

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Herstellung der Hirnschnittpräparate

Die Art der Präparation und Aufbewahrung der Gewebeschnitte der *Colliculi superiores* (CS), welche Mäusen des gemischt genetischen Hintergrundes C57/Bl6 entnommen wurden, folgte den Standardbedingungen des Labors (Jüttner et al., 2001).

Der Tag der Geburt wurde als postnataler Tag (P) 0 definiert. Es wurden Experimente in den Altersstufen P0/P1, P7/P8 und P15/P16 durchgeführt, wobei die Mäuse des angegebenen Genotyps zwischen P13 und P14 die Augen öffnen. Die Altersstufen werden im Folgenden mit P0, P7 bzw. P15 bezeichnet. Soweit es nicht anders beschrieben ist, wurden die Experimente zum Zeitpunkt P15 durchgeführt.

Nach vorangegangener Äthernarkose wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Während der Präparation, die in eiskalter künstlicher Liquorflüssigkeit (*artificial cerebrospinal fluid* (ACSF); 125 mM NaCl, 4 mM KCl, 10 mM Glukose, 1,25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂; pH = 7.3) unter dem Binokular durchgeführt wurde, wurden die *colliculi superiores* der Vierhügelregion dargestellt und entnommen. Im Anschluss wurden mit einem Vibratom (Vibratome Series 1000, Sectioning System, Vibratome, St. Louis, MO, USA) zwei horizontale Schnitte von 150 µm Dicke durch das *Stratum griseum superficiale* (SGS) und *Stratum opticum* (SOp) der CS ebenfalls in eiskalter ACSF angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend für ca. 2,5 h in ACSF unter Begasung (5% CO₂, 95% O₂) bei Raumtemperatur (RT, 20-22 °C) gelagert. Entsprechend des jeweiligen Protokolls wurden die Schnitte in einem Teil der Experimente zusätzlich in 1-Aminoindan-1,5-Dicarboxyl-Säure (AIDA, 300 µM), 6-Methyl-1-(Phenylethynyl) Pyridin (MPEP, 1 µM), Phorbol 12,13-Dibutyrat (PDBu, 1 µM) bzw. Chelerythrin Chlorid (CC, 2 µM) inkubiert.

Chelerythrin Chlorid (CC) und Dinitroquinoxalin-2,3(1H,4H)-Dion (DNQX) wurden von Tocris (Bristol, UK) und Tetrodotoxin (TTX) von Alomone Labs (Jerusalem, Israel) erworben. Alle anderen Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, BRD) bezogen.

Alle Experimente wurden entsprechend der Richtlinien und Verordnungen des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit, Berlin (LaGeTSi, Tötungsanzeige T0405/98 vom 1.1.1998 und T0123/03 vom 1.1.2003) durchgeführt.

2.2 Elektrophysiologische Messungen

Die Aufzeichnung der synaptischen Aktivität wurde innerhalb eines engen Zeitfensters von 2,5 h bis 3,5 h nach Anfertigung der Hirnschnitte vollzogen. Zur Durchführung der elektrophysiologischen Messungen wurden die einzelnen Schnitte des sCS in einer Immersionskammer unter einem platingestützten Nylonnetz fixiert und mit oxygenierter ACSF superfundiert (1 ml/min). Die einzelnen Neurone konnten unter einer Phasenkontrastoptik eines aufrechten Mikroskops (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, BRD) mit Hilfe eines Wasserimmersionsobjektives (63x) dargestellt werden. Hierbei konnte keine qualitative Unterscheidung der verschiedenen Neuronenpopulationen vorgenommen werden. Diesbezüglich zur Kontrolle durchgeführte intrazelluläre Lucifer-Yellow-Färbungen zeigten allerdings ein neuronales Dendritenfeld mit einem Durchmesser von mehr als 200 μm und einem Somadurchmesser von mehr als 12 μm , sodass zu vermuten ist, dass es sich hierbei um Vertikalzellen mit weitem Dendritenfeld (sogenannte *wide field neurons*) handelt (Jüttner et al., 2001). Sowohl die Ganzzelleableitungen (*whole-cell*-Konfiguration) als auch die Ableitungen durch eine teilweise perforierte Zellmembran (*perforated-patch*-Konfiguration) wurden mit einem EPC-7 *patch-clamp*-Verstärker (List, Darmstadt, BRD) bei RT aufgezeichnet. Die Pipetten (Patchpipetten, Superfusionspipetten) wurden aus Borsilikatglaskapillaren (WPI, Sarasota, FL, USA) mit einem P87-Puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) hergestellt.

Die Intrazellulärlösung (120 mM KCl, 4 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 10 mM Glukose, 0,5 mM CaCl₂ und 2 mM MgCl₂; pH 7.3) enthielt bei *perforated-patch*-Ableitungen zusätzlich Gramicidin (2-3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Lucifer Yellow (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die Aufzeichnungen wurden beendet, sobald Lucifer Yellow in die Zelle penetrierte. Die Pipettenlösung enthielt außerdem Lidocain N-Ethyl-Bromid (QX314, 2 mM, RBI, Natick, MA, USA), um eine Generierung von Aktionspotentialen im zu untersuchenden Neuron zu verhindern.

Bei einem Durchmesser der Pipettenspitze von 1-2 μm variierte der Pipettenwiderstand von 4 $\text{M}\Omega$ bis 6 $\text{M}\Omega$. Die Ableitung postsynaptischer Ströme erfolgte bei einem Haltepotential (V_h) von -70 mV, während der Serienwiderstand (R_s) weitestgehend korrigiert wurde (50–70 %) (Abb. 3). R_s wurde in Intervallen während der Experimente bestimmt und überschritt vor Kompensation nicht 25 $\text{M}\Omega$.

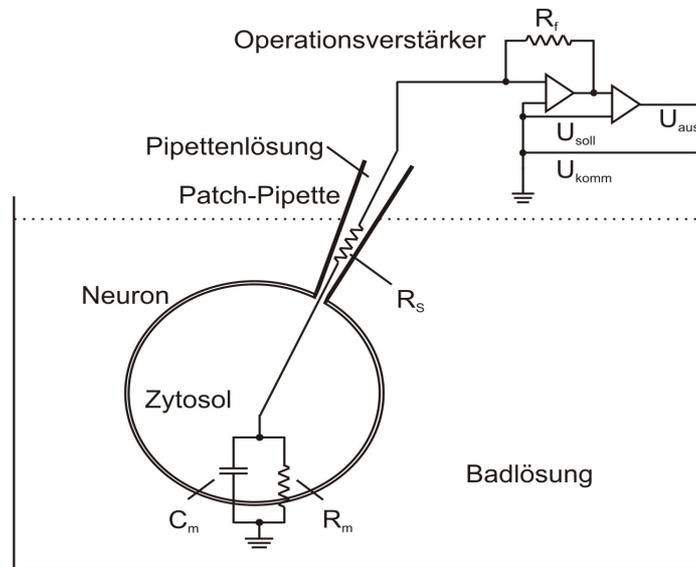


Abbildung 3: Schematische Darstellung und Ersatzschaltbild der *whole-cell*-Konfiguration (modifiziert nach Numberger et Draguhn, 1996). Die Patchpipette ist in der Ganzzelleableitung über den Serienwiderstand R_s mit dem Zellsoma verbunden. Membranfragmente, die in die Pipettenöffnung gesaugt werden können, erhöhen R_s . Der Membranwiderstand R_m und die Kapazität C_m charakterisieren die elektrischen Eigenschaften der kugelförmig idealisiert dargestellten Neuronmembran.

Durch GABA vermittelte synaptische Ströme wurden isoliert, indem sowohl glutamaterge (50 μM DNQX und 50 μM DL-2-Amino-5-Phosphonovalerische Säure (DL-APV)), glyzinerge (0,5 μM Strychnin) als auch cholinerge (5 μM d-Tubocurarin) Rezeptoren blockiert wurden. Diese inhibitorischen postsynaptischen Ströme (IPSCs – *inhibitory postsynaptic currents*) waren vollständig und reversibel blockierbar durch den GABA_A-Rezeptorantagonisten Bicucullin (20 μM). Bei dem gewählten Haltepotential von $V_h = -70$ mV kommen die IPSCs aufgrund des Cl^- -Ausstroms bei hoher intrazellulärer Cl^- -Konzentration als einwärts gerichtete Ströme zur Darstellung. Um Miniatur-IPSCs (mIPSCs) aufzuzeichnen, die unabhängig von aktionspotential-vermittelter Neurotransmitterfreisetzung sind, wurde Tetrodotoxin (1 μM) der Badlösung

hinzugesetzt. Soweit es nicht anders angegeben ist, wurden alle Pharmaka über die Badlösung appliziert.

Für einige der durchgeführten Experimente war es notwendig sicherzustellen, dass sowohl die intrazelluläre Chloridkonzentration als auch *second-messenger*-Systeme vorhandener Signalkaskaden aufrechterhalten bleiben. Da diese bei der Ganzzelleableitung ausgewaschen werden, wurde die Methode des perforierten Patches angewendet. Hierbei wird der Membranfleck unter der Pipette mit Hilfe des porenbildenden bakteriellen Antibiotikums Gramicidin perforiert (Ebihara et al., 1995; Kyrozis & Reichling, 1995). Durch die so erhaltenen niederohmigen Verbindungen zum Zytoplasma, mit Serienwiderstandswerten von R_S zwischen 7 M Ω und 25 M Ω , können jedoch keine größeren Moleküle diffundieren. Da das Vorhandensein von Gramicidin die Sealbildung erheblich erschwert, wurde die Spitze der Pipette zuerst mit antibiotikumfreier Intrazellulärlösung gefüllt (*tip filling*). Danach wurde die Pipette von hinten mit gramicidinhaltiger Lösung gefüllt. Um zu verhindern, dass Gramicidin schon vor Ausbildung des Seals an die Pipettenspitze gelangt, wurde während der Annäherung an die Zelle kein Überdruck angelegt. Nach Ausbildung des Gigaseals in der *cell-attached*-Konfiguration wurden innerhalb von 15-25 min leitfähige Poren in den Membranfleck unter der Pipette eingebaut. Dies wurde durch eine zunehmende Kapazität, die mittels Testpulses kontrolliert wurde und durch das Vorhandensein von spannungsaktivierten Strömen (Abb. 4) deutlich. Die Messung wurde begonnen, sobald der Serienwiderstand bis zu einem konstanten Wert abgesunken war. Lucifer Yellow, das die eingebauten Poren nicht passieren kann, wurde der Pipettenlösung als Kontrolle hinzugesetzt, um eine mögliche Ausbildung der *whole-cell*-Konfiguration sofort zu erkennen.

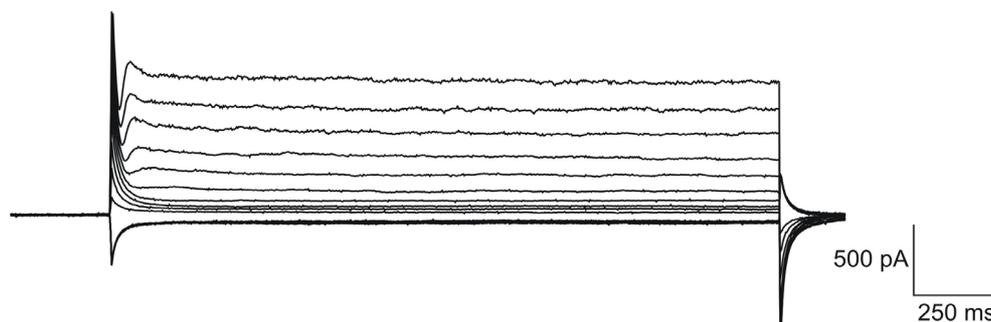


Abbildung 4: Ableitung von spannungsaktivierten K^+ -Strömen im *perforated patch*. Bei vorhandenem TTX (1 μ M) wurde die Zelle, ausgehend von einem Haltepotential $V_h = -70$ mV, in 10 mV Schritten um bis zu 100 mV depolarisiert und bis zu 20 mV hyperpolarisiert.

Die elektrophysiologischen Messdaten wurden mit Hilfe eines 16-Bit AD-Wandlers (ITC-16) bei einer Akquisitionsrate von 10 kHz aufgenommen. Dabei fand die entsprechende Software (Win-Tida 4.11, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) mit Besselfilter bei 3 kHz Verwendung. Die Amplituden und Kinetiken der aufgezeichneten spontanen IPSCs (sIPSCs) und mIPSCs wurden automatisch durch die Software PeakCount (© by Dr. med. Ch. Henneberger), welche bereits mehrfach Anwendung fand (Meier et al., 2003, Jüttner et al., 2005, Henneberger et al., 2005), analysiert.

2.3 Semiquantitative mRNA-Bestimmung durch RT-PCR

Die semiquantitative mRNA-Bestimmung wurde an Schnitten des visuellen CS durchgeführt, die analog zur Präparation für die elektrophysiologischen Messungen gewonnen wurden. Im Anschluss an die Präparation, ggf. mit nachfolgender Inkubation, und die Entfernung der restlichen Flüssigkeit wurden die Schnitte in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ca. -80 °C). Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von Trizol (GibcoBRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert, anschließend photometrisch ihre Reinheit überprüft sowie deren Menge bestimmt. Mittels reverser Transkription (Reverse Transkriptase RNA [RT-RNA], SuperScript™ II RT Enzyme, GibcoBRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) wurden 2 µg der zuvor gewonnenen Gesamt-RNA mit Hilfe eines oligo-dT-Primers (1 µl) in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt (15 min 70 °C, Annealing 2 min 4 °C, 5 min 42 °C, RT 60 min 42 °C, 10 min 70 °C). Die so gewonnene cDNA wurde dann bei -20 °C gelagert. Unter Einsatz des entsprechenden Primerpaares (Tab. 1) wurden anschließend Aliquots der cDNA amplifiziert. Hierfür enthielt ein Ansatz (25 µl) entsprechend den Herstellerangaben 0,2 mM dNTP, 1,1 mM MgCl₂ und 1,25 U RedTaq DNA-Polymerase. Die Konzentration der spezifischen F-/R-Primer betrug in allen Ansätzen 200 nM. Als Thermocycler wurde ein PCRSprint (Hybaid-AGS, Heidelberg, Deutschland) mit folgendem Protokoll verwendet (1 x: 5 min 94 °C - 1 min 58,5 °C - 1 min 72 °C; 29 x: 1 min 94 °C - 1 min 58,5 °C - 1 min 72 °C; 1 x: 10 min 72 °C).

Durch Titration der eingesetzten Mengen cDNA wurde sichergestellt, dass sich die PCR im linearen Bereich der Amplifikation befand. Zur Quantifizierung wurde als Standard die

Expression von *mouse*- β -Aktin (Primerkonzentration: 100 nM) gewählt und in allen Ansätzen mitamplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch eine Agarosegelelektrophorese getrennt und mittels Ethidiumbromid angefärbt. Die nachfolgende Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Software Image-Quant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Hierbei wurde die relative Expression an mRNA als das Verhältnis zwischen der Intensität der nachzuweisenden mRNA und der Intensität von β -Aktin berechnet.

Primer	Vorwärts (3' - 5')	Rückwärts (3' - 5')
mGluR 1	CAA ATC CTC TTT TGT CGG AGT	AGC TCT GCG TTG GGC CAC CA
mGluR 5	GTG ACA GAT GGA TAT CAG CGA	AAT TGG CTT CAT CGC ATC ACA
GABA _A -R α_1	ATC GTC TGA GAC CAG GTT TGG	CCC ATC TTC TGC TAC AAC CAC
GABA _A -R α_2	AAT CGG CTT AGA CCA GGA CTG	GGG CCA CTG ACT TTT TCC CAT
GABA _A -R α_3	TCA AGA CGA CAA GAA CCT GGG	TAT CAG TGT CTG ACA CAG GGC
GABA _A -R β_2	CAG GTT CTT ATC CCA GAT TGT	GGT CCA TCT TGT TGA CAT CCA
GABA _A -R β_3	CTT TTC GGC ATC TTC TCG GC	TCC ACG CCA GTA ACA GCC TTG
GABA _A -R γ_2	CAA GGT CTC CTA TGT CAC AGC	AAG GCG GTA GGG AAG AAG ATC
PKC α	TGA ATC CTC AGT GGA ATG AGT	GGT TGC TTT CTG TCT TCT GAA
PKC β	CCC GAA GGA AGC GAG GGC AAT GAA	AGT TCA TCT GTA CCC TTC CGC TCT
PKC γ	CGG GCT CCT ACG TCG GAT GAG	GCA GGC GTC CTG GGC TGG CAC
PKC δ	CAC CAT CTT CCA GAA AGA ACG	CTT GCC ATA GGT CCA GTT GTT
PKC ϵ	CAT CGA TCT CTC TCG GGA TCA TCG	CGG TTG TCA AAA TGA CAA GGC
PKC η	AGC TAG CCG TCT TCC ACG AGA CGC	GGA CGA CGC AGG TGC ACA CTT
PKC θ	TTG ATC TTT CCA GAG CCA CG	CTT CGC ATC TCC TAG CAT G
β -Aktin	ACC AAG GTG TGA TGG TGG GAA	CGC TCG TTG CCA ATA GTG ATG

Tabelle 1: Aufstellung der für die semiquantitative mRNA-Bestimmung verwendeten Primerpaare.

2.4 Immunhistochemie und konfokale Mikroskopie

Ein gegen den vesikulären inhibitorischen Aminosäuretransporter (VIAAT, 1:800, Meerschwein, Dumoulin et al., 2000, freundlicherweise überlassen von B. Gasnier) gerichteter

polyklonaler Antikörper (Ak) und ein monoklonaler, gegen das Synapsin Oberflächenantigen I gerichteter, Ak (Syn, 1:200, Hase, Stone et al., 1999, Chemicon, Temecula, USA) fanden als primäre Ak Verwendung. Als sekundäre Ak wurden Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC)- und Carboxymethyl-Indocyanin-3-(Cy3)-konjugierte Ak (1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, PA, USA) verwendet.

Die mit dem Vibratom angefertigten 500 µm dicken und jeweils nur einen *Colliculus superior* enthaltenden Gewebelöcher wurden entsprechend der Experimentieransätze unverzüglich, bzw. nach 2,5-stündiger Inkubation in begaster ACSF und zugesetztem AIDA, MPEP, PDBu oder CC, fixiert. Die Fixierung erfolgte in phosphatgepufferter Saline (PBS; 120 mM, pH 7,4) einschließlich 4 % (w/v [Menge/Volumen]) Paraformaldehyd und 4 % Saccharose für 6h bei 4 °C (Meier et al., 2003). Anschließend wurden die Gewebelöcher für 3 x 10 min in PBS gewaschen und danach in 1 % PBS einschließlich 8 % Saccharose über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Nach wiederholtem Waschen in PBS wurde das Gewebe in TissueTek OCT Compound (Sakura Finetek, AT Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und bei -20 °C gelagert. Die anschließend angefertigten 20 µm dicken, horizontalen Gefrierschnitte (Jung CryoMicrotome 1800, Leica, Bensheim, Germany) des visuellen CS wurden auf gelatinebeschichtete Glasträger aufgezogen und nachfolgend für 10 min in 1 % PBS, danach für 15 min in 50 mM NH₄Cl und abschließend wieder für 10 min in 1 % PBS gewaschen. Über Nacht wurden die CS-Schnitte mit den primären Antikörpern in 0,12 % (w/v) Triton X-100 in 0,1 % (w/v) Gelatine-PBS-Lösung bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach mehrfachem Waschen in Gelatine-PBS, Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur und nochmaligem Waschen in Gelatine-PBS sowie PBS wurden die Schnitte mit Vectashield +/- DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) überzogen und mit einem Glasplättchen abgedeckt. Um die Spezifität der primären Antikörper nachzuweisen, wurden diese in Kontrollfärbungen weggelassen und durch vergleichbar verdünnte Serumlösungen derselben Spezies ersetzt.

Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem konfokalen *laser-scanning* Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Krypton-Argon-Laser, MRC 1024; Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) aufgenommen. Die Exzitationswellenlängen betragen 488 nm für FITC- und 568 nm für Cy3-sekundäre Antikörper. Bilder von zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern (GF, 100 x 100 µm) wurden mit Hilfe eines 63-fachen Ölimmersionsobjektivs, der Software „Laser Sharp 2000“ (Bio-Rad) und eines 2-fachen digitalen Zooms akquiriert. Um eine bessere Auflösung der peripheren Begrenzung eines jeden immunreaktiv-positiven Bereiches zu erlangen, wurde jeweils eine Serie von 7-8

konfokalen Schnittbildern, mit exakt 0,1 µm Abstand voneinander, aufgenommen und anschließend mit der Software „Laser Pix 2000“ (Bio-Rad) mathematisch zu einem Durchschnittsbild gemittelt.

Für die weitere Quantifizierung der Immunreaktivitäten wurde für jedes Fluoreszenzbild ein Intensitätsschwellenwert ($I_{\text{Schwelle}} = 2/3 (I_{\text{Max}} - I_{\text{Min}})$) ermittelt (Scion Image Beta 3b, Scion Corporation, Frederick, USA), wobei I_{Max} und I_{Min} jeweils die maximalen und minimalen Intensitäten eines jeden Bildes darstellen. Die Anzahl und Fläche der VIAAT- und Syn-positiven Bereiche wurde für 20-40 GF aus 3-6 unabhängigen Experimenten bestimmt. Die durchschnittlichen Intensitätswerte und die Fläche der Bereiche mit Fluoreszenzintensitäten oberhalb des Schwellenwertes wurden jeweils simultan ermittelt. Für die weitere Analyse wurden nur Fluoreszenzbilder mit annähernd gleichen mittleren Intensitätswerten verwendet.

2.5 PKC-Aktivitätsbestimmung

Die PKC-Aktivität wurde *in vitro* an Zellysaten des visuellen CS unter Zuhilfenahme der $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -vermittelten Phosphorylierung des zugefügten *myristoylated-arginine-rich-C-kinase* Substrates (MARCKS) gemessen (Fiala et al., 1999; Grunbaum & Müller, 1998).

Nach Inkubation in ACSF, AIDA, MPEP bzw. CC wurden die Gewebeschnitte dreimal in eiskalter 1% PBS gewaschen und anschließend in 0,3 ml eines eiskalten Homogenisationspuffers (50 mM Tris-HCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,8) mechanisch homogenisiert. Die Lysate wurden bei 15.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Sowohl die Überstände als auch die wieder aufgelösten *pellets* wurden anschließend der Analyse unterzogen.

Für die Bestimmung der PKC-Aktivität (siehe auch Grünbaum & Müller, 1996) wurden die Proben mit 1 mM Ca^{2+} für 3 min präinkubiert. Anschließend wurden 30 µl der Reaktionslösung (300 µM MARCKS-Peptid, 50 mM Tris, pH 7,8, 10 mM MgCl_2 und 10 µM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Amersham, 1.500 counts/min*pmol)) zu jeder Probe hinzugegeben und für 30 sec bei RT inkubiert. Ca^{2+} -abhängige und Ca^{2+} -unabhängige PKC-Isoformen wurden durch das Hinzufügen von zusätzlich 1 mM Ca^{2+} oder 2 mM EGTA zur Reaktionslösung unterschieden.

Um die Hintergrundphosphorylierung zu quantifizieren, wurde jede Probe außerdem ohne

MARCKS-Peptid in der Reaktionslösung inkubiert. Die Phosphorylierung wurde dann mit 5 µl SDS-Puffer gestoppt. Danach wurden die Proben in einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) aufgetrennt und die ^{32}P -Inkorporation in das Substrat wurde durch zweitägige Belichtung von Kodak X-Omat AR-Filmen (Eastman Kodak, Rochester, NY) mit den Gelen dargestellt. Die Belichtung der Filme wurde soweit angepasst, dass die Signale der markierten Proteine sich jeweils in einem linearen Bereich befanden. Die Belichtung der Filme wurde mit einem Szintillationszähler kalibriert, der die Aufnahme von ^{32}P in das MARCKS-Peptid bestimmte. Die Autoradiogramme wurden daraufhin mit einem UMAX UC840-Scanner (UMAX; Willich, BRD) abgetastet und die ^{32}P -Aufnahme wurde durch photometrische Messung der Bandenintensität (NIH-Image, Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA) bestimmt.

2.6 Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentrationen in akuten und inkubierten Hirnschnitten

Zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumruhekonzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) kollikulärer Neurone wurde Fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Die Hirnschnitte wurden bei Raumtemperatur für 40 min in ACSF mit 10 µM Fura-2 AM inkubiert, anschließend gewaschen und nochmals für 20 min in ACSF aufbewahrt. Somit wurde eine ausreichende Deesterifikation des Fura-2 AM sichergestellt. Im Falle einer Behandlung der Hirnschnitte mit AIDA / MPEP wurden diese in allen o.g. Schritten appliziert.

Im Anschluss wurden die Hirnschnitte in derselben Immersionskammer unter einer Phasenkontrastoptik (40x, numerische Apertur 0,75, Zeiss) eines aufrechten Mikroskops (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, BRD) untersucht, die auch für die elektrophysiologischen Experimente verwendet wurde. Fura-2 AM wurde mit den Wellenlängen 360 nm und 380 nm angeregt. Die Exzitations- und Emissionsstrahlung wurden durch einen 510 nm dichromatischen Spiegel getrennt und die emittierte Strahlung bei 520 nm einem Breitbandfilter unterzogen. Die Fluoreszenzsignale wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet

(1280x1024 Pixel, 1 Pixel = 0,4 µm x 0,4 µm, TILL Photonics, Gräfelfing, Germany).

Die zu untersuchenden Sehfelder wurden zufällig ausgewählt. 60 Fluoreszenzbildpaare (360 und 380 nm) wurden mit 1-Sekunden-Intervallen aufgezeichnet. Die Fluoreszenz-

intensitäten der zu untersuchenden Neuronen wurden für beide Exzitationswellenlängen bestimmt. Die Hintergrundfluoreszenz wurde für eine Region in der unmittelbaren Nähe der Zelle ermittelt und vom Ergebnis subtrahiert.

Um sicherzustellen, dass lediglich Daten von vitalen Neuronen in die weitere Analyse kamen, wurden $[Ca^{2+}]_i$ -Ströme durch die Applikation von K^+ (5 sec, 25 mM) 15 Sekunden nach dem Beginn des Experiments evoziert. Außerdem waren folgende Forderungen zu erfüllen: i) die Fluoreszenzintensität musste bei einer 380 nm Exzitation um mindestens 30% fallen, ii) innerhalb von 40 sec nach Stopp der K^+ -Applikation musste die Ausgangsfluoreszenz wiederhergestellt sein und iii) die Fluoreszenzintensität bei einer 360 nm Exzitation musste während des gesamten Experimentes stabil sein.

Um die Ruhekalziumkonzentrationen vor der K^+ -Applikation zu bestimmen, wurden zehn hintergrundkorrigierte Fluoreszenzintensitäten für beide Anregungswellenlängen aufgezeichnet. $[Ca^{2+}]_i$ wurde aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten $R = F_{360} / F_{380}$ ermittelt, entsprechend $[Ca^{2+}]_i = KDB (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ (Grynkiewicz et al., 1985). Hierbei stellen R_{min} und R_{max} die Fluoreszenzverhältnisse für nullwertige und gesättigte Ca^{2+} - Konzentrationen dar. R_{min} , R_{max} und KDB wurden *in vitro* durch Kalibrierung mit dem *Calcium Calibration Buffer Kit #2* (Molecular Probes, Eugene, USA) bestimmt. Es ergaben sich folgende Werte: $R_{min} = 0,42$, $R_{max} = 2,37$ und $KDB = 859$ nM.

2.7 Statistische Analyse der erhobenen Daten

Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde mit der Software „Origin 4.1“ (Microcal, Northampton, MA, USA) durchgeführt. Numerische Daten sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler angegeben. Hierbei bezieht sich der Standardfehler auf die jeweilige Stichprobe. Für die Anzahl der in eine Statistik eingehenden Neurone, PCRs oder Bildausschnitte wurde die Variable n verwendet. In Diagrammen ist sie in der Form (n) dargestellt. Für statistische Vergleiche wurden je nach Art der zugrunde liegenden Daten ANOVA (*One-way analysis of variance*) oder t-Tests mit Bonferroni *post-hoc* Korrektur verwendet. Das jeweilige Signifikanzniveau ist in den Diagrammen mit * für $p < 0.05$, ** für $p < 0.01$ und *** für $p < 0.001$ gekennzeichnet.