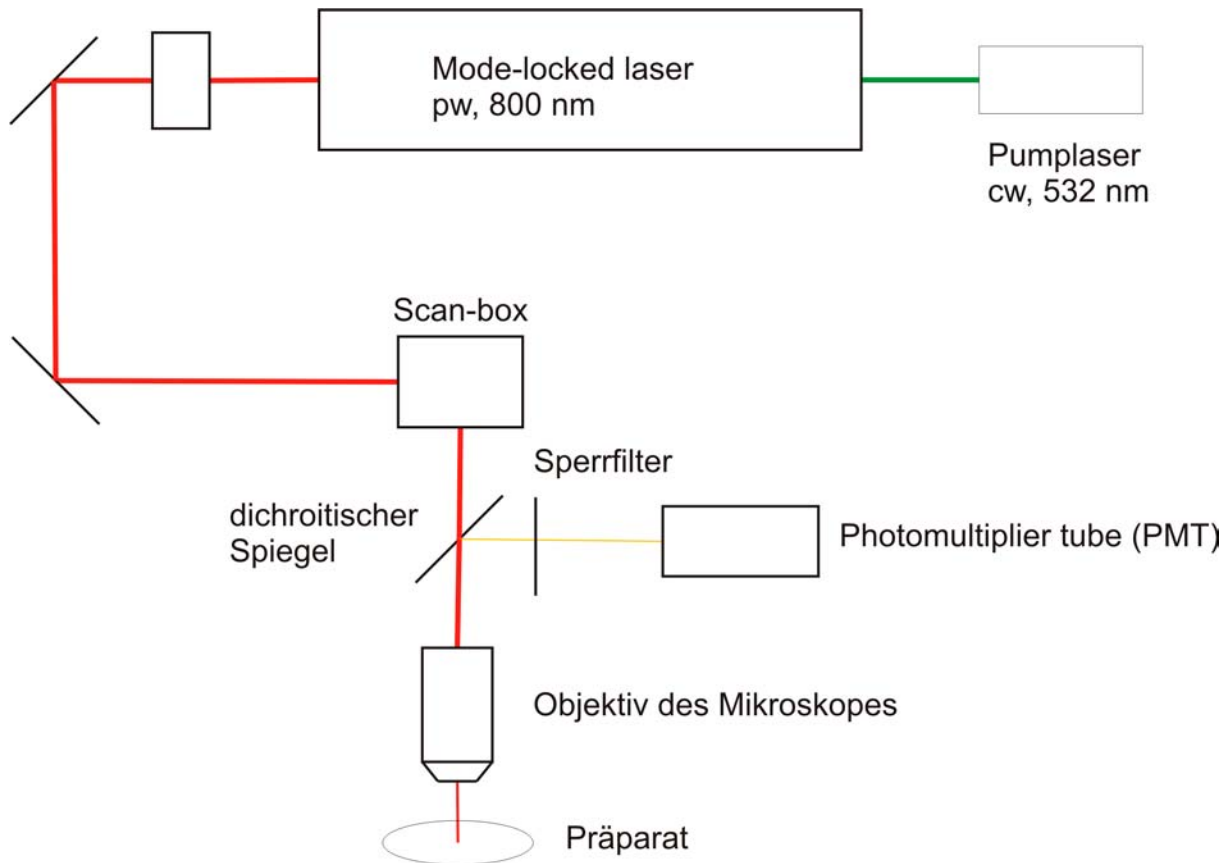


Abb. 3: Schematischer Aufbau des Lasersystems.

Ein nicht gepulster 10 W Pumplaser liefert die Anregungsenergie für den gepulsten Femtosekundenlaser. In der *scan-box* wird das Anregungslicht durch ein Spiegelpaar für die Abtastung des Präparates in X und Y Richtung ausgelenkt. Der dichroitische Spiegel lässt das langwellige Anregungslicht passieren. Durch den Zwei-Photoneneffekt wird die Anregungsenergie von zwei Lichtquanten vereint. Es resultiert ein kurzwelligeres Emissionslicht, welches durch den dichroitischen Spiegel und einen Sperrfilter dem Photomultiplier zugeführt wird, durch den die Photonen detektiert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Hirnschnitt-Präparat

Zunächst wurde an, nach dem oben beschriebenen Standardprotokoll hergestellten, Hirnschnitt-Präparaten die Praktikabilität der Injektion von AM-Esterfarbstoffen in Hirngewebe untersucht. Variiert wurden hierbei Applikationsdruck, Applikationsdauer, Art des Fluoreszenzfarbstoffes, Farbstoffkonzentration, Alter der Mäuse und Hirnregion (Neokortex, Hippokampus, Cerebellum). Nach erfolgter Anfärbung einer Hirnregion wurde ferner das Färbeverhalten über Stunden beobachtet. Auch Hirngewebe von etwa zwei Wochen alten Tieren konnte erfolgreich mit Farbstoff beladen werden.

Es wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe getestet: Fura PE3 AM, Fura Red AM, Indo 1 AM, Calcium Green 1 AM, Oregon Green 1 AM, Fluo 4 AM, Magnesium Green AM. Mit allen konnte eine vergleichbar gute Beladung der kortikalen Zellen erreicht werden. Die injizierte Farbstoffmenge betrug etwa 400 fl. Dies wurde durch Injektion von Fura 2 AM in 2 % Agarose-Gel ermittelt. Mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie wurde hierfür der maximale Durchmesser des fluoreszierenden Bereichs gemessen und das Volumen des annähernd kugelförmigen Bereichs berechnet.

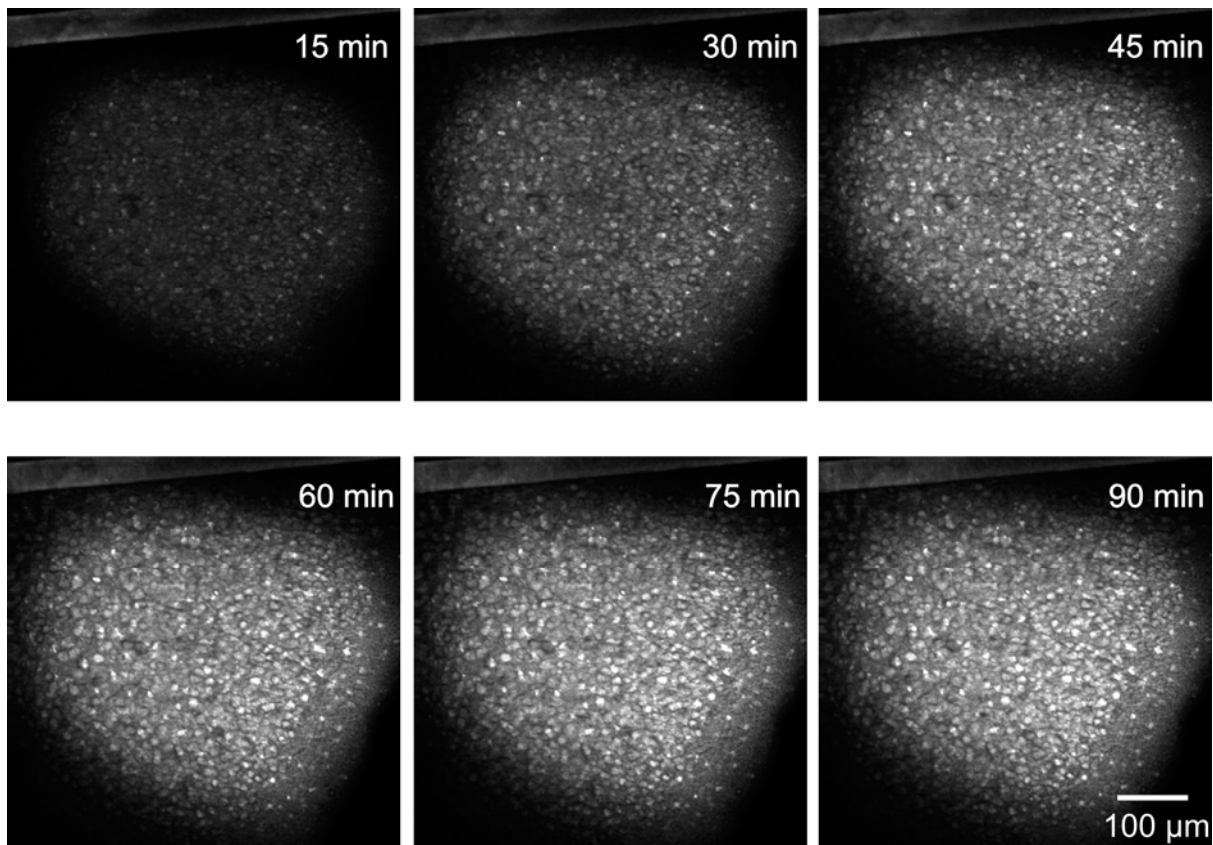


Abb. 4: Ladephase am Hirnschnittpräparat im Zeitverlauf

Übersichtsaufnahme Objektiv 20 x; Maus P12, Calcium Green 1 AM, 1mM, Dauer der Farbstoffapplikation 20 s. Angabe der nach Beladung vergangenen Zeit. Am oberen Bildrand Anschnitt eines Nylonfadens zur mechanischen Fixierung des Präparates.

Wie in Abbildung 4 und 5 gezeigt, erreichte die gemessene intrazelluläre Fluoreszenz nach etwa einer Stunde ein stabiles Niveau. Über mehrere Stunden kam es zur langsamen Abnahme der gemessenen Fluoreszenz. Am ehesten dürfte dies durch Leckage des Farbstoffes aus den Zellen heraus (aktiver transmembranöser Transport) bedingt gewesen sein. Über einen Zeitraum von 6 h kam es *in vitro* lediglich zur Abnahme der maximalen Fluoreszenzintensität um 25 %.

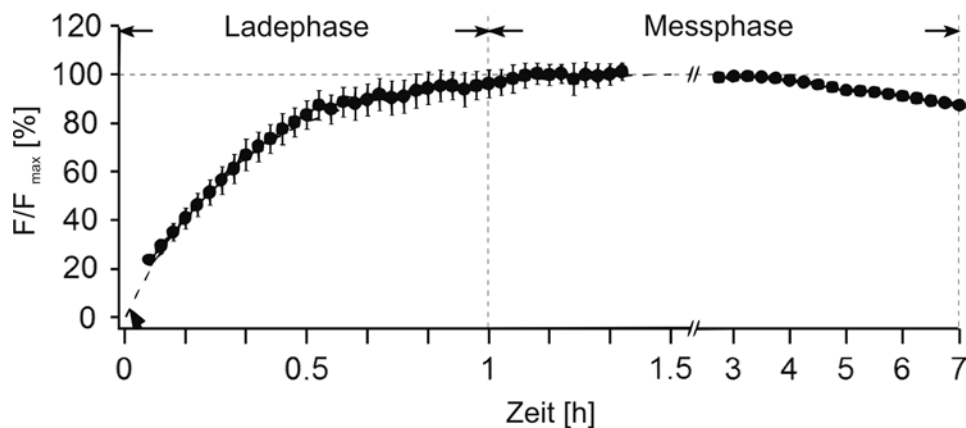


Abb. 5: Normalisierte mittlere Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit nach Farbstoffinjektion *in vitro*.

Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes in Hirnschnittpräparate und anschließende Langzeitbeobachtung der Entwicklung der Fluoreszenzintensität. Dargestellt sind im linken Teil der Abbildung Daten aus neun Experimenten, rechts Daten aus drei Experimenten.

Nach anfänglicher Dauer der Farbstoffapplikation von bis zu 2 h erwies sich die kurzzeitige Injektion innerhalb 20 Sekunden bis zu einer Minute als ebenso effektiv. Es wurde eine gleichmäßige Beladung der Zellen auch in der Tiefe des Schnittes erreicht. Im Median hatte das angefärbte Areal einen Durchmesser von etwa 500 μm (Abbildung 6).

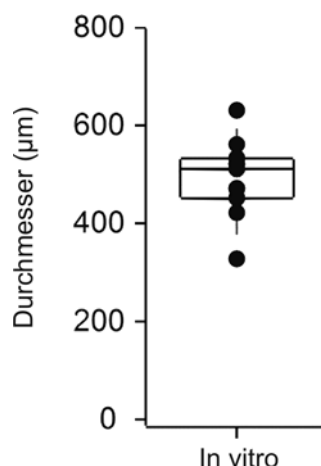


Abb. 6: Größe des gefärbten Areals *in vitro*.

Darstellung von Einzelwerten, Median sowie erstem und zweitem Quartil der Messwerte ($n = 10$). Injektion und Vermessung des mit Farbstoff beladenen kortikalen Areals erfolgten am Hirnschnittpräparat.

Abbildung 7A zeigt exemplarisch mit Calcium Green 1 AM beladene Neuronen im Neokortex einer neugeborenen Maus am Hirnschnittpräparat. Die spontane neuronale Aktivität der markierten Zellen wurde registriert und wird in Abbildung 7B als Verhältnis der Änderung der Fluoreszenzintensität zur Ausgangsfluoreszenz im Zeitverlauf dargestellt.

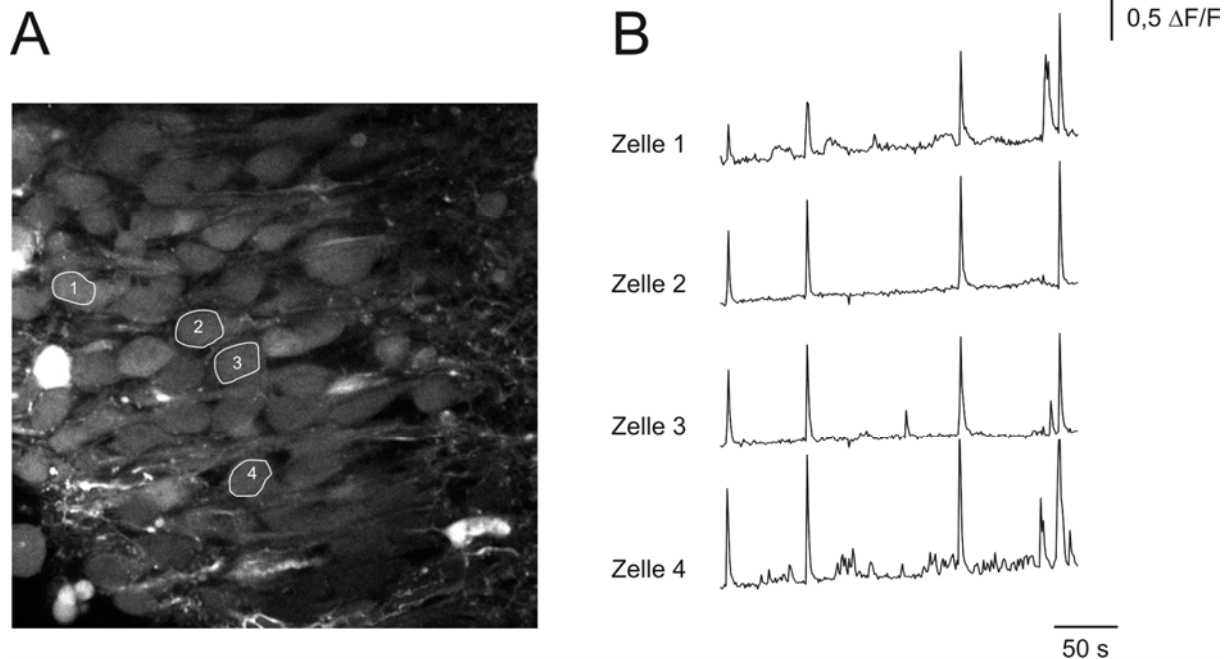
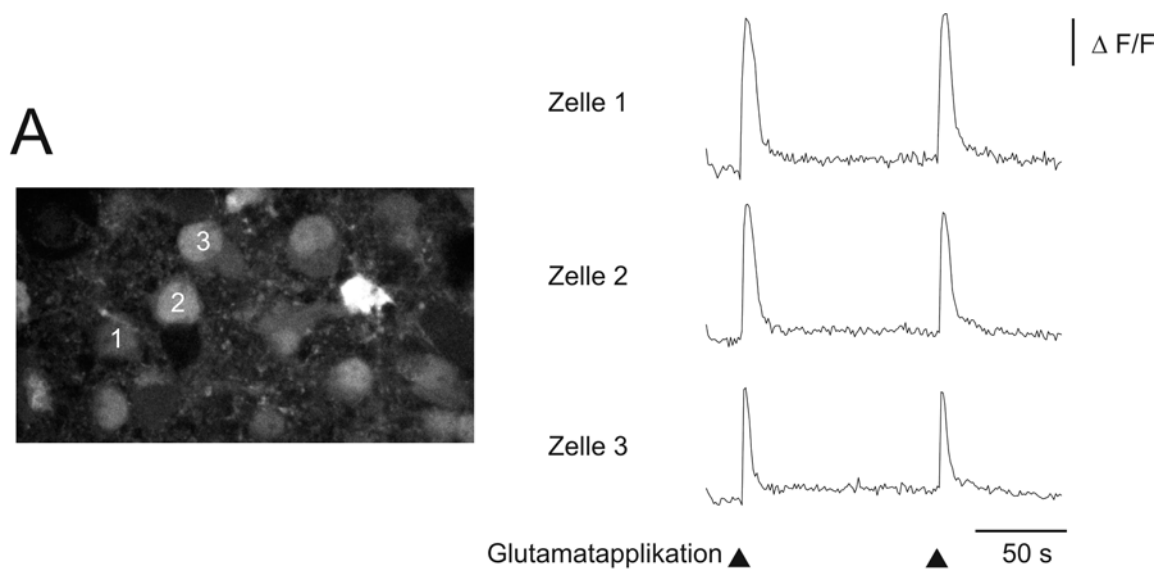


Abb. 7: Messung von Spontanaktivität im Schnittpräparat des Neokortex.

A Calcium Green 1 AM, Alter P 0, gute Darstellung der Schicht II/III-Neurone, Objektiv 60 x.

B Ca^{++} -Transienten infolge Spontanaktivität der in A markierten Zellen.

Abbildung 8A demonstriert die durch pulsatile Applikation von Glutamat auf ein Hirnschnittpräparat hervorgerufenen intrazellulären Kalziumtransienten als Änderung der Fluoreszenzintensität. Die hervorragende erzielbare Abbildungsqualität zeigt exemplarisch Abbildung 8B. Neben Neuronen und Gliazellen kommt auch das Neuropil als Geflecht von Zellfortsätzen zur Darstellung.



B

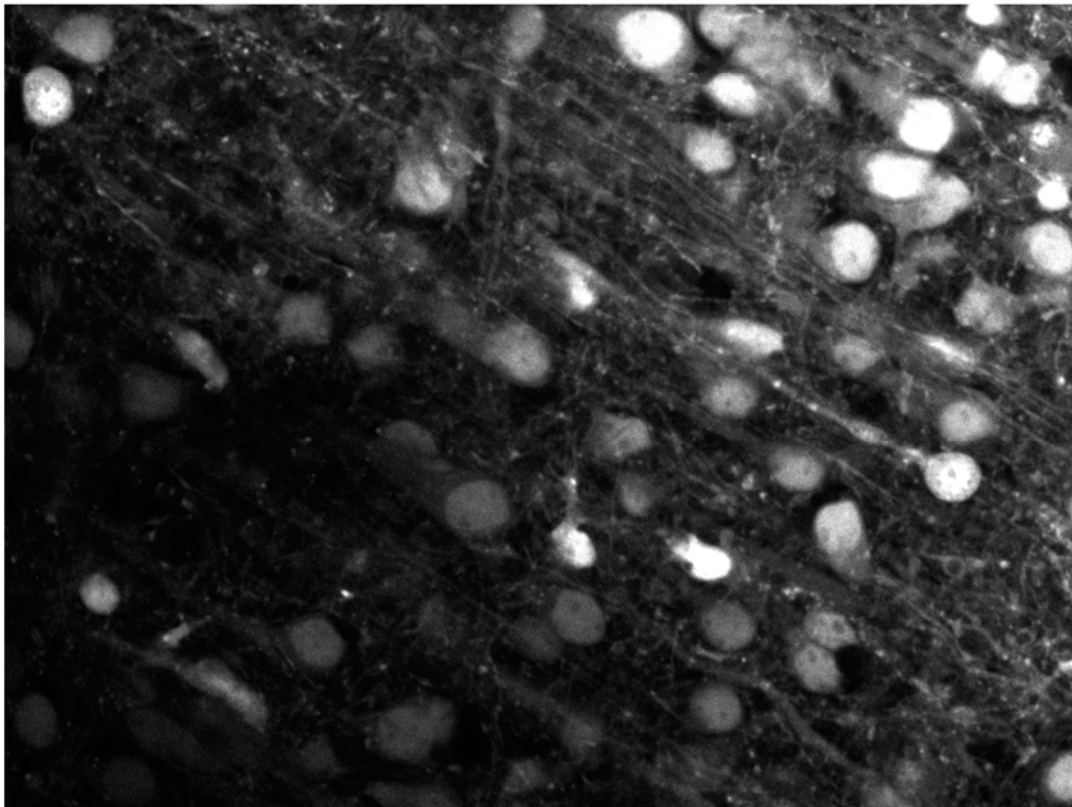


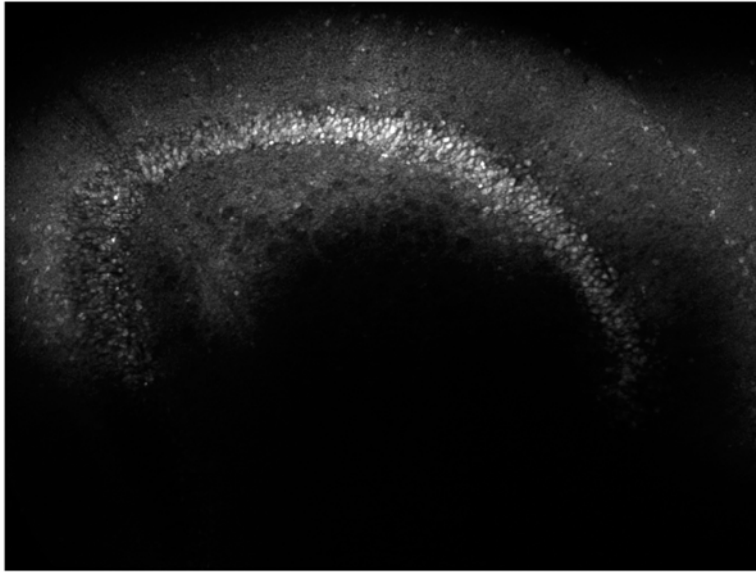
Abb. 8: Glutamatapplikation am Schnittpräparat des Neokortex.

A Calcium Green 1 AM, Alter P 2; Druckapplikation von Glutamat durch eine Glaspipette (100 μM , 150 ms Dauer, 0,35 bar) auf die Hirnschnittoberfläche über dem Messort. Rechts simultane Messung der durch Glutamat induzierten Ca^{++} -Transienten an den links markierten Zellen.

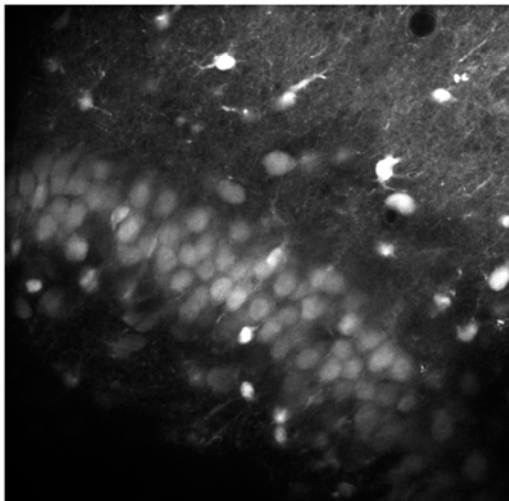
B Calcium Green 1 AM, Alter P 0; Darstellung der Neurone der Schicht II/III mit ihren dendritischen Fortsätzen sowie Astroglia.

Auch an Schnittpräparaten des Hippokampus etwa zwei Wochen alter Mäuse wurde die Bolusapplikation von AM-Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Abbildung 9A zeigt hiervon eine Übersichtsaufnahme. Die effiziente Beladung der Pyramidenzellen der CA3-Region stellt Abbildung 9B dar. Der Fluoreszenzfarbstoff führte auch zur retrograden Markierung der dendritischen Fortsätze dieser Neuronen. In Abbildung 9C sind an einem einzelnen Dendriten klar dendritische Spines abgrenzbar.

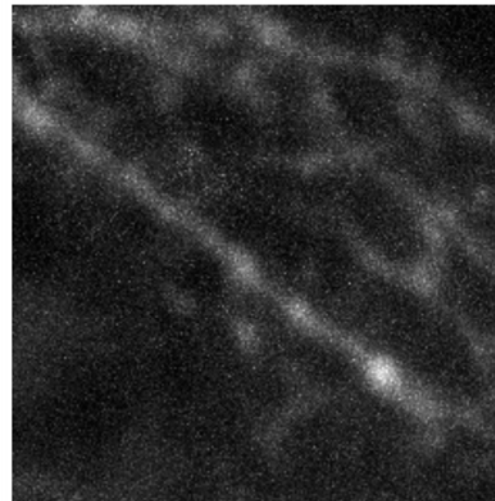
A



B



C



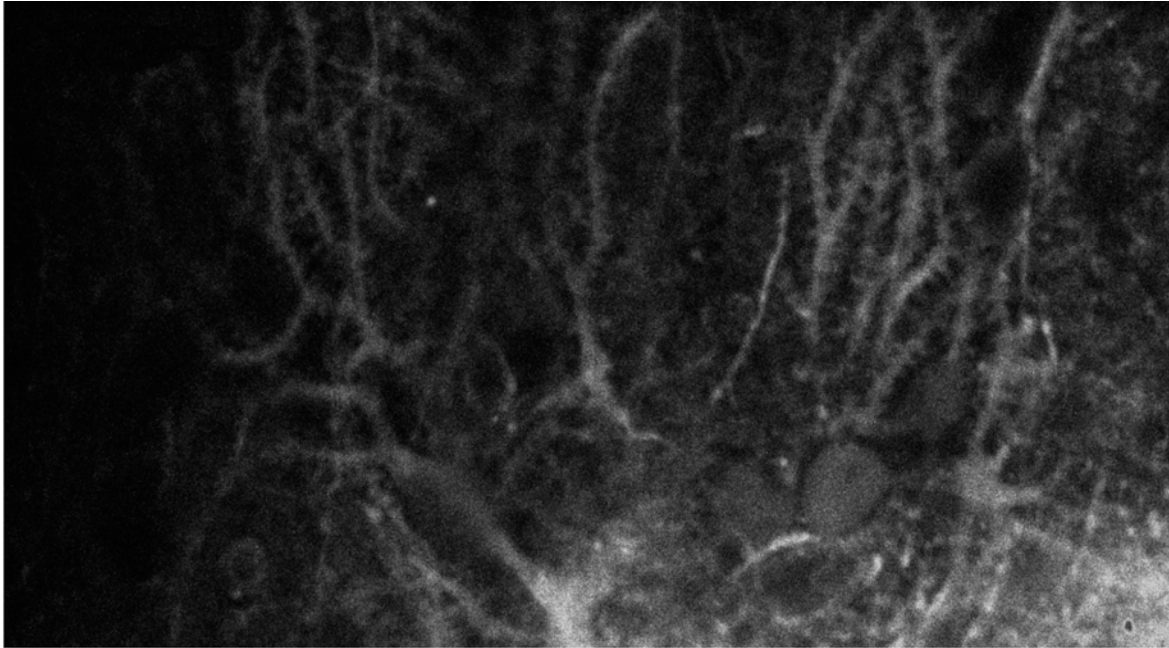
2 μ m

Abb. 9: Hirnschnittpräparate des Hippokampus der Maus.

(A) Calcium Green 1 AM, Alter P 16, Farbstoffinjektion über 20 s, Übersichtsaufnahme, Objektiv 10 x. (B) Fura PE 3, Alter P 13, Farbstoffinjektion über 20 s, Detaildarstellung der Pyramidenzellen der CA3-Region, Objektiv 60 x. (C) Fura PE 3, Alter P 14, Z-Projektion eines einzelnen Dendriten einer retrograd mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen hippocampalen

Pyramidenzelle (Objektiv 60 x und digitaler Zoom). Einzelne dendritische *spines* sind abgrenzbar.

An einem Schnittpräparat des Cerebellums eines adulten Meerschweinchens konnte ebenfalls die Anwendbarkeit der Fluoreszenzfarbstoff-Bolusapplikation demonstriert werden (Abbildung 10).



20 μ m

Abb. 10: Dendritenbaum Purkinjezellen, Cerebellum, Indo 1 AM.

Präparat zur Verfügung gestellt von Dr. Jana Hartmann

3.2 Ganzhirn-Präparat

Den nächste Schritt auf dem Weg zur Etablierung der Bolus-Injektionsmethode *in vivo* stellte die Farbstoffinjektion *in vitro* in Ganzhirn-Präparate dar. Wie unter 2.4. beschrieben erfolgten die Farbstoffinjektionen in präparierte Mäusehirne, die in einer Schale mit Silikon befestigt waren. Abbildung 11 zeigt anhand eines zusammengesetzten Bildes einen mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie gewonnenen Schnitt durch den Neokortex eines intakten Ganzhirnpräparates. Quer angeschnittene Blutgefäße stellen sich im linken Abschnitt der Abbildung als punktförmige ungefärbte Areale dar.

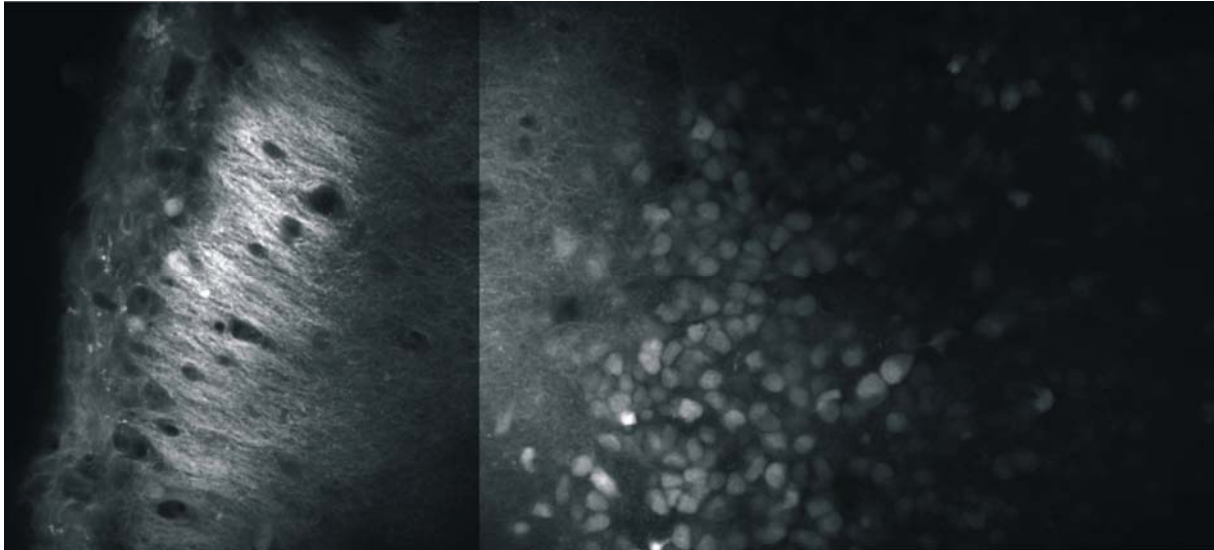


Abb. 11: Zusammengesetzte Abbildung eines mit Farbstoff injizierten Ganzhirnpräparates. Schnitt durch ein mit Calcium Green 1 AM durch Bolusinjektion beladenes Gehirn einer P 0 Maus. Links im Bild befindet sich die Oberfläche des Gehirns, darunter die zellarme Schicht I mit einigen quer angeschnittenen Blutgefäßen. Rechts im Bild die Zellen der Schicht II/III. Objektiv 60 x.

Am gleichen Präparat wurde auch die Möglichkeit eines virtuellen Schnittes durch das Präparat mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie demonstriert. Abbildung 12 wurde durch einen „XZ-Scan“ erzeugt, also Abtastung des Präparates entlang einer einzelnen Linie mit Änderung des Mikroskop - Fokus um $0,350\ \mu\text{m}$ (also entlang der Z-Achse) zwischen einzelnen Durchläufen. Dargestellt ist erneut ein Schnitt durch den Neokortex, wobei sich die oberflächlichen Schichten im Bild oben, die Schicht II/III im Bild unten befinden. Links im Bild wurde ein Blutgefäß longitudinal angeschnitten.

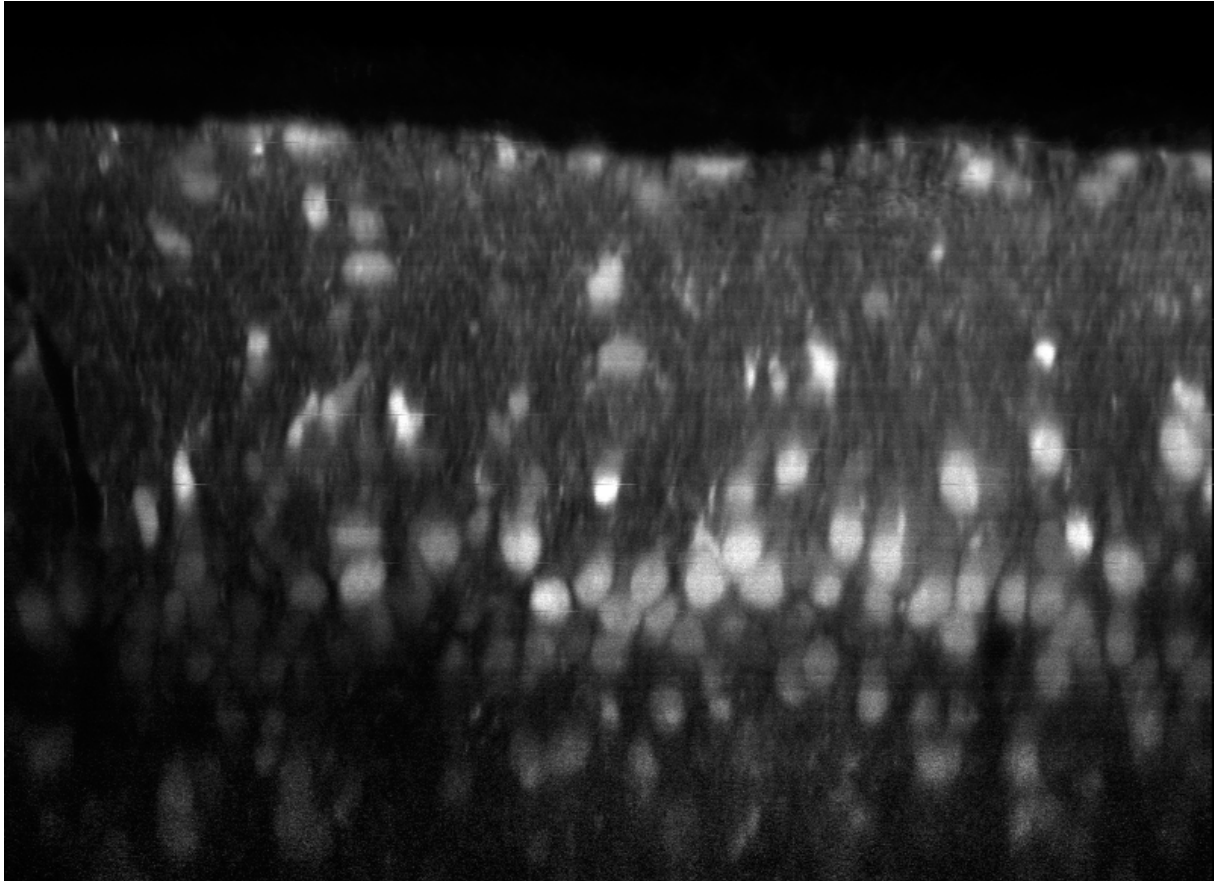


Abb. 12.: Virtueller Schnitt durch ein Ganzhirnpräparat

Gleiches Ganzhirnpräparat wie in Abbildung 11. Virtueller Schnitt orthogonal zur Schnittebene in Abbildung 11 durch Abtastung entlang einer Linie mit sukzessiver Verschiebung der Fokalebene des Mikroskops zwischen den einzelnen Durchläufen und anschließender XZ-Projektion ($\Delta Z = 0,350 \mu\text{m}$). In der Abbildung befindet sich die Hirnoberfläche oben.

Als Vertreter der Dextran-konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe wurde Calcium Green Dextran am Ganzhirnpräparat durch Bolusinjektion appliziert. Es konnte hierbei lediglich eine interstitielle Farbstoffbeladung festgestellt werden (Abbildung 13). Eine intrazelluläre Aufnahme erfolgte nicht. Die Abbildung zeigt einen obliquen Schnitt durch das Ganzhirnpräparat einer neugeborenen BALB/c-Maus. Durch Kontrastierung des Interstitiums kommen oberflächliche Blutgefäße mit Erythrozyten zur Darstellung sowie in der oberflächlichen kortikalen Schicht I (Stratum moleculare) zahlreiche anhand morphologischer Kriterien als Cajal-Retzius Zellen zu identifizierende Neurone (Radnikow et al., 2002). Die Neurone der tieferen Schicht II/III nahmen ebenfalls keinen Dextran-konjugierten Farbstoff auf.

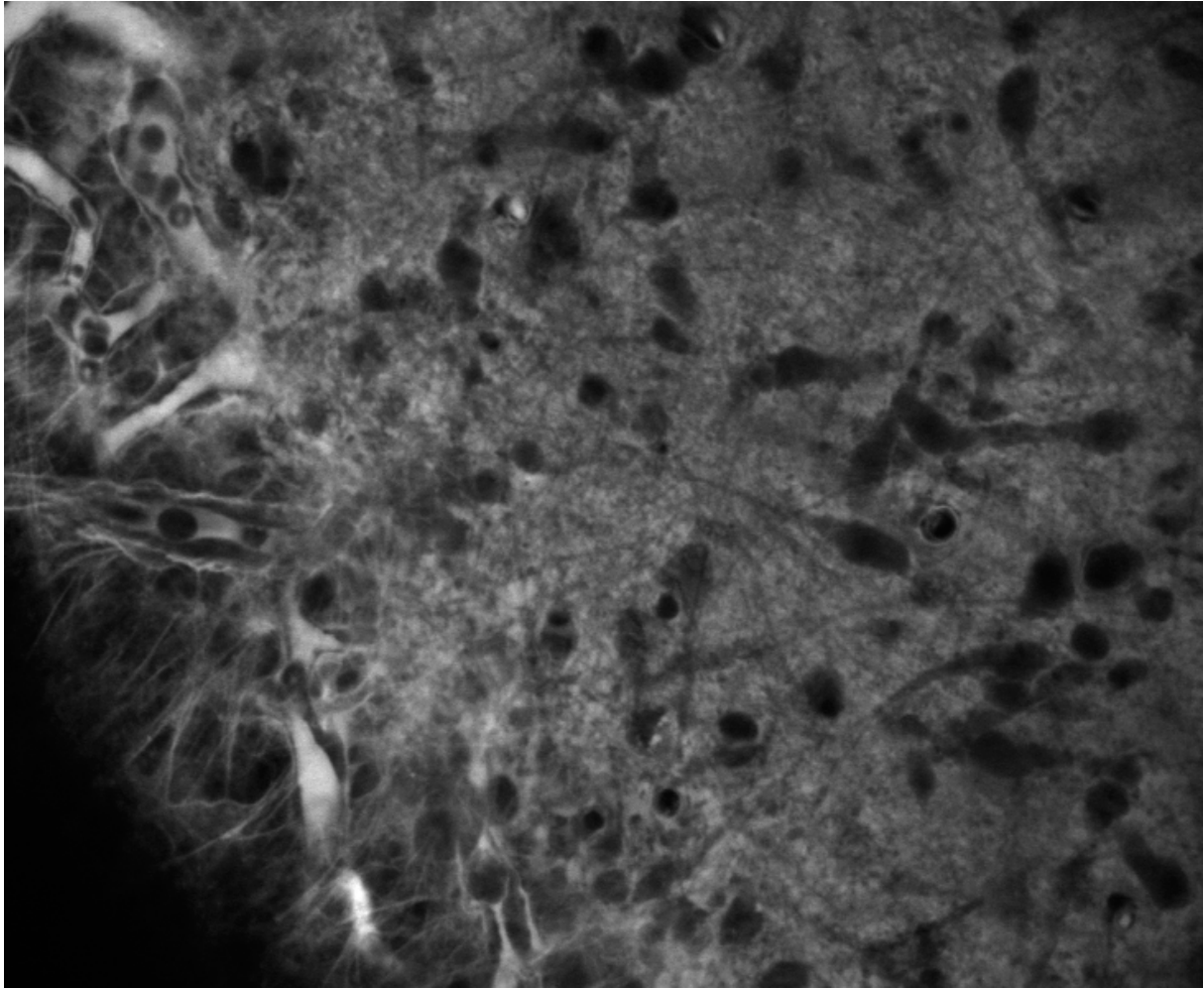


Abb. 13: Anfärbung mit Calcium Green Dextran 3000

Ganzhirnpräparat, P 0. Objektiv 60 x. Links im Bild oberflächliche Blutgefäße mit Erythrozyten. Rechts davon Stratum moleculare (Schicht I) mit Cajal–Retzius Zellen. Keine erkennbare Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen.

3.3 Messung *in vivo*

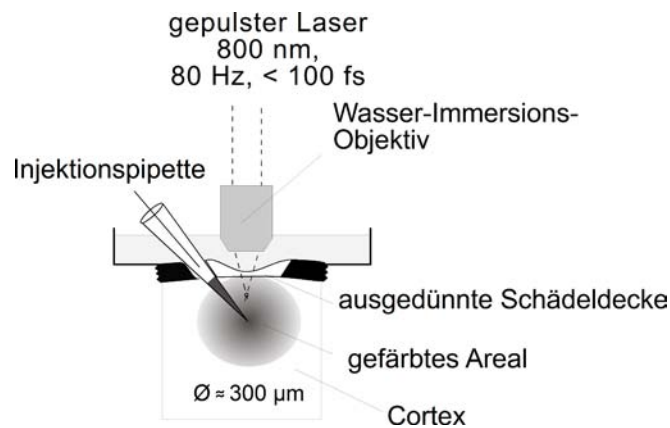


Abb. 14: Schematischer Untersuchungs Aufbau *in vivo*.

Der Querschnitt zeigt die mit Ringerlösung perfundierte Messkammer. Nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes durch eine kleine (< 1 mm) Öffnung in der Schädeldacke mit einer feinen Glaskapillare in die gewünschte Tiefe kann die Messung durch die ausgedünnerte Schädeldacke erfolgen. Hierfür ist die Zwei-Photonen-Fluoreszenzlasermikroskopie mit gepulstem Anregungslaserlicht erforderlich. Positionierung der Messkammer im Experiment über dem *barrel-cortex*.

Abbildung 14 zeigt das Prinzip der Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff und der anschließenden Messung mittels Zwei-Photonen-Fluoreszenzlasermikroskopie. Eine feine Glaspipette, befüllt mit der AM-Esterform eines Fluoreszenzfarbstoffes wurde mittels Mikromanipulator durch eine kleine (< 1 mm) Öffnung in der Kalotte oberhalb des *barrel-cortex* eingeführt und coaxial bis in die gewünschte Tiefe (in der Regel 150-200 µm) in den Kortex eingestochen. Anschließend wurden etwa 400 fl Farbstofflösung durch Druckapplikation (0,7 bar über 1 Minute) appliziert. Es zeigte sich bei der Bolusapplikation *in vivo* bei allen getesteten Farbstoffen eine vergleichbar gute Farbstoffaufnahme.

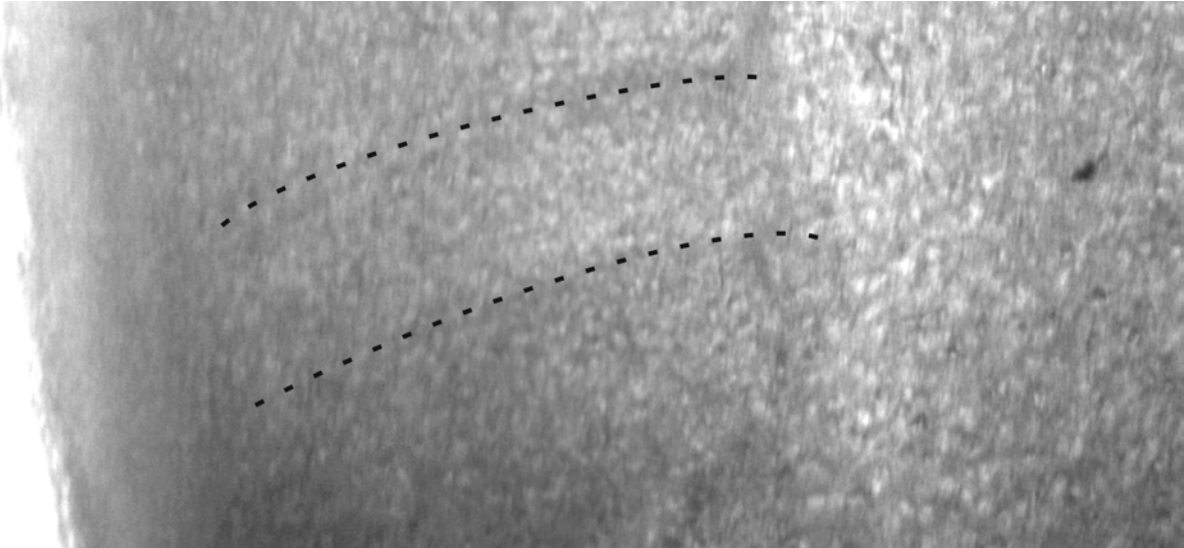


Abb. 15: Lichtmikroskopische Darstellung des *barrel-cortex*.

Bei dem Hirnschnitt befindet sich links im Bild die Hirnoberfläche, rechts davon erst die zellarme Schicht I (Stratum moleculare), anschließend daran die zellreicheren kortikalen Schichten. Besonders im Bereich der Schicht IV lassen sich im rechten Winkel zur Hirnoberfläche angeordnete parallele Strukturen erkennen. Diese stellen die „*barrel*“ als Organisationseinheiten des somatosensorischen Kortex der Maus dar.

Um die Größe des angefärbten Bereiches festzustellen, wurde nach Farbstoffbeladung *in vivo* das Gehirn entnommen und daraus Schnittpräparate hergestellt. Es konnte bei drei von drei untersuchten Hirnen bestätigt werden, dass sich das angefärbte Areal innerhalb der Region des „*barrel cortex*“ befand. Lichtmikroskopisch ließen sich in der kortikalen Schicht IV sogenannte „*barrel*“ nachweisen. Abbildung 15 zeigt exemplarisch das durchlichtmikroskopische Bild eines Hirnschnittpräparates im Bereich des *barrel cortex*.

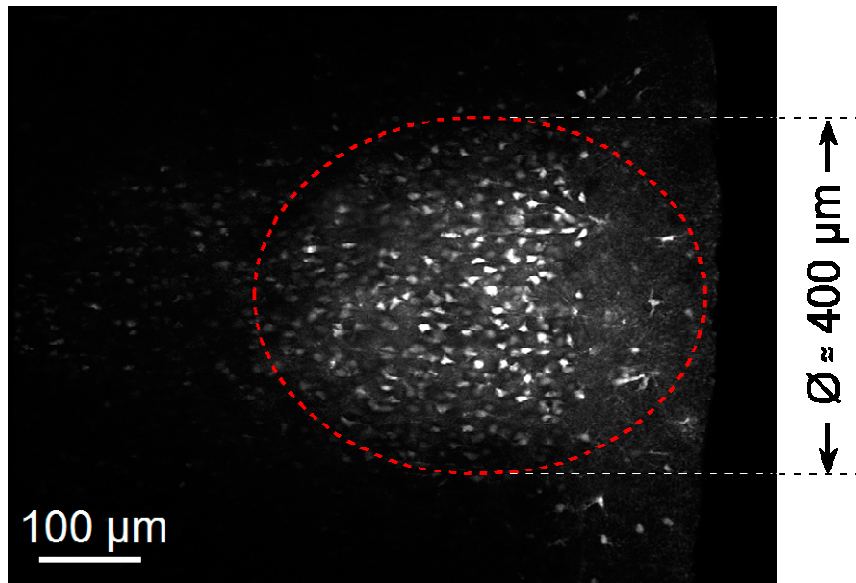


Abb. 16: Beispiel des mit Farbstoff beladenen kortikalen Areals.

Farbstoffinjektion *in vivo*, anschließend erfolgte die Aufarbeitung zum Hirnschnittpräparat.

Der Durchmesser des angefärbten Bereichs wurde zum einen an Präparaten vermessen, die *in vivo* mit Farbstoff beladen und anschließend zu Hirnschnitten aufgearbeitet worden waren. Zum anderen wurde an *in vivo* angefärbten Präparaten noch *in vivo* der Durchmesser des Bereichs mit angefärbten Zellen bestimmt. Es ergaben sich jeweils annähernd sphärische angefärbte Bereiche innerhalb der kortikalen Schichten I-III. Der mediane Durchmesser der *in vivo* gefärbten Bereiche betrug etwa 300 μm , wobei der Durchmesser bei späterer Vermessung *in vitro* (rote Kreise in Abbildung 17) ein wenig größer erschien als bei der vorherigen Messung *in vivo* (rote Rechtecke in Abbildung 17). Dieser Unterschied könnte durch die schwächere Anfärbung der Zellen im Randbereich erklärbar sein, deren Fluoreszenzintensität möglicherweise zu gering für die Erfassung durch die Bildgebung *in vivo* war. Auffallend war die gute Größenübereinstimmung der *in vivo* angefärbten Areale bei anschließender Messung *in vitro* mit den nur *in vitro* mit Farbstoff beladenen Arealen (Abbildung 6).

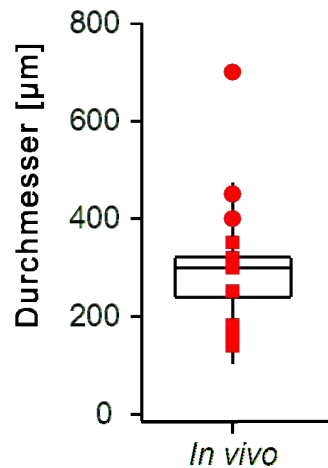


Abb. 17: Größe des angefärbten Areals *in vivo*

Abbildung 18 gibt ein Beispiel für den Anstieg der Fluoreszenzintensität in einem bestimmten Areal nach einminütiger Bolusapplikation von Oregon Green 1 AM. Vergleichbar den *in vitro* gefundenen Ergebnissen wurde auch hier nach etwa einer Stunde ein stabiles Niveau der Fluoreszenzintensität erreicht (Abbildung 19). Die Abnahme der Fluoreszenz war im Verlauf mehrerer Stunden auch *in vivo* relativ gering, so dass es möglich war, Messungen über 4–6 Stunden durchzuführen, ohne dass es hierbei zu einer nennenswerten Abnahme der Fluoreszenz durch Leckage des Farbstoffes aus den Zellen oder Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes kam.

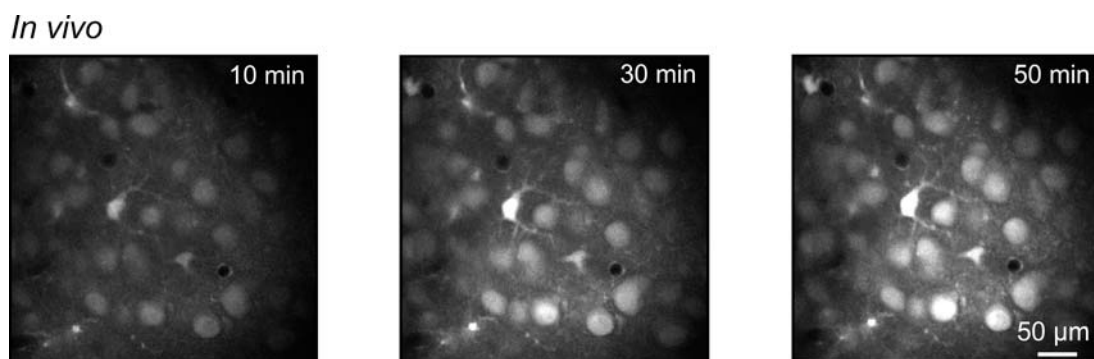


Abb. 18: Beladung kortikaler Zellen *in vivo* im Zeitverlauf

Beobachtung der Entwicklung der Fluoreszenzintensität in 90 µm Tiefe *in vivo* nach Injektion von 1mM Oregon Green 1 AM über die Dauer einer Minute in den Kortex einer P14 Maus.

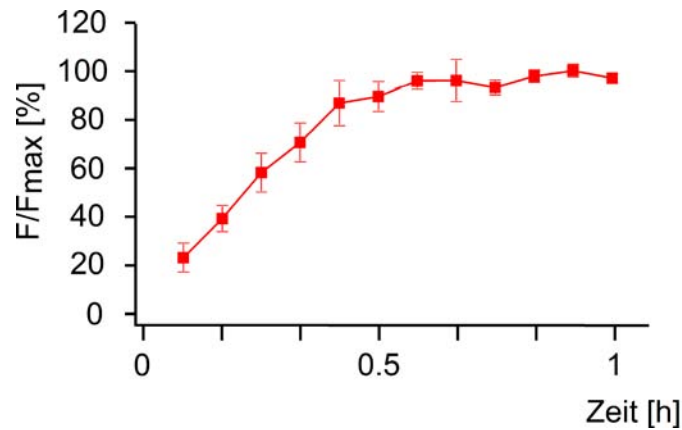


Abb. 19: Beladung kortikaler Zellen *in vivo* im Zeitverlauf

Im Unterschied zur Untersuchung an Hirnschnittpräparaten, wo es allenfalls während lang dauernder Untersuchungen zu minimalen lateralen Verschiebungen des Präparates oder zur ungewollten Änderung der Fokalebene des Mikroskops kommen kann, sind Bewegungsartefakte bei Untersuchungen *in vivo* ein ernstzunehmendes Problem. Insbesondere erschweren Artefakte durch Atmung und Herzschlag der Versuchstiere die Messung auf Einzelzellebene. Es zeigte sich, dass Bewegungsartefakte durch den Herzschlag bei Begrenzung der für die Farbstoffinjektion geschaffenen Öffnung in der Schädeldecke auf einen Durchmesser von unter 1 mm deutlich reduziert werden können. Weiterhin war es auch möglich, Messungen durch die mittels Mikrofräser auf 8-10 μm ausgedünnte Schädeldecke hindurch vorzunehmen. Noch bis zu 200 μm unter der Oberfläche des Kortex konnten so Neuronen und Gliazellen dargestellt werden (Abbildung 20). Nach vollständiger Entfernung der Schädeldecke über dem zu untersuchenden Areal konnte die Tiefe, in der noch einzelne Zellen aufgelöst werden konnten, auf bis zu 300 μm vergrößert werden (Abbildung 21).

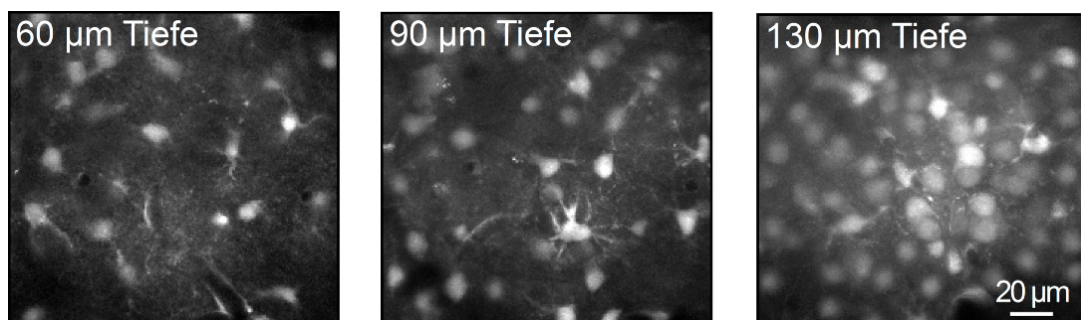


Abb. 20: Messung in verschiedenen Tiefen *in vivo* durch ausgedünnte Schädeldecke
Maus P13, Farbstoff Fura PE3 AM, Objektiv 60 x.

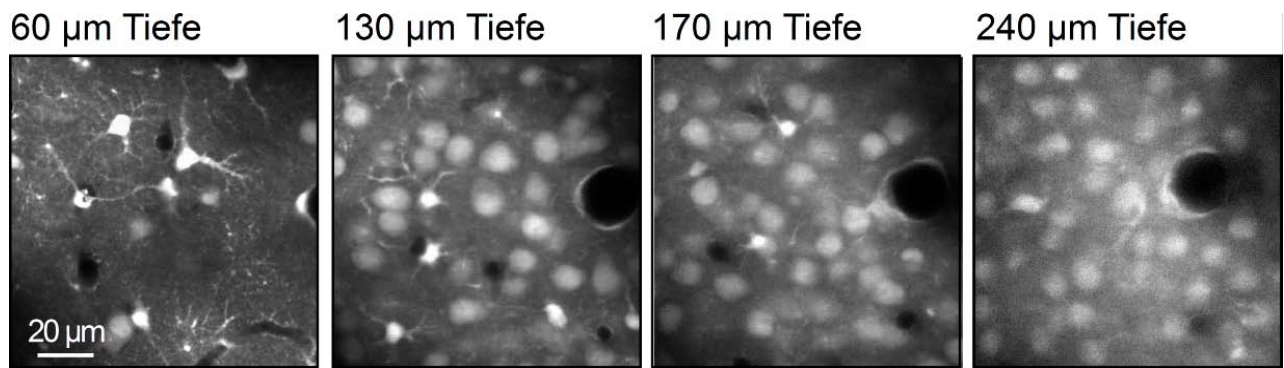


Abb. 21: Messung *in vivo* nach Entfernen der Schädeldecke

Maus P13, Farbstoff Fura PE3 AM, Objektiv 60 x.

An den mit verschiedenen Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen beladenen Zellen lag *in vivo* Spontanaktivität vor. Abbildung 22 zeigt hierfür ein Beispiel.

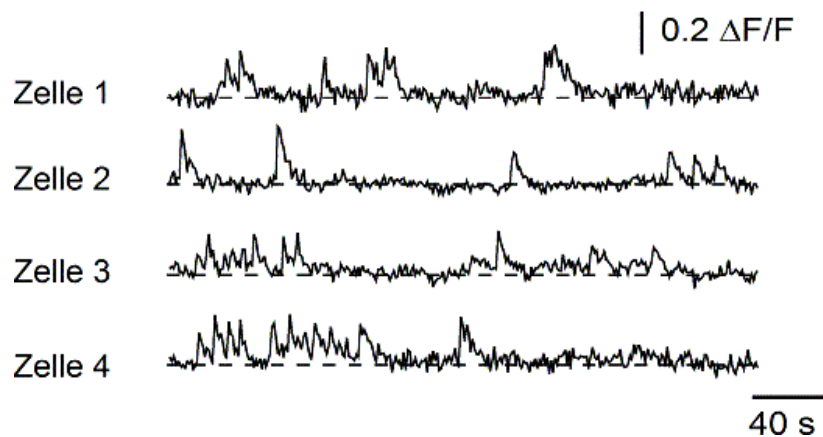


Abb. 22: Messung spontaner Calciumgradienten an mehreren Einzelzellen *in vivo*

Maus, Alter P5, Messung 70 µm unter der kortikalen Oberfläche.

Es konnte auch demonstriert werden, dass die Zellen analog zu Untersuchungen *in vitro* durch Glutamatapplikation stimuliert werden können. Hierfür wurde *in vivo* mittels Iontophorese Glutamat im Bereich der Neuronen der kortikalen Schicht II/III appliziert (Abbildung 23). Die hierdurch hervorgerufenen intrazellulären Kalziumtransienten konnten mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie in Zellen in einem Umkreis von etwa 50 µm um die Spitze der Applikationspipette herum gemessen werden. Die Stimulation erfolgte durch das Glutamat und nicht durch den Stromfluss, durch den dieses appliziert wurde. Dies zeigte sich in Kontrolleexperimenten mit Pipetten ohne Glutamat, in denen keine Kalziumtransienten induziert wurden.

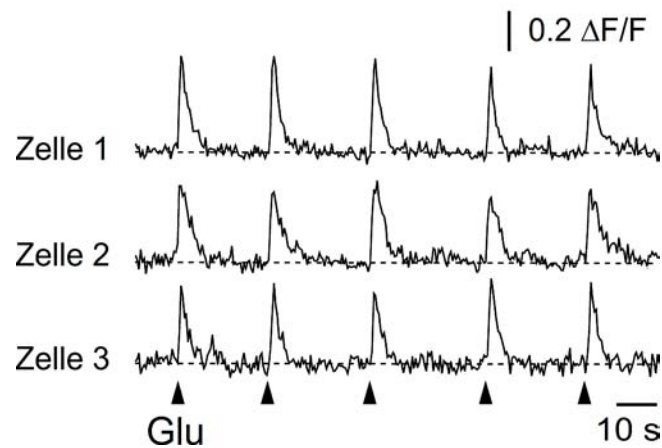
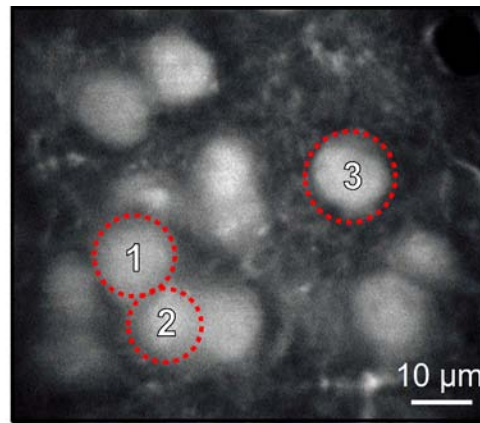


Abb. 23: Iontophoretische Glutamatapplikation *in vivo*

P 13 Maus, fünf iontophoretische Applikationen von Glutamat (500 ms Pulse, 10 mM) im Bereich der kortikalen Schicht II/III. Dargestellt sind im unteren Teil der Abbildung die simultan an den drei oben markierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch gemessenen Ca^{++} -Transienten.

Im Anschluss an das Experiment wurde das Gehirn aus Abbildung 23 entnommen und daraus Hirnschnittpräparate hergestellt. Wiederum wurde iontophoretisch Glutamat auf die Neurone appliziert (Abbildung 24a). Hierdurch konnten Kalziumtransienten hervorgerufen werden, welche den *in vivo* induzierten und gemessenen sehr ähnlich waren. Durch Blockade der Glutamatrezeptoren vom AMPA-Typ und NMDA-Typ mittels Anreicherung der Perfusionslösung des Hirnschnittes mit CNQX und APV konnten die Transienten reversibel supprimiert werden. Abbildung 24b zeigt das Fehlen der Kalziumsignale trotz Glutamatapplikation unter Rezeptorblockade.

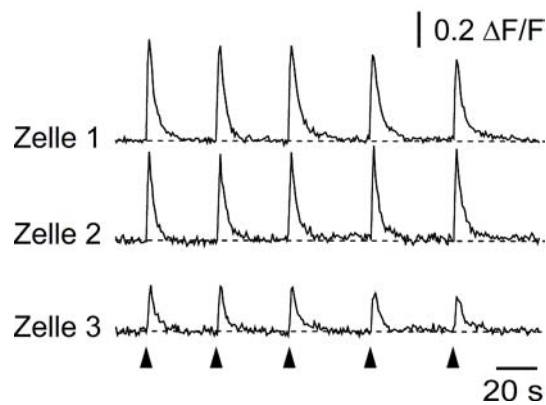
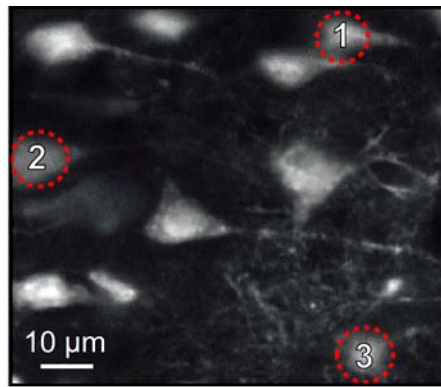


Abb. 24a: Iontophoretische Glutamatapplikation *in vitro*

Aus dem *in vivo* mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Gehirn von Abbildung 23 wurde anschließend ein Hirnschnittpräparat hergestellt und *in vitro* erneut iontophoretisch Glutamat appliziert. Es konnten vergleichbare Kalziumtransienten gemessen werden. Die Beschriftung der X und Y Achsen bezieht sich auch auf die Abbildungen 24b und 24c.

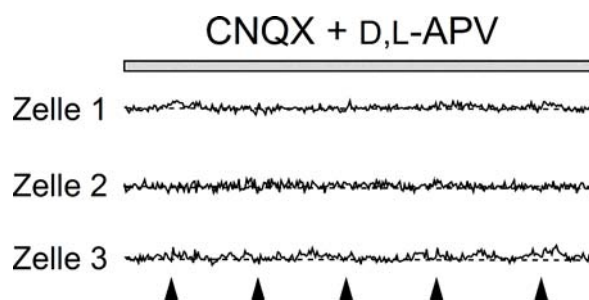


Abb. 24b: Suppression der Ca^{++} - Transienten durch Glutamatrezeptorantagonisten

Nach Auswaschen der Chemikalien aus der Perfusionslösung des Hirnschnittes waren die Neurone über ihre Glutamatrezeptoren wieder durch Glutamat-Pulse erregbar. Dies belegen die erneut messbaren Kalziumtransienten (Abbildung 24c).

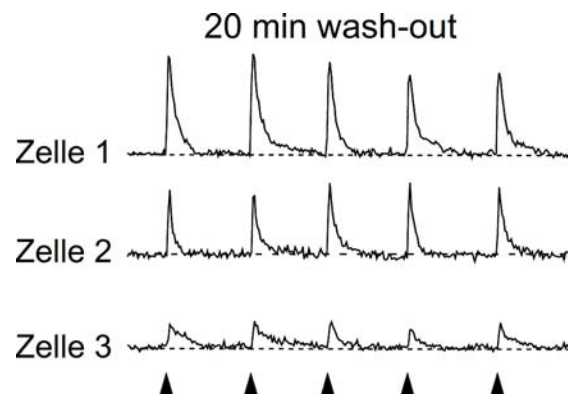


Abb. 24c: Reversibilität der Glutamatrezeptorblockade nach Auswaschen der Antagonisten

Zudem konnte durch simultane *patch-clamp*-Untersuchung und zeitlich hochauflösende fluorimetrische Calciummessung entlang einer Linie (*line scan*) an einem Neuron gezeigt werden, dass durch die iontophoretische Applikation von Glutamat 520–590 ms lange Folgen von 8–12 Aktionspotentialen ausgelöst wurden mit gleichzeitigem Einstrom von Ca^{++} in die Zelle (Abbildung 25).

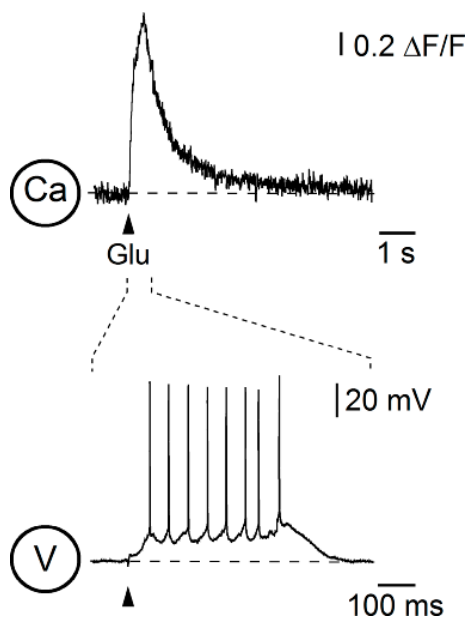


Abb. 25: Gleichzeitige Messung eines Ca^{++} -Transienten und der einhergehenden Aktionspotentiale *in vitro* (*patch-clamp*-Messung durch Prof. Garaschuk).

Wie in Abbildung 26 dargestellt, konnte auch gezeigt werden, dass nach Bolusapplikation von Kalzium-sensitiven Farbstoffen *in vivo* im Bereich des *barrel cortex* in den Neuronen der Schicht II/III Kalziumtransienten gemessen werden können, die durch mechanische Stimulation der Tasthaare der Versuchstiere hervorgerufen wurden. Die Reizung der kontralateralen Tasthaare erfolgte durch

pulsatile Applikation von Druckluft. Die Messung der evozierten Kalziumtransienten erfolgte im sogenannten *line scan* Modus. Die Abtastung des Präparates fand hierbei nicht in einer Ebene, sondern lediglich auf einer vorgegebenen Linie statt, wodurch eine sehr hohe zeitliche Auflösung von 5 ms ermöglicht wurde. Die mittlere Amplitude $\Delta F/F$ der Transienten betrug $0,38 \pm 0,07$ ($n = 9$ Zellen). Die Abnahmezeitkonstante betrug 140 – 390 ms und war somit vergleichbar der Konstante von durch elektrische Stimulation hervorgerufenen Kalziumtransienten (Abbildung 26C).

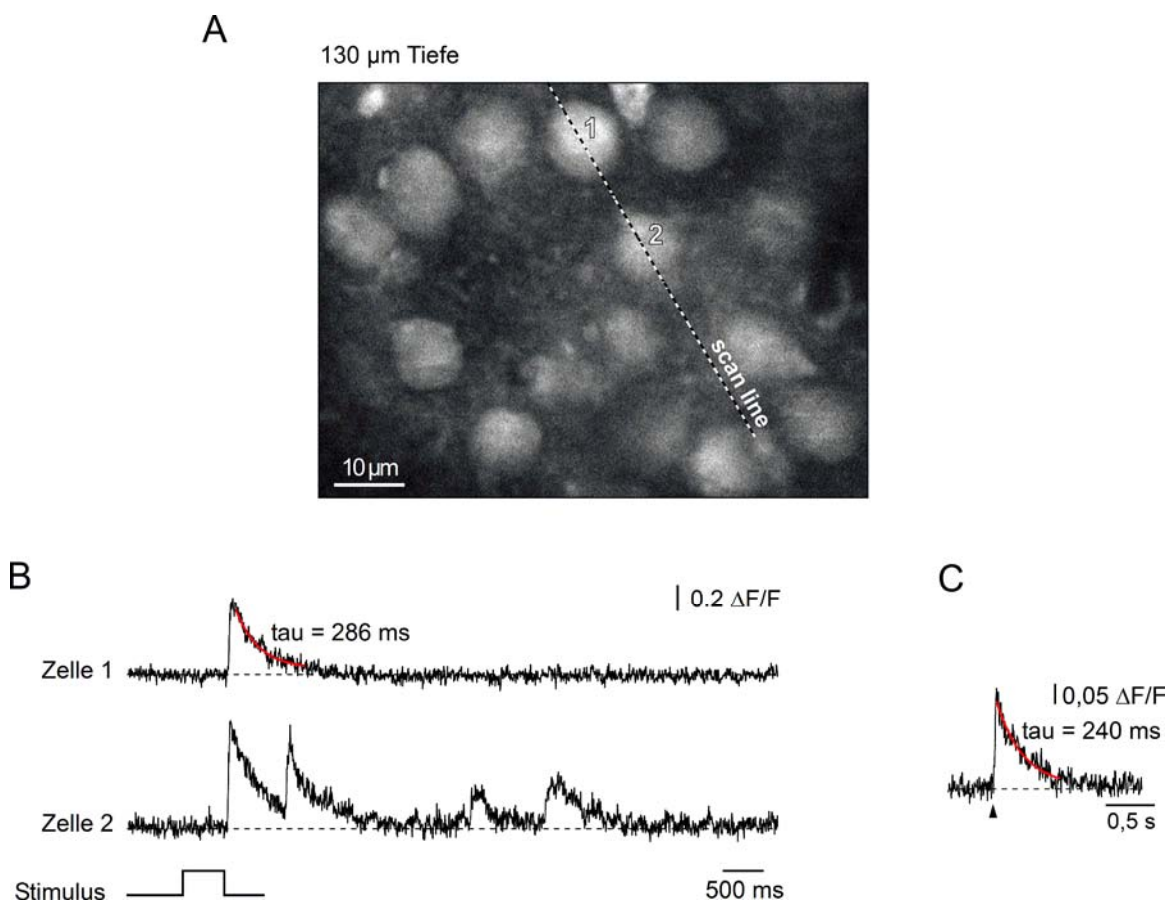


Abb. 26: *In vivo* aufgezeichnete Kalziumtransienten durch mechanische Stimulation von Tasthaaren

(A) Ausschnittvergrößerung mit Neuronen der Schicht II/III des *barrel cortex* einer P13

Maus. Die Messlinie und die in B analysierten Zellen sind eingezeichnet. (B) Gemessene Kalziumtransienten in zwei Zellen, hervorgerufen durch mechanische Stimulation der Tasthaare auf der kontralateralen Seite der Maus.

(C) Kalziumtransient eines Schicht II/III Neurons einer P14 Maus nach elektrischer Einzelstimulation (70 V, 200 μs, Mittelung aus 5 aufeinanderfolgenden Versuchen *in vivo*).

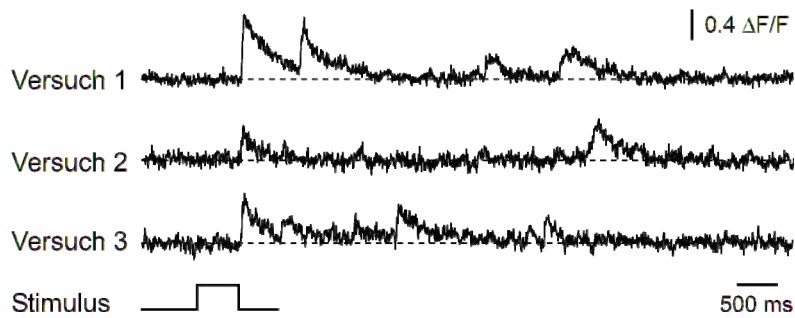


Abb. 27: Messung an Zelle 2 aus Abb. 26A in drei aufeinander folgenden Versuchen mit mechanischer Stimulation der Barthaare

Es wurde auch das Antwortverhalten benachbarter Neurone im somatosensorischen *barrel cortex* auf Stimulation der Tastaare untersucht. Hierfür wurden jeweils Gruppen von drei nebeneinander liegenden Neuronen beobachtet. Insgesamt wurden 38 Versuche an drei verschiedenen Mäusen durchgeführt. In 34 % der Versuche reagierten alle Zellen auf die taktile Stimulation. In 36 % antworteten nur einzelne Neurone. Bei weiteren 30 % der Versuche konnten keine Kalziumtransienten evoziert werden. Festzuhalten ist, dass an jeder der untersuchten Zellen wenigstens ein - auch spontaner - Kalziumtransient registriert werden konnte. Außerdem wechselte die Kombination der auf den Reiz antwortenden Zellen von Versuch zu Versuch. In mehr als einem Drittel der Versuche wurde also durch Auslenkung der Tastaare der Tiere lediglich ein Teil der Neurone im Untersuchungsgebiet aktiviert. Dieser Umstand zeigt, dass auch bei Stimulation sämtlicher Tastaare einer Körperseite nur bestimmte Gruppen von Neuronen im kontralateralen somatosensiblen Kortex aktiviert werden.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation gelang es erstmals *in vivo* gleichzeitig an hunderten einzelnen Neuronen funktionelle Kalziummessungen im Neokortex der Maus vorzunehmen. Diese Messungen benötigen nur einen gering invasiven chirurgischen Zugang. Bei jungen Tieren ist auch eine Messung durch den intakten, lediglich ausgedünnten Schädel möglich, wodurch einerseits die bei Untersuchungen *in vivo* zwangsläufig auftretenden Artefakte durch Atmung und Herzschlag minimiert werden und es andererseits auch denkbar wird, Langzeitmessungen mit erneuter Injektion von Fluoreszenzfarbstoff vorzunehmen. Einen Ansatz hierfür demonstrierten Christie et al. bei der Erforschung von Alzheimer-Plaques (Christie et al., 2001). Die Bolusapplikation des Fluoreszenzfarbstoffes ermöglicht es, Neurone in der Tiefe des Kortex adulter Tiere zu markieren. In Kombination mit einem miniaturisierten, auf dem Schädel angebrachten Zwei-Photonen-Mikroskop (Helmchen et al., 2001) wären Untersuchungen *in vivo* auch an sich frei bewegenden Tieren möglich.

Die Besonderheit der hier dargestellten Methode liegt in der Bolusapplikation von AM-Esterfarbstoffen direkt in das Gewebe. Durch diese Vorgehensweise konnte insbesondere die Beladung adulter Neurone mit AM-Farbstoffen verbessert werden, die sich bei Badapplikation dieser Farbstoffe üblicherweise kaum anfärben lassen. Zudem ließ sich selektiv die angefärbte Hirnregion und auch das Ausmaß des gefärbten Bereichs bestimmen. Es konnte die Anwendbarkeit der Methode für eine Vielzahl verschiedener neuronaler Strukturen demonstriert werden (z.B. Kortex, Cerebellum, Hippokampus). Insbesondere die Möglichkeit Purkinje-Zellen mit Farbstoff zu beladen ist bemerkenswert, da dieser Zelltyp bei der Badapplikation von AM-Farbstoffen, unabhängig vom Alter der Tiere, mit anderen Protokollen nur schwer zu beladen ist (Kirischuk und Verkhratsky, 1996). Die bisherigen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die vorgestellte Färbemethode sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Verbindung mit den üblichen Farbstoffen verwendet werden kann, also auch mit spannungssensitiven Farbstoffen, Natrium- und Chlorid-sensitiven Farbstoffen und lipophilen Substanzen wie DiO (3,3-dioctadecyloxycarbocyanin) und Dil (1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanin). Ein Vorteil der Methode ist sicherlich auch, dass die hierbei verwendete Menge an Farbstoff (etwa 400 fl der

Farbstofflösung) wesentlich geringer ist, als bei der Badapplikation desselben. Dadurch werden die Kosten der Experimente gesenkt.

Im Vergleich zur Beladung von Einzelneuronen durch Punktion mit farbstoffgefüllten Mikroelektroden ist die Beladung neuronaler Zellen mittels Injektion eines Farbstoffbolus mit einer Reihe von Nachteilen behaftet. Zunächst einmal betrug die maximale Untersuchungstiefe in den dargestellten Experimenten etwa 200 μm durch den intakten Schädel hindurch und 300 μm nach Entfernen der Schädeldecke. Demgegenüber können an mittels Mikroelektroden befüllten Neuronen noch dendritische Fortsätze in 500 μm Tiefe abgebildet werden (Svoboda et al., 1997). Dies ist teilweise durch die geringere erreichbare intrazelluläre Farbstoffkonzentration mit der neuen Färbemethode zu erklären. Es wurde die geringe Menge von etwa 400 fl einer 1 mM Farbstofflösung in das Gewebe injiziert, durch die dann Zellen innerhalb eines Radius von *in vivo* etwa 300 μm beladen wurden. Demgegenüber werden bei direkter Beladung einzelner Neurone mittels Mikropipetten Farbstofflösungen höherer Konzentration von 3 – 6 mM verwendet (Svoboda et al., 1999). Auch der erreichbare Bildkontrast wird bei interstitieller Injektion der Farbstofflösung durch Anfärbung des Neuropils um die Neurone herum vermindert. Diese beiden Einschränkungen machen Untersuchungen an feinen dendritischen Fortsätzen *in vivo* nach Bolusinjektion von Fluoreszenzfarbstoffen nicht möglich.

Die Empfindlichkeit der Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie könnte zukünftig durch Verwendung von Anregungslicht längerer Wellenlänge, eine größere numerische Apertur des verwendeten Objektivs, eine optimierte Transmission der verwendeten optischen Elemente und eine Verbesserung der Empfindlichkeit des Lichtdetektors noch gesteigert werden.

Bislang wurden bei Untersuchungen *in vivo* hauptsächlich Dextran–konjugierte Fluoreszenzfarbstoffe benutzt, um Neurone mit kalziumsensitiven Farbstoffen zu markieren (Kreitzer et al., 2000, O'Donovan et al., 1993). Hierbei wird der Farbstoff mit Glaspipetten, deren Spitze zuvor abgebrochen wurde in die Nähe der Zellsomata oder in den Bereich von Zellfortsätzen injiziert, wobei eine Verletzung der Zelle bewusst in Kauf genommen wird, da dies die Farbstoffaufnahme steigert (Kreitzer et al., 2000). Durch retrograden oder antegraden intrazellulären Transport wird der Fluoreszenzfarbstoff innerhalb der Zielzellen auch über größere Distanzen verteilt. Auf diese Weise wurden *in vivo* bereits Untersuchungen an spinalen Motoneuronen

des Zebrafisches durchgeführt (Fetcho und O'Malley, 1995), es wurden Licht-induzierte Kalziumtransienten in einzelnen Axonen der Retina von Krallenfrosch-Kaulquappen (*Xenopus*) beobachtet (Edwards, J. A. und Cline, 1999) und Geruchs-induzierte Kalziumsignale in Glomeruli des Bulbus olfactorius der Maus und des Zebrafisches abgeleitet (Friedrich und Korsching, 1997, Wachowiak und Cohen, 2001). Mulligan et al. konnten mit einer ähnlichen Vorgehensweise nach Injektion von Dextran-konjugierten kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen *in vivo* und anschließender mehrtägiger Wartezeit für den intrazellulären Transport der Farbstoffe *in vitro* einzelne Neuronen im Bereich des akzessorischen Bulbus olfactorius des Froschs mit hoher zeitlicher Auflösung untersuchen (Mulligan et al., 2001).

Es lässt sich also feststellen, dass sowohl die in dieser Arbeit vorgestellte Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen als auch die Einbringung von Dextran-konjugierten Farbstoffen mit scharfen Glaspipetten für die Beladung von Zellen *in vivo* geeignet sind. Während jedoch mit der hier dargestellten Methode praktisch unmittelbar nach Farbstoffinjektion Messungen erfolgen können, muss nach der Injektion von Dextran-konjugierten Farbstoffen eine längere Wartephase für den langsamen intrazellulären Transport der Farbstoffe eingeplant werden.

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methodik gelang es nicht, Zellen mit Dextran-konjugierten Farbstoffen zu beladen. Der injizierte Farbstoff sammelte sich lediglich im Interstitium an. Dies ist möglicherweise eine Folge des im Vergleich zu dem von anderen Autoren beschriebenen Ladevorgang mit Dextranfarbstoffen relativ schonenden Injektionsvorganges. Insbesondere wird von einer Steigerung der intrazellulären Aufnahme durch die Zellen beschädigende Prozesse ausgegangen, also beispielsweise durch den Einsatz des Detergens Triton X-100 in der Färbelösung (Friedrich und Korsching, 1997, O'Donovan et al., 1993, Wachowiak und Cohen, 2001) oder indem Pipetten mit großer Öffnung von 40 – 50 µm (Kreitzer et al., 2000) verwendet werden.

Als Beispiel für Untersuchungen *in vivo* nach Injektion von Farbstoffen mit der hier beschriebenen Technik wurden Kalziumtransienten in Neuronen der Schicht II/III des *barrel cortex* untersucht. Diese traten spontan auf oder wurden durch iontophoretische Glutamatapplikation oder elektrische Stimulation induziert und waren vergleichbar denen aus Untersuchungen an Hirnschnittpräparaten.

Auch konnten nach Stimulation der Tastaare Kalziumtransienten in Zellgruppen im somatosensorischen Kortex beobachtet werden. Diese Transienten traten infolge von Aktionspotentialen an den untersuchten Neuronen der Schicht II/III auf (Svoboda et al., 1997). Die Untersuchungen zeigten, dass auf Ebene der Neurone der Schicht II/III des *barrel cortex* der Maus bei Auslenkung der Mehrzahl der zugehörigen Tastaare jeweils von Versuch zu Versuch wechselnde Gruppen von Neuronen aktiviert werden.

Der hier vorgestellte Untersuchungsansatz birgt grosses Potential für künftige Untersuchungen an kortikalen Neuronenverbänden und Einzelzellen.

5. Publikation

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in den Proceedings of the National Academy of Sciences (Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K. und Konnerth, A.

In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks

Proc Natl Acad Sci U S A. 100 (2003) 7319-24)

Der Artikel wurde vorgestellt in Biophotonics International 10 (2003) 55-56.

In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks

Christoph Stosiek*, Olga Garaschuk*, Knut Holthoff, and Arthur Konnerth†

Physiologisches Institut, Ludwig-Maximilians Universität München, Pettenkoferstrasse 12, 80336 Munich, Germany

Communicated by Clay M. Armstrong, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, April 16, 2003 (received for review January 31, 2003)

Two-photon calcium imaging is a powerful means for monitoring the activity of distinct neurons in brain tissue *in vivo*. In the mammalian brain, such imaging studies have been restricted largely to calcium recordings from neurons that were individually dye-loaded through microelectrodes. Previous attempts to use membrane-permeant forms of fluorometric calcium indicators to load populations of neurons have yielded satisfactory results only in cell cultures or in slices of immature brain tissue. Here we introduce a versatile approach for loading membrane-permeant fluorescent indicator dyes in large populations of cells. We established a pressure ejection-based local dye delivery protocol that can be used for a large spectrum of membrane-permeant indicator dyes, including calcium green-1 acetoxymethyl (AM) ester, Fura-2 AM, Fluo-4 AM, and Indo-1 AM. We applied this dye-loading protocol successfully in mouse brain tissue at any developmental stage from newborn to adult *in vivo* and *in vitro*. *In vivo* two-photon Ca^{2+} recordings, obtained by imaging through the intact skull, indicated that whisker deflection-evoked Ca^{2+} transients occur in a subset of layer 2/3 neurons of the barrel cortex. Thus, our results demonstrate the suitability of this technique for real-time analyses of intact neuronal circuits with the resolution of individual cells.

The question of how neuronal networks accomplish information processing is central for the understanding of higher brain functions. This question is difficult to answer, not only because of the immense number of computing elements, but also because of the difficulties of direct real-time monitoring of network activity. So far, the function of neuronal networks *in vivo* has been assessed mostly by extracellular multielectrode recordings (1) or by large-scale brain imaging techniques, including functional magnetic resonance imaging, positron-emission tomography, imaging of intrinsic optical signals, and voltage-sensitive dye-based imaging (2–6). A real-time analysis of neuronal networks *in vivo* is so far best achieved by using the powerful approach of voltage-sensitive dye-based imaging (4). Over the years these techniques have been used extensively for studying different aspects of brain function and have led to the discovery of important macroscopic features of processing networks, such as, for example, the orientation preference map in the visual cortex (7). However, many aspects of signal processing at the single-cell level as well as the temporal dynamics in processing neuronal networks have remained unclear.

Fluorometric Ca^{2+} imaging is another sensitive method for monitoring neuronal activity (8, 9). It makes use of the fact that in living cells, most depolarizing electrical signals are associated with Ca^{2+} influx attributable to the activation of one or more of the numerous types of voltage-gated Ca^{2+} channels, abundantly expressed in the nervous system (10, 11). These signals are often amplified further by Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores (10, 11). Such Ca^{2+} signals are essential for elementary forms of neuronal communication, such as chemical synaptic transmission (12–15). In addition, Ca^{2+} signaling is obligatory for complex processes, such as the induction of memory- and learning-related forms of neuronal plasticity (16). Furthermore, many aspects of development at the beginning of a neuron's life, including gene expression, neuronal migration, and neurite

outgrowth require transient intracellular elevations in Ca^{2+} concentration (17–20), whereas, paradoxically, Ca^{2+} transients are also involved in neuronal cell death (11).

The advantage of Ca^{2+} imaging is that it allows real-time analyses of individual cells and even subcellular compartments. At the same time it readily permits simultaneous recordings from many individual cells and has been used successfully in numerous *in vitro* studies in tissue cultures and brain slices. With the development of two-photon fluorescence microscopy, Ca^{2+} imaging *in vivo*, in neurons located up to 500 μm below the cortical surface, has become possible (21). In demanding experiments, Svoboda *et al.* (21, 22) measured Ca^{2+} transients in dendrites of neurons in the barrel cortex during spontaneous and evoked action potential firing as well as during sensory stimulation. A similar approach was used by Charpak *et al.* (23) for monitoring odor-evoked calcium signals in mitral cells of the rat olfactory bulb. So far, however, high-resolution Ca^{2+} imaging *in vivo* has been restricted mostly to a single neuron at any one time and, therefore, has not been used for monitoring neuronal networks directly. This limitation was imposed by the necessity of impaling a cell of interest with an intracellular electrode to load it with an indicator dye. *In vivo* Ca^{2+} imaging of populations of neurons has been attempted by using dextran-bound Ca^{2+} indicators (24). The study of Wachowiak *et al.* (25), who used calcium green dextran to monitor axonal Ca^{2+} signals in anterogradely labeled olfactory receptor neurons, is one of the few examples of such an imaging study in mammals *in vivo*. Although this approach is very useful for investigating synaptic inputs to olfactory bulb glomeruli, its spatial resolution relies entirely on the well-defined pattern of axonal connections in this system. For *in vitro* experiments there exists an alternative and simple method for loading cells with Ca^{2+} indicator dyes. For loading, slices or cell cultures are incubated in an external saline containing the membrane-permeant acetoxymethyl (AM) ester form of the dye (26). When combined with two-photon Ca^{2+} imaging, this staining technique allows simultaneous monitoring of the activity of thousands of individual neurons located up to 200 μm below the surface of a slice (27). Unfortunately, even *in vitro* the technique is often restricted to cells in culture or to slices of neonatal tissue (28).

The aim of the present study was to develop an approach that would allow the use of AM esters of Ca^{2+} indicators for staining populations of neurons *in vivo*, independent, if possible, of the age of the experimental animals.

Materials and Methods

In Vivo Loading of Cell Populations with Ca^{2+} Indicator Dyes. Animal care was in accordance with institutional guidelines and was approved by the local government. BALB/c mice [1–17 days old (P1–17), $n = 23$] were anesthetized with either ketamine/xylazine or urethane (0.1/0.01 mg/g and 1.9 mg/g of body

Abbreviations: AM, acetoxymethyl; Pn, postnatal day n; OG-1, Oregon green 488 BAPTA-1 [BAPTA is 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid]; MCBL, multicell bolus loading.

*C.S. and O.G. contributed equally to this work.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: konnerth@lrz.uni-muenchen.de.

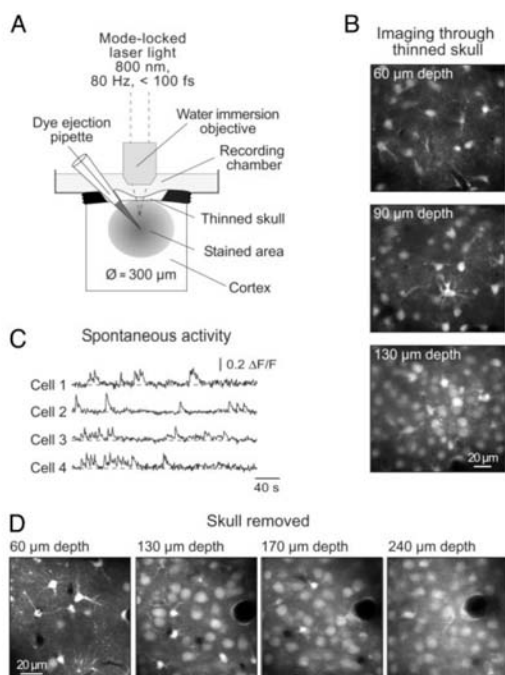


Fig. 1. *In vivo* calcium imaging of neuronal populations. (A) Schematic drawing of the experimental arrangement. (B) Images taken through a thinned skull of a P13 mouse at increasing depth. (C) Spontaneous Ca^{2+} transients recorded in a different experiment through a thinned skull in individual neurons (P5 mouse) located 70 μm below the cortical surface, from a region similar to that shown in B. (D) Images obtained as in B in an experiment (P13 mouse) in which the skull was removed before imaging.

weight, respectively, i.p.). Adult (4-month-old) mice were anesthetized by inhalation of isoflurane (1.5% in pure O_2). Depth of anesthesia was assessed by monitoring pinch withdrawal and eyelid reflex as well as respiration rate. The skull over the barrel cortex was thinned under a dissection microscope by using stainless steel drill bits and polished with a felt polisher (Dr. Ihde Dental, Munich). The custom-made recording chamber with a hole in the middle was then glued to the skull with cyanoacryl glue (see Fig. 1A). The mouse was transferred into the set-up and placed onto a warming plate (38°C). The recording chamber was perfused with a warm (37°C) external saline containing, in mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 26 NaHCO_3 , 1.25 NaH_2PO_4 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 20 glucose, pH 7.4, when bubbled with 95% O_2 /5% CO_2 . A small craniotomy ($\approx 1\text{ mm}$) was performed above an area devoid of big blood vessels by using a thin (30 gauge) injection needle. AM ester of an indicator dye was dissolved in DMSO plus 20% Pluronic F-127 (e.g., 2 g of Pluronic F-127 in 10 ml of DMSO) to yield a concentration of 10 mM. For cell loading this solution was diluted 1/10 with a standard pipette solution containing, in mM: 150 NaCl, 2.5 KCl, 10 HEPES, pH 7.4, yielding a final dye concentration of 1 mM. A micropipette was filled with this solution and inserted coaxially into the cortex. A pressure pulse [1 min, 0.7 bar (1 bar = 100 kPa); Picospritzer II, General Valve, Fairfield, NJ] was applied to the pipette to eject $\approx 400\text{ fl}$ of the dye-containing solution. The volume of the ejected

solution was estimated by injecting Fura-2 AM into an agar block (2% agarose, Sigma) and measuring the maximal diameter of the fluorescing sphere by means of two-photon microscopy. The same loading procedure was used in cortical slices.

For loading of calcium green-1 dextran (molecular weight 3,000 or 10,000) the dye was dissolved (12.5% solution) in the standard pipette solution and applied through micropipettes similar to those used for injections of AM indicator dyes, for various times (1–120 min) under the pressure of 0.7–1.4 bar.

Two-Photon Imaging. Imaging was performed by using a custom-built two-photon laser-scanning microscope based on a mode-locked laser system operating at 800 nm, 80-MHz pulse repeat, $< 100\text{-fs}$ pulse width (Tsunami and Millennia Xs, Spectra Physics, Mountain View, CA) and a laser-scanning system (Olympus Fluoview, Olympus, Tokyo) coupled to an upright microscope (BX51WI, Olympus) and equipped with one of the following water-immersion objectives: $\times 10$, 0.3 numerical aperture (NA); $\times 20$, 0.95 NA; $\times 40$, 0.8 NA; $\times 60$, 0.9 NA; all from Olympus) or $\times 60$, 1.0 NA (Fluor $\times 60$, Nikon, Tokyo). The average power delivered to the brain was $< 70\text{ mW}$. Images were analyzed off-line with a LABVIEW-based custom-made software package (National Instruments, Austin, TX) and IGOR software (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Data are presented as the relative change in fluorescence ($\Delta F/F$).

Whisker Deflection and Electrical Stimulation *in Vivo*. For each trial the majority of whiskers on the contralateral side of the snout were deflected in caudal-to-rostral direction by a single 500-ms air puff (0.7 bar) applied through a thin glass capillary connected to a Picospritzer II. To avoid direct sensory stimulation of the skin, the capillary was positioned in a way that it blew away from the mouse's snout.

For electrical stimulation, voltage (30–70 V, 100–200 μs) pulses were passed through pipettes, similar to the ones used for injections of AM indicator dyes, filled with the external saline. The ground electrode was positioned in the recording chamber.

Electrophysiological Recordings and Drug Application. Coronal cortical slices (400 μm thick) were prepared from 18 BALB/c mice aged from P5 to P71, as previously described (27, 29). Membrane potentials were recorded with an EPC-9 patch-clamp amplifier (HEKA, Lambrecht, Germany) by using patch pipettes (resistance 4–5 $\text{M}\Omega$) filled with an intracellular solution containing, in mM: 140 KCl, 10 NaCl, 4 MgATP, 0.4 NaGTP, 20 or 50 μM Oregon green 488 BAPTA-1 [OG-1; BAPTA is 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid] hexapotassium salt, and 10 HEPES (pH 7.3, adjusted with KOH). For whole-cell patch-clamp experiments KCl and NaCl were replaced by 130 mM CsCl and 20 mM tetraethylammonium chloride. The series resistance was 12–16 $\text{M}\Omega$.

Glutamate (10 mM) was applied by using an MVCS-C-01 iontophoresis system (ejection current $-1\ \mu\text{A}$, duration 300–500 ms; NPI Electronic, Tamm, Germany) with a micropipette having a resistance of 10–12 $\text{M}\Omega$ when filled with a glutamate-containing external saline. A retaining current of +20 nA was imposed between applications to prevent leakage of glutamate. Data are presented as mean \pm SEM.

Results

Fig. 1A illustrates the basic approach used to stain large populations of neurons *in vivo* with Ca^{2+} indicator dyes (see also *Materials and Methods*). A pipette containing the AM ester form of an indicator dye was inserted into the cortex through an $\approx 1\text{-mm}$ -wide skull opening. The pipette was advanced along its axis until it reached the desired depth (usually 150–200 μm below the cortical surface), and $\approx 400\text{ fl}$ of the dye-containing solution was pressure-ejected (0.7 bar, 1 min). The pipette

resistance was 6–9 M Ω when filled with the loading solution (see *Materials and Methods* for composition) and was continuously monitored during the dye ejection. We tested various indicator dyes, including Fura-PE3 AM (Fig. 1B), Fura red AM, Indo-1 AM, calcium green-1 AM (Fig. 1C), OG-1 AM (Figs. 1D, 2, 3 C–D, 4, and 5), Fluo-4 AM, and magnesium green AM (Fig. 3 A and B). Despite earlier observations that, in slices, some Ca²⁺ indicators work better than others (28), all dyes seemed to be taken up by neurons equally well under our *in vivo* conditions. We termed this staining approach multicell bolus loading (MCBL).

The dye-loaded cells were visualized by using two-photon fluorescence microscopy (Fig. 1A; ref. 30). Because craniotomies are often accompanied by marked breath- and heartbeat-related movement artifacts (2, 31), we tried to image cells through the intact skull. We found that if the skull was thinned down to a thickness of 8–10 μ m, individual cells could be well resolved up to 200 μ m below the cortical surface (Fig. 1B). Removing the skull above the imaging field further improved depth resolution (Fig. 1D), allowing the detection of individual cells up to 300 μ m below the cortical surface. It should be noted that the stability of recordings depended critically on the diameter of the craniotomy. Thus, openings larger than 1 mm in diameter were often accompanied by movement artifacts occurring at the heartbeat frequency. Cells stained with various indicator dyes were spontaneously active (see Fig. 1C for an example with calcium green-1 AM) and responded to electrical stimulation as well as to glutamate application with an increase in the intracellular Ca²⁺ concentration (see below).

To estimate the size of the stained area we removed the brains at the end of experiment and cut them in slices. First, we confirmed in 3/3 brains that the stained area was located within the barrel cortex. This conclusion was based on the slice anatomy and on the fact that by using bright-field optics barrel-like structures were seen clearly in layer 4. We then measured the diameter of the stained area both in the *in vivo* stained and sliced brains and, separately, in the intact *in vivo* imaged brains. In both cases, dye injections 150–200 μ m below the cortical surface resulted in almost spherical stained areas (Fig. 2A) covering cortical layers 1–3. The median diameter of the stained regions was \approx 300 μ m (Fig. 2B, left column; $n = 13$ mice), although the diameters of the stained areas in sliced brains (red circles in Fig. 2B) appeared to be slightly larger than those *in vivo* (red squares in Fig. 2B). This difference is probably due to the dim cells at the edge of the stained area emitting too little fluorescence to be detected *in vivo*. Of note, MCBL was readily applicable to acutely prepared cortical slices (see below), yielding stained areas of comparable dimensions (Fig. 2B, right column).

As shown in Fig. 2 C and D, a stable level of fluorescence within stained cells was reached \approx 1 h after dye ejection. There was no major difference in the time course of dye loading *in vivo* ($n = 7$) and *in vitro* ($n = 9$). At intensities of the excitation light used to image stained cells virtually no autofluorescence of the cortical tissue was detected either *in vitro* (tissue next to the stained area in Figs. 2A and 3A) or *in vivo* (not shown). With time, fluorescence intensity decreased in stained cells, most likely reflecting the leakage of the dye. The leakage rate was estimated *in vitro* by measuring mean fluorescence levels at 5-min intervals for 6 h, starting 1 h after the dye ejection ($n = 3$, Fig. 2D). Despite the fact that the stained slices were kept at 34–37°C, the leakage rate was relatively low, resulting in less than 25% loss of peak fluorescence intensity in 6 h. *In vivo* it was possible to conduct continuous experiments for 4–6 h without any significant dye leakage and/or bleaching. The longest recording session conducted first *in vivo* and then *in vitro* lasted for 10 h. Thus, our loading technique provides stable staining conditions for neurons both *in vivo* and *in vitro* with apparently better results *in vivo*.

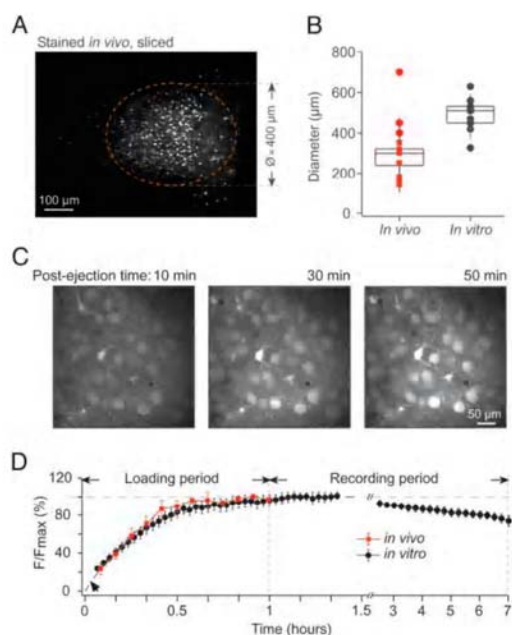


Fig. 2. Effectiveness and time-course of the staining procedure. (A) Image of the stained area in a cortical slice obtained from a P13 mouse ($\times 20$ objective). The cells were stained *in vivo*, and the brain was then removed and sliced. (B) Box plot of data illustrating the diameter of the stained area in different experiments. Each symbol marks a separate experiment. Squares ($n = 10$) represent cortices stained and imaged *in vivo*, and circles represent cortices imaged *in vitro* and stained either *in vivo* ($n = 3$, red symbols) or *in vitro* ($n = 10$, black symbols). (C) Consecutive images taken *in vivo* at 90- μ m depth 10, 30, and 50 min after ejection (1 min) of 1 mM OG-1 AM into the cortex of a P14 mouse. (D) Normalized mean fluorescence intensity as a function of post-ejection time. The plot summarizes data obtained in seven *in vivo* (red squares) and nine *in vitro* (black circles) experiments (left part of the graph) and in three *in vitro* (black circles) experiments (right part of the graph).

Previously, we and others (see, for example, ref. 28) have experienced difficulties in loading neurons in brain slices from adult rodents with bath-applied AM indicator dyes. In contrast, MCBL provided excellent results in slices of adult mice (Fig. 3A). Surprisingly, the quality of staining appeared to be better in adults than in neonates. Not only all cell somata were detectable in adults, but also many cellular processes could be visualized (arrows in Fig. 3A Right). The healthy appearance of stained cells as well as their robust responses to iontophoretic glutamate applications (Fig. 3B) indicated the viability of our approach. Similar data were obtained in slices cut from *in vivo* stained adult brains ($n = 4$, not shown). Thus, MCBL is applicable for virtually noninvasive, in-depth staining of neurons in the adult brain.

To estimate the intracellular indicator dye concentration when using MCBL, the cells in cortical slices were first stained with OG-1 AM. Thereafter, one of the slices was patched and dialyzed with an intracellular solution containing either 20 or 50 μ M OG-1 hexapotassium salt. The steady-state fluorescence intensity of the patched cell was used to estimate the dye concentration in the neighboring AM-loaded neurons. As shown in Fig. 3 C and D, on average, the dye concentration within intact neurons was close to 20 μ M ($n = 35$ cells). We noticed, however, that cells

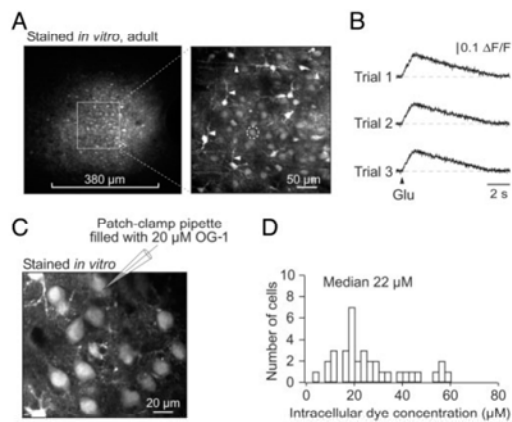


Fig. 3. *In vitro* staining of the adult mouse cortex. (A Left) An overview (taken with a $\times 20$ objective) of the area in a cortical slice from a P71 mouse stained with magnesium green AM. (Right) A maximal projection of 10 images taken with a $\times 60$ objective from 50 to 60 μm underneath the slice surface. The imaged area is delimited by the square area indicated in Left. (B) Line-scan recordings of Ca²⁺ transients in a neuron (marked with a white circle in A Right), evoked by three consecutive 350-ms iontophoretic glutamate applications. (C) Layer 2/3 cells in a cortical slice stained *in vitro* with OG-1 AM. After staining, one cell was patched and perfused with an intracellular solution containing 20 μM OG-1 hexapotassium salt. (D) Histogram illustrating the distribution of the estimated OG-1 concentration in neurons stained by using the MCBL technique.

with a glia-like appearance were always much brighter. The dye concentration in this type of cells reached levels of 80–100 μM ($n = 4$). Similar levels of cellular fluorescence in neuron- and glia-like cells were also obtained in slices from other brain regions, including hippocampus, thalamus, and cerebellum. It is important to note that MCBL did not cause any relevant dye compartmentalization in organelles, as often encountered with AM-dye loading protocols involving prolonged incubations. This finding was verified by staining cells in slices first with OG-1 AM and then patching them with dye-free pipette solutions. The resulting dialysis decreased the cell's fluorescence to nearly background levels ($13.6 \pm 3\%$, $n = 4$ cells). No "hot spots," indicative for dye molecules captured within organelles, were detected in high-resolution images of thereby unloaded cells.

To test the viability of stained neurons further, we stimulated layer 2/3 neurons *in vivo* by iontophoretic glutamate application (Fig. 4A). This stimulation resulted in transient increases in the intracellular calcium concentration in cells located in the vicinity ($\leq 50 \mu\text{m}$) of the application pipette (Fig. 4A Lower). The Ca²⁺ transients were caused by glutamate itself and not by the ejection current, because the same stimuli applied from a pipette containing no glutamate failed to induce any Ca²⁺ transients (data not shown). We next compared Ca²⁺ transients recorded *in vivo* with glutamate-activated Ca²⁺ transients obtained in layer 2/3 neurons in slices of the same *in vivo* stained brains. After slicing the brain, the neurons were stimulated by iontophoretic glutamate pulses similar to those used *in vivo* (Fig. 4B). These stimulations resulted in similar Ca²⁺ transients, which were reversibly blocked by a mixture of the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) and 50 μM α -L-2-amino-5-phosphonovaleic acid (APV). As illustrated in Fig. 4C, in a whole-cell patch-

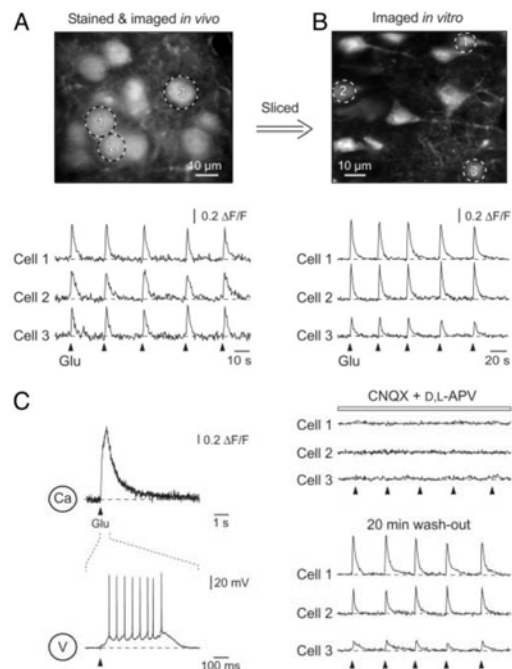


Fig. 4. *In vivo* and *in vitro* comparison of glutamate-evoked Ca²⁺ transients. (A Upper) A high-magnification image of layer 2/3 neurons *in vivo* in the cortex of a P13 mouse. (Lower) Ca²⁺ transients in three individual neurons (marked in Upper) evoked by five consecutive 500-ms iontophoretic glutamate applications. (B Upper) *In vivo* stained layer 2/3 neurons from the same mouse as in A visualized *in vitro* in a cortical slice. (Lower) Ca²⁺ transients in three individual neurons evoked by iontophoretic glutamate applications in control, in the presence of 10 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) and 50 μM α -L-2-amino-5-phosphonovaleic acid (APV), and 20 min after wash-out of the drugs. (C) Line-scan Ca²⁺ measurements and simultaneous recordings of membrane potential changes evoked by a 500-ms iontophoretic glutamate application in a whole-cell patch-clamped layer 2/3 pyramidal neuron.

clamped neuron such iontophoretic glutamate applications caused 520- to 590-ms trains of 8–12 action potentials ($n = 3$ cells).

Fig. 5 demonstrates that MCBL is suitable for monitoring somatic Ca²⁺ transients evoked in individual layer 2/3 neurons of the barrel cortex by whisker deflection. By using the line-scan mode (5 ms per line) we recorded whisker deflection-evoked Ca²⁺ transients (mean amplitude of 0.38 ± 0.07 , $n = 9$ cells). The decay time constant of the transients was 140–390 ms and was comparable to the decay time constant of transients evoked by single-shock electrical stimulation (Fig. 5 Inset). To obtain an insight into how neighboring layer 2/3 neurons respond to the same sensory stimulus, groups of three cells were monitored simultaneously. We selected cells located along a straight line with at least one cell responding more than once during the first three stimuli. In 34% of the trials (total of 38 trials, three mice) all cells responded to the stimulus, in 36% of cases only a subset of cells responded, and in 30% of the trials, whisker deflection failed to produce Ca²⁺ responses in these three cells. At least one Ca²⁺ transient was recorded in each

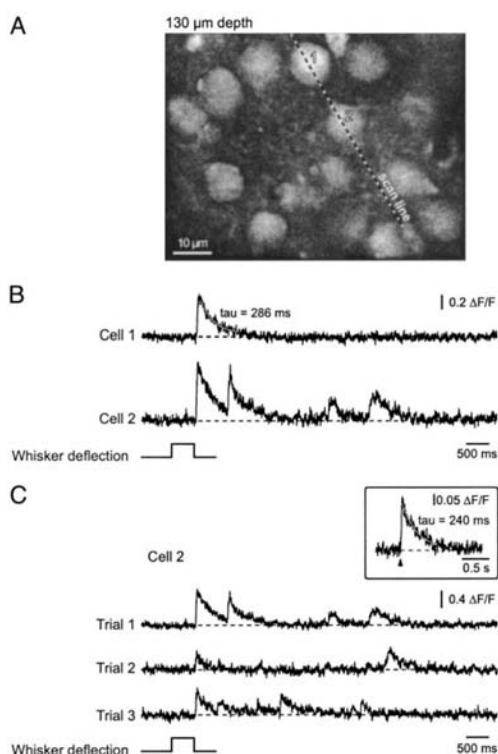


Fig. 5. *In vivo* recordings of Ca^{2+} transients evoked by whisker deflection. (A) A high-magnification image of layer 2/3 neurons *in vivo* in the barrel cortex of a P13 mouse. (B) Line-scan recordings of Ca^{2+} transients evoked in two neurons by a deflection of the majority of whiskers on the contralateral side of the mouse's snout. The position of the scanned line and the cells analyzed are indicated in A. Note that the Ca^{2+} transients occurred 17–22 ms after the termination of the stimulus and therefore probably represent stimulus-offset responses (42). Here and in C, the solid line represents a mono-exponential fit of the decay phase of the transient. (C) Ca^{2+} transients evoked in cell 2 during three consecutive trials. The top trace is from the trial illustrated in B. (Inset) A Ca^{2+} transient in a P14 layer 2/3 neuron evoked *in vivo* by single-shock electrical stimulation (70 V, 200 μs , average of five consecutive trials).

studied cell and the pattern of responding cells changed from trial to trial. Thus, in more than one-third of the trials, whisker deflections activated only a subset of neurons, indicating that even the global activation of all whiskers result in a mosaic activation pattern in the cortical layer 2/3.

Discussion

The approach introduced here permits simultaneous Ca^{2+} recordings in tens to hundreds of individual neurons. Importantly, it requires only minor surgery and allows, at least in young mice, neurons to be imaged through the intact, although thinned, skull. Leaving the skull intact not only helps to eliminate movement artifacts but also opens the possibility of long-lasting, perhaps even chronic, recordings (32) with the possibility of restraining the neurons if necessary. In addition, the MCBL technique provides a straightforward means for in-depth staining of neurons in the adult brain. If combined with a miniature head-

mounted two-photon microscope (33), it may also allow *in vivo* two-photon imaging in freely moving animals.

The major difference between MCBL and other staining methods using AM indicator dyes is that in our study the indicators were delivered for a short period directly to the target cells. In particular, this approach improved the staining of neurons in the adult brain, which are, in general, not stained by bath-applied AM indicator dyes. Local dye delivery also allowed the size of the stained region to be controlled, thus permitting selective staining of areas of interest. Furthermore, MCBL is suitable for staining virtually any cell type, including all kinds of cortical, hippocampal, thalamic, and cerebellar neurons. Remarkably, it allows staining of cerebellar Purkinje cells, which are difficult to load with bath-applied AM indicator dyes at any developmental stage (ref. 34; unpublished observations). Our results suggest that MCBL can be used for loading cells *in vivo* and *in vitro* with any indicator dyes, including voltage-sensitive dyes, Na^+ and Cl^- indicators, lipophilic dyes such as DiO (3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine) and DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine), etc. Last, but not least, MCBL needs only ≈ 400 fl of the dye-containing solution per experiment compared with the much larger quantities used for bath loading and is, therefore, also economically attractive.

In comparison to *in vivo* imaging of microelectrode-loaded cells, MCBL has, however, some obvious limitations. First, the depth limit in our recordings was ≈ 200 μm with and 300 μm without the skull, compared with 500 μm when imaging cell dendrites of microelectrode-loaded cells (21). This difference is partially due to the higher dye concentration in cells reached by microelectrode-loading procedures. Thus, MCBL-loaded cells contained up to 60 μM , on average 20 μM , indicator dye, instead of <3 – 6 mM when stained by using a microelectrode. Another problem is a reduced image contrast because of the staining of many fine processes in the surrounding neuropil. These two limitations make the use of MCBL for *in vivo* imaging of neuronal dendrites at present difficult. Future strategies for improving the quality of recordings include the use of longer wavelengths of the excitation light, larger numerical apertures of the objective lens, better transmittance of all lenses, beam splitters and filters, higher photon sensitivity of the photomultiplier tube, etc. Because the proportion of scattered photons in the emitted fluorescence signal increases markedly with increasing imaging depth, a larger craniotomy and a larger effective angular acceptance of the detection optics (35) should also significantly improve depth resolution by enabling the collection of larger portion of scattered photons. Finally, better results will be obtained with dyes having a larger two-photon cross section (30).

To date, the commonly used method for *in vivo* staining of neuronal populations with calcium indicator dyes has been to label them with dextran conjugates of the dyes (24, 36). This technique employs retrograde or anterograde transport of the dye and, thus, selectively stains neurons projecting to, or axonal fibers originating from, the site of dye application. The dextran-based staining procedure has been used *in vivo* to image population activity of spinal neurons in the zebra fish (37), to monitor light-induced Ca^{2+} transients in individual retinal axons of *Xenopus* tadpoles (38), and to record odor-induced Ca^{2+} signals in the olfactory bulb glomeruli of mouse and zebra fish (25, 39). Furthermore, by using a similar approach, Mulligan *et al.* (40) imaged individual neurons with a good signal-to-noise ratio near the injection site within the frog accessory olfactory bulb. Although both MCBL and the dextran-based staining technique are suited for *in vivo* staining of neurons, these approaches cannot substitute for each other. Whereas MCBL provides neuronal staining "here and now," the dextran-based staining technique requires prolonged time periods for dye uptake. We want to stress that we failed to label cells with dextran-

conjugated dyes when using the “mild” delivery protocol used for AM indicators (see *Materials and Methods* for details). We did not try, however, to improve dye uptake by using the usual cell-damaging procedures, such as adding the detergent Triton X-100 to the staining solution (24, 25, 39) or perforating cells with large dye-ejection pipettes [40- to 50- μm tip openings (36)]. Thus, under our conditions the dextran-conjugated dyes just accumulated in the extracellular space near the ejection site and were not taken up by neurons.

To test the usefulness of MCBL *in vivo*, we monitored Ca^{2+} transients in layer 2/3 neurons of the barrel cortex. Ca^{2+} transients, similar to those recorded in slices, were observed in response to either iontophoretic glutamate application or single-shock electrical stimulation. Importantly, we detected Ca^{2+} transients in clusters of neurons in response to whisker stimulation. These Ca^{2+} transients were caused most probably by one or two action potentials (21, 22, 41). The signal-to-noise ratio was sufficient to allow individual, nonaveraged somatic Ca^{2+} transients to be distinguished clearly from the background noise. The occurrence of these large Ca^{2+} transients in layer 2/3 neurons is surprising in view of the findings of Brecht and Sakmann (42), who performed *in vivo* patch-clamp recordings of individual layer 4 neurons in rats and found that these cells, which relay

thalamic output to layer 2/3, exhibit very little whisker deflection-correlated action potential firing. On the other hand, Stern *et al.* (41) reported that whisker deflections often produce action potentials in layer 2/3 neurons of rats older than P20. In our recordings presumed action potential-generated Ca^{2+} transients were observed in mouse neurons already at P13. Our data suggest that on the level of individual layer 2/3 neurons, deflections of the majority of whiskers result in a mosaic activation pattern, which changes from trial to trial. This original finding is difficult to obtain with other approaches.

Our method provides a surprisingly simple and robust approach for imaging Ca^{2+} in cortical networks with single-cell resolution *in vivo*. We trust that this method will allow rapid progress in our understanding of neuronal interactions in the intact brain and, particularly, a better understanding of functional changes on the level of single neurons and networks in various mouse mutants.

We thank Y. Kovalchuk, W. K. Kafitz, and H. Adelsberger for valuable technical suggestions; J. Davis for comments on the manuscript; and R. Maul, S. Schickle, and I. Schneider for technical assistance. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 391 to O.G. and A.K.) and Graduiertenkolleg 333.

- Nicolelis, M. & Ribeiro, S. (2002) *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 602–606.
- Shoham, D., Glaser, D. E., Arieli, A., Kenet, T., Wijnbergen, C., Toledo, Y., Hildesheim, R. & Grinvald, A. (1999) *Neuron* **24**, 791–802.
- Raichle, M. E. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 765–772.
- Orbach, H. S., Cohen, L. B. & Grinvald, A. (1985) *J. Neurosci.* **5**, 1886–1895.
- Grinvald, A., Frostig, R. D., Lieke, E. & Hildesheim, R. (1988) *Physiol. Rev.* **68**, 1285–1366.
- Logothetis, N., Merkle, H., Augath, M., Trinath, T. & Ugurbil, K. (2002) *Neuron* **35**, 227–242.
- Bonhoeffer, T. & Grinvald, A. (1991) *Nature* **353**, 429–431.
- Tsien, R. Y. (1988) *Trends Neurosci.* **11**, 419–424.
- Mao, B. Q., Hamzai-Sichani, F., Aronov, D., Froemke, R. C. & Yuste, R. (2001) *Neuron* **32**, 883–898.
- Tsien, R. W. & Tsien, R. Y. (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 715–760.
- Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 11–21.
- Neher, E. (1998) *Neuron* **20**, 389–399.
- Südhof, T. (2000) *Neuron* **28**, 317–320.
- Yuste, R. & Denk, W. (1995) *Nature* **375**, 682–684.
- Kovalchuk, Y., Eilers, J., Lisman, J. & Konnerth, A. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 1791–1799.
- Chittajallu, R., Alford, S. & Collingridge, G. L. (1998) *Cell Calcium* **24**, 377–385.
- Buonanno, A. & Fields, R. D. (1999) *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 110–120.
- Gomez, T. M. & Spitzer, N. C. (1999) *Nature* **397**, 350–355.
- Spitzer, N. C., Lautermilch, N. J., Smith, R. D. & Gomez, T. M. (2000) *BioEssays* **22**, 811–817.
- Komuro, H. & Rakic, P. (1998) *J. Neurobiol.* **37**, 110–130.
- Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D. & Tank, D. W. (1997) *Nature* **385**, 161–165.
- Svoboda, K., Helmchen, F., Denk, W. & Tank, D. W. (1999) *Nat. Neurosci.* **2**, 65–73.
- Chapman, S., Mertz, J., Beaupaire, E., Morcaux, L. & Delaney, K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1230–1234.
- O'Donovan, M. J., Ho, S., Sholomenko, G. & Yee, W. (1993) *J. Neurosci. Methods* **46**, 91–106.
- Wachowiak, M. & Cohen, L. B. (2001) *Neuron* **32**, 723–735.
- Tsien, R. Y. (1981) *Nature* **290**, 527–528.
- Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. (2000) *Nat. Neurosci.* **3**, 452–459.
- Yuste, R. (2000) in *Imaging: A Laboratory Manual*, eds Yuste, R., Lanni, F. & Konnerth, A. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), pp. 34.1–34.9.
- Edwards, F., Konnerth, A., Sakmann, B. & Takahashi, T. (1989) *Pflügers Arch.* **414**, 600–612.
- Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. (1990) *Science* **248**, 73–76.
- Margrie, T. W., Brecht, M. & Sakmann, B. (2002) *Pflügers Arch.* **444**, 491–498.
- Christie, R. H., Baekai, B. J., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Kajdasz, S. T., Webb, W. W. & Hyman, B. T. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 858–864.
- Helmchen, F., Fec, M. S., Tank, D. W. & Denk, W. (2001) *Neuron* **31**, 903–912.
- Kirschuk, S. & Verkhatsky, A. (1996) *Pflügers Arch.* **431**, 977–983.
- Ohcim, M., Beaupaire, E., Chaigneau, E., Mertz, J. & Charpak, S. (2001) *J. Neurosci. Methods* **111**, 29–37.
- Kreitzer, A. C., Gcc, K. R., Archer, E. A. & Regehr, W. G. (2000) *Neuron* **27**, 25–32.
- Fetcho, J. R. & O'Malley, D. M. (1995) *J. Neurophysiol.* **73**, 399–406.
- Edwards, J. A. & Cline, H. T. (1999) *J. Neurophysiol.* **81**, 895–907.
- Friedrich, R. W. & Korsching, S. I. (1997) *Neuron* **18**, 737–752.
- Mulligan, S. J., Davison, I. & Delaney, K. R. (2001) *Neuroscience* **104**, 137–151.
- Stern, E., Maravall, M. & Svoboda, K. (2001) *Neuron* **31**, 305–315.
- Brecht, M. & Sakmann, B. (2002) *J. Physiol.* **543**, 49–70.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ein- und Zwei-Photonen-Anregung im direkten Vergleich.....	10
Abb. 2: Experimentalaufbau im Überblick.....	15
Abb. 3: Schematischer Aufbau des Lasersystems.	17
Abb. 4: Ladephase am Hirnschnittpräparat im Zeitverlauf.....	19
Abb. 5: Normalisierte mittlere Fluoreszenzintensität <i>in vitro</i>	20
Abb. 6: Größe des gefärbten Areals <i>in vitro</i>	20
Abb. 7: Messung von Spontanaktivität im Schnittpräparat des Neokortex.	21
Abb. 8: Glutamatapplikation am Schnittpräparat des Neokortex.	22
Abb. 9: Hirnschnittpräparate des Hippokampus der Maus.	23
Abb. 10: Dendritenbaum Purkinjezellen	24
Abb. 11: Zusammengesetzte Abbildung eines Ganzhirnpräparates.....	25
Abb. 12: Virtueller Schnitt durch ein Ganzhirnpräparat.....	26
Abb. 13: Anfärbung mit Calcium Green Dextran 3000.....	27
Abb. 14: Schematischer Untersuchungsaufbau <i>in vivo</i>	28
Abb. 15: Lichtmikroskopische Darstellung des <i>barrel-cortex</i>	29
Abb. 16: Beispiel des mit Farbstoff beladenen kortikalen Areals.....	30
Abb. 17: Größe des angefärbten Areals <i>in vivo</i>	31
Abb. 18: Beladung kortikaler Zellen <i>in vivo</i> im Zeitverlauf	31
Abb. 19: Diagramm der Beladung kortikaler Zellen <i>in vivo</i> im Zeitverlauf.....	32
Abb. 20: Messung <i>in vivo</i> durch die ausgedünnte Schädeldecke.....	32
Abb. 21: Messung <i>in vivo</i> nach Entfernen der Schädeldecke.....	33
Abb. 22: Messung spontaner Calciumgradienten an Einzelzellen <i>in vivo</i>	33
Abb. 23: Iontophoretische Glutamatapplikation <i>in vivo</i>	34
Abb. 24a: Iontophoretische Glutamatapplikation <i>in vitro</i>	35
Abb. 24b: Supprimierte Ca ⁺⁺ - Transienten durch Glutamatrezeptorantagonisten....	35
Abb. 24c: Reversibilität der Glutamatrezeptorblockade.....	36
Abb. 25: Ca ⁺⁺ -Transienten und einhergehende Aktionspotentiale <i>in vitro</i>	36
Abb. 26: Kalziumtransienten durch mechanische Stimulation von Tasthaaren	37
Abb. 27: Weitere Messung mit mechanischer Stimulation der Barthaare.....	38

Literaturverzeichnis

Berridge, M. J., Lipp, P. und Bootman, M. D.

The versatility and universality of calcium signalling
Nat Rev Mol Cell Biol. 1 (2000) 11-21

Buonanno, A. und Fields, R. D.

Gene regulation by patterned electrical activity during neural and skeletal muscle development
Curr Opin Neurobiol. 9 (1999) 110-20

Centonze, V. E. und White, J. G.

Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging
Biophys J. 75 (1998) 2015-24

Charpak, S., Mertz, J., Beaupaire, E., Moreaux, L. und Delaney, K.

Odor-evoked calcium signals in dendrites of rat mitral cells
Proc Natl Acad Sci U S A. 98 (2001) 1230-4

Chittajallu, R., Alford, S. und Collingridge, G. L.

Ca²⁺ and synaptic plasticity
Cell Calcium. 24 (1998) 377-85

Christie, R. H., Bacskai, B. J., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Kajdasz, S. T., Webb, W. W. und Hyman, B. T.

Growth arrest of individual senile plaques in a model of Alzheimer's disease observed by in vivo multiphoton microscopy
J Neurosci. 21 (2001) 858-64

Denk, W., Strickler, J. H. und Webb, W. W.

Two-photon laser scanning fluorescence microscopy
Science. 248 (1990) 73-76

Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B. und Takahashi, T.

A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system
Pflugers Arch. 414 (1989) 600-12

Edwards, J. A. und Cline, H. T.

Light-induced calcium influx into retinal axons is regulated by presynaptic nicotinic acetylcholine receptor activity in vivo
J Neurophysiol. 81 (1999) 895-907

Fetcho, J. R. und O'Malley, D. M.

Visualization of active neural circuitry in the spinal cord of intact zebrafish
J Neurophysiol. 73 (1995) 399-406

Friedrich, R. W. und Korsching, S. I.

Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb
visualized by optical imaging

Neuron. 18 (1997) 737-52

Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. und Konnerth, A.

Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex

Nat Neurosci. 3 (2000) 452-9

Gomez, T. M. und Spitzer, N. C.

In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium
transients

Nature. 397 (1999) 350-5

Grinvald, A., Frostig, R. D., Lieke, E. und Hildesheim, R.

Optical imaging of neuronal activity

Physiol Rev. 68 (1988) 1285-366

Helmchen, F., Fee, M. S., Tank, D. W. und Denk, W.

A miniature head-mounted two-photon microscope. high-resolution brain imaging in
freely moving animals

Neuron. 31 (2001) 903-12

Kirschuk, S. und Verkhratsky, A.

[Ca²⁺]_i recordings from neural cells in acutely isolated cerebellar slices employing
differential loading of the membrane-permeant form of the calcium indicator
fura-2

Pflugers Arch. 431 (1996) 977-83

Komuro, H. und Rakic, P.

Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter
receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations

J Neurobiol. 37 (1998) 110-30

Konnerth, A.

Patch-clamping in slices of mammalian CNS

Trends Neurosci. 13 (1990) 321-3

Kovalchuk, Y., Eilers, J., Lisman, J. und Konnerth, A.

NMDA receptor-mediated subthreshold Ca(2+) signals in spines of hippocampal
neurons

J Neurosci. 20 (2000) 1791-9

Kreitzer, A. C., Gee, K. R., Archer, E. A. und Regehr, W. G.

Monitoring presynaptic calcium dynamics in projection fibers by in vivo loading of a
novel calcium indicator

Neuron. 27 (2000) 25-32

Logothetis, N., Merkle, H., Augath, M., Trinath, T. und Ugurbil, K.

Ultra high-resolution fMRI in monkeys with implanted RF coils

Neuron. 35 (2002) 227-42

Majewska, A., Yiu, G. und Yuste, R.

A custom-made two-photon microscope and deconvolution system
Pflügers Arch. 441 (2000) 398-408

Mao, B. Q., Hamzei-Sichani, F., Aronov, D., Froemke, R. C. und Yuste, R.

Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices
Neuron. 32 (2001) 883-98

Mir, L. M.

Application of electroporation gene therapy: past, current, and future
Methods Mol Biol. 423 (2008) 3-17

Mulligan, S. J., Davison, I. und Delaney, K. R.

Mitral cell presynaptic Ca²⁺ influx and synaptic transmission in frog amygdala
Neuroscience. 104 (2001) 137-51

Neher, E.

Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in
neurotransmitter release
Neuron. 20 (1998) 389-99

Nevian, T. und Helmchen, F.

Calcium indicator loading of neurons using single-cell electroporation
Pflügers Arch. 454 (2007) 675-88

Nicolelis, M. A. und Ribeiro, S.

Multielectrode recordings: the next steps
Curr Opin Neurobiol. 12 (2002) 602-6

O'Donovan, M. J., Ho, S., Sholomenko, G. und Yee, W.

Real-time imaging of neurons retrogradely and anterogradely labelled with calcium-
sensitive dyes
J Neurosci Methods. 46 (1993) 91-106

Oheim, M., Beaupaire, E., Chaigneau, E., Mertz, J. und Charpak, S.

Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth
J Neurosci Methods. 111 (2001) 29-37

Orbach, H. S., Cohen, L. B. und Grinvald, A.

Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex
J Neurosci. 5 (1985) 1886-95

Radnikow, G., Feldmeyer, D. und Lubke, J.

Axonal projection, input and output synapses, and synaptic physiology of Cajal-
Retzius cells in the developing rat neocortex
J Neurosci. 22 (2002) 6908-19

Raichle, M. E.

Behind the scenes of functional brain imaging: a historical and physiological perspective

Proc Natl Acad Sci U S A. 95 (1998) 765-72

Roe, A. W.

Long-term optical imaging of intrinsic signals in anesthetized and awake monkeys

Appl Opt. 46 (2007) 1872-80

Shoham, D., Glaser, D. E., Arieli, A., Kenet, T., Wijnbergen, C., Toledo, Y., Hildesheim, R. und Grinvald, A.

Imaging cortical dynamics at high spatial and temporal resolution with novel blue voltage-sensitive dyes

Neuron. 24 (1999) 791-802

Spitzer, N. C., Lautermilch, N. J., Smith, R. D. und Gomez, T. M.

Coding of neuronal differentiation by calcium transients

Bioessays. 22 (2000) 811-7

Südhof, T. C.

The synaptic vesicle cycle revisited

Neuron. 28 (2000) 317-20

Svoboda, K., Denk, W., Kleinfeld, D. und Tank, D. W.

In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons

Nature. 385 (1997) 161-5

Svoboda, K., Helmchen, F., Denk, W. und Tank, D. W.

Spread of dendritic excitation in layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex in vivo

Nat Neurosci. 2 (1999) 65-73

Tashiro, M., Itoh, M., Fujimoto, T., Masud, M. M., Watanuki, S. und Yanai, K.

Application of positron emission tomography to neuroimaging in sports sciences

Methods. 45 (2008) 300-6

Tsien, R. W. und Tsien, R. Y.

Calcium channels, stores, and oscillations

Annu Rev Cell Biol. 6 (1990) 715-60

Tsien, R. Y.

A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells

Nature. 290 (1981) 527-8

Tsien, R. Y.

Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium

Trends Neurosci. 11 (1988) 419-24

Wachowiak, M. und Cohen, L. B.

Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb
Neuron. 32 (2001) 723-35

Yuste, R. und Denk, W.

Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration
Nature. 375 (1995) 682-4

Yuste, R.

Loading Brain Slices with AM Esters of Calcium Indicators
in "Imaging Neurons - A Laboratory Manual", Yuste, R., Lanni, F., Konnerth, A.
(Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, 34.1 - 34.9

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Arthur Konnerth für die einmalige Gelegenheit, in einer international renommierten neurowissenschaftlichen Arbeitsgruppe an einer spannenden Fragestellung zu arbeiten. Mit Frau Prof. Dr. Olga Garaschuk stellte er mir zudem eine besonders erfahrene Mitarbeiterin an die Seite. Die zahlreichen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Mitarbeiter des Institutes waren mir stets eine grosse Unterstützung. Hervorzuheben ist Prof. Dr. Knut Holthoff, der zeitweise eine Rolle als Betreuer übernahm.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Gratzl als Leiter des Graduiertenkolleg 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft, durch das ich zum einen finanziell unterstützt wurde und zum anderen an zahlreichen wertvollen Fortbildungsveranstaltungen in einer interessanten Gruppe von Doktoranden der Biologie und Medizin teilnehmen durfte.