

Dreidimensionale Erfassung neuronaler Netzwerkaktivität im unreifen visuellen Kortex der Maus mit Hilfe der Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

vorgelegt der Fakultät für Informatik und Automatisierung

der Technischen Universität Ilmenau

von

Dipl.-Ing. (FH) Michael Kummer

geboren am 10.06.1986 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr.-Ing. habil. Jens Haueisen
2. Prof. Dr. rer. nat. Knut Holthoff
3. Juniorprof. Dr. rer. nat. Albrecht Stroh

Tag der Einreichung: 26.11.2015

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12.08.2016

urn:nbn:de:gbv:ilm1-2016000414

Zusammenfassung

Eine weithin akzeptierte Hypothese der Neurobiologie besagt, dass die spontane Aktivität neuronaler Netzwerke während der Gehirnentwicklung von wesentlicher Bedeutung für die physiologische Ausreifung des Kortex ist. Es besteht daher ein großes Interesse, frühe Formen spontaner Netzwerkaktivität raumzeitlich hochaufgelöst zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit diente der intakte visuelle Kortex der Maus dabei als Versuchsmodell zur Erfassung der neonatalen Netzwerkaktivität in Form von raumzeitlich koordinierten somatischen Kalziumtransienten mittels eines selbst zusammengebauten Zweiphotonenmikroskops in Kombination mit einer zelltypspezifischen Expression genetisch kodierter Fluoreszenzindikatoren. Fluoreszenzmikroskopische Messungen neuronaler Netzwerkaktivität in drei Raumdimensionen sind nur unter Bildung eines Kompromisses aus räumlicher und zeitlicher Auflösung möglich. Eine Realisierungsmöglichkeit besteht in der Verwendung spiralförmiger Raumtrajektorien. Da dieses Verfahren über eine zu geringe räumliche Auflösung für einen Bildaufbau zur direkten Bestimmung von abgetasteten Raumpositionen verfügt, muss eine Validierung der Positionierung durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Verfahren entwickelt, um die laterale und die axiale Positioniergenauigkeit zu validieren. Die Anwendung des Verfahrens auf hardwareoptimierte Scantrajektorien hat ergeben, dass die für die einzelzelluläre Registrierung neuronaler Netzwerkaktivität benötigte Positioniergenauigkeit erreicht werden kann. Wie bildbasierte Epifluoreszenzmessungen gezeigt haben, besteht die neonatale Netzwerkaktivität im Wesentlichen aus niederfrequent auftretenden, räumlich ausgedehnten Clustern. Die Messungen belegen ferner, dass die Generierung dieser Clusteraktivität durch den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) sowohl räumlich als auch zeitlich inhibiert wird. Dieser hemmende Effekt auf die Netzwerkaktivität geht einher mit einer depolarisierenden GABA-Wirkung auf einzelzellulärer Ebene, welche für spannungsabhängige Kalzium- und Natriumkanäle größtenteils unterschwellig ist. Um diese Netzwerkaktivität weiter raumzeitlich zu charakterisieren, wurden dreidimensionale zweiphotonengestützte Messungen mittels optimierter positionsvalidierter Scantrajektorien durchgeführt. Diese Messungen ergaben, dass kortikale Cluster lateral begrenzt sind, während ihre axiale Ausdehnung typischerweise die gesamte obere kortikale Platte umfasst. Einzelzelluläre Ableitungen glutamaterger Neurone belegten zudem, dass die Cluster ein hohes Maß an Koaktivierung benachbarter Zellen aufweisen. Die vorliegende Arbeit dokumentiert eine für zweiphotonenmikroskopische Einzelzelleitungen hinreichend genaue Positionierung optimierter Scantrajektorien, deren Anwendung neue Erkenntnisse zur raumzeitlichen Struktur der Netzwerkaktivität im unreifen Kortex lieferte.

Abstract

A widely accepted hypothesis in neurobiology states that spontaneous activity of developing neuronal networks plays an important role for the physiological maturation of cortical circuits. Hence there is a high interest to characterize early types of spontaneous network activity at high spatial and temporal resolution. In the present study, the intact mouse visual cortex served as a model system for measuring neonatal network activity in the form of spatiotemporal coordinated somatic calcium transients using a custom-built two-photon fluorescence microscope in combination with cell type-specific expression of genetically encoded fluorescent indicators. Optical measurements of neuronal activity in three-dimensional space require a compromise between spatial and temporal resolution. One potentially suitable method relies on the use of spiral-shaped scan trajectories. Because the spatial resolution of the latter approach is too low for image formation and consequently inappropriate for assigning positions in three-dimensional space, a validation of positioning accuracy is required. In this work, a method was developed that enables validating the lateral and axial positioning accuracy of a two-photon microscope. Applying this technique to hardware-optimized scan trajectories showed that positioning accuracies are sufficient for recording neuronal network activity at single-cell resolution. Epifluorescence measurements revealed that neonatal network activity is mainly composed of spatially extended clusters occurring at low frequencies. Furthermore these measurements demonstrated that the generation of cluster events is spatiotemporally inhibited by the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA). This inhibitory effect is accompanied by a depolarizing effect of GABA at the cellular level which is largely sub-threshold for the activation of voltage-gated calcium and sodium channels. For a further characterization of cluster events, three-dimensional two-photon microscopy using optimized and validated scan trajectories was applied. Our data provided evidence for a distinct spatial confinement of cortical clusters in the horizontal plane. Additionally cluster events were found to typically involve the entire depth of the upper cortical plate. Single-cellular recordings from glutamatergic neurons showed a high degree of co-activation of neighboring cells within single cluster events. The present study demonstrated a sufficiently high positioning accuracy of optimized scan trajectories and revealed new insights into the spatiotemporal structure of neuronal network activity in the developing neocortex.

Danksagung

Zunächst möchte ich meine tiefste Dankbarkeit Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. Jens Haueisen, Herrn Prof. Dr. Knut Holthoff und Herrn Prof. Dr. Otto W. Witte aussprechen, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichten. Des Weiteren Danke ich Herrn Juniorprof. Dr. rer. nat. Albrecht Stroh für die Übernahme der Drittbegutachtung.

Gesondert möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. habil. Knut Kirmse für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die fachlichen Diskussionen und seine Unterstützung bedanken.

Gedankt sei allen Kollegen der Experimentellen Neurologie des Universitätsklinikums Jena, insbesondere der Arbeitsgruppe Biolumineszenz für ein angenehmes Arbeitsklima und die gegenseitige Hilfe. Mein Dank gilt auch den Kollegen aus Tübingen für ihre Mitwirkung an den *in vivo* Studien.

Ich bedanke mich bei meiner Familie und meiner Freundin Doreen für die fortwährende Liebe, Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Allen ungenannten Personen, die mir auf meinem bisherigen Lebensweg geholfen haben, danke ich gleichermaßen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Zusammenfassung | I |
| Abstract | II |
| Danksagung | III |
| Inhaltsverzeichnis | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| Abbildungsverzeichnis | XII |
| Tabellenverzeichnis | XV |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Motivation | 1 |
| 1.2 Neuronale Netzwerke im Kortex von Nagern | 2 |
| 1.2.1 Neonatale Netzwerkaktivität | 2 |
| 1.2.2 Identifikation glutamaterger und GABAerger Neurone | 4 |
| 1.2.3 Wirkung von GABA im neonatalen Kortex | 5 |
| 1.3 Dreidimensionale Zweiphotonenmikroskopie | 6 |
| 2 Zielstellung und Anforderungsspezifikationen | 11 |
| 2.1 Zielstellung | 11 |
| 2.2 Anforderungsspezifikationen..... | 11 |
| 2.2.1 Steuersoftware | 11 |
| 2.2.2 Datenakquisition | 12 |
| 2.2.3 Dreidimensionale Scans | 13 |
| 3 Material und Methoden | 16 |
| 3.1 Zweiphotonenmikroskop..... | 16 |
| 3.2 Verifikation der Datenakquisition..... | 19 |
| 3.3 Kalzium-Bildgebung..... | 21 |
| 3.4 Dreidimensionale Scanverfahren | 22 |
| 3.5 Optimierung dreidimensionaler Aktivitätsmessungen | 23 |
| 3.6 Bestimmung dreidimensionaler Laserfokuspositionen | 33 |
| 3.6.1 Artifizielles Referenzobjekt..... | 33 |

| | | |
|-------|---|-------|
| 3.6.2 | Laterale Reflexionsmessung..... | 33 |
| 3.6.3 | Axiale Lasertriangulation | 35 |
| 3.6.4 | Synchronität von Positionssignalen | 37 |
| 3.7 | Auswertung dreidimensionaler Scandaten..... | 38 |
| 3.7.1 | Voxel-basierte Auswertung..... | 38 |
| 3.7.2 | Einzelzell-basierte Auswertung..... | 40 |
| 3.8 | In vivo Messungen..... | 41 |
| 3.8.1 | Versuchstiere..... | 41 |
| 3.8.2 | Präparation..... | 42 |
| 3.8.3 | Anästhesie und Überwachung von Vitalparametern..... | 42 |
| 3.8.4 | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen..... | 42 |
| 3.8.5 | Visuelle Stimulation | 43 |
| 3.9 | Statistik..... | 44 |
| 4 | Ergebnisse..... | 45 |
| 4.1 | Genauigkeit der Laserfokusposition..... | 45 |
| 4.2 | Netzwerkaktivität im visuellen Kortex der Maus in vivo | 58 |
| 4.2.1 | Identifikation glutamaterger und GABAerger Neurone | 58 |
| 4.2.2 | Wirkung von GABA im neonatalen Kortex <i>in vivo</i> | 64 |
| 4.2.3 | Dreidimensionale Netzwerkaktivität im neonatalen Kortex..... | 82 |
| 5 | Diskussion | 99 |
| 5.1 | Genauigkeit der Laserfokusposition..... | 99 |
| 5.2 | Netzwerkaktivität im visuellen Kortex der Maus in vivo | 104 |
| 5.2.1 | <i>In vivo</i> Identifikation glutamaterger und GABAerger Neurone | 104 |
| 5.2.2 | Wirkung von GABA im neonatalen Kortex <i>in vivo</i> | 105 |
| 5.2.3 | Dreidimensionale Netzwerkaktivität im neonatalen Kortex..... | 109 |
| 6 | Zusammenfassung und Ausblick | 115 |
| | Literaturverzeichnis..... | XVI |
| | Anhang..... | XXVII |
| | A – Implementierung der Steuersoftware 2PLSMC | XXVII |

| | |
|---|--------|
| B – Dateiformate der Software 2PLSMC | XXXV |
| C – Testprogramm des DAQ-Moduls von 2PLSMC..... | XXXVII |
| D – Testprotokolle zur Verifikation der Datenakquisition..... | XLI |
| E – Inhaltsverzeichnis der beiliegenden DVD..... | L |
| Ehrenwörtliche Erklärung..... | LII |
| Thesen | LIII |

Abkürzungsverzeichnis

Generelle Abkürzungen

| | |
|--------|---|
| 2D | zweidimensional (zwei Raumdimensionen) |
| 3D | dreidimensional (drei Raumdimensionen) |
| 2PLSM | Zweiphotonenlaserscanningmikroskop |
| 2PLSMC | 2PLSM-Controller (Software) |
| ACs | Aktionsströme |
| ACSF | künstliche Zerebrospinalflüssigkeit (Engl.: <i>artificial cerebrospinal fluid</i>) |
| ADU | Analog-Digital-Umsetzer |
| AI | Analoger Eingang |
| AM | Acetoxymethyl |
| ANOVA | Varianzanalyse (Engl.: <i>analysis of variance</i>) |
| AO | Analoger Ausgang |
| APV | 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (selektiver NMDA-Rezeptor-Antagonist) |
| AVG | Mittelung (Engl.: <i>average</i>) |
| Baclo | Baclofen (spezifischer GABA _B -Rezeptor-Agonist) |
| BAPTA | Chelatbildner 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| BayK | Methyl 2,6-dimethyl-5-nitro-4-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate (BayK 8644, Kalziumkanal-Agonist) |
| CCD | CCD-Sensor (Engl.: <i>charge-coupled device</i>) |
| Cd | Cadmiumchlorid (CdCl ₂) |
| ch | Rand der Messkammer |
| CMOS | CMOS-Sensor (Engl.: <i>complementary metal-oxide semiconductor</i>) |
| CP | kortikale Platte |
| CPU | Prozessor (Engl.: <i>central processing unit</i>) |
| DAPI | Zellkernmarker 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DAQ | Datenerfassung |
| DAU | Digital-Analog-Umsetzer |
| DNQX | 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (non-NMDA-Rezeptor-Antagonist) |
| DSM | Algorithmus zur Berechnung äquidistanter Raumpunktabstände |
| EC | extrazelluläre Elektrode |
| EEG | Elektroenzephalografie |
| EMX1 | Gensequenz EMX1 |
| FFT | schnelle Fourier-Transformation (Engl.: <i>fast Fourier transform</i>) |
| FOV | Sichtfeld (Engl.: <i>field of view</i>) |
| GABA | γ-Aminobuttersäure |

| | |
|------------------|--|
| GAD67 | Glutamatdecarboxylase 67 |
| GCaMP | genetisch kodierter Kalziumindikator |
| GCaMP3 | GCaMP (Version 3) |
| GCaMP6f | GCaMP (Version 6f) |
| GFAP | saures Gliafaserprotein (Engl.: <i>glial fibrillary acidic protein</i>) |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein (Engl.: <i>green fluorescent protein</i>) |
| Glu | Glutamat |
| GUM | Leitfaden zum Ausdruck von Messunsicherheiten (Engl.: <i>guide to the expression of uncertainty in measurement</i>) |
| JPW1114 | rot fluoreszierender Farbstoff |
| L-655,708 | ethyl (13aS)-7-methoxy-9-oxo-11,12,13,13a-tetrahydro-9H-imidazo[1,5-a]pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-1-carboxylate (GABA _A -Rezeptor α 5-Untereinheit-spezifischer, inverser Agonist) |
| Laser | Licht-Verstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung (Engl.: <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>) |
| LED | Leuchtdiode (Engl.: <i>light-emitting diode</i>) |
| LFP | lokales Feldpotential (Engl.: <i>local field potential</i>) |
| LS | <i>loose-seal</i> |
| LSB | niedrigstwertige Bitposition (Engl.: <i>least significant bit</i>) |
| max | Detektionsgrenze |
| MOM | <i>Movable Objective Microscope</i> (Sutter Instrument) |
| Musc | Muscimol (GABA-Rezeptor-Agonist) |
| MZ | marginale Zone |
| μ C | Mikrokontroller |
| N ₂ O | Lachgas |
| NeuN | Neuron-spezifisches Kernprotein |
| NKCC1 | Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ -Kotransporter, Unterform 1 |
| OGB1 | synthetischer Kalziumindikator Oregon Green 488 BAPTA-1 AM |
| P | Überschreitungswahrscheinlichkeit |
| P [Zahl] | Alter eines Versuchstieres, angegeben in [postnatalen Tagen] |
| PMT | Photomultiplier |
| PSF | Punktbildfunktion (Engl.: <i>point spread function</i>) |
| RAM | Direktzugriffsspeicher (Engl.: <i>random-access memory</i>) |
| RMS | quadratischer Mittelwert (Engl.: <i>root mean square</i>) |
| ROI | Zielregion (Engl.: <i>region of interest</i>) |
| RTSI | Echtzeit-Systemintegration (Engl.: <i>real-time system integration</i>) |
| sag | <i>Sinus sagittalis superior</i> |

| | |
|-------|---|
| SD | Standardabweichung (Engl.: <i>standard deviation</i>) |
| SEM | Standardfehler des arithmetischen Mittels (Engl.: <i>standard error of the mean</i>) |
| Stim | extrazelluläre Stimulationselektrode |
| TIFF | Dateiformat für Bilddaten (Engl.: <i>tagged image file format</i>) |
| trans | <i>Sinus transversus</i> |
| TS | <i>tight-seal</i> |
| TTX | Tetrodotoxin (Blocker spannungsaktivierter Natriumkanäle) |
| UCP | obere kortikale Platte |
| VGAT | vesikulärer GABA-Transporter |
| z_1 | Fokusebene 1 |
| z_2 | Fokusebene 2 |

Variablen

| | |
|--------------------------|--|
| A_{XY} | Scanamplitude entlang der X- und Y-Achse |
| A_Z | Scanamplitude entlang der Z-Achse |
| C | elektrische Kapazität |
| d | Positions-Offset entlang der Z-Achse |
| d_j | absolute Positionsabweichung |
| $F_{\text{Hintergrund}}$ | absolute Fluoreszenzintensität (Hintergrund) |
| FI | Fluoreszenzindex |
| F_{Soma} | absolute Fluoreszenzintensität (Zellsoma) |
| $f(FI)$ | Gaußfunktion in Abhängigkeit von FI |
| f_{scan} | Scanfrequenz |
| f_{XY} | Schwingfrequenz (Anzahl der Spiralwindungen) |
| f_Z | Frequenz der Sinusschwingung entlang der Z-Achse |
| h | Höhe |
| i | variable Ganzzahl ($i \in \mathbb{N}$) |
| $I(z)$ | Intensität in Abhängigkeit von der Schichttiefe |
| I_0 | Ausgangsintensität |
| j | Platzhalter für eine der Raumachsen (X, Y oder Z) |
| k | variable Ganzzahl ($k \in [1 \dots 12000]$; $k \in \mathbb{N}$) |
| l_{Abtast} | Äquidistanter Abstand zwischen Scanpunkten |
| l_{Voxel} | Kantenlänge eines Voxels |
| L_{Gesamt} | Gesamtlänge einer Scantrajektorie |
| L_{kurz} | Länge des kurzen Objektivphantoms |
| L_{lang} | Länge des langen Objektivphantoms |

| | |
|------------------|--|
| L_{ohne} | Länge des „masselosen“ Objektivphantoms |
| $L_{regulär}$ | Länge des regulären Objektivphantoms |
| m | Anzahl der Scanebenen |
| n | Anzahl der Merkmalsausprägungen |
| n_{10} | Anzahl der Abtastwerte von 10 Scanperioden ($n_{10} \in \mathbb{N}$) |
| n_S | Anzahl geforderter Scanpunkte einer Spiraltrajektorie |
| n_{XY} | Anzahl vorhandener Scanpunkte aus einer XY-Vorgabe |
| N | beliebige, positive Ganzzahl ($N \in \mathbb{N}^*$) |
| N_A | Anzahl der Abtastwerte |
| N_{ROI} | Anzahl der gespeicherten ROIs |
| N_S | Anzahl der Spiralen |
| N_V | Anzahl überschwelliger Voxel |
| p_{Rj} | Referenzpositionssignal |
| \vec{P}_k | Raumkoordinaten des k-ten Punktes einer Hilfstrajektorie |
| Q_{HW} | Annäherung an die Grenzen der Hardware |
| r | Radius |
| \vec{r}_i | Raumposition eines Voxels |
| \vec{r}_S | momentaner Aktivitätsschwerpunkt |
| R | elektrischer Widerstand |
| R_m | elektrischer Widerstand der Zellmembran |
| s_{Cj} | Amplitudennormalisiertes Steuersignal |
| s_{Fj} | Amplitudennormalisiertes Rückkopplungssignal |
| s_{Rj} | Amplitudennormalisiertes Referenzsignal |
| SR | Abtastrate (Engl.: <i>sampling rate</i>) |
| SSE | Quadratsummenfehler (Engl.: <i>sum square error</i>) |
| t | Zeitvariable |
| $t_{Belichtung}$ | Belichtungszeit eines Scanpunkts |
| t_{Fj} | Zeitverzögerung eines Rückkopplungssignals |
| t_{Lag} | Zeitverzögerung (Engl.: <i>lag</i>) |
| t_{Res} | Zeitauflösung der Datenakquisition (1 μ s) |
| t_{Rj} | Zeitverzögerung eines Referenzsignals |
| t_{XY} | Zeitvariable des Signalverlaufes einer einzelnen öffnenden Spirale |
| t_Z | Zeitvariable des Signalverlaufes einer Spiraltrajektorie |
| T_{Scan} | Dauer einer Scanperiode |
| T_Z | Periodendauer der Sinusschwingung entlang der Z-Achse |
| u_{Cj} | Steuersignal |

| | |
|-------------------|--|
| \hat{u}_{Cz} | Amplitude eines Steuersignals (Z-Achse) |
| u_{Fj} | Rückkopplungssignal |
| u_{PMT} | Detektorsignal |
| V_{RMSx} | Effektivgeschwindigkeit (X-Achse) |
| V_{RMSy} | Effektivgeschwindigkeit (Y-Achse) |
| $x(t_{XY})$ | X-Komponente des Signalverlaufes einer einzelnen öffnenden Spirale |
| x_{Abtast} | X-Koordinate eines Scanpunktes einer Spiraltrajektorie |
| x_S | X-Koordinate eines Aktivitätsschwerpunktes |
| x_{Voxel} | X-Koordinate des Mittelpunktes eines Voxels |
| $y(t_{XY})$ | Y-Komponente des Signalverlaufes einer einzelnen öffnenden Spirale |
| y_{Abtast} | Y-Koordinate eines Scanpunktes einer Spiraltrajektorie |
| y_S | Y-Koordinate eines Aktivitätsschwerpunktes |
| y_{Voxel} | Y-Koordinate des Mittelpunktes eines Voxels |
| $z(i)$ | Z-Koordinate eines Scanpunktes einer Raumtrajektorie |
| $z(t_Z)$ | Z-Komponente des Signalverlaufes einer Spiraltrajektorie |
| z_{Abtast} | Z-Koordinate eines Scanpunktes einer Spiraltrajektorie |
| z_S | Z-Koordinate eines Aktivitätsschwerpunktes |
| z_{Voxel} | Z-Koordinate des Mittelpunktes eines Voxels |
| β_{0j} | Offset einer linearen Regressionsfunktion |
| β_{1j} | Anstieg einer linearen Regressionsfunktion |
| λ_D | Dämpfungskonstante |
| $\Delta F/F$ | Relative Intensitätsänderung bezogen auf eine Grundlinie |
| $\Delta z(i)$ | Punktabstände einer Raumtrajektorie entlang der Z-Achse |
| v_{Xeff} | maximale Effektivgeschwindigkeit (X-Achse) |
| v_{Yeff} | maximale Effektivgeschwindigkeit (Y-Achse) |
| ρ | Spearman's Rangkorrelationskoeffizient |
| $\varphi(t_{XY})$ | Phasenwinkel in Abhängigkeit von der Zeit |
| ω | Winkelgeschwindigkeit |

Einheiten

| | |
|----------|---|
| Pixel | quadratisches Bildelement |
| Sample | Abtastwert |
| Sample/s | Abtastrate (Anzahl der Abtastwerte pro Sekunde) |
| Voxel | kubisches Volumenelement |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 3.1: Fotografie des zusammengebauten Zweiphotonenmikroskops (2PLSM) . | 16 |
| Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des Zweiphotonenmikroskops (2PLSM)..... | 17 |
| Abbildung 3.3: Signalkette des Detektorsignals | 18 |
| Abbildung 3.4: Ansteuerung der Galvanometer..... | 19 |
| Abbildung 3.5: Ansteuerung des Piezo-Aktors | 19 |
| Abbildung 3.6: Ansteuerung der Pockels-Zelle | 19 |
| Abbildung 3.7: Beispiel eines Vergleiches zwischen den Ergebnissen der Vergleichsfunktion und den bekannten Störstellen..... | 20 |
| Abbildung 3.8: Vergleich von Z-Stapel (Rasterscan) und Spiralscan (Linien-scan) | 23 |
| Abbildung 3.9: Berechnung äquidistanter Scanpunkte | 26 |
| Abbildung 3.10: Kumulative Verteilungen der Punktabstände zweier spiralförmiger Raumtrajektorien | 27 |
| Abbildung 3.11: Grad der Annäherung der Spiralscans an die Grenzen der Hardware des Mikroskops | 28 |
| Abbildung 3.12: Volumenabdeckung als Qualitätsmaß von Spiralscans | 29 |
| Abbildung 3.13: Einfluss der Kantenlänge zu erfassender Voxel im untersuchten Volumen auf Volumenabdeckung und Anzahl der Scanpunkte pro gescanntem Voxel..... | 30 |
| Abbildung 3.14: Abhängigkeit der Scanqualität, bestehend aus Volumenabdeckung und der Anzahl an Scanpunkten pro Voxel, von drei Scanparametern | 31 |
| Abbildung 3.15: Grad der Annäherung der Spiralscans an die Grenzen der Hardware für reduzierte Scanvolumina | 31 |
| Abbildung 3.16: Scanqualität bei reduziertem Scanvolumen..... | 32 |
| Abbildung 3.17: Abhängigkeit der Scanqualität von drei Scanparametern bei reduziertem Scanvolumen | 32 |
| Abbildung 3.18: Verfahren zur Messung der lateralen Positioniergenauigkeit | 34 |
| Abbildung 3.19: Verfahren zur Messung der axialen Positioniergenauigkeit | 36 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 4.1: Längenänderung der Schnittgeraden aus Scantrajektorie mit fluoreszierenden <i>beads</i> als Maß dreidimensionaler Scaninstabilität..... | 46 |
| Abbildung 4.2: Hardwarebedingte Zeitverzögerungen gemessener Positionssignale gegenüber den Steuersignalen | 47 |
| Abbildung 4.3: Kalibrierung der Rückkopplungssignale..... | 48 |
| Abbildung 4.4: Die Positioniergenauigkeit der X-Achse ist kleiner als $\pm 2,5 \mu\text{m}$ | 49 |
| Abbildung 4.5: Die Positioniergenauigkeit der Y-Achse ist kleiner als $\pm 2,5 \mu\text{m}$ | 51 |
| Abbildung 4.6: Die axiale Positioniergenauigkeit ist abhängig von Scanparametern und Objektiveigenschaften..... | 53 |
| Abbildung 4.7: Maximale Absolutabweichungen von vier Objektiv-Phantomen bei einer sinusförmigen Bewegung entlang der Z-Achse mit einer Amplitude von $200 \mu\text{m}$ und einer Frequenz von 20 Hz | 54 |
| Abbildung 4.8: Elektromagnetische Wechselwirkungen zwischen Galvanometern und Piezo-Aktor | 55 |
| Abbildung 4.9: Positionsabweichungen entlang der Z-Achse in Abhängigkeit von der Referenzposition und der Scanamplitude A_z (reguläres Objektiv-Phantom) | 56 |
| Abbildung 4.10: Stabilität der rückgekoppelten Positionssignale..... | 57 |
| Abbildung 4.11: tdTomato-Fluoreszenz der $\text{Emx1}^{\text{IREScre}};\text{Ai14}$ Mauslinie | 58 |
| Abbildung 4.12: Unterscheidung tdTomato-negativer und tdTomato-positiver Zellen <i>in vivo</i> | 59 |
| Abbildung 4.13: Klassifikation tdTomato-negativer und tdTomato-positiver Zellen <i>in vivo</i> mittels Fluoreszenzindex FI | 60 |
| Abbildung 4.14: tdTomato-negative Zellen sind GABAerge Interneurone..... | 62 |
| Abbildung 4.15: Spontane und visuell evozierte Kalziumtransienten in GABAergen und glutamatergen Schicht II / III Neuronen..... | 63 |
| Abbildung 4.16: GABAerge Depolarisation in unreifen Neuronen <i>in vivo</i> | 65 |
| Abbildung 4.17: GABA-induzierte, somatische Kalziumtransienten in Gegenwart von BayK 8644 <i>in vivo</i> | 68 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 4.18: GABA induziert somatische Kalziumtransienten in Zellen der kortikalen Platte im postnatalen Alter von 3 – 4 Tagen <i>in vitro</i> | 71 |
| Abbildung 4.19: Mangel an somatischen Kalziumtransienten und Aktionspotentialen nach GABAerger, afferenter Stimulation <i>in vivo</i> | 74 |
| Abbildung 4.20: Eine lokale GABA-Applikation innerhalb der kortikalen Platte löst keine somatischen Kalziumtransienten im postnatalen Alter von 3 – 4 Tagen <i>in vivo</i> aus | 74 |
| Abbildung 4.21: Spontane Aktivitätsereignisse im neonatalen, okzipitalen Neokortex <i>in vivo</i> | 76 |
| Abbildung 4.22: Grundlegende Eigenschaften spontaner Aktivitätsereignisse im neonatalen, okzipitalen Neokortex <i>in vivo</i> | 78 |
| Abbildung 4.23: Einfluss GABAerger Transmission auf neokortikale Netzwerkaktivität <i>in vivo</i> | 81 |
| Abbildung 4.24: Messung neonataler Netzwerkaktivität mittels Voxelscan..... | 83 |
| Abbildung 4.25: Zeitliche Charakteristik neonataler Netzwerkaktivität im dreidimensionalen Raum..... | 85 |
| Abbildung 4.26: Räumliche Charakteristik neonataler Netzwerkaktivität im dreidimensionalen Raum | 87 |
| Abbildung 4.27: Raumzeitliche Charakteristik neonataler Netzwerkaktivität im dreidimensionalen Raum | 89 |
| Abbildung 4.28: Dichte neonataler Aktivitätsereignisse von vier Experimenten | 91 |
| Abbildung 4.29: Messung neonataler Netzwerkaktivität mittels Einzelzellscan..... | 93 |
| Abbildung 4.30: Zeitliche Charakteristik neonataler Netzwerkaktivität im dreidimensionalen Raum mit Einzelzellauflösung | 96 |
| Abbildung 4.31: Dreidimensionale Rekonstruktion von 52 neonatalen Aktivitätsereignissen aus vier Experimenten | 98 |
| Abbildung 4.32: Dichte zellulär aufgelöster Aktivitätsereignisse | 98 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|---------|
| Tabelle 1: Dateiformat *.ini (Z-Stapel Scanvorschrift)..... | XXXV |
| Tabelle 2: Dateiformat *.scp (Spiralscan Scanvorschrift)..... | XXXV |
| Tabelle 3: Dateiformat *.tdp (Akquisitionsdaten) | XXXVI |
| Tabelle 4: Signalparameter einer Akquisition | XXXVII |
| Tabelle 5: Dateiformat *.et | XXXVIII |
| Tabelle 6: Protokoll zur Überprüfung der Benutzereingaben..... | XLI |
| Tabelle 7: Einstellungen zum Test der Vergleichsfunktion | XLIII |
| Tabelle 8: Benutzereingaben zur Überprüfung der digitalen Speicherung und Zuordnung von Spannungsverläufen | XLIV |
| Tabelle 9: Fehlerbudgetierung der analogen Ausgänge (NI PCI-6110) | XLVI |
| Tabelle 10: Fehlerbudgetierung der analogen Ausgänge (NI PCI-6711) | XLVII |
| Tabelle 11: Fehlerbudgetierung der analogen Eingänge (NI PCI-6110, Spannungsbereich: ± 5 V)..... | XLVII |
| Tabelle 12: Fehlerbudgetierung der analogen Eingänge (NI PCI-6110, Spannungsbereich: ± 10 V)..... | XLVIII |

1 Einleitung

1.1 Motivation

Mit der Entdeckung eines bewegungs- und orientierungsspezifischen Antwortverhaltens kortikaler Neurone des primären visuellen Kortex von Hauskatzen bereiteten Hubel und Wiesel 1959 den Weg für unser heutiges Verständnis von der Wahrnehmung visueller Reize im Gehirn [1]. Eine funktionelle Weiterleitung und Verarbeitung dieser Reize setzt eine physiologische Entwicklung der Großhirnrinde (Kortex) voraus. Wird diese Entwicklung gestört, kann dies zu Fehlfunktionen der Reizwahrnehmung im adulten Organismus führen. Ein fundamentales Konzept der Neurobiologie besagt, dass die Aktivität neuronaler Netzwerke selbst maßgeblich an dem Ausreifungsprozess des Kortex beteiligt ist [2-4]. EEG-Ableitungen (Elektroenzephalografie) von frühgeborenen Menschen und neonatalen Ratten belegen, dass sich diese frühe Form der spontanen Netzwerkaktivität grundlegend von der im adulten Gehirn unterscheidet [2,4,5]. Auf zellulärer Ebene ist die neonatale Netzwerkaktivität bisher nur unvollständig charakterisiert. Dieser Umstand beruht wesentlich auf der experimentellen Schwierigkeit simultane Ableitungen neuronaler Aktivität von mehreren hundert Zellen im lebenden Organismus durchzuführen. Eine dazu verfügbare Technik ist die sogenannte Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie, die vorrangig in Tiermodellen wie Mäusen und Ratten angewendet wird. Obgleich neuronale Netzwerke alle drei Raumdimensionen beanspruchen, beschränken sich funktionelle Untersuchungen an Nagern während der ersten postnatalen Woche bisher auf zwei Raumdimensionen [6]. In den vergangenen acht Jahren erfuhr die dreidimensionale Zweiphotonenmikroskopie eine stetige Weiterentwicklung, jedoch erfordert die Ableitung neuronaler Netzwerkaktivität in Form von raumzeitlich koordinierten somatischen Kalziumtransienten (transiente intrazelluläre Erhöhungen der Konzentration an freiem Kalzium) *in vivo* stets eine Einschränkung entweder in der räumlichen oder der zeitlichen Auflösung der Messwerterfassung [7-17]. Um die Auswertung der Aktivität einzelner Zellen zu ermöglichen, muss die räumliche Auflösung im subzellulären Bereich liegen. Die klassische Zweiphotonenmikroskopie basiert auf einem Abtastverfahren mittels eines Lasers, dem sogenannten Scanning, das für einen bestimmten Zeitpunkt nur einen einzigen Messwert einer definierten Raumposition erfassen kann. Aktuelle Methoden erzielen jedoch keine ausreichend hohe zeitliche Auflösung, um ein vollständiges Volumen mit subzellulärer, räumlicher Auflösung abzutasten. Dies hat typischerweise zur Folge, dass die Bestimmung der genauen Zellpositionen, die eine räumlich hohe Auflösung erfordert, von den Aktivitätsmessungen, die eine hohe zeitliche Auflösung benötigen, separiert werden muss. Können die Positions- und Aktivitätsmessungen nicht simultan durchgeführt werden, müssen die

Informationen beider Messungen, den sogenannten Scans, *post hoc* zusammengesetzt werden. Dies setzt wiederum eine hohe Positioniergenauigkeit des Mikroskops in allen drei Raumdimensionen während der Anwendung zwei verschiedener Scanmodi voraus. Die Laserfokusposition eines Zweiphotonenmikroskops (2PLSM) bestimmt maßgeblich den Ort gemessener Fluoreszenzintensitäten zu einem bestimmten Zeitpunkt. Bisher existiert kein standardisiertes Verfahren zur Validierung der Positioniergenauigkeit der Laserfokusposition.

1.2 Neuronale Netzwerke im Kortex von Nagern

1.2.1 Neonatale Netzwerkaktivität

Wenngleich die kortikale Entwicklung von Säugetieren nicht vollständig verstanden ist, konnten in der letzten Dekade elektrophysiologische Studien an frühgeborenen Menschen und neonatalen Nagern viele Parallelen in der frühen Netzwerkaktivität aufzeigen [2,4,5,18]. EEG-Ableitungen von Frühgeborenen weisen im Vergleich zu dem EEG Erwachsener ungewöhnlich niederfrequente und gleichzeitig diskontinuierliche Oszillationen im Delta-Band (0,1 – 4 Hz) auf, die ebenfalls im somatosensorischen [18-20] und visuellen [4,21,22] Kortex von Ratten ableitbar sind. Aufgrund ihrer spindelförmigen Einhüllenden in extrazellulären Ableitungen wird diese Aktivität, die aus der Superposition von Potentialänderungen lokaler Zellverbände von ~200 – 400 µm Durchmesser resultiert [20], *spindle bursts* genannt [18]. Befunde aus dem primären somatosensorischen Kortex der Ratte belegen, dass die Generierung von *spindle bursts* auf glutamaterger synaptischer Transmission beruht, da eine pharmakologische Blockierung glutamaterger Synapsen die Aktivität vollständig unterdrückt [19]. Des Weiteren scheinen GABAerge (γ -Aminobuttersäure, GABA) Synapsen nicht direkt an der Generierung von *spindle bursts* beteiligt zu sein, sie spielen aber eine Rolle bei der Begrenzung deren räumlicher Ausbreitung [19].

Zusätzlich wurde die frühe spontane Netzwerkaktivität durch optische Ableitungen in kalziumbildgebenden Experimenten charakterisiert. Dazu wurden ein Lichtleiter in den Kortex neugeborener Mäuse implantiert und optische Summensignale von Ensembles bestehend aus tausenden Zellen, die mit einem fluoreszierenden Kalziumindikator markiert waren, in Form von sogenannten Kalziumwellen abgeleitet [23]. Ein Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration kann dabei als Indikator für die Generierung von somatischen Aktionspotentialen angesehen werden [24]. Adelsberger und Kollegen schlussfolgerten aus der Größe des markierten Volumens, dass die Kalziumwellen eine Koaktivierung von tausenden Zellen bewirken und von fast minutenlangen Perioden ohne jegliche Aktivität gefolgt werden [23]. Diese massive Koaktivierung konnte im somatosensorischen Kortex der Maus mittels zweidimensionaler Zweiphotonen-Fluoreszenz-

messungen mit Einzelzellauflösung bestätigt werden [6]. Betrachtungen des Entwicklungsprofils der Aktivität ergaben, dass der Anteil aktiver Zellen je Kalziumwelle in den ersten drei postnatalen Wochen stetig abnimmt, während die mittlere Frequenz der Aktivierung individueller Zellen ansteigt [6]. Untersuchungen im visuellen Kortex, beginnend kurz vor Augenöffnung (Augenöffnung bei Mäusen: 12 – 15 Tage nach der Geburt) bis hin zur adulten Maus, weisen auf ein gleiches Profil der Entwicklung hin [25]. In dieser Studie konnten keine Kalziumsignale vor dem achten postnatalen Tag nachgewiesen werden, da die Tiere im anästhesierten Zustand untersucht wurden und konventionelle Atemgas-Anästhetika die frühen Kalziumwellen vollständig unterdrücken [23,26]. Unter Verwendung genetisch kodierter und synthetischer Kalziumindikatoren gelang es Ackman und Kollegen parallele Epifluoreszenzmessungen im visuellen Kortex und den *Colliculi superiores* durchzuführen [26]. Die Forschergruppe beobachtete die Weiterleitung sogenannter retinaler Wellen (Engl.: *retinal waves*) ausgehend von terminalen Projektionen der Retina in den *Colliculus superior*. Genannte Wellen stellen massive Koaktivierungen retinaler Ganglienzellen dar, die durch spontane, nicht-sensorische Aktivierung von Amakrinzellen ausgelöst werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass diese Aktivität von der Retina selbst generiert wird, da Mäuse in der ersten postnatalen Woche aufgrund der Abwesenheit funktioneller Verbindungen von Photorezeptoren zu retinalen Ganglienzellen noch blind sind [4,27]. In der Studie von Ackman und Kollegen traten Kalziumwellen im visuellen Kortex koinzident zu Kalziumwellen im ipsilateralen *Colliculus superior* auf, was andeutet, dass die retinalen Wellen sowohl direkt von den Retinae an die *Colliculus superiores* als auch über das *Corpus geniculatum laterale* an den visuellen Kortex weitergeleitet werden [26]. Zumindest für den *Colliculus superior* ist bekannt, dass die neonatale Aktivität der Retina für die Ausbildung retinotoper Karten essentiell ist [28-30]. Wie zuvor für die Retina beschrieben [27], breiten sich die Kalziumwellen sowohl entlang der horizontalen Ebene des *Colliculus superior*, als auch entlang der horizontalen Ebene des Kortex aus [26]. Ob es dabei auch zu einer dynamischen Ausbreitung entlang der laminaren Schichten des Kortex auf zellulärer Ebene kommt, ist bisher unbekannt. Seit geraumer Zeit wird darüber spekuliert, ob die Kalziumwellen des Kortex aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften, insbesondere deren Dauer und Wiederholffrequenz, ein Korrelat der *spindle bursts* darstellen [2]. Elektrophysiologische Parallelableitungen von der Retina und dem visuellen Kortex der Ratte belegen, dass *spindle bursts* im visuellen Kortex mit spontanen retinalen Wellen der Retina zeitlich korrelieren [21]. In dieser Studie konnte mit Hilfe von vier parallelen Elektroden je Hemisphäre im Abstand von 1 mm keine Ausbreitung der Aktivität beobachtet werden. Eine Schwierigkeit des verwendeten experimentellen Ansatzes ist die limitierte räumliche Auflösung und die Beschränkung auf nur eine erfasste, potentielle

Ausbreitungsrichtung im dreidimensionalen Raum. In einem zweidimensionalen Raster angeordnete Elektrodenarrays mit multiplen elektrischen Kontakten (dreidimensionale Multielektrodenarrays) sind in der Lage, Potentialänderungen lokaler Zellverbände an definierten Raumpositionen zu detektieren [31,32]. Für eine dreidimensionale Erfassung neuronaler Netzwerkaktivität mit Aktivitätsinformationen einzelner Zellen sind jedoch Untersuchungen mit Hilfe der räumlich hochauflösenden Zweiphotonenmikroskopie erforderlich. Die genauen Mechanismen der neonatalen Netzwerkaktivität sind bisher unbekannt. Eine zelltypspezifische Charakterisierung dieser Aktivität kann dabei helfen, die zellulären Mechanismen und deren Auswirkungen auf die kortikale Entwicklung besser zu verstehen.

1.2.2 Identifikation glutamaterger und GABAerger Neurone

Nahezu alle neokortikalen Nervenzellen können entsprechend ihrer Neurotransmitterproduktion in glutamaterg und GABAerg unterteilt werden. Zwei methodisch grundlegende Ansätze ermöglichen eine Diskriminierung der genannten Zelltypen: *post hoc* und *in situ*. Unter Verwendung einer geeigneten Immunhistochemie kann die Identität eines Großteiles der untersuchten Zellen *post hoc* (*ex vivo*) bestimmt werden [8,33]. Eine wesentliche Schwierigkeit dieser Methode liegt in der Re-Identifikation *in vivo* untersuchter Zellen nach der Fixierung des Gewebes *ex vivo* (fixationsbedingte Volumenreduktion). Die Unterscheidung glutamaterger und GABAerger Zellen *in situ* erfordert entweder die Kenntnis über elektrophysiologisch relevante Zellparameter oder eine spezifische Markierung der Zellen mittels Fluoreszenzfarbstoffen. Für die Identifikation ganzer Zellpopulationen bietet sich letzteres Verfahren unter Verwendung zellspezifischer, genetisch kodierter Fluoreszenzproteine an. Tamamaki und Kollegen generierten eine *Knockin*-Mauslinie, welche ein grün fluoreszierendes Protein (Engl.: *enhanced green fluorescent protein*) unter dem Promotor der Glutamatdecarboxylase 67 (GAD67) exprimiert [34]. Während dieser Ansatz die Visualisierung GABAerger Neurone ermöglicht, wird die Synthese von GABA durch die Deletion des GAD67-Gens physiologisch relevant reduziert [34,35]. Untersuchungen dieser Mauslinie werden typischerweise an heterozygoten Mäusen durchgeführt, da die Synthese in homozygoten Tieren so stark beeinträchtigt wird, dass die Tiere nicht überlebensfähig sind. Alternativ kann die Expression eines gelben Proteins (*Venus*) unter dem Promotor des vesikulären GABA-Transporters (VGAT) eine Reduktion der GABA-Synthese umgehen [36,37]. In beiden Mauslinien bleiben glutamaterge Neurone vollständig ungefärbt, sodass weitere Fluoreszenzfarbstoffe zur Visualisierung dieser Zellpopulation notwendig wären. Eine *in vivo* Identifikation von glutamatergen und GABAergen Neuronen mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs konnte bisher nicht durchgeführt werden.

1.2.3 Wirkung von GABA im neonatalen Kortex

GABA ist der wichtigste inhibitorische (hemmende) Neurotransmitter im adulten Gehirn *in vivo* [38,39] und entfaltet seine Wirkungen über zwei Typen von Rezeptoren: GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren. GABA_A-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle die hauptsächlich für Chlorid- und in geringem Maße für Bikarbonationen permeabel sind [40]. GABA_B-Rezeptoren sind metabotrope, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und befinden sich sowohl in prä- als auch postsynaptischen Zellmembranen [40]. Die hemmende Wirkung von GABA kann zum einen durch Hyperpolarisation des Membranpotentials und zum anderen durch eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit hervorgerufen werden. Seit langem ist bekannt, dass die Wirkung von GABA eine deutliche Veränderung während der neuronalen Entwicklung durchläuft [41]. In verschiedenen Teilen des Nervensystems von verschiedenen Tierspezies konnte nachgewiesen werden, dass GABA unreife Neurone depolarisiert [42]. Dies unterstützt die Generierung von Aktionspotentialen und somit auch die Generierung von Netzwerkaktivitätsmustern [41,43-47]. Diese Daten führten zu der Ansicht, dass GABA als einer der maßgeblichen exzitatorischen (erregenden) Neurotransmitter im sich entwickelnden Gehirn wirkt und sowohl essentiell für Wachstum und Differenzierung von Neuronen als auch für die Ausreifung synaptischer Verbindungen ist [48-50].

Die entwicklungsbedingte Verschiebung einer depolarisierenden hin zu einer hyperpolarisierenden Wirkung von GABA wird auf eine Abnahme der intrazellulären Chlorid-Konzentration während der frühen Entwicklung zurückgeführt [51,52]. Das Konzept der depolarisierenden Wirkung wurde in den letzten Jahren allerdings mehrfach in Frage gestellt [53-55]. Der Fokus der Kritik lag dabei auf pathophysiologischen Effekten bei der Verwendung von akuten Hirnschnitten, auf denen die meisten der bisherigen Befunde beruhen. Zum einen sollte das Fehlen eines geeigneten Energiesubstrates in der künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF, Engl.: *artificial cerebrospinal fluid*), die der Erhaltung eines adäquaten Milieus für das Hirngewebe während *in vitro* Experimenten dient, zu einer artifizialen Erhöhung der intrazellulären Chlorid-Konzentration führen [53,54]. Zum anderen sollte die Schnittpräparation selbst durch die traumatische Verletzung des Hirngewebes zu einer Akkumulation von Chlorid in den geschädigten Zellen führen [55]. Wenngleich diese Kritik nicht durch weitere Befunde bestätigt werden konnte [56-60], fehlt immer noch ein stützender Beweis der depolarisierenden Wirkung von GABA für das intakte Gehirn von Säugetieren.

1.3 Dreidimensionale Zweiphotonenmikroskopie

Die Zweiphotonenmikroskopie beruht auf der simultanen Absorption zweier Photonen von fluoreszierenden Molekülen (Zweiphotonenabsorption), die innerhalb eines Zeitintervalls von $\sim 10^{-16}$ s stattfindet [61]. In der konventionellen Einphotonenabsorption wird für die Anregung eines Fluorophors in einen höheren Singulettzustand eine definierte Mindestenergie des absorbierten Photons benötigt. Da die Energie eines Photons umgekehrt proportional zu dessen Wellenlänge ist, werden für einen Zweiphotonenabsorptionsprozess zwei Photonen von einer (theoretisch) doppelten Wellenlänge und damit halber Energie benötigt. Dies hat zur Folge, dass für die Anregung herkömmlicher, im visuellen Bereich des elektromagnetischen Spektrums emittierende Fluoreszenzfarbstoffe eine Anregungswellenlänge im energieärmeren, infraroten Bereich verwendet werden kann. Infrarotes Licht erlaubt eine höhere Eindringtiefe in das zu untersuchende Gewebe, da sich Streueffekte umgekehrt proportional zur vierten Potenz der Wellenlänge verhalten. Um die Wahrscheinlichkeit einer Absorption zweier Photonen in weniger als $\sim 10^{-16}$ s für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen relevant zu erhöhen, wird eine hohe Anzahl an Photonen und damit eine hohe Energiedichte der Anregungsquelle benötigt. Es werden daher gepulste Infrarotlaser verwendet, die eine entsprechend hohe Energiedichte während der Pulse, aber im Mittel eine vergleichbar niedrige Energiedichte aufweisen. Fokussiert man den Laserstrahl durch ein Objektiv auf eine definierte Raumposition, ist die Wahrscheinlichkeit einer Zweiphotonenanregung lediglich in einem fokalen Volumen von weniger als einem Femtoliter ausreichend hoch [61]. Die Emission von Photonen beschränkt sich daher hauptsächlich auf die Fokusposition des Lasers. Dies hat zur Folge, dass in der Zweiphotonenmikroskopie typischerweise Photomultiplier (PMTs) eingesetzt werden, die Photonen aus dem gesamten Sichtfeld (FOV, Engl.: *field of view*) des Objektivs detektieren (das Anregungslicht wird typischerweise über einen wellenlängenselektiven, dichroitischen Spiegel herausgefiltert). Der Signal-Rausch-Abstand (Signal: fokal emittierte Photonen, Rauschen: alle anderen Photonen) ist damit gegenüber der Einphotonenmikroskopie entscheidend erhöht, da selbst von dem untersuchten Gewebe gestreute, fokal emittierte Photonen vom Detektor erfasst werden können. Diese Photonen wären in der konfokalen Einphotonenmikroskopie nicht erfassbar, da Lochblenden die Detektion von Photonen aus nicht fokalen Bereichen verhindern [62]. Darüber hinaus führt die fokale Begrenzung der Zweiphotonenanregung zu einer Reduktion der Phototoxizität und der Photobleichung des Gewebes außerhalb des Fokus [63].

Das intakte Gehirn stellt ein denkbar ungünstiges Untersuchungsobjekt für die Fluoreszenzmikroskopie dar, da es Licht hochgradig streut und absorbiert [64]. Dank der bereits aufgeführten Vorteile der Zweiphotonenmikroskopie ist die Erfassung von

Fluoreszenzintensitäten in drei Raumdimensionen mit einer Positionsauflösung im Mikrometerbereich *in vivo* dennoch realisierbar. In Kombination mit ionenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Zweiphotonenmikroskopie eine zeitlich niedrig aufgelöste Messung neuronaler Netzwerkaktivität. Weit verbreitet ist die Verwendung von Kalziumindikatoren, da die Konzentrationsänderung des freien intrazellulären Kalziums in Folge von Aktionspotentialen verglichen zu anderen Ionen sehr hoch ist. Mechanistisch öffnen sich spannungsgesteuerte Kalziumkanäle der Zellmembran aufgrund einer Depolarisation, sodass ein Kalziumeinstrom in die Zelle stattfindet. Werden Indikatoren verwendet, die unter Bindung von Kalzium eine höhere Fluoreszenz-Quantenausbeute aufweisen, kann die Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration durch eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung detektiert werden [65]. Synthetische veresterte Kalziumindikatoren (z.B.: OGB1-AM) werden typischerweise mittels einer Glaspipette in den Kortex injiziert (Bolusbeladung, [66]). Die Bindung der Fluoreszenzmoleküle an Acetoxymethyl (AM), ermöglicht ein passives Eindringen in Zellsomata. Eine anschließende enzymatische Abspaltung von AM ermöglicht die Bindung von intrazellulärem Kalzium an OGB1-Moleküle und verhindert ein Austreten aus der Zelle, sodass ein hoher Kontrast zwischen ungefärbten Extrazellulärraum und tausenden angefärbten Zellsomata im Injektionsvolumen entsteht [66]. Genetisch kodierte Indikatoren (z.B.: GCaMP3) können darüber hinaus unabhängig von einer injektionsbedingt inhomogenen Verteilung des Indikators zelltypspezifisch exprimiert werden, welches neben der Zelllokalisierung und der Aktivitätsmessung eine Identifikation des Zelltyps (z.B.: GABAerg oder glutamaterg) ermöglicht [64].

Die Konstruktion dreidimensionaler 2PLSM basiert (bis auf wenige Ausnahmen [14,17,67]) auf Einpunktmessungen, d.h. zu einem bestimmten Zeitpunkt kann immer nur die Fluoreszenz eines fokalen Volumens bestimmt werden [7-13,15,16,68-70]. Werden diese Messungen an definierten Positionen einer horizontalen Ebene sequentiell durchgeführt, ermöglicht dies die Erfassung eines Fluoreszenzbildes. Die räumliche Auflösung des Bildes ist dabei neben der optischen Auflösung des Mikroskops von den Abständen zwischen den angefahrenen Positionen und deren Anzahl abhängig. Fluoreszenzintensitäten eines vollständigen Volumens werden typischerweise aus Fluoreszenzbildern verschiedener Tiefen zusammengesetzt (Z-Stapel). Dieses Vorgehen erlaubt eine strukturelle Darstellung von Fluoreszenzkontrasten eines Volumens. Die raumzeitliche Auflösung des Volumens wird dabei maßgeblich von der Geschwindigkeit und der Genauigkeit der Positioniereinrichtungen des 2PLSMs begrenzt. Messungen, die eine Bestimmung aller Zellpositionen in dem abgetasteten Volumen erlauben, besitzen hardwarebedingt eine zu geringe Abtastrate (<0,5 Hz) für die Erfassung neuronaler Aktivität. Da lediglich somatische Fluoreszenzänderungen zur Bestimmung der

Aktivitätszustände von Zellen benötigt werden, sind alle nichtsomatischen Einpunktmessungen verzichtbar. Sind die zu erfassenden Positionen der Somata im dreidimensionalen Raum bekannt, kann auf Kosten räumlicher Auflösung die Abtastfrequenz erhöht werden.

Im Jahr 2007 wurde von Göbel und Kollegen erstmalig die Messung dreidimensionaler Netzwerkaktivität *in vivo* mithilfe der Zweiphotonenmikroskopie an juvenilen Ratten durchgeführt [7]. Die Gruppe verwendete ein Positioniersystem bestehend aus zwei galvanometrischen Spiegeln zur Positionierung des fluoreszenzanregenden Laserfokus in der lateralen Ebene (X- und Y-Achse) und einen Piezo-Aktor zur Bewegung des Objektivs und damit des Fokus entlang der Z-Achse. Dies ermöglichte die Applikation eines zeitlich hochauflösenden Scanmodus (Periodendauer: 10^{-1} s) zur Erfassung von Fluoreszenzänderungen entlang einer spiralförmigen Trajektorie innerhalb eines kubischen Zielvolumens von 200 – 300 μm Kantenlänge. Mittels eines zweiten bildbasierten Scanmodus, dem sogenannten Z-Stapel, erfolgten die Identifizierung von Zellen innerhalb des Zielvolumens und deren anschließende positionsabhängige Zuweisung zu den zuvor detektierten Fluoreszenzänderungen.

Da zeitlich hochauflösende Volumenscans eine schnelle und positionsgenaue Fokussierung entlang der Z-Achse voraussetzen, wurden neben Piezo-Aktoren [7,12,69] räumliche Modulatoren für Licht (Engl.: *spatial light modulators*) [11,14,17], galvanometrisch-axial bewegte Spiegel [70], raumzeitliche Laserstrahl-Multiplexer [9] und elektrisch fokussierbare Linsen [10] verwendet. Darüber hinaus bietet ein System bestehend aus vier akustooptischen Modulatoren die Möglichkeit, eine trägheitsfreie, dreidimensionale Positionierung des fokalen Volumens vorzunehmen [13,15,16,68]. Letzteres Verfahren ermöglicht eine zeitlich hochauflösende, diskontinuierliche Abtastung benutzerdefinierter Raumpositionen, welches den Leistungsumfang mechanischer Positioniersysteme (z.B.: Galvanometer und Piezo-Aktoren) übersteigt. Die mehrfache serielle Beugung des Laserstrahls wird wiederum von zusätzlichen chromatischen und raumzeitlichen Dispersionseffekten begleitet, die für die Fluoreszenzmessungen korrigiert werden müssen [16]. Weiterhin ist es nicht möglich Bewegungsartefakte des Zielvolumens (Atmung, Herzschlag und unwillkürliche Muskelanspannungen des Versuchstieres sowie Schwellung des Zielgewebes) während der Applikation einer diskontinuierlichen Abtastung zu erfassen [15,16]. Eine Kombination aus bildgebender und diskontinuierlicher Abtastung, kann letzteren Nachteil auf Kosten zeitlicher Auflösung ausgleichen [15]. Ein weiteres Verfahren kombiniert die zweidimensionale Positionierung akustooptischer Modulatoren mit einer axialen Fokussierung mittels einer elektromagnetisch verformbaren Linse, die hinter dem Objektiv in den Strahlengang des Lasers platziert wird [10]. Axiale Positionsänderungen können dabei innerhalb von 15 ms

durchgeführt werden, welches einen Geschwindigkeitsvorteil gegenüber einer Piezo-Aktor-basierten Fokussierung darstellt. Durch Verformung einer flexiblen, sphärischen Membran mittels Spannungsänderungen einer Schwingspule wird nach dieser Methode nicht nur der Laserfokus innerhalb des Zielvolumens moduliert, sondern zusätzlich die Größe der maximalen Fokusebene in Abhängigkeit von der Tiefe verringert [10]. Eine quasi-simultane Fluoreszenzmessung in verschiedenen Fokusebenen wurde alternativ durch die Aufteilung eines gepulsten Laserstrahls in vier um jeweils 3 ns verzögerte Strahlen realisiert [9]. Ist die Abklingzeit eines verwendeten Fluoreszenzindikators kürzer als die Periodendauer der Laserpulse (~12 ns) ermöglicht dieses Verfahren die Detektion von vier verschiedenen Fluoreszenzsignalen innerhalb dieses Zeitintervalls [64]. Diesen Umstand nutzend konnte ein Volumen bestehend aus vier quadratischen Ebenen (512×512 Pixel, $200 \times 200 \mu\text{m}^2$) mit einem axialen Abstand von jeweils $30 \mu\text{m}$ mit einer Frequenz von 60 Hz abgetastet werden [9]. In diesem Fall können Aktivitäts- und Positionsinformationen der gescannten Zellen direkt bestimmt werden, ohne einen weiteren Scanmodus zu verwenden. Von Nachteil ist, dass nur ein Bruchteil der im Volumen enthaltenen Zellen simultan beobachtet werden kann und für eine Änderung der Anzahl und Anordnung der Bildebenen der optische Strahlengang des Mikroskops verändert werden muss. *Spatial light modulators* können alternativ für dreidimensionale Fluoreszenzmessungen und zur Erfassung neuronaler Netzwerkaktivität verwendet werden [11,14,17] – entweder für eine tatsächliche Mehrpunktmessung mittels CCD-Kamera und holographischer Maskierung des Laserstrahls [17] oder für Einzelmessungen mittels PMT zur Erfassung von Summen- [14] und Einzelsignalen definierter Raumpositionen [11]. Während im letzteren Verfahren die Lichtmodulation nur zur axialen Fokussierung verschiedener Bildebenen verwendet wurde, wird der Laserstrahl im zuvor genannten Verfahren gemäß der Anzahl an vorgegebenen Raumpositionen mit einem Flüssigkristall-Lichtmodulator in Teilstrahlen aufgeteilt und mit einem Mikrospiegelaktor raumzeitlich kodiert. Die Aktivität der Raumpositionen wird dann aus den detektierten Summenfluoreszenzsignalen über die Zeit rekonstruiert. Phasenlichtmodulatoren wurden bisher nur einmalig für Echtzeit-Simultanmessungen eingesetzt [17]. Eine Schwierigkeit liegt dabei in der mangelnden axialen Ortsauflösung. Eine weitere Messmethode ermöglicht eine aberrationsfreie, axiale Fokussierung mittels eines galvanometrisch verschiebbaren Spiegels, der die Phase des durch eine zweite Objektivlinse fokussierten Laserstrahls moduliert [70].

Für eine korrekte und reproduzierbare Positionsbestimmung von Fluoreszenzsignalen in einem dreidimensionalen Raum muss unabhängig davon, ob das Zielvolumen mittels einer kontinuierlichen Trajektorie oder diskontinuierlich abgetastet wird, die Position des fokalen Volumens zu jedem Zeitpunkt der Messung bekannt sein.

Bisher wurden zu diesem Zweck Rückkopplungssignale von Galvanometern und Piezo-Aktoren simultan zum Fluoreszenzsignal aufgezeichnet [7,12,70,71]. In *closed-loop* Scanner-Galvanometern werden die Rotorposition und damit die Spiegelposition häufig photoelektrisch detektiert. Hierzu dienen eine LED, ein am Rotor montiertes Flügelrad und einer oder mehrere Photodetektoren. Die Position ist linear abhängig von der detektierten Lichtintensität, welche durch das Flügelrad zwischen LED und Detektoren moduliert wird [72]. In *closed-loop* Piezo-Aktoren werden neben Dehnmessstreifen vorwiegend kontaktfreie kapazitive Positionsdetektoren verwendet [73]. Die genannten Methoden zur Positionsdetektion lassen nur einen indirekten Rückschluss auf die tatsächliche Raumposition des fokalen Volumens zu, da diese nur die Positionierung einzelner Positioniereinrichtungen widerspiegeln und nicht die Positionierung des Fokus im dreidimensionalen Raum. Die rückgelesenen Signale der Detektoren müssen daher durch einen externen Standard validiert werden. Weit verbreitet ist die Verwendung von in Agar eingebetteten fluoreszierenden Polystyrol-Sphären (Engl.: *beads*), die als (nicht standardisiertes) dreidimensionales Referenzobjekt dienen. In einer Studie von Katona und Kollegen wurde alternativ ein homogen fluoreszierender Kunststoffobjektträger entlang der Scantrajektorie ausgeblencht [69]. Dies ermöglichte *post hoc* die Bestimmung maximaler Positionsabweichungen innerhalb eines definierten Scanintervalls. Die Messung absoluter Abweichungen zu einem bestimmten Zeitpunkt ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Um dies zu untersuchen, muss ein neues Verfahren entwickelt werden.

2 Zielstellung und Anforderungsspezifikationen

2.1 Zielstellung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Mangel eines positionsvalidierten Messverfahrens zur kontinuierlichen Erfassung der Netzwerkaktivität von mehreren hundert Zellen in Form von raumzeitlich koordinierten somatischen Kalziumtransienten mit Einzelzellauflösung *in vivo* sowie der unvollständige Wissensstand über die spontane Netzwerkaktivität im primären visuellen Kortex der Maus in der ersten postnatalen Woche. Der erste Punkt untergliedert sich in folgende Teilaspekte:

- I. Entwicklung eines Verfahrens zur Quantifizierung der Positioniergenauigkeit der Laserfokusposition eines Galvanometer-Piezo-basierten Zweiphotonenmikroskops (Kapitel 3.6)
- II. Hard- und softwaretechnische Realisierung dreidimensionaler Aktivitätsmessungen mit einer validierten, subzellulären Positioniergenauigkeit (Kapitel 4.1)
- III. Optimierung dreidimensionaler Scanverfahren zur Erfassung neonataler Netzwerkaktivität der Maus in der ersten postnatalen Woche (Kapitel 3.5)

Daran anschließend soll die neonatale Netzwerkaktivität im primären visuellen Kortex der Maus *in vivo* unter folgenden Gesichtspunkten charakterisiert werden:

- IV. Wie ist die Aktivität in den oberen kortikalen Schichten räumlich organisiert und welche Rolle spielen dabei einzelne Zellen (Kapitel 4.2.3)?
- V. Inwiefern ist eine *in vivo* Identifikation GABAerger und glutamaterger Neurone mit einem Fluoreszenzfarbstoff möglich (Kapitel 4.2.1)?
- VI. Wirkt GABA als depolarisierender Neurotransmitter und welche Rolle spielt die GABAerge Transmission bei der Generierung spontaner Netzwerkaktivität (4.2.2)?

2.2 Anforderungsspezifikationen

2.2.1 Steuersoftware

Zur Realisierung dreidimensionaler Aktivitätsmessungen wird ein Programm benötigt, welches die Einzelkomponenten eines Galvanometer und Piezo-Aktor basierten 2PLSM (Aufbau siehe Kapitel 3.1) nach Vorgaben des Benutzers ansteuern kann. Konkret bestehen folgende Anforderungen an die Software:

- Erstellen und Speichern benutzerdefinierter dreidimensionaler Scanvorschriften (inklusive aller Signalparameter und -verläufe)
- Scanvorschau zur Navigation und Vorbereitung von dreidimensionalen Aktivitätsmessungen
- Ausführung benutzerdefinierter dreidimensionaler Scanvorschriften (Steuer-
spannungsverläufe der X-, Y- und Z-Achse, sowie einer elektronisch steuerbaren
Einrichtung zur Modulation der Anregungslaserintensität) bei simultaner
Aufzeichnung von digitalisierten Spannungsverläufen (ein Intensitäts- und drei
Positionssignale bzw. zwei Intensitäts- und zwei Positionssignale)
- Anpassung der Anregungslaserintensität in Abhängigkeit von der aktuellen
Steuerspannung der Z-Achse (Kompensation von Streuung entlang der
Schichttiefe einer Zielstruktur)
- Option zum Setzen virtueller Landmarken während der Scanvorschau (manuelle
Korrektur von Bewegungsartefakten der Zielstruktur)
- Verlustfreies Speichern aller analog-digital umgesetzten Rohdatenwerte in einer
Datei mit einer Größe von bis zu 5 GB
- Kompatibilität zu vorhandenen Hardwareressourcen, insbesondere einem
Computer (Betriebssystem: Windows XP SP3 32-bit; RAM: 3 GB; CPU: Intel Core
i5-650, 3,2 GHz)

Die Auswertung der gespeicherten Daten soll unabhängig von der Ansteuerung erfolgen. Es muss eine Schnittstelle implementiert sein, die dem Benutzer Zugriff auf die Rohdaten ermöglicht (Exportmodul).

2.2.2 Datenakquisition

1. Benutzereingaben

Die Wertebereiche für die vom Benutzer eingegebenen Parameter müssen von der Software geprüft werden. Wird der Wertebereich eines Parameters überschritten, soll der eingegebene Wert an den nächstmöglichen Wert im Wertebereich angepasst werden. Weiterhin muss vor dem Start der Messung eine Fehlermeldung auf dem Bildschirm angezeigt werden, wenn die Eingabekombination nicht realisierbar ist. Nach Bestätigung der Fehlermeldung muss die Möglichkeit eingeräumt werden die Eingaben zu korrigieren.

2. Vergleich erfasster und generierter Signalverläufe

Für die Vergleichbarkeit erfasster und generierter Signale ist ein Vergleichsmodul gefordert, das eine exakte Differenzbildung von allen Spannungswerten zweier Signalverläufe durchführen kann (≥ 15 Stellen Genauigkeit). Dabei muss sichergestellt werden, dass die Reihenfolge der Abtastwerte beider Signalverläufe eingehalten werden,

sodass die Differenz jeweils aus dem korrekten Wertepaar gebildet wird. Durch einen zusätzlichen Parameter soll der Benutzer die Möglichkeit erhalten, die Signalverläufe um eine definierte Anzahl von Abtastwerten gegeneinander zu verschieben, um eine potentielle Phasenverschiebung zwischen zwei Signalen zu detektieren. Durch Vorgabe eines Grenzwertes für den Betrag der Signaldifferenz wird die Übereinstimmung der Signalverläufe ermittelt. Grenzwertüberschreitungen sind dem Benutzer anzuzeigen.

3. Digitale Speicherung und Zuordnung von Spannungsverläufen

Abgebildete und erfasste Spannungsverläufe müssen in einem definierten Dateiformat, gemäß ihrer Abarbeitungsreihenfolge, in jeweils einer Datei gespeichert werden. Die Reihenfolge ist definiert aus einer Folge von benutzerdefinierten Spannungsverläufen, die nacheinander erzeugt werden sollen.

4. Abbildung von Spannungsverläufen

Die vom Benutzer vorgegebenen digitalen Spannungsverläufe müssen mittels eines Digital-Analog-Umsetzers (DAU) mit einer hinreichenden absoluten Genauigkeit umgesetzt werden. Jede einzelne Spannung darf in einem Spannungsbereich von ± 10 V einen absoluten Fehler von ± 10 mV nicht überschreiten.

5. Erfassung von Spannungsverläufen

Zu erfassende Spannungsverläufe müssen mittels eines Analog-Digital-Umsetzers (ADU) hinreichend genau digitalisiert werden. Jede der digitalisierten Spannungen darf in einem Spannungsbereich von ± 10 V einen absoluten Fehler von ± 20 mV nicht überschreiten. Eine Überschreitung von ± 10 mV in einem Spannungsbereich von ± 5 V ist nicht zulässig.

6. Simultane Abbildung und Erfassung von Spannungsverläufen

Die simultane Abbildung und Erfassung von Spannungsverläufen muss gewährleistet werden. Simultan bedeutet in diesem Fall, dass die Spannungen zum selben Zeitpunkt (Toleranz: ± 1 Sample) abgebildet bzw. erfasst werden. Die Abtastraten müssen für alle parallelen Lese- und Schreibvorgänge identisch sein.

2.2.3 Dreidimensionale Scans

Benutzerdefinierte Scanvorschriften stellen die Grundlage zur Ansteuerung des 2PLSMs dar. Zur Erfassung neuronaler Netzwerkaktivität in einem definierten Volumen müssen folgende Punkte einbezogen werden:

- Größe des Zielvolumens
- Scanverfahren (Raster- oder Linienscan)
- Volumen- bzw. Zellabdeckung
- Periodendauer eines Scandurchlaufes (zeitliche Auflösung)

- Abstand der Scanpunkte (räumliche Auflösung)
- Anzahl der Scanpunkte

Nach Stand der Technik ist es nicht möglich, Netzwerkaktivität an jedem Punkt eines Volumens simultan mittels der Zweiphotonenmikroskopie mit einer ausreichenden räumlichen Auflösung zu erfassen. Einen 2007 von Göbel und Kollegen entwickelten Kompromiss zwischen räumlicher und zeitlicher Auflösung stellt der Spiralscan dar [7]. Dieser gehört zur Klasse der Linienscans, wobei mehrere sich öffnende und schließende archimedische Spiralen (XY-Ebene) kontinuierlich entlang der Z-Achse aneinandergereiht werden. Um nach einer vollständigen Periode zum Startpunkt der beschriebenen Raumtrajektorie zurückzugelangen und um eine hohe Volumenabdeckung zu erzielen, wird am definierten Maximum der Z-Ausdehnung ein 180° Phasensprung der Spiralen sowie eine Umkehrung der Bewegung entlang der Z-Achse verwendet. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten Göbel und Kollegen neuronale Netzwerkaktivität von mehreren hundert Zellen im Neokortex von lebenden juvenilen Ratten ableiten [7]. Kampa und Kollegen ist es unter Verwendung der gleichen Methode ebenfalls gelungen, die Aktivität kleiner neuronaler Netzwerke (70–150 Neurone) im visuellen Kortex adulter Mäuse bei gleichzeitiger visueller Stimulation zu beobachten [12]. Da ein Spiralscan die morphologischen Informationen des Zielvolumens nicht erfasst, muss ein zusätzlicher Rasterscan (Z-Stapel) mit einer hohen räumlichen, aber für die Erfassung von Kalziumtransienten (transiente intrazelluläre Erhöhung der Konzentration an freiem Kalzium) zu niedriger zeitlicher Auflösung, verwendet werden. Liegen die Fluoreszenzdaten beider Verfahren für ein bestimmtes Volumen vor, ist es möglich die gemessene Aktivität aus dem Linienscan einer Raumposition bzw. Zelle im Rasterscan zuzuweisen ([7], Kapitel 3.4 und Abbildung 3.8). Unter Verwendung des Spiralscans leiten sich zwei weitere Scanparameter ab, die in Abhängigkeit vom Zielvolumen angepasst werden müssen: 1) Anzahl der Scanebenen (Paare von öffnenden und schließenden archimedischen Spiralen) und 2) Anzahl der Spiralwindungen je archimedischer Spirale. Einen alternativen Linienscan stellt der frei vom Benutzer definierte Scan dar. In diesem Verfahren werden während des Experimentes Zellpositionen in einem Rasterscan identifiziert. Eine resultierende Raumtrajektorie zur Erfassung der Aktivität der Zellen wird anhand der ermittelten Positionen errechnet. In Abhängigkeit von der Applikation kann dies zu einer Erhöhung erfasster Zellen führen. In der Studie von Göbel und Kollegen gab es jedoch keinen Unterschied zu dem Spiralscan (Ableitung der Aktivität von mehr als 90% identifizierter Zellen eines Volumens) [7], sodass für die geplanten Messungen der Spiralscan verwendet und optimiert werden soll. Konkret gilt es, die mittlere Anzahl an Abtastpunkten pro Zielstruktur (Zelle) bei einer gleichzeitig hohen Anzahl an erfassten Zielstrukturen zu maximieren.

Die vorzunehmende Optimierung ist dabei zwingend von der gegebenen Applikation abhängig und wird von weiteren Parametern begrenzt:

- Größe und Homogenität des durch den Kalziumindikator angefärbten Volumens
- Größe, Verteilung und Dichte der Zielstrukturen
- Optische Eigenschaften des zu untersuchenden Gewebes (Streuung, Reflexion)
- Belichtungszeit und -intensität in Abhängigkeit von der Tiefe im Gewebe (Phototoxizität *versus* Unterbelichtung)
- Grenzen der Mikroskop-Hardware (Optik, Galvanometer, Piezo-Aktor, Detektoren)

Im Rahmen dieser Arbeit sind die genannten Parameter auf die Messung neuronaler Netzwerkaktivität im neonatalen, visuellen Kortex zu adaptieren:

- Maximierung des Scanvolumens zur Erfassung der Aktivität von 10^2 bis 10^3 Zellen
- Einzelzellauflösung (räumliche Auflösung)
- Mindestens 0,1 s zeitliche Auflösung zur Erfassung von Kalziumtransienten (Größenordnung des Signals: 10^0 s)

3 Material und Methoden

3.1 Zweiphotonenmikroskop

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zweiphotonenmikroskop (2PLSM) zusammgebaut (Abbildung 3.1), das die zur Erfassung neuronaler Netzwerkaktivität benötigten dreidimensionalen Scanverfahren, die in Kapitel 3.4 beschrieben werden, unterstützt. Die Kernkomponente besteht dabei aus dem *Movable Objective Microscope* (MOM, Sutter Instrument, Abbildung 3.1C). Zwei Galvanometer (Abbildung 3.1D) ermöglichen eine zweidimensionale Abtastung einer Zielstruktur. Zur Fokussierung des Objektivs (Abbildung 3.1H) entlang der dritten Raumdimension wird ein Piezo-Aktor verwendet (Abbildung 3.1G).

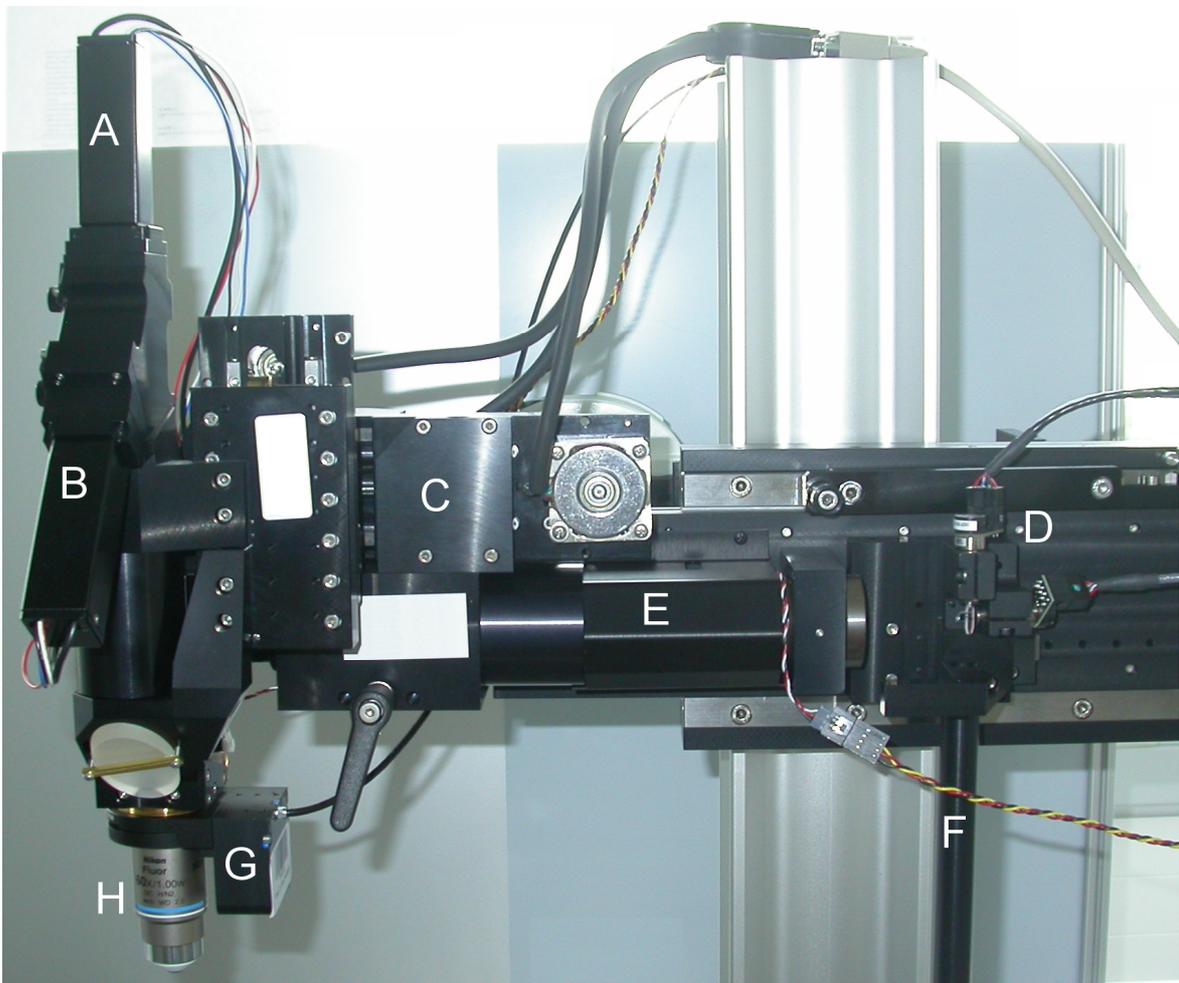


Abbildung 3.1: Fotografie des zusammgebauten Zweiphotonenmikroskops (2PLSM). A,B – Photomultiplier (PMT), C – *Movable Objective Microscope* (MOM), D – Galvanometer, E – Strahlengang nach den galvanometrischen Spiegeln, F – Eingang des Strahlengangs vor den galvanometrischen Spiegeln, bzw. nach der Anregungsquelle, G – Piezo-Aktor, H – Objektiv. Elektronische Steuereinheiten und die Einkoppelung der Anregungsquelle sind nicht abgebildet. Teile des Gehäuses wurden für diese Darstellung entfernt.

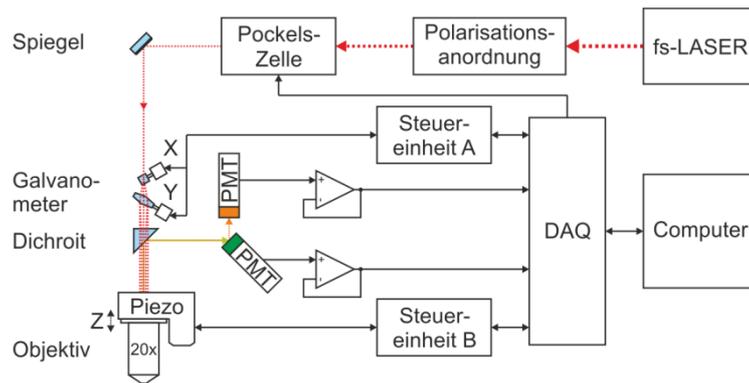


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des Zweiphotonenmikroskops (2PLSM). DAQ – zentrale Datenerfassungseinheit zur Synchronisation aller zu erfassenden Signale (Intensitäts- und rückgelesene Positionssignale) und anzusteuern den Komponenten des Mikroskops (Steuereinheiten A und B, sowie die Pockels-Zelle). fs-LASER – Femtosekundenlaser. PMT – Photomultiplier. Piezo – Piezo-Aktor.

Abbildung 3.2 zeigt eine schematische Darstellung des Galvanometer-Piezo-basierten Zweiphotonenmikroskops. Der gepulste Femtosekundenlaser (Chameleon Ultra II, Coherent) diente als Anregungsquelle der Zweiphotonenabsorption in Molekülen der zu untersuchenden Zielstrukturen (z.B.: Zellen beladen mit einem Kalziumindikator, Kapitel 3.3). Die Anregungswellenlänge kann auf Kosten maximaler Laserleistung in einem Bereich von 680 nm bis 1080 nm eingestellt werden. Da die Ausgangsleistung (maximal 4 W mittlere Leistung bei 800 nm) laserintern nicht zusätzlich reduziert werden kann, dienen eine nachgeschaltete Polarisationsanordnung ($\lambda/2$ -Plättchen 10RP52-2, Glan-Taylor-Prisma 10GL08, Newport) und eine Pockels-Zelle (M350-80LA, Verstärker Model 302RM, Conoptics) der Einstellung einer zu erzielenden Anregungsintensität ($\sim 10^{-2}$ bis 10^{-1} W). Die Pockels-Zelle kann in einer Größenordnung von einer Mikrosekunde angesteuert werden (Bandbreite: 250 kHz, Anstiegs- / Abfallzeit: 1 μ s). Eine Anpassung der Intensität innerhalb eines Scanvorgangs mit Belichtungszeiten von $\sim 10^{-6}$ bis 10^{-5} s wird somit ermöglicht. Der intensitätsangepasste Laserstrahl wird mittels zweier galvanometrischer Spiegel entlang der X- und Y-Achse abgelenkt (Länge \times Breite: 6 \times 5 mm und 12 \times 5 mm), welches eine Abtastung verschiedener Positionen innerhalb einer Zielebene ermöglicht. Zur schnellen Fokussierung entlang der Z-Achse dient ein Piezo-Aktor, (P-725.4CD PIFOC, Physik Instrumente) an dem das Objektiv (XLUMPLFLN 20XW, Olympus) befestigt ist. Der Aktor erweitert die Positionierung des Anregungsvolumens um die dritte Raumdimension. Steuereinheit A (CT 67321H – 1, Cambridge Technology) und B (PI E-665.CR, Physik Instrumente) liefern jeweils für jede der angesteuerten Achsen ein Rückkopplungssignal, mit dessen Hilfe die aktuelle Position des fokalen Anregungsvolumens indirekt bestimmt werden kann. Das von dem angeregten Volumen emittierte Licht wird über einen dichroitischen Spiegel (670 DCXXR, Chroma Technology) auf zwei Photomultiplier (H10770PA-40, Hamamatsu, Filter vor

PMT1: 535/50 nm oder <680 nm wenn eine spektrale Unterscheidung nicht erforderlich ist, Filter vor PMT2: 610/75 nm) projiziert, die wiederum ein elektrisches Signal proportional zur detektierten Lichtintensität an die Datenerfassungseinheit weiterleiten. Die Detektions- und Steuersignale können mittels eines Computers empfangen bzw. gesendet werden.



Abbildung 3.3: Signalkette des Detektorsignals. PMT – Photomultiplier. C7319 – Vorverstärker des vom PMT detektierten Intensitätssignals. "AI0 (PMT)" – verstärkter Signaleingang in den geschirmten Anschlussblock NI BNC-2110. Das Analogsignal wird im Multifunktions-Datenerfassungsmodul NI PCI-6110 analog-digital gewandelt.

In Abbildung 3.3 ist die Signalkette zwischen PMT und dem Computer dargestellt. Das Detektionssignal wird über einen Vorverstärker (C7319, Cambridge Technology) und einen geschirmten Anschlussblock mit BNC-Anschlüssen (NI PCI-2110, National Instruments) an ein Multifunktions-Datenerfassungsmodul (NI PCI-6110, National Instruments) übermittelt und dort analog-digital umgesetzt (Spannungsbereich: ± 5 V bzw. ± 10 V, Auflösung: 12 bit). Abbildung 3.4 zeigt den Signalweg zwischen den Galvanometern und dem Computer. Die Übermittlung der beiden Steuerspannungen (X-Position, Y-Position) zur Änderung der jeweiligen Spiegelposition erfolgt ebenfalls über die oben genannte Datenerfassungskarte (Digital-Analog-Umsetzung, Spannungsbereich: ± 10 V, Auflösung: 16 bit). Die rückgekoppelten Positionssignale werden von der Steuereinheit A wieder zurück an den Computer gesendet. Die Ansteuerung des Piezo-Aktors (Abbildung 3.5) erfolgt über ein Hochgeschwindigkeits-Analogausgangsmodul (NI PCI-6711, Spannungsbereich: ± 10 V, Auflösung: 12 bit, National Instruments) und einen 68-Pin-Anschlussblock mit SCC-Erweiterungssteckplätzen (NI SCC-68, National Instruments). Das rückgelesene Positionssignal (Z-Feedback) wird über die zuvor beschriebene Karte (NI PCI-6110) an den Computer übermittelt. Alternativ kann ein zweites Detektorsignal über diesen Kanal (AI1) eingelesen werden. Die Steuerspannung der Pockels-Zelle belegt einen weiteren analogen Ausgang (AO1, Abbildung 3.6). Zur Synchronisation von Akquisitionsprozessen besteht eine RTSI-Verbindung (Engl.: *real-time system integration*) zwischen beiden Datenerfassungskarten (Doppelpfeil zwischen NI PCI-6110 und NI PCI-6711 in Abbildung 3.3 bis 3.6). Die Anschlussblöcke sind an die Karten über jeweils ein Verbindungskabel (SH68-68-EP, National Instruments) angeschlossen.

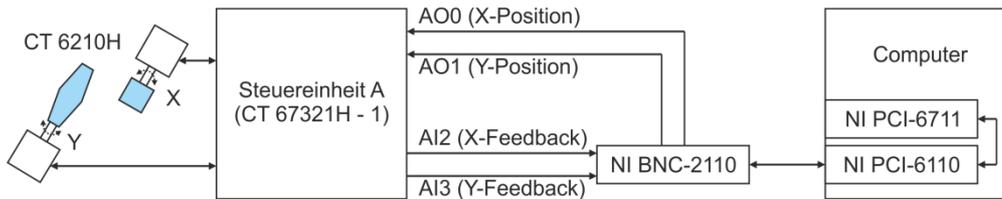


Abbildung 3.4: Ansteuerung der Galvanometer. Das Multifunktions-Datenerfassungsmodul NI PCI-6110 wandelt Steuerspannungen "AO0 (X-Position)" und "AO1 (Y-Position)" zur Positionierung der Galvanometer X und Y digital-analog und stellt diese über den geschirmten Anschlussblock NI BNC-2110 der Steuereinheit A bereit. Die rückgelesenen Positionssignale "AI2 (X-Feedback)" und "AI3 (Y-Feedback)" werden auf umgekehrten Weg analog-digital gewandelt.

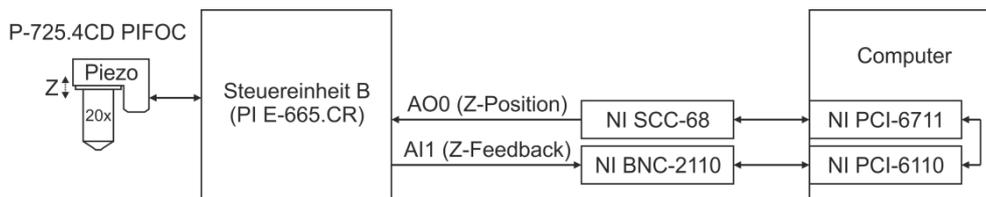


Abbildung 3.5: Ansteuerung des Piezo-Aktors. Das Hochgeschwindigkeits-Analogausgangsmodule NI PCI-6711 wandelt die Steuerspannung "AO0 (Z-Position)" digital-analog und stellt diese über den 68-Pin-Anschlussblock NI SCC-68 der Steuereinheit B bereit. Die rückgelesene Position des Piezo-Aktors "AI1 (Z-Feedback)" wird über den geschirmten Anschlussblock NI BNC-2110 an das Multifunktions-Datenerfassungsmodul NI PCI-6110 übertragen und in letzterem analog-digital gewandelt.



Abbildung 3.6: Ansteuerung der Pockels-Zelle. Das Hochgeschwindigkeits-Analogausgangsmodule NI PCI-6711 wandelt die Steuerspannung "AO1 (Intensität)" digital-analog und stellt diese über den 68-Pin-Anschlussblock NI SCC-68 dem Verstärker der Pockels-Zelle bereit. Der Verstärker erzeugt in Abhängigkeit von der Steuerspannung eine Hochspannung, die eine Modulation der Anregungsintensität in der Pockels-Zelle ermöglicht.

3.2 Verifikation der Datenakquisition

Im Rahmen der Verifikation der Datenakquisition des 2PLSM wurde ein Testprogramm implementiert (Anhang C), das die Kernkomponente DAQ-Modul des 2PLSMC (Anhang A) nach den Vorgaben aus Kapitel 2.2.2 überprüft (Testprotokolle und -kriterien sind in Anhang D hinterlegt):

1. Prüfung von Benutzereingaben

Der Test wurde von drei unabhängigen Benutzern durchgeführt und konnte als bestanden eingestuft werden.

2. Vergleich erfasster und generierter Signalverläufe

Beispielhaft sei das Ergebnis eines Vergleiches gezeigt (Abbildung 3.7). Bis auf eine unterschwellige „Störstelle“ (<1 mV) wurden in dem dargestellten Durchlauf alle „Störstellen“ von dem implementierten Vergleichsmodul detektiert. Nach Durchführung der gesamten Testprozedur wurde das erwartete Verhalten in sechs Iterationen erfüllt, sodass der Test als bestanden eingestuft wurde.

3. Digitale Speicherung und Zuordnung von Spannungsverläufen

Nach Durchführung der Testprozedur wurde das erwartete Verhalten in 14 Iterationen erfüllt, sodass der Test als bestanden eingestuft wurde.

4. Abbildung von Spannungsverläufen

Mittels der Software NI MAX 5.0 (National Instruments) konnte die Kalibrierung beider Akquisitionskarten NI PCI-6110 und NI PCI-6711 (Kapitel 3.1) erfolgreich durchgeführt werden. Gemäß der Fehlerbudgetierung in Tabelle 9 und Tabelle 10 (siehe Anhang D) wurden die Anforderungen an den maximalen Fehler der abgebildeten Spannungen eingehalten.

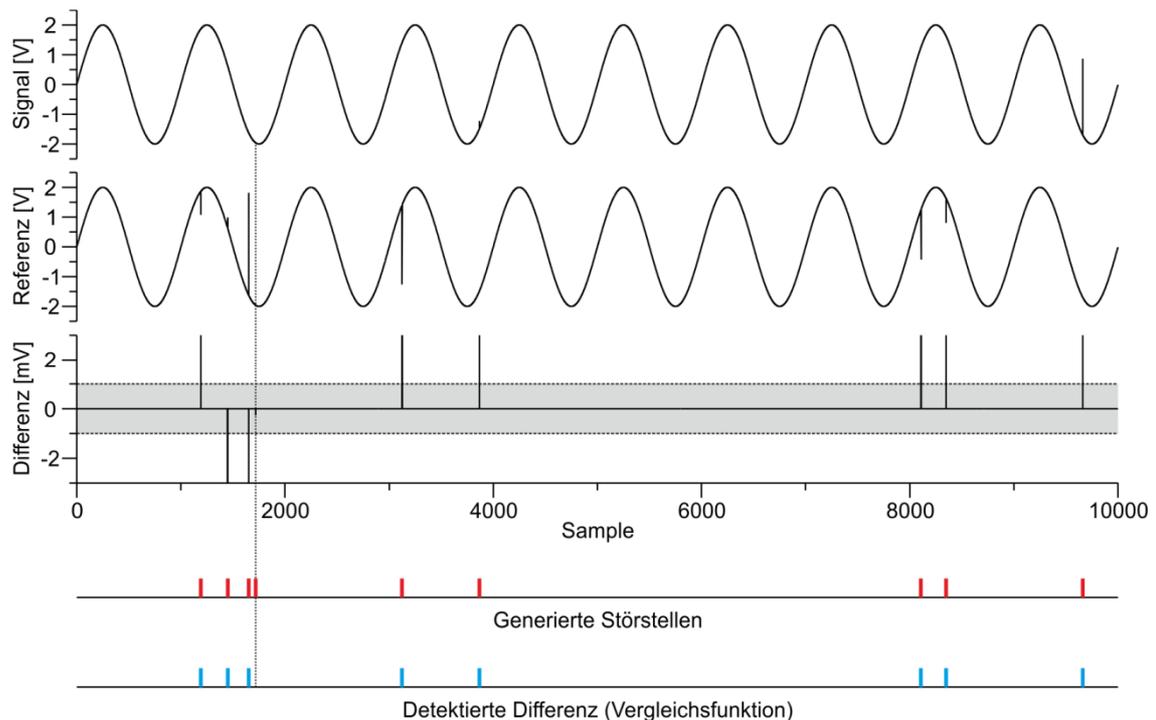


Abbildung 3.7: Beispiel eines Vergleiches zwischen den Ergebnissen der Vergleichsfunktion und den bekannten Störstellen. Differenzen ("Referenz" subtrahiert von "Signal") größer ± 3 mV sind in der Darstellung abgeschnitten. Unterschwellige Störstellen (Bereich: ± 1 mV, schattierte Fläche in "Differenz") werden von der Vergleichsfunktion ignoriert [richtig negative Ergebnisse – rote Markierung in "Generierte Störstellen" und keine blaue Markierung in "Detektierte Differenz (Vergleichsfunktion)"]. Im vorliegenden Beispiel existieren eine unterschwellige Störstelle (isolierte rote Markierung) und acht detektierte Differenzen (simultane rote und blaue Markierungen).

5. Erfassung von Spannungsverläufen

Mittels der Software NI MAX 5.0 konnte die Kalibrierung der Akquisitionskarte NI PCI-6110 erfolgreich durchgeführt werden (entspricht der Kalibrierung unter Punkt 4). Gemäß der Fehlerbudgetierung in Tabelle 11 und Tabelle 12 (siehe Anhang D) wurden die Anforderungen an den maximalen Fehler gemessener Spannungen eingehalten.

6. Simultane Abbildung und Erfassung von Spannungsverläufen

Nach Durchführung der Testprozedur konnten in jeweils zwei der vier Iterationen eine stochastische Abweichung von 25 mV im Vergleich Kanal 0 gegen Kanal 1 (AI0 gegen AI1) festgestellt werden (je 1 von 10^6 Samples). In allen anderen Fällen lagen die Abweichungen innerhalb der vorgegebenen 20 mV-Schranke (22 von 24 Vergleichen). Da die Auswirkungen unter realem Einsatz des 2PLSM als vernachlässigbar einzuschätzen sind (die Flankensteilheit der Mikroskopkomponenten ist mindestens eine Größenordnung kleiner), konnte der Test als bestanden eingestuft werden. Die Synchronität aller verwendeten analogen Ein- und Ausgänge war gegeben.

Zusammenfassend konnte mittels eines Testprogramms und sechs bestandener Testprozeduren das DAQ-Modul der Ansteuerung des 2PLSM und damit die Datenakquisition des Systems verifiziert werden.

3.3 Kalzium-Bildgebung

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung relativer Änderungen freier intrazellulärer Kalziumkonzentrationen ($\Delta F/F_0$, relative Fluoreszenzänderung eines Kalziumindikators in Relation zu einer Ausgangsintensität F_0), welche eine indirekte Folge zellulärer Aktivität darstellen, wurden sowohl synthetische als auch genetisch kodierte Kalziumindikatoren verwendet. Mittels Bolusbeladung des synthetischen Indikators Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB1, 310 – 500 μM) erfolgte eine Zelltyp-unspezifische Färbung von Zellsomata in Zielvolumina von rund 0,5 mm Durchmesser [66]. Die Injektion wurde mittels Druck (1 – 2 min bei 40 – 50 kPa) aus einer im Zentrum des Volumens platzierten Glaspipette (3 – 7 M Ω) durchgeführt. Der genetisch kodierte Kalziumindikator GCaMP3 [74] wurde unter dem EMX1-Promotor exprimiert (Kapitel 3.8.1), wodurch spezifisch glutamaterge Neurone und Gliazellen angefärbt wurden. Alle Weitfeldfluoreszenzmessungen wurden an einem Einphotonen-Epifluoreszenzmikroskop (Kapitel 3.8.4) unter Verwendung des GCaMP3-Indikators durchgeführt. Am 2PLSM wurden Fluoreszenz-anregungswellenlängen von 800 – 830 nm für OGB1 bzw. 920 nm für GCaMP3 verwendet.

3.4 Dreidimensionale Scanverfahren

Zwei Scanverfahren der Zweiphotonenlaserscanningmikroskopie sind im Rahmen dieser Arbeit relevant: Z-Stapel (Rasterscan) und Spiralscan (Linien-scan). Der Z-Stapel besteht aus drei synchronisierten Komponenten: einer hochfrequenten Dreiecksfunktion entlang der X-Achse, einer niederfrequenten Sägezahnfunktion entlang der Y-Achse und einer noch niederfrequenteren Treppenfunktion entlang der Z-Achse (Abbildung 3.8). Die Amplituden der Funktionen definieren die Größe des gescannten Volumens, wobei die Ausdehnung der XY-Ebene zusätzlich von der Optik des Mikroskops abhängig ist. Das Verhältnis der Frequenzen der X- und Y-Funktion und die Anzahl der Scanpunkte pro Ebene definieren die laterale Auflösung des Scans. Die Anzahl der Treppenstufen definiert die axiale Auflösung. Man beachte, dass jede zweite gescannte Zeile einer XY-Ebene (Intervalle negativen Anstiegs innerhalb der Dreiecksfunktion) entgegen dem Bildaufbau (links nach rechts) verläuft und für eine korrekte Darstellung gespiegelt werden muss. Die Periodendauern der Y- und Z-Achse müssen ganzzahligen Vielfachen der Periodendauer der X-Achse entsprechen.

Der Spiralscan basiert auf einer kontinuierlichen Aneinanderreihung sich schließender und öffnender archimedischer Spiralen der XY-Ebene und einer sinusförmigen Bewegung entlang der Z-Achse (siehe Anhang E – V1). Der Signalverlauf einer einzelnen öffnenden Spirale definiert sich aus den folgenden X- und Y-Komponenten:

$$x(t_{XY}) = A_{XY} \cdot t_{XY} \cdot \cos(\varphi(t_{XY})) \quad (3.1)$$

$$y(t_{XY}) = A_{XY} \cdot t_{XY} \cdot \sin(\varphi(t_{XY})) \quad (3.2)$$

A_{XY} repräsentiert die Amplitude der Spirale. Der Phasenwinkel $\varphi(t_{XY})$ in Abhängigkeit von der Zeit t_{XY} ($t_{XY} \in \mathbb{R}, [0 \dots 1]$) ist folgendermaßen definiert: $\varphi(t_{XY}) = 2\pi \cdot f_{XY} \cdot t_{XY}$. Die Schwingfrequenz f_{XY} ($f_{XY} \in \mathbb{N}^*$) ist ein Maß für die Anzahl der Spiralwindungen. Die Z-Komponente ist folgendermaßen definiert:

$$z(t_Z) = A_Z \cdot (1 - \cos(2\pi \cdot f_Z \cdot t_Z)), \quad (3.3)$$

wobei A_Z die Amplitude, gleichbedeutend der halben Strecke entlang der Z-Achse repräsentiert. Eine Scanperiode entspricht der Periodendauer der Z-Komponente ($T_{scan} = f_{scan}^{-1} = T_Z = f_Z^{-1}$). Innerhalb dieser Periode werden $m = 2N_S$ Spiralen (abwechselnd schließend und öffnend, m entspricht der Anzahl der Scanebenen) aneinander gereiht, wobei ein Phasensprung von 180° nach N_S Spiralen erfolgt [75]. In Abbildung 3.8 werden die drei Raumkomponenten (XYZ) eines Z-Stapels und die eines Spiralscans gegenüber gestellt.

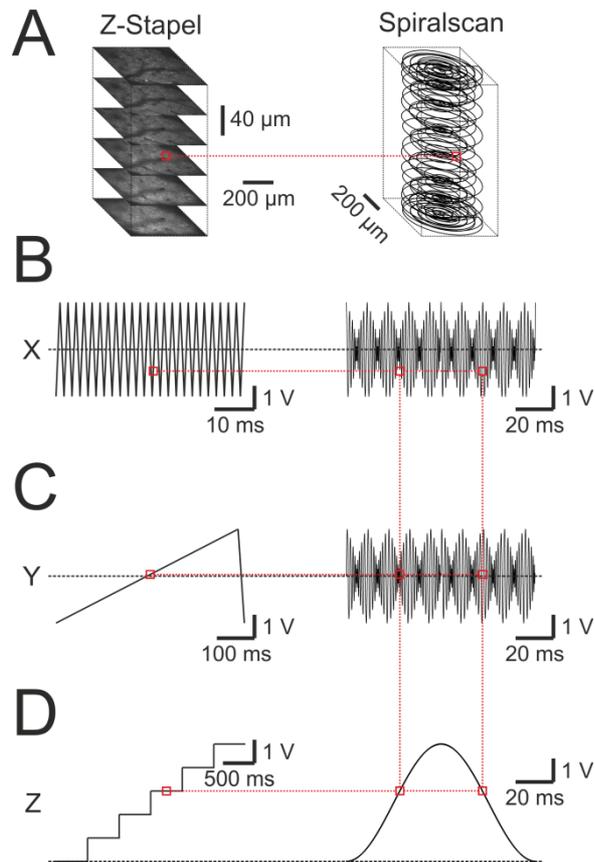


Abbildung 3.8: Vergleich von Z-Stapel (Rasterscan) und Spiralscan (Linienscan). A – Dreidimensionale Projektion von sechs abgetasteten Bildebenen innerhalb eines Z-Stapels (links). Die Raumtrajektorie eines Spiralscans im selbigen Volumen ist auf der rechten Seite dargestellt. B, C, D – Signalverläufe der in A dargestellten Scans (links: Z-Stapel, rechts: Spiralscan) entlang einer Raumachse. B – X-Achse. C – Y-Achse. D – Z-Achse. Die Projektionen der in A markierten Raumposition sind jeweils in B, C und D dargestellt (rote Rechtecke).

3.5 Optimierung dreidimensionaler Aktivitätsmessungen

In Abhängigkeit von dem verwendeten Objektiv ändern sich die Länge und Breite des hardwaretechnisch abtastbaren Volumens. Die Fokussierung entlang der Z-Achse bleibt davon jedoch unberührt. Der Piezo-Aktor kann in einem Regelbereich von 0 V bis 10 V mit einer maximalen Längenänderung von 400 μm angesteuert werden ($\sim 40 \mu\text{m}/\text{V}$). Vorversuche ergaben, dass die optischen Streueigenschaften des visuellen Kortex der Maus in einem postnatalen Alter von drei bis vier Tagen eine Registrierung einer maximalen Gewebetiefe von 200 μm entlang der Z-Achse ermöglichen. Sich an der Vorgabe einer zeitlichen Auflösung von 100 ms orientierend wurden die Scanfrequenz, mit der ein Zielvolumen abgetastet wird und damit auch die Frequenz der Sinusschwingung des Objektivs, auf 10 Hz festgelegt. Letztere ist wesentlich kleiner als die Resonanzfrequenz des Aktors (laut Hersteller ~ 150 Hz unter Einbezug einer Objektivmasse von 150 g, ~ 80 Hz bei 235 g [75]) und sollte keine Limitierung darstellen.

Für alle dreidimensionalen Messungen kortikaler Aktivität wurde ein 20x Objektiv verwendet (Masse: ~230 g, Kapitel 3.1). Der resultierende Skalierungsfaktor entlang der X- und Y-Achse beträgt ~124 $\mu\text{m}/\text{V}$ bei einer maximalen Galvanometer-Steuerspannung von $\pm 10\text{ V}$ (entspricht einem mechanischen Winkel von $\pm 15^\circ$). Der limitierende Faktor der Ansteuerung liegt nicht in der Größe des Sichtfeldes (Engl.: *field of view*, FOV), sondern in der Geschwindigkeit, mit der eine bestimmte Position angefahren werden kann. Die Kleinwinkelantwort, also das Zeitintervall zwischen Start der Ansteuerung und Erreichen der Position eines Winkels von $0,1^\circ$ (innerhalb einer 1% Fehlergrenze der finalen Position), beträgt laut Hersteller 100 μs . Daraus ergibt sich ein Richtwert für die Spiegelgeschwindigkeit mit der eine angeforderte Position erreicht werden kann ($0,1^\circ / 100\ \mu\text{s}$, entspricht einem Steuersignal von ~667 V/s). Dieser Wert kann als grobe Abschätzung für die Einschwingcharakteristik der Galvanometer angenommen werden, wobei dieser zusätzlich von dem Massenträgheitsmoment der verwendeten Spiegel (2,1 $\text{mg}\cdot\text{cm}^2$ bzw. 2,4 $\text{mg}\cdot\text{cm}^2$ für die X- und Y-Achse, Kapitel 3.1) und den individuellen Einstellungen der Galvanometersteuereinheit abhängig ist. Die theoretische Maximalgeschwindigkeit des Systems kann dabei höher liegen und wird maßgeblich von der verfügbaren Steuerspannung und -stromstärke sowie von der aktuellen Temperatur des jeweiligen Galvanometers begrenzt. Zusätzlich beschränkt die Galvanometersteuereinheit selbst die Geschwindigkeit durch eine Slew-Rate-Begrenzung. Ein regulärer Bild-Rasterscan von 512×512 Bildpunkten (Pixeln) ist auf dem vorhandenen System auf ein maximales FOV von $\sim 500 \times 500\ \mu\text{m}^2$ (Steuerspannung von $\pm 2\text{ V}$) bei einer Y-Spiegelfrequenz von $\sim 3\text{ Hz}$ und einer X-Spiegelfrequenz von $\sim 850\text{ Hz}$ begrenzt. Die daraus resultierenden Effektivwerte der Geschwindigkeit der Steuersignale betragen $\sim 6800\text{ V/s}$ (V_{RMSx}) und $\sim 4800\text{ V/s}$ (V_{RMSy}). Besagte Parameter können für eine erste Optimierung der Spiralscans, welche entgegen der Rasterscans ein breites Frequenzspektrum aufweisen, verwendet werden. Eine Prüfung der Realisierbarkeit (Hardwarekompatibilität) und Langzeitstabilität (Größenordnung: $10^0 - 10^1\text{ min}$) ist jedoch Voraussetzung für die Applikation eines individuellen Scans (Kapitel 4.1).

Verteilung äquidistanter Scanpunkte

Um eine homogene Belichtung des Zielvolumens mittels eines dreidimensionalen Linienscans zu erzielen, werden alle aufeinanderfolgenden Scanpunkte entlang einer vorgegebenen Raumtrajektorie äquidistant angeordnet. Laut Definition der archimedischen Spirale in Kapitel 3.4 berechnen sich diese Punkte in einem konstanten Drehwinkel $\varphi(t_{XY})$ unter Verwendung eines konstanten Zeitintervalls Δt_{XY} , welches zu einer hohen Variabilität aufeinanderfolgender Punktabstände führt. Zudem muss die parallel ablaufende, sinusförmige Bewegung entlang der Z-Achse in die Äquidistanzberechnung einbezogen werden. Göbel und Kollegen entwickelten einen Algorithmus zur

Berechnung äquidistanter Punkte [7]. Dieser ist auf bestimmte Parameterkombinationen begrenzt. Konkret ist die Vorgabe einer geforderten Länge der Raumtrajektorie $L_{Gesamt} = n_S \cdot l_{Abtast} = (t_{Belichtung} \cdot f_{Scan})^{-1} \cdot l_{Abtast}$ durch Angabe einer Belichtungszeit $t_{Belichtung}$ und einer Scanfrequenz f_{Scan} (das Produkt ergibt n_S Scanpunkte) sowie einem äquidistanten Abstand der Scanpunkte l_{Abtast} und gegebenen XY-Spiralpaaren (wiederum vordefiniert anhand der Anzahl der Spiralwindungen f_{XY} , Anzahl der Scanebenen m und der Spiralamplitude A_{XY} , Kapitel 3.4) überdefiniert. Im schlimmsten Fall ist die Anzahl geforderter Scanpunkte n_S um Größenordnungen kleiner als die Anzahl vorhandener Punkte aus der XY-Vorgabe n_{XY} , d.h. der Signalverlauf der XY-Komponente wäre nach Erreichen der Punktvorgabe n_S unvollständig. Im umgekehrten Fall würde der Z-Signalverlauf keiner vollständigen Periode einer Sinusschwingung entsprechen. Um besagte Einschränkungen zu umgehen wurde ein eigener Algorithmus (Algorithmus zur Berechnung äquidistanter Raumpunktabstände, DSM), der Teil des Scangenerators ist, verwendet (Anhang A). Konkret wird aus der gegebenen XY-Trajektorie und einer Periode einer Sinusschwingung (Z-Dimension) mit der gleichen Anzahl an Scanpunkten n_{XY} eine Ziel-Trajektorienlänge L_{Gesamt} ermittelt:

$$L_{Gesamt} \approx \sum_{k=1}^{n_{XY}} |\vec{P}_{k+1} - \vec{P}_k| \quad (3.4)$$

Dabei repräsentiert \vec{P}_k die Raumkoordinaten des k-ten Punktes dieser Hilfstrajektorie. Zusammen mit dem vorgegebenen Ziel-Abstand l_{Abtast} errechnet sich die Anzahl der Scanpunkte der Ziel-Trajektorie n_S wie folgt:

$$n_S \approx \lfloor L_{Gesamt} \cdot l_{Abtast}^{-1} \rfloor. \quad (3.5)$$

Da während der Berechnung neuer Scanpunkte aus der XY-Vorgabe zwangsläufig einzelne Raumpunktvorgaben im Zuge der Äquidistanz vernachlässigt werden müssen, stellen oben berechnete Trajektorienlänge und Anzahl der Scanpunkte in jedem Fall eine Überschätzung dar (Abbildung 3.9).

Um darüber hinaus Werte für n_S zu erhalten, die für die Einhaltung einer diskreten Abtastrate der Hardware anwendbar sind, muss die Berechnung der Äquidistanzen gegebenenfalls mit geeigneten Werten für l_{Abtast} wiederholt werden. Die Äquidistanzberechnung besteht konkret aus folgenden Schritten: 1) Berechnung der Anzahl der Scanpunkte n_S , 2) Berechnung der Werte $\Delta z(i)$ und Abstände der Z-Komponente $\Delta z(i) = |z(i) - \Delta z(i-1)|$ ($i \in n_S$, $i > 0$), 3) iterative Überprüfung der Distanzen aller aufeinanderfolgenden Scanpunkte [ein bereits geprüfter Punkt im dreidimensionalen Raum und ein Punkt aus der XY-Vorgabe; der erste geprüfte Punkt entspricht dem ersten Punkt der XY-Vorgabe mit $z(1) = 0$]. Die jeweilige Z-Komponente

des zweiten Punktes ist definiert durch $z(i)$. Ist die resultierende, dreidimensionale Distanz gleich l_{Abtast} , wird der zu prüfende Punkt direkt übernommen. Ist die Distanz zu klein, wird dieser übersprungen. Die Überprüfung wird dann mit dem nächsten Punkt der XY-Vorgabe fortgesetzt. Ist die Distanz zu groß, wird ein neuer Punkt entlang der vorgegebenen Trajektorie mit einem dreidimensionalen Abstand von l_{Abtast} und einem Abstand in der Z-Dimension von $\Delta z(i)$ eingefügt ([7], Abbildung 3.9). Schritt 3) wird so lange wiederholt, bis alle Punkte der Vorgabe n_{XY} überprüft wurden. Abbildung 3.10 zeigt beispielhaft die Verteilungen der Abstände aller aufeinanderfolgenden Punkte zweier Hilfstrajektorien vor (breite Verteilungen) und zwei finalen Trajektorien nach der Berechnung der Äquidistanzen (jeweils ein diskreter Wert).

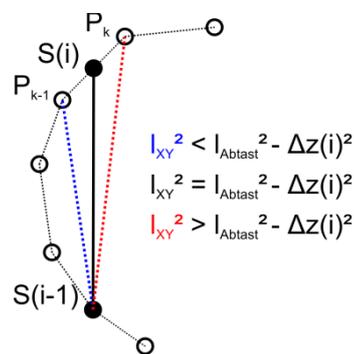


Abbildung 3.9: Berechnung äquidistanter Scanpunkte auf Grundlage einer XY-Vorgabe (Kreise, P) und einer sinusförmigen Bewegung entlang der Z-Achse (nicht dargestellt). Die resultierende Raumtrajektorie (ausgefüllte Kreise, S) ist abhängig von der geforderten Äquidistanz im Raum (l_{Abtast}) und den Punktabständen entlang der Z-Achse ($\Delta z(i)$). Die senkrecht zu $\Delta z(i)$ stehende Distanz in der XY-Ebene (l_{XY}) definiert die Positionierung endgültiger Scanpunkte entlang der XY-Vorgabe S(i). Adaptiert nach Abbildung „S3b“ in [7].

Auf Grundlage von [7] konnte ein Algorithmus (DSM) implementiert werden, der unabhängig von Belichtungszeit $t_{Belichtung}$ und Scanfrequenz f_{Scan} eine Periode eines dreidimensionalen Spiralscans mit äquidistant verteilten Punkten berechnet. Zudem kann l_{Abtast} unabhängig von der XY-Vorgabe spezifiziert werden. Dies ermöglicht wiederum die Definition einer konkreten Anzahl von Scanpunkten pro Trajektorienabschnitt. Eine Zelle von beispielsweise 10 μm Durchmesser erhielte bei einem einzigen Schnitt der Trajektorie entlang des Äquators der Zelle $10 \mu m \cdot l_{Abtast}^{-1}$ Scanpunkte. Inwieweit eine hohe mittlere Anzahl an Scanpunkten pro Volumenelement und eine hohe Abdeckung dieser Volumenelemente eines spezifischen Scans vorliegen, soll nach den folgenden Betrachtungen zu den Hardwarebegrenzungen geklärt werden.

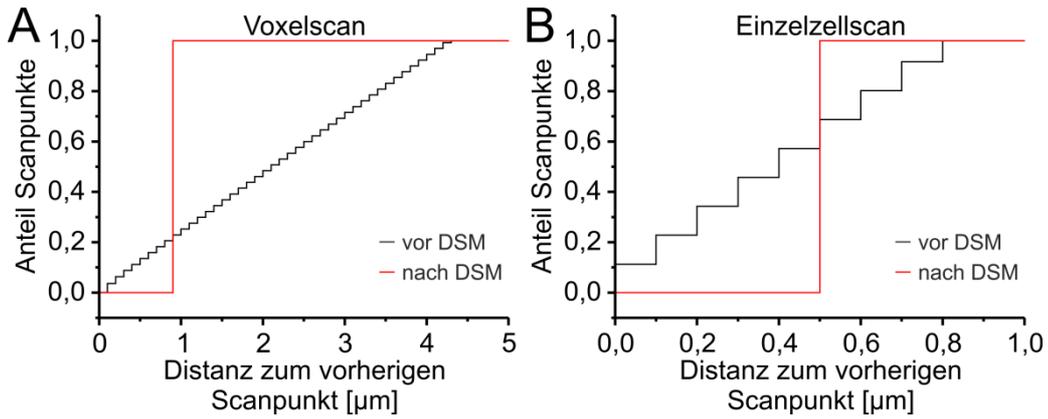


Abbildung 3.10: Kumulative Verteilungen der Punktabstände zweier spiralförmiger Raumtrajektorien vor und nach Äquidistanzberechnung (DSM-Algorithmus). A – Beispiel einer Trajektorie mit einer geforderten Äquidistanz von rund 1 µm. B – Beispiel mit einer Äquidistanz von 0,5 µm. A, B – Bin-Größe: 0,1 µm.

Hardwarebegrenzungen

Im Zuge der Optimierung der Spiralscans für die geplanten dreidimensionalen Aktivitätsmessungen wurde der Parameterraum zunächst durch die bestehenden Vorgaben und den bekannten Grenzen des Mikroskopsystems begrenzt: 1) Scanamplitude in der XY-Ebene $A_{XY} = 250 \mu\text{m}$, 2) Scanamplitude entlang der Z-Achse $A_z = 100 \mu\text{m}$, 3) Scanfrequenz $f_{Scan} = 10 \text{ Hz}$, 4) maximale Effektivgeschwindigkeit entlang der X-Achse $v_{Xeff} \leq 6800 \text{ V/s}$, 5) maximale Effektivgeschwindigkeit entlang der Y-Achse $v_{Yeff} \leq 4800 \text{ V/s}$ und 6) maximale Abtastrate $SR \leq 10^6 \text{ Sample/s}$. Weiterhin ist ein Abstand der Scanpunkte von maximal 1 µm (entspricht zehn Scanpunkten einer am Äquator geschnittenen, kugelförmigen Zelle mit einem Durchmesser von 10 µm) für ein Mindestmaß an Signal-Rausch-Verhältnis erforderlich. Weiterhin spezifizieren Göbel und Kollegen 10 – 14 für die Anzahl der Scanebenen und 6 – 11 für die Anzahl der Spiralwindungen als typische Werte [7]. Für die Sondierung adäquater Parameterkombinationen der geplanten Applikation wurde der Parameterraum folgendermaßen definiert: 1) äquidistanter Abstand l_{Abtast} im Bereich von 0,1 – 1 µm (Schrittweite: 0,1 µm), 2) 1 – 20 Scanebenen m (Schrittweite: 1) und 3) 1 – 20 Spiralwindungen f_{XY} (Schrittweite: 0,1).

Unter Einbezug der genannten Parameter wurden die Raumtrajektorien von 38200 verschiedenen Spiralscans berechnet. 8379 dieser Scans erfüllten die Hardwareanforderungen für v_{Xeff} , v_{Yeff} und SR . Zur Identifikation potentiell optimierter Parameterkombinationen wurde ein Maß für den Grad der Annäherung an die Grenzen der Hardware Q_{HW} berechnet:

$$Q_{HW}(i) = v_{Xeff}(i)_{norm} \cdot v_{Yeff}(i)_{norm} \cdot SR(i)_{norm}, \quad (3.6)$$

Dabei sind für jeden Spiralscan i die drei Parameter v_{xeff} , v_{yeff} und SR auf ihren Wertebereich normiert, sodass $Q_{HW}(i) \in [0 \dots 1]$ gilt. Abbildung 3.11 zeigt die Verteilung von Q_{HW} für alle Parameterkombinationen unterhalb der Hardwaregrenzen.

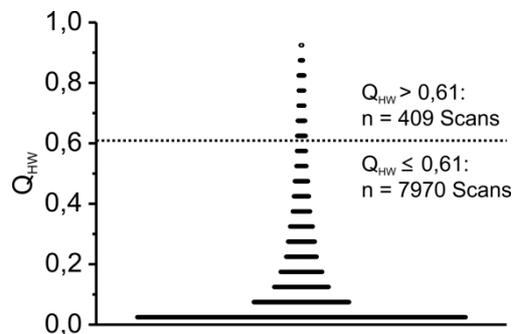


Abbildung 3.11: Grad der Annäherung der Spiralscans an die Grenzen der Hardware des Mikroskops Q_{HW} . Jedes Symbol entspricht einer Parameterkombination einer berechneten Raumtrajektorie ($n = 8379$). Die Symbole oberhalb der gepunkteten Linie repräsentieren die oberen 5% der Verteilung.

Der Median der Verteilung liegt bei 0,05 und deutet an, dass die meisten Kombinationen weit von besagten Limitierungen entfernt sind. Nur ein Bruchteil (obersten 5% der Verteilung) haben einen Wert von $Q_{HW} > 0,61$ ($n = 409$ Scans). Diese sind von Interesse, da eine anzustrebende hohe Anzahl an Scanpunkten pro Zelle und eine hohe Anzahl an geschnittenen Zellen eine hohe Abtastrate und eine hohe Trajektorienlänge pro Scanperiode und damit hohe Ansteuerungsgeschwindigkeiten bedingen. Im Zuge der Optimierung wurden diese 5% der Verteilung weiter auf ihre Scanqualität untersucht.

Scanqualität

Ziel der Optimierung ist die Maximierung der mittleren Anzahl an Scanpunkten pro Volumenelement (Definition: kugelförmige Zellen mit einem Durchmesser von $10 \mu\text{m}$) bei gleichzeitiger Maximierung der Volumenabdeckung. Letztere definiert sich aus dem Quotient aller auszuwertenden Volumenelemente (>0 Scanpunkte, oder eine definierte Subpopulation aller erfassten Elemente) und allen Volumenelementen eines zylindrischen Scanvolumens (Zylinderradius: A_{XY} , Zylinderhöhe: $2 \cdot A_Z$). Neben der Maximierung der Scanpunkte soll darüber hinaus eine homogene Abtastung des Zielvolumens erfolgen (geringe Streuung der Anzahl an Scanpunkten aller Volumenelemente). Zur Berechnung der theoretischen Qualität eines Scans wurde ein regelmäßiges Raster von Volumenelementen (Zellen) im Zielvolumen unter Einbezug einer Elementdichte von 416.000 Elementen/ mm^3 simuliert. Gemäß einer Voruntersuchung entspricht die angenommene Dichte ungefähr der Zelldichte der Schicht II / III im neonatalen visuellen Kortex der Maus.

Betrachtet man zunächst die Verteilung der Volumenabdeckung aller Scans mit einem $Q_{HW} > 0,61$ muss man feststellen, dass keiner der Scans mehr als 16% der Zellen erfasst (alle Zellen mit mindestens einem Scanpunkt, Abbildung 3.12).

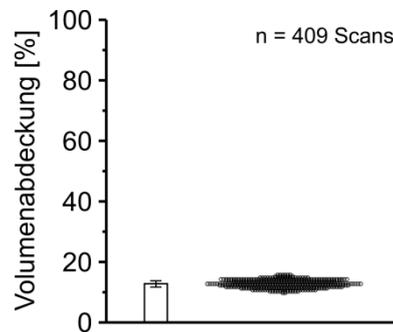


Abbildung 3.12: Volumenabdeckung als Qualitätsmaß von Spiralscans mit einer Annäherung an die Hardwaregrenzen von $Q_{HW} > 0,61$. Balken (links): Median \pm Quartile. Jedes Symbol auf der rechten Seite entspricht einer einzelnen Scanparameterkombination.

Da mindestens die Hälfte aller im Volumen befindlichen Volumenelemente vom Spiralscan erfasst werden sollen, ergeben sich zwei Möglichkeiten: 1.) Vergrößerung der Elemente unter Verlust der Einzelzellauflösung (siehe Voxeldefinition) oder 2.) Reduktion des zu scannenden Volumens (siehe Scanvolumenreduktion).

Voxeldefinition

Um die Vorgabe der Volumenmaximierung beizubehalten, wurde die Definition der Volumenelemente angepasst. Konkret wurde das Zielvolumen gleichmäßig in Voxel einer Kantenlänge l_{Voxel} unterteilt. Die Zuordnung eines Scanpunktes mit den Koordinaten $[x_{Abtast}; y_{Abtast}; z_{Abtast}]$ zu einem Voxel erfolgte dabei nach dem Schema:

$$(x_{Voxel} - 0,5 \cdot l_{Voxel}) \geq x_{Abtast} > (x_{Voxel} + 0,5 \cdot l_{Voxel}) \quad (3.7)$$

$$(y_{Voxel} - 0,5 \cdot l_{Voxel}) \geq y_{Abtast} > (y_{Voxel} + 0,5 \cdot l_{Voxel}) \quad (3.8)$$

$$(z_{Voxel} - 0,5 \cdot l_{Voxel}) \geq z_{Abtast} > (z_{Voxel} + 0,5 \cdot l_{Voxel}), \quad (3.9)$$

wobei die Koordinate $[x_{Voxel}; y_{Voxel}; z_{Voxel}]$ dem Mittelpunkt des Scanpunkt enthaltenden Voxels entspricht. Die Analyse der Scanqualität wurde für vier verschiedene Kantenlängen ($15 \mu m$, $20 \mu m$, $25 \mu m$ und $30 \mu m$) für alle Scans mit $Q_{HW} > 0,61$ durchgeführt (Abbildung 3.13). Unter Verwendung von $l_{Voxel} > 20 \mu m$ ergaben sich potentiell verwendbare Scans mit hoher Volumenabdeckung bei gleichzeitig hoher Abtastung der Voxel. Um wiederum die Anzahl an Voxeln im Zielvolumen und damit die räumliche Auflösung zu maximieren, wurde l_{Voxel} für alle weiteren Betrachtungen auf $25 \mu m$ festgelegt (3375 Voxel mit $l_{Voxel} = 25 \mu m$ gegen 1932 Voxel mit $l_{Voxel} = 30 \mu m$).

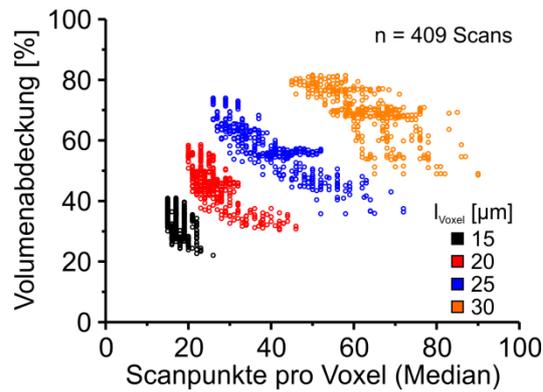


Abbildung 3.13: Einfluss der Kantenlänge zu erfassender Voxel im untersuchten Volumen auf Volumenabdeckung und Anzahl der Scanpunkte pro gescanntem Voxel. l_{Voxel} – Kantenlänge der Voxel. Jedes Symbol entspricht einer einzelnen Scanparameterkombination. Der Einfluss vier verschiedener Kantenlängen ist für jeweils 409 Kombinationen farbkodiert dargestellt.

Abbildung 3.14 zeigt die Abhängigkeit der Scanqualität vom äquidistanten Abstand l_{Abtast} , der Anzahl der Scanebenen m und der Anzahl der Spiralwindungen f_{XY} . Aufgrund der Grenzen der Hardware verhalten sich die Parameter m und f_{XY} komplementär: Eine hohe Anzahl an Scanebenen m bedingt eine niedrige Anzahl an Spiralwindungen f_{XY} und umgekehrt. Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen beiden Parametern sorgt für eine hohe Volumenabdeckung bei geringer mittlerer Anzahl an Scanpunkten. Letztere kann wiederum durch Minimierung von l_{Abtast} und gleichzeitiger Reduktion der Volumenabdeckung erhöht werden. Wird m minimiert und f_{XY} maximiert, können maximal ~55% aller Voxel im Volumen erfasst werden (senkrecht verteilte Punkte entlang von 55% Volumenabdeckung in Abbildung 3.14). Dieser Sättigungseffekt lässt sich darauf zurückführen, dass bei der Verwendung einer geringen Anzahl von Scanebenen auch bei einer hohen Abdeckung der XY-Ebenen (durch eine hohe Anzahl an Spiralwindungen) große Bereiche entlang der Z-Achse nicht von der Spiraltrajektorie abgedeckt werden können. Im beschriebenen Fall wäre die Streuung der Scanpunkte pro Voxel demnach besonders hoch. Um dies zu umgehen, wurden f_{XY} und m , mit größerem Gewicht auf m für die geplanten Aktivitätsmessungen maximiert. Auf Kosten der mittleren Anzahl an Scanpunkten (Median: 33) konnte so eine theoretische Volumenabdeckung von über 60% erzielt werden ($l_{\text{Abtast}} = 1 \mu\text{m}$; $f_{XY} = 5,6$; $m = 9$). Nach Anpassung von l_{Abtast} an eine diskrete Abtastrate von $SR = 0,8 \cdot 10^6 \text{ Sample/s}$ war die theoretische Optimierung für den Scan eines maximalen Volumens für das 2PLSM abgeschlossen ($l_{\text{Abtast}} = 0,985 \mu\text{m}$, nachfolgend als Voxelscan bezeichnet). Um der Forderung der Einzelzellauflösung gerecht zu werden, wurde ein zweiter Scan mit reduziertem Scanvolumen optimiert.

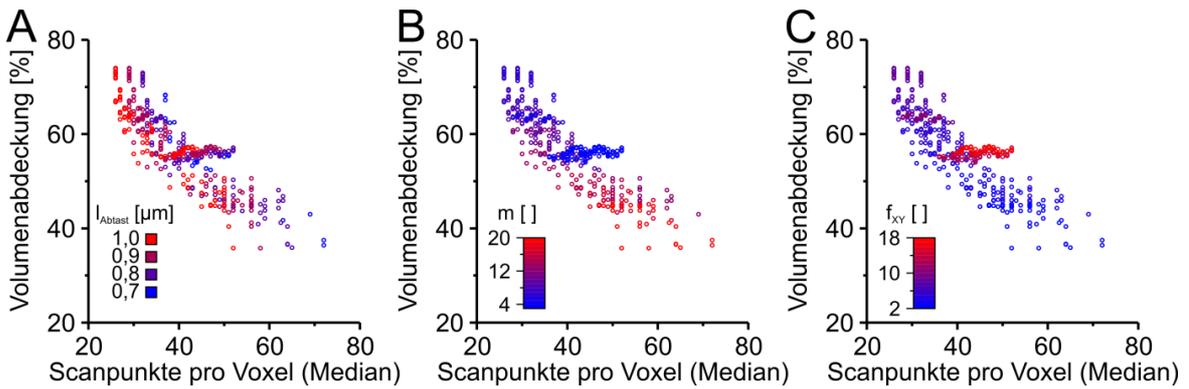


Abbildung 3.14: Abhängigkeit der Scanqualität, bestehend aus Volumenabdeckung und der Anzahl an Scanpunkten pro Voxel, von drei Scanparametern: A – Abstand der Scanpunkte entlang der Raumtrajektorie l_{Abtast} , B – Anzahl der Scanebenen m und C – Anzahl der Spiralwindungen f_{XY} . Die Symbole der drei Diagramme repräsentieren eine gemeinsame Parameterkombination ($n = 409$). Der jeweilige Scanparameter ist farbkodiert dargestellt.

Scanvolumenreduktion

Unter Erhalt der Einzelzellauflösung und einer maximalen Volumenabdeckung in einem Scanvolumen von $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ wurden zunächst alle hardwarekompatiblen Scans im oben genannten Parameterraum ($l_{\text{Abtast}}; f_{XY}; m$) identifiziert ($n = 26565$ Scans; Abbildung 3.15). Da die reduzierte Amplitude von $A_{XY} = 50 \mu\text{m}$ hardwarebedingt mehr potentielle Scankonfigurationen zulässt, sollen im Folgenden die oberen 15% der Verteilung betrachtet werden ($n = 3968$ Scans mit $Q_{HW} > 0,17$).

Die Resonanzfrequenz der Galvanometer (Herstellerangaben: $2 \text{ kHz}_{\text{RMS}}$) kann nun allerdings vor Erreichen der Maxima von $v_{X\text{eff}}$ und $v_{Y\text{eff}}$ auftreten und muss zusätzlich für jeden Scan überprüft werden. Eine integrierte Kerbfilterung der Galvanometersteuerung um die Resonanzfrequenz ermöglicht die Vernachlässigung geringer Frequenzanteile nahe 2 kHz. Somit wurde die Grenzfrequenz von 2 kHz lediglich auf die unteren 75% der spektralen Leistungsdichte der Scans bezogen (Frequenz nach Erreichen von 75% der Gesamtleistung des X- bzw. des Y-Signalverlaufs). Von 3968 Scans blieben somit noch 391 verwendbare Konfigurationen übrig, die im Folgenden näher betrachtet werden sollen (Abbildung 3.16).

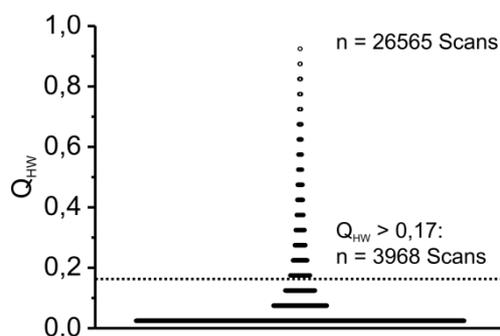


Abbildung 3.15: Grad der Annäherung der Spiralscans an die Grenzen der Hardware für reduzierte Scanvolumina. Q_{HW} – Grad der Annäherung. Größe der Volumina: $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$. Jedes Symbol

entspricht einer Parameterkombination einer berechneten Raumtrajektorie ($n = 26565$). Die Symbole oberhalb der gepunkteten Linie repräsentieren die oberen 15% der Verteilung.

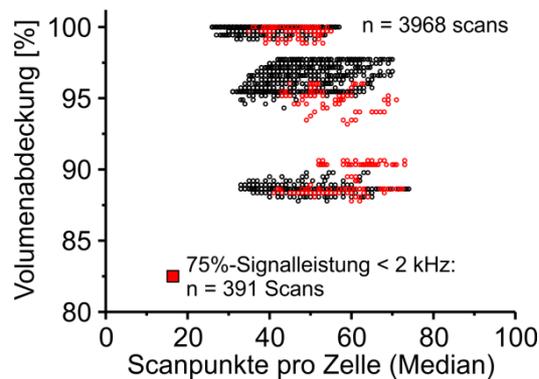


Abbildung 3.16: Scanqualität bei reduziertem Scanvolumen von $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$. Jedes Symbol entspricht einer Parameterkombination einer berechneten Raumtrajektorie ($n = 3968$). Rot markierte Symbole repräsentieren Trajektorien mit einer geringeren Signalleistung gegenüber den restlichen Trajektorien (schwarz) und somit geringerem Anteil an hardwarebegrenzenden Hochfrequenzkomponenten im Steuersignal der Galvanometer.

Analog dem Voxel-basierten Ansatz, kann eine Minimierung der Distanz der Scanpunkte l_{Abtast} die mittlere Anzahl an Scanpunkten pro Zelle maximieren (Abbildung 3.17). Um jedoch eine vollständige und homogene Volumenabdeckung zu erzielen, ist gleichzeitig eine Maximierung von f_{XY} und m erforderlich. Unter Beibehaltung einer Belichtungszeit der Scanpunkte des Voxelscans von $t_{\text{Belichtung}} = 1,25 \mu\text{s}$ ergibt sich eine optimierte Parameterkonfiguration von $l_{\text{Abtast}} = 0,5 \mu\text{m}$; $f_{XY} = 7$; $m = 20$ mit einer Volumenabdeckung von 100% und einer mittleren Anzahl an 46 Scanpunkten pro Zelle. Im Zuge der Anpassung an eine diskrete Abtastrate von $SR = 0,8 \cdot 10^6 \text{ Sample/s}$ ergibt sich eine Distanz der Scanpunkte von $l_{\text{Abtast}} = 0,549 \mu\text{m}$. Die Optimierung für den Scan mit Einzelzellaufösung ist damit abgeschlossen (nachfolgend als Einzelzellscan bezeichnet).

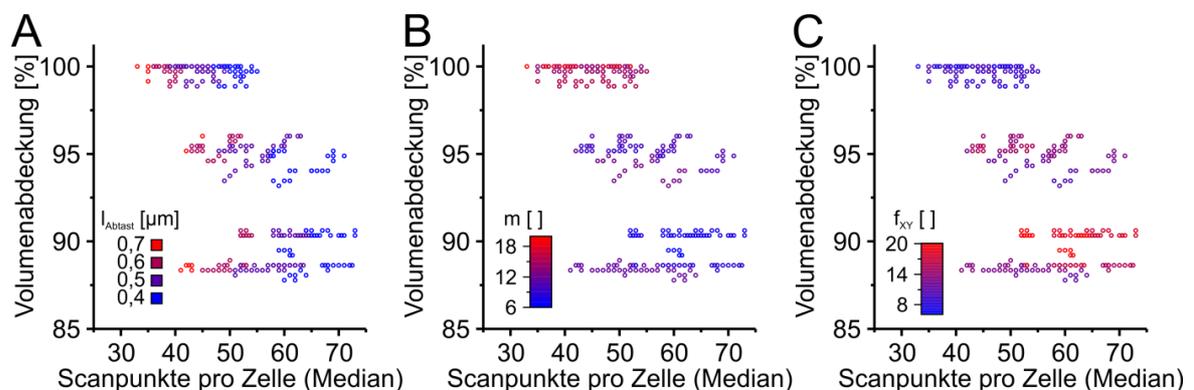


Abbildung 3.17: Abhängigkeit der Scanqualität von drei Scanparametern bei reduziertem Scanvolumen ($100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$): A – Abstand der Scanpunkte entlang der Raumtrajektorie l_{Abtast} , B – Anzahl der Scanebenen m und C – Anzahl der Spiralwindungen f_{XY} . Die Symbole der drei Diagramme repräsentieren eine gemeinsame Parameterkombination ($n = 391$). Der jeweilige Scanparameter ist farbkodiert dargestellt.

Zusammenfassend konnten zwei Scankonfigurationen (Voxelscan und Einzelzellscan) zur Messung neonataler Netzwerkaktivität auf theoretischer Basis optimiert werden. Der erste Scan beruht auf einem maximalen Scanvolumen unter Verlust der Einzelzellauflösung. Die Optimierung des zweiten Scans basiert auf einer Maximierung der Volumenabdeckung bei gleichzeitig hoher Anzahl an Scanpunkten pro Zelle. Eine abschließende Einschätzung zur Verwendbarkeit der optimierten Spiralscans kann erst nach Prüfung der tatsächlich von der Hardware abgebildeten Signalverläufe und deren Langzeitstabilität erfolgen (Kapitel 4.1).

3.6 Bestimmung dreidimensionaler Laserfokuspositionen

3.6.1 Artifizielles Referenzobjekt

Für eine erste Bewertung der Positionsstabilität des fokalen Volumens eines 2PLSMs, wurden in Agar eingebettete, fluoreszierende Polystyrol-Sphären (Engl.: *beads*) mit einem Durchmesser von 10 μm (F8836, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Es erfolgte eine Verteilung der Sphären in einem Agar-Block (4% Agar in doppelt destilliertem Wasser) zu einer finalen Konzentration von ungefähr 20000 Sphären/ mm^3 . Einen optimierten Spiralscan nutzend, wurde ein Volumen von $500 \times 500 \times 200 \mu\text{m}^3$ über 10 Minuten mit einer Frequenz von 10 Hz abgetastet (Voxelscan, Kapitel 3.5). Unmittelbar vor diesem Scan erfolgte die Aufzeichnung eines Z-Stapels (512 \times 512 Pixel, $496 \times 496 \mu\text{m}^2$, 101 Ebenen entlang der Z-Achse, Abstand der Ebenen: 2 μm , Mittelung von fünf Bildern pro Ebene, Bildwiederholfrequenz: 2 Hz), der eine Bestimmung der Sphärenpositionen im abgetasteten Volumen ermöglichte. Geschnittene *beads* (Scanpositionen, welche sich in oder nahe einer Sphäre befinden, weisen ein helles Fluoreszenzplateau entlang der Scantrajektorie auf) wurden visuell im Intensitätsverlauf des Spiralscans identifiziert (Fluoreszenzbild aus 80000 Scanpunkten \times 6000 Scanperioden). Mittels eines Schwellenwertalgorithmus erfolgte anschließend die Berechnung von Längenänderungen der Schnittgeraden durch die *beads* in 5-s-Intervallen (Mittelung der Fluoreszenzdaten jedes Scanpunkts über 50 Scanperioden, $n = 120$ Zeitintervalle je Schnittgeraden). Die Ausgangslänge der Schnittgeraden wurde als Mittelwert aus den ersten zehn Intervallen definiert. Verklumpte *beads*, welche als nahe oder kombinierte Plateaus in den Intensitätsprofilen erscheinen, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

3.6.2 Laterale Reflexionsmessung

Unter Verwendung reflektierender Skalenstriche (Abstand: $10 \pm 0,2 \mu\text{m}$) eines Objektmikrometers (R1L3S2P, Thorlabs) als bekannte Referenzpositionen ist es möglich, die laterale Positioniergenauigkeit eines 2PLSMs zu bestimmen (X- und Y-Achse, Abbildung 3.18A). Zu diesem Zweck wurde der Laserstrahl des integrierten

Femtosekundenlasers über die Galvanometer und das 20x Objektiv auf das Objektmikrometer projiziert. Das Anlegen einer Steuerspannung an eines der beiden Galvanometer (u_{Cx} oder u_{Cy}) ermöglichte die Detektion von Reflexionsmaxima der Referenzpositionen während der Bewegung des projizierten Laserstrahls über das Mikrometer (Abbildung 3.18B). Das entstehende Intensitätsprofil wurde mit dem PMT des Mikroskops detektiert und anschließend digitalisiert (u_{PMT}). Ausgehend von der maximalen Scanposition von links, wurde die erste detektierte Reflexion als absolute Position $0 \mu\text{m}$ definiert. Jedes nachfolgende Maximum erhielt ein Inkrement von $10 \mu\text{m}$ (Referenzposition p_{Rx} oder p_{Ry}). Um anschließend die Positionsbestimmung der Galvanometer validieren zu können, wurden die simultan aufgezeichneten Rückkopplungssignale (u_{Fx} oder u_{Fy}) mit den extern ermittelten Referenzpositionen korreliert (p_{Rx} oder p_{Ry}).

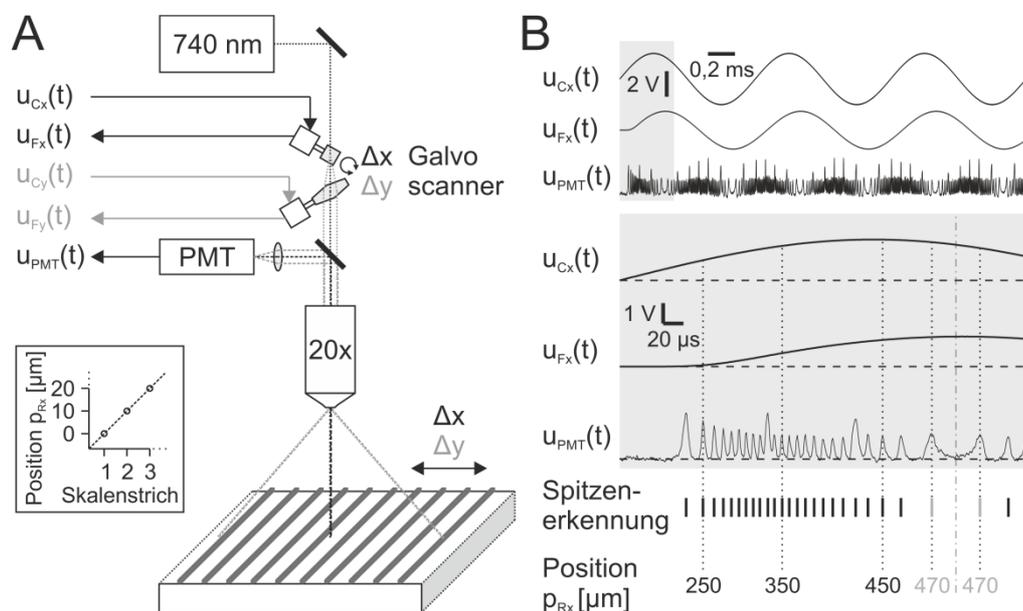


Abbildung 3.18: Verfahren zur Messung der lateralen Positioniergenauigkeit. A – Experimenteller Aufbau. Der auf ein reflektierendes Liniengitter (Linienabstand: $10 \pm 0,2 \mu\text{m}$) gerichtete Laserstrahl wird in Abhängigkeit vom Steuersignal eines Galvanometers ($u_{Cx}(t)$ oder $u_{Cy}(t)$) reflektiert. Das Rückkopplungssignal des Galvanometers ($u_{Fx}(t)$ oder $u_{Fy}(t)$) wird kontinuierlich gemessen. Die Intensität des reflektierten Laserstrahls wird simultan dazu von einem PMT gemessen und in eine Spannung $u_{PMT}(t)$ umgewandelt. Der Kasten zeigt die lineare Beziehung zwischen Skalenstrichen des Objektmikrometers und der Referenzposition. **B – Beispielmessung.** Oben: Zeitverläufe von $u_{Cx}(t)$, $u_{Fx}(t)$ und $u_{PMT}(t)$. Der grau markierte Bereich ist im unteren Bereich vergrößert dargestellt. Man beachte die signifikante Phasenverschiebung zwischen Steuersignal $u_{Cx}(t)$ und dem resultierenden Positionssignal des Galvanometers $u_{Fx}(t)$. **Spitzenenerkennung:** Spitzenwerterkennung reflektierter Maxima in $u_{PMT}(t)$. Absolute Positionen werden aus diskreten $10 \mu\text{m}$ -Schritten detektierter Spitzenwerte berechnet. Man beachte, dass die Positionsrichtung nach einem Wendepunkt der Galvanometerbewegung sich umkehrt (graue Markierungen). Gestrichelte Linien repräsentieren die Grundlinie von 0 V . Die abwechselnd gepunktete und gestrichelte Linie repräsentiert einen Wendepunkt. Modifiziert nach [76].

Die Anregungswellenlänge des Lasers wurde auf 740 nm eingestellt. Das Objektmikrometer wurde unter dem Objektiv, optisch mit einem Wassertropfen verbunden, platziert. Es erfolgte eine Anpassung der Anregungsintensität mittels der Polarisationsanordnung und der Pockels-Zelle (Kapitel 3.1). Es wurde darauf geachtet, den PMT aufgrund zu hoher Reflexionsintensitäten nicht zu beschädigen. Mittels eines 1 Hz Bild-Rasterscans über das gesamte FOV (512×512 Pixel, $496 \times 496 \mu\text{m}^2$) und einem Mikromanipulator (3 axes Mini 25, Luigs & Neumann) erfolgte die Ausrichtung des Objektmikrometers unter dem Mikroskop. Die Skalenstriche wurden im rechten Winkel zu der Achse die bewertet werden sollte ausgerichtet. Anhand des Reflexionsbildes des Rasterscans und kleinen Winkelbewegungen erfolgte die visuelle Minimierung der Verkippung des Mikrometers gegen die optische Achse des Objektivs. Waren alle reflektierten Linien in einer fokalen Ebene, galt die Ausrichtung als abgeschlossen (Kippwinkel des Reflexionsprofils $<5^\circ$). Anschließend wurde das Steuersignal des Y-Galvanometers $u_{Cy}(t)$ konstant auf 0 V gesetzt, damit dessen Spiegel während der Bewertung der X-Achse in Mittelstellung verharrt. Nacheinander wurden dreieck-, sägezahn-, gedämpfte und ungedämpfte sinusförmige Steuerspannungen $u_{Cx}(t)$ getestet (Amplituden: 0,5 – 2 V, Frequenzen: 1 – 2000 Hz). Ein gedämpfter Sinus repräsentiert dabei eine eindimensionale Komponente eines zwei- oder dreidimensionalen Spiralscans ($l_{Abtast} = 1 \mu\text{m}$; $f_{XY} = 5$; $m = 1$ bzw. 12).

Scandurchläufe, die Hardwarefehler (z.B. aufgrund einer Überschreitung der maximalen Beschleunigung) generierten, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Für eine Zuweisung der Referenzpositionen zu den Scanzeitpunkten wurde ein Schwellenwertalgorithmus auf die Reflexionsdaten $u_{PMT}(t)$ jedes Scandurchlaufs angewendet. Das Ergebnis wurde anschließend visuell überprüft. Ein lokales Maximum des Reflexionsprofils (Spitzenwert) wurde als Zentrum eines Skalenstriches betrachtet und für weitere Analysen verwendet, wenn 1) in $u_{PMT}(t)$ eine lokale Überschreitung des Schwellenwertes (1,7 – 2,2 V) mit einer anschließenden Unterschreitung vorlag, 2) keine Sättigung aller Abtastwerte innerhalb der Überschreitung vorhanden war, 3) die zeitlichen Abstände zu Umkehrpunkten der Galvanometerbewegungsrichtung mindestens 15 Abtastwerte betrug und 4) der Schwellenwert nach visueller Detektion als solcher bestätigt werden konnte. Die gleiche Prozedur wurde zur Bewertung der Y-Achse verwendet, wobei das Objektmikrometer um 90° gedreht und $u_{Cx}(t)$ mit $u_{Cy}(t)$ ausgetauscht wurde.

3.6.3 Axiale Lasertriangulation

Zur Validierung der Genauigkeit des Rückkopplungssignals der Z-Achse wurde ein Referenzpositionssignal von einer simultanen Abstandsmessung zwischen bewegter Piezo-Last und einem stationären Lasertriangulationssensor verwendet (AM400, CMOS

Auflösung: $0,1 \mu\text{m}$, ALLSENS Messtechnik, Abbildung 3.19A). Um eine geeignete Zieloberfläche für die Triangulation zu schaffen, ist das regulär verwendete $20\times$ Objektiv durch ein Objektiv-Phantom ersetzt worden. Die axiale Position dieses Phantoms wurde mittels des integrierten kapazitiven Positionsdetektors des Piezo-Aktors bestimmt (Rückkopplungssignal u_{Fz}) und mit der simultan gemessenen Referenzposition (p_{Rz}) verglichen (Abbildung 3.19). Zur Reduktion von Drift und Hystereseeffekten erfolgte der Betrieb des Piezo-Aktors im *closed-loop* Modus (Aktivierung interner Schaltkreise zur Positionsstabilisierung). Um die notwendige Geschwindigkeit schneller dreidimensionaler Scans zu erhalten, wurden die Beschleunigungen unter Verwendung von sinusförmigen Steuerspannungen minimiert (u_{Cz} , Amplituden: $0,625 - 5 \text{ V}$, Frequenzen: $1 - 20 \text{ Hz}$, 100 Perioden je Scandurchlauf). Zur Untersuchung potentieller Abhängigkeiten der gemessenen Positionen vom Massenschwerpunkt der Piezo-Last kamen drei Objektiv-Phantome verschiedener Länge zum Einsatz: 1) „regulär“: $L_{\text{regulär}} = 73 \text{ mm}$, 2) „kurz“: $L_{\text{kurz}} = 0,5 \times L_{\text{regulär}}$ und 3) „lang“: $L_{\text{lang}} = 2 \times L_{\text{regulär}}$ (Material: sandgestrahltes Messing oder Bronze). Die Masse aller drei Phantome war gleich der Masse des originalen Objektivs ($m = 230 \text{ g}$, XLUMPLFLN 20XW). Ein zusätzliches Phantom „ohne“, mit einer Länge von weniger als 1 mm und einer Masse von rund 2 g , kam als nahezu masselose Kontrolle zum Einsatz (Material: sandgestrahltes Aluminium). Der Triangulationsensor wurde auf die Unterseite des jeweiligen Phantoms zentriert. Die Korrektur des Kippwinkels zwischen optischer Achse des Mikroskops und des Sensors erfolgte mittels einer Dreh- und Neigungsplattform (PY003, Thorlabs). Durch den Ausschluss der jeweils ersten 50 Scanperioden wurde die Analyse der Scandurchläufe auf den eingeschwungenen Teil der Positionierantwort des Piezo-Aktors beschränkt [69].

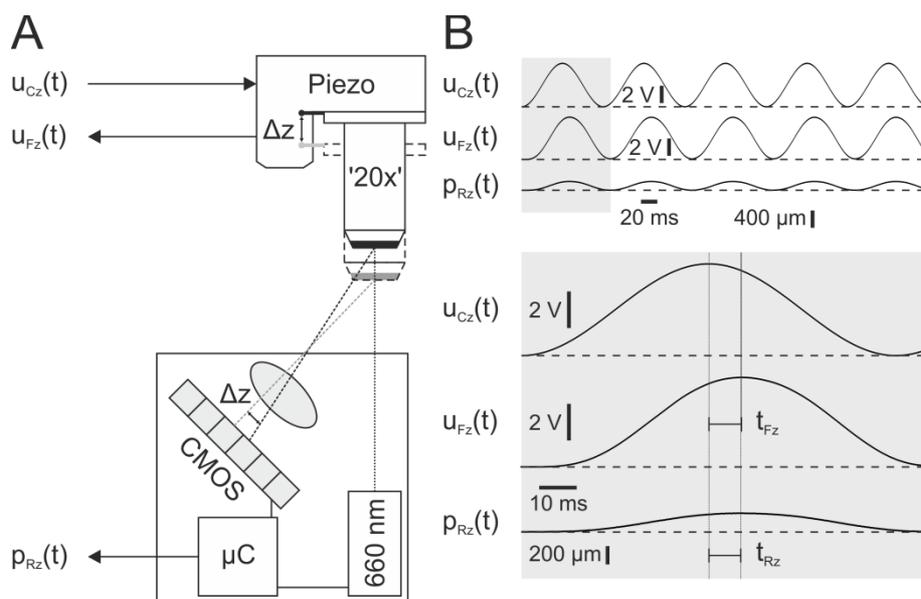


Abbildung 3.19: Verfahren zur Messung der axialen Positioniergenauigkeit. A – Experimenteller Aufbau. Absolute Positionen des Objektiv-Phantoms '20x' werden simultan via kapazitiven

Rückkopplungssignal des Piezo-Aktors $u_{Fz}(t)$ und dem Referenzsignal der Lasertriangulation $p_{Rz}(t)$ gemessen. Die Phantompositionen zu einem bestimmten Zeitpunkt sind von dem angelegten Steuersignal $u_{Cz}(t)$ abhängig. Δz : Elongation des Phantoms aufgrund des Steuersignals. μC : Mikrokontroller. Auflösung des CMOS: $0,1 \mu m$. B – Beispielmessung. Oben: Zeitverläufe von $u_{Cz}(t)$, $u_{Fz}(t)$ und $p_{Rz}(t)$. Der grau markierte Bereich ist im unteren Bereich vergrößert dargestellt. Man beachte die signifikante Zeitverzögerung zwischen Steuersignal und den gemessenen Positionssignalen t_{Fz} und t_{Rz} . Gestrichelte Linien repräsentieren die Grundlinie von 0 V. Modifiziert nach [76].

3.6.4 Synchronität von Positionssignalen

Für jede Achse wurde separat die Phasenverschiebung zwischen internem Rückkopplungssignal u_{Fj} und dem zugehörigen Referenzsignal p_{Rj} zu den angelegten Steuerspannungen u_{Cj} bestimmt. j ist ein Platzhalter für x , y bzw. z und repräsentiert die jeweilige Raumachse. Das zeitabhängige, sinusförmige Steuersignal mit einer Winkelgeschwindigkeit von ω wurde über ein Intervall von 10 Scanperioden zu $s_{Cj}(t)$ normalisiert ($s_{Cj}(t) \in [-1 \dots 1]$):

$$s_{Cj}(t) = \sin(\omega \cdot t + \omega \cdot t_{Lag}). \quad (3.10)$$

t_{Lag} ist ein Platzhalter für: 1) die Zeitverzögerung zwischen Referenz- und Steuersignalen t_{Rj} und 2) die Zeitverzögerung zwischen Rückkopplungs- und Steuersignalen t_{Fj} . Die normalisierten Steuersignale $s_{Cj}(t)$ wurden um $\omega \cdot t_{Lag}$ phasenverschoben, wobei t_{Res} ein diskretes Zeitintervall von $1 \mu s$ und k eine Variable zum Test verschiedener Phasenverschiebungen repräsentieren ($k \in [1 \dots 12000]$; $k \in \mathbb{N}$):

$$t_{Lag}(k) = k \cdot t_{Res}. \quad (3.11)$$

t_{Lag} wurde quantisiert, da die Auflösung der aufgezeichneten Signale auf $1 \mu s$ beschränkt war. Anschließend erfolgte die Subtraktion $s_{Cj}(t)$ von den zugehörigen amplitudennormalisierten Rückkopplungssignalen $s_{Fj}(t)$ ($s_{Fj} \in [-1 \dots 1]$) oder den Referenzsignalen $s_{Rj}(t)$ ($s_{Rj} \in [-1 \dots 1]$). Für verschiedene Phasenverschiebungen $\omega \cdot t_{Lag}$ wurde der Quadratsummenfehler (SSE) dieser Differenzen berechnet (n_{10} entspricht der Anzahl der Abtastwerte von 10 Perioden, $n_{10} \in \mathbb{N}$, variable Ganzzahl $i \in [1 \dots n_{10}]$):

$$SSE(t_{Lag}) = \sum_{i=1}^{n_{10}} \left(s_{Rj}(i) - s_{Cj}(i, t_{Lag}) \right)^2. \quad (3.12)$$

Das lokale Minimum von $SSE(t_{Lag})$, an dem $SSE(t_{Lag}(k)) < SSE(t_{Lag}(k+1))$ und $SSE(t_{Lag}) \rightarrow 0$ wurde als die inhärente Zeitverzögerung zwischen dem entsprechenden Positionssignal und dem Steuersignal angesehen. Somit repräsentiert eine Differenz zwischen der Zeitverzögerung des Referenzsignals und der Zeitverzögerung des

Rückkopplungssignals eine Zeitverzögerung zwischen der nominellen Echtzeitscannposition und seiner Darstellung im Rückkopplungssignal.

In einem nächsten Schritt wurden für jede Achse separat die zeitverzögerungskorrigierten Rückkopplungssignale mit den zugehörigen Referenzpositionen verglichen. Unter Annahme minimaler Positionsabweichungen bei Verwendung niederfrequenter, dreieckförmiger Steuersignale (X- und Y-Achse: 1 Hz, Z-Achse: 0,02 Hz) erfolgte eine lineare Regression der Rückkopplungssignale u_{F_j} zu den Referenzpositionen p_{R_j} :

$$u_{F_j}(i) = \beta_{0_j} + \beta_{1_j} \cdot p_{R_j}(i), \quad (3.13)$$

wobei i den Index eines aufgezeichneten Positionspaar ($i \in \mathbb{N}$) und β_{0_j} , β_{1_j} die Regressions-Parameter (Offset $[\beta_{0_j}] = V$, Anstieg $[\beta_{1_j}] = V/\mu m$) repräsentieren. Folglich ergibt sich die Abweichung $d_j(i)$ in μm jeder rückgekoppelten Position zu einer Referenzposition aus:

$$d_j(i) = \beta_{1_j}^{-1} \cdot (u_{F_j}(i) - \beta_{0_j}) - p_{R_j}(i). \quad (3.14)$$

Zur Reduktion von Laser-Specklerauschen wurden die Positionssignale der Z-Achse mit einem gleitenden Mittelwertfilter geglättet (Fenstergröße: 250 Abtastwerte). Anschließend sind die axialen Positionsabweichungen aus dem Mittel von 50 aufeinanderfolgenden Perioden je Scandurchlauf berechnet worden. Zur Minimierung langsamer, mechanischer Bewegungsartefakte (z.B. des Objektmikrometers oder des Triangulationssensors) wurde der Offset-Parameter wiederholt bestimmt und korrigiert [Gleichung (3.13)].

3.7 Auswertung dreidimensionaler Scandaten

3.7.1 Voxel-basierte Auswertung

Die Rohdaten (Intensitäts- und Positionsdaten) der Voxel-basierten Spiralscans (Voxel: kubisches Volumenelement, Kapitel 3.5) wurden mit Hilfe des Datei-Exports der Software 2PLSMC (Anhang A) in jeweils vier TIFF-Bilddateien [77] (Engl.: *tagged image file format*) gespeichert. Für jedes Zielvolumen erfolgte die Aufzeichnung eines räumlich hochaufgelösten Z-Stapels (512 × 512 Pixel, 496 × 496 μm^2 , 101 Ebenen in einem Abstand von 2 μm , fünf Bildmittelungen und eine Bildabtastrate von 2 Hz) zum Abgleich der Morphologie und den Positionsdaten. Zu diesem Zweck wurden alle auf einem regulären Raumgitter angeordneten Voxel (21 × 21 × 9 Voxel = 3969 Voxel, Voxel-Kantenlänge: 25 μm , Koordinaten des Mittelpunktes des ersten Voxels [XYZ]: [-237,5 μm ; -237,5 μm ; +12,5 μm]) visuell einer der folgenden Strukturen des Z-Stapels zugewiesen: 1) marginale Zone, 2) obere kortikale Platte und 3) keine neuronale Struktur (z.B.: Gefäßstrukturen). Die Zugehörigkeit eines Scanpunktes zu einem Voxel war auf

Grundlage seiner Positionsdaten im Spiralscan (Koordinaten: $[x_{Abtast}; y_{Abtast}; z_{Abtast}]$) und dem jeweiligen Voxelmittelpunkt (Koordinaten: $[x_{Voxel}; y_{Voxel}; z_{Voxel}]$) definiert:

$$(x_{Voxel} - 12,5 \mu m) \geq x_{Abtast} > (x_{Voxel} + 12,5 \mu m) \quad (3.15)$$

$$(y_{Voxel} - 12,5 \mu m) \geq y_{Abtast} > (y_{Voxel} + 12,5 \mu m) \quad (3.16)$$

$$(z_{Voxel} - 12,5 \mu m) \geq z_{Abtast} > (z_{Voxel} + 12,5 \mu m) \quad (3.17)$$

Aus dieser Definition ergaben sich die Verteilungen der Scanpunkte pro Voxel sowie die Volumenabdeckung des Scans unter Einbezug eines zylindrischen Scanvolumens (Zylinderradius: 250 μm , Zylinderhöhe: 200 μm , Zentrum des Zylinders: $[0 \mu m; 0 \mu m; 100 \mu m]$). Für jeden Spiralscan erfolgte anschließend die Berechnung der Intensitätsverläufe jedes Voxels über typischerweise zwei Minuten (Mittelung aller Scanpunktintensitäten für jedes Voxel und jede Periode, 1200 Scanperioden). Voxel mit einer zugewiesenen Morphologie (marginale Zone oder kortikale Platte), die mindestens 20 Scanpunkte besaßen, wurden in weitere Analysen einbezogen. Anhand der Intensitätsverläufe der Spiralrohdaten (Intensitätsbilder mit 80000 Scanpunkten \times Anzahl der Scanperioden) erfolgte die visuelle Identifikation von Perioden mit Bewegungsartefakten. Diese Perioden wurden von der Analyse ausgeschlossen und von der Gesamtdauer des Spiralscans abgezogen. Unter Verwendung des in pClamp 10.2 implementierten *template-matching*-Algorithmus erfolgte anschließend die Bestimmung der Aktivitätszustände der Voxel. Wurde ein Kalziumtransient in dem Intensitätsverlauf eines Voxels detektiert, galt dieses zum Zeitpunkt des Spitzenwertes des Transientes als aktives Voxel. Ein Aktivitätsereignis definierte sich aus der Aktivierung von mindestens einem Voxel zu zwei Zeitpunkten in einem Intervall von 500 ms. Darüber hinaus wurden alle Aktivierungen mit einem maximalen zeitlichen Abstand von 500 ms zu einem Ereignis zusammengefasst. Daraus ließen sich die Parameter Beteiligungsrate (alle aktiven Voxel dividiert durch die Gesamtanzahl an Voxeln eines Ereignisses) und Ereignisfrequenz (Anzahl der Ereignisse dividiert durch die Dauer aller Messintervalle, abzüglich der Perioden mit Bewegungsartefakten) berechnen. Die Frequenz je Voxel ergab sich aus der Summe aller Kalziumtransienten eines Voxels dividiert durch die Dauer aller Messintervalle, abzüglich der Perioden mit Bewegungsartefakten. Zur Berechnung der Ausbreitung eines Ereignisses wurde die Summe aller auf eine Raumachse projizierten aktiven Voxel (X- und Y-Achse: 1 – 20 Voxel, Z-Achse: 1 – 8 Voxel) multipliziert mit der Voxellänge (25 μm) verwendet. Ein momentaner Aktivitätsschwerpunkt \vec{r}_S ergab sich aus den intensitätsgewichteten Raumpositionen \vec{r}_l aller überschwelligen Voxel einer Scanperiode (Anzahl überschwelliger Voxel N_V , Intensitätsschwelle: $0,25 \times$ Maximum $\Delta F/F_0$ eines definierten Ereignisses, Grundlinie der $\Delta F/F_0$ eines Voxels: Mittelwert aus 50 Perioden vor Beginn des Ereignisses):

$$\vec{r}_S = \begin{pmatrix} x_S \\ y_S \\ z_S \end{pmatrix} = \left(\sum_{i=0}^{N_V} \Delta F/F_0(i) \right)^{-1} \cdot \sum_{i=0}^{N_V} \Delta F/F_0(i) \cdot \vec{r}_i \quad (3.18)$$

Um die Schwerpunkte adäquat zu berechnen, wurde eine Beteiligung von mindestens 30 Voxeln oberhalb der Intensitätsschwelle vorausgesetzt. Die zurückgelegte Distanz eines Aktivitätsschwerpunktes entlang einer Raumachse (X-, Y- oder Z-Achse) ergab sich aus der jeweiligen Änderung von x_S , y_S oder z_S , über die Zeit bezogen auf die anfängliche Position des Schwerpunktes. Die Anstiegszeit eines Ereignisses berechnete sich aus dem Zeitintervall zwischen Start und Ende eines Ereignisses (Start: Zeitpunkt, nach dem bereits 25% aller Spitzenwerte der Kalziumtransienten eines Ereignisses aufgetreten sind, Ende: analog zu Start mit 75%). Der Nachbarschaftsindex eines Voxels (Aktivitätsrate) berechnet sich aus der Anzahl aktiver Voxel-Nachbarn dividiert durch die Anzahl aller Voxel-Nachbarn (Wertebereich: 0 – 1).

3.7.2 Einzelzell-basierte Auswertung

Die Rohdaten (Intensitäts- und Positionsdaten) der Einzelzell-basierten Spiralscans (Kapitel 3.5) wurden analog den Voxel-basierten Scans (Kapitel 3.7.1) im TIFF-Format gespeichert. Nach einem Spiralscan erfolgte direkt die Aufzeichnung eines vergleichsweise schnellen Z-Stapels (512 × 512 Pixel, 100 × 100 μm², 21 Ebenen in einem Abstand von 5 μm, keine Bildmittelungen und eine Bildabtastrate von 2 Hz), gefolgt von einem langsameren Z-Stapel mit einer höheren räumlichen Auflösung (512 × 512 Pixel, 100 × 100 μm², 51 Ebenen in einem Abstand von 2 μm, fünf Bildmittelungen und eine Bildabtastrate von 2 Hz). Es wurden ausschließlich Spiralscans ausgewertet, die nach visueller Prüfung ein Aktivitätsereignis enthielten und keine mechanischen Artefakte während oder nach dem Ereignis aufwiesen. War der sich anschließende Referenz-Z-Stapel (entweder der schnelle oder wenn möglich der langsame Z-Stapel) ebenfalls mechanisch stabil, erfolgte die Identifikation von Zellpositionen (kreisförmige Zielregionen (ROIs), Durchmesser: 7 μm) auf Grundlage der Bildinformationen des Z-Stapels. Nach Abgleich der identifizierten Zellpositionen mit den Positionsdaten des Spiralscans konnten die Anzahl der Scanpunkte jeder Zelle und die Volumenabdeckung (zylindrisches Scanvolumen, Zylinderradius: 50 μm, Zylinderhöhe: 100 μm, Zentrum des Zylinders: [0 μm, 0 μm, 50 μm]) berechnet werden. Die Zuweisung von Abtastwerten erfolgte durch ein dreidimensionales Abstandskriterium von ≤3,5 μm zwischen identifiziertem Zellmittelpunkt und den Scanpunkten der Spiraltrajektorie. Die Simulationen der Scanpunktverteilungen wurden anhand von zufälligen Zellpositionen und konstanten Punktpositionen einer Einzelzell-Spiraltrajektorie durchgeführt (kubisches Zielvolumen: 100 × 100 × 100 μm³; Zellradius: 5 μm oder 3,5 μm; Zelldichte: 5,0 · 10⁵ ± 1,9 · 10⁵ Zellen/mm³, Mittelwert ± Standardabweichung (SD), über-

lappende Zellpositionen kleiner dem Zellradius ausgeschlossen). Die Berechnung der Intensitätsverläufe einer Zelle über die Zeit erfolgte durch Mittelung aller vorhandenen Intensitätsverläufe von Scanpunkten einer Zelle (Minimum: ein Scanpunkt pro Zelle). Die Aktivitätszustände der Zellen (aktiv oder inaktiv) wurden anhand eines Schwellenwertkriteriums definiert (aktive Zelle: $\Delta F/F_0 \geq 3SD$ Grundlinienrauschen in einem Intervall von 3 – 5 s während des visuell detektierten Ereignisses, Grundlinienintervall: 10 s). Auf Basis dieser Klassifizierung erfolgte die Berechnung der Beteiligungsrate (alle aktiven Zellen während eines Ereignisses dividiert durch die Gesamtanzahl an Zellen) und der Ereignisfrequenz (Anzahl der Ereignisse dividiert durch die Dauer aller Messintervalle). Die Ereignisse wurden weiterhin in Rand- und Zentralereignisse klassifiziert (Zentralereignis: ≥ 30 aktive Zellen, Distanz des Ereignisschwerpunktes zum Schwerpunkt aller Zellen $< 15 \mu\text{m}$, Schwerpunktdefinition nur anhand der Zellmittelpunkte). Der Nachbarschaftsindex einer Zelle (Aktivitätsrate benachbarter Zellen) berechnet sich aus der Anzahl aktiver Zell-Nachbarn dividiert durch die Anzahl aller gemessenen Zell-Nachbarn (Wertebereich: 0 – 1, Nachbarschaftsdefinition: Zellmittelpunkte $< 6 \times$ Zellradius). Die Simulationen der Aktivitätsraten wurde anhand von zufälligen Zellpositionen, konstanten Punktpositionen einer gemessenen Spiraltrajektorie und einer definierten Beteiligungsrate durchgeführt (kubisches Zielvolumen: $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$; Zellradius: $3,5 \mu\text{m}$; Zelldichte: $5,0 \cdot 10^5 \pm 1,9 \cdot 10^5$ Zellen/ mm^3 , Mittelwert \pm SD, überlappende Zellpositionen ausgeschlossen, Beteiligungsrate: 0,11 oder 0,65). Die dreidimensionale Ereignis-Animation (siehe Anhang E – V3) wurde auf Grundlage der $\Delta F/F_0$ -Daten von Zellen eines Aktivitätsereignisses in Origin Pro 9.0 mit Hilfe eines erstellten LabTalk-Skriptes angefertigt.

3.8 In vivo Messungen

3.8.1 Versuchstiere

Die *in vivo* Experimente wurden an C57BL/6J (zweidimensionale Zweiphotonen-Kalzium-Bildgebung und elektrophysiologische Experimente, Tieralter: postnataler Tag (P) 3 – 4, außer in separaten Kontrollgruppen: P1 bzw. P25-27), $\text{Emx1}^{\text{IREScre}}:\text{GCaMP3}^{\text{LSL}}$ (Weitfeld-Epifluoreszenz- und Zweiphotonen-Kalzium-Bildgebung, Tieralter: P3 – 4) und $\text{Emx1}^{\text{IREScre/wt}}:\text{R26}^{\text{Tomato/wt}}$ (*in vivo* Identifikation von GABAergen und Glutamatergen Neuronen sowie visuelle Stimulationsexperimente, Tieralter: P21 – 49) Mäusen durchgeführt. Die Generierung der $\text{Emx1}^{\text{IREScre}}:\text{GCaMP3}^{\text{LSL}}$ Mauslinie erfolgte durch Kreuzung von homozygoten $\text{Emx1}^{\text{IREScre}}$ Weibchen [78] (The Jackson Laboratory, Bestellnummer: 005628) mit homozygoten $\text{GCaMP3}^{\text{LSL}}$ Männchen [79] (Ai38, The Jackson Laboratory, Bestellnummer: 014538). Heterozygote $\text{Emx1}^{\text{IREScre/wt}}$ [78] Mäuse (The Jackson Laboratory, Bestellnummer: 005628) wurden mit homozygoten $\text{R26}^{\text{Tomato}}$ Mäusen [80] (Ai14 Cre-Reporter Linie, The Jackson Laboratory, Bestellnummer: 007908)

zur Generierung von doppelt heterozygoten $Emx1^{IREScre/wt};R26^{Tomato/wt}$ Mäusen gekreuzt (im Folgenden als $Emx1^{IREScre};Ai14$ bezeichnet).

3.8.2 Präparation

Vorbereitend zu allen *in vivo* Experimenten erfolgte die Herstellung eines optischen Zugangs zum visuellen Kortex der Versuchstiere. Konkret wurden die Tiere mit Isofluran in reinem Sauerstoff tief anästhesiert und die über dem Schädelknochen befindliche Haut lokal mit 2%igen Lidocain unterfüllt. Anschließend erfolgten die Entfernung des Skalps und der Knochenhaut sowie das Aufkleben einer Plastikkammer mit einer zentralen Bohrung von 2 – 3 mm Durchmesser auf dem Knochen mittels eines auf Cyanoacrylat basierenden Klebers [81,82]. Die Kammer wurde wiederum fest mit dem Objektisch des Mikroskops verbunden und anschließend mit künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF) perfundiert (Flussrate: ~3 ml/min, pH 7,4 bei 35 – 36°C). Für alle Experimente, außer für die Aufnahmen in Abbildung 4.22E-H, erfolgte die Durchführung einer Kraniotomie (~0,3 – 0,7 mm² für Voxel- und Einzelzelleableitungen und ~1,0 – 1,4 mm²) über dem linken okzipitalen Kortex mit einer 27G Kanüle. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die unter dem Knochen befindliche Dura Mater nicht verletzt wird.

3.8.3 Anästhesie und Überwachung von Vitalparametern

Während der *in vivo* Aufzeichnungen wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere kontinuierlich überwacht und mittels einer Wärmematte nahe physiologischen Werten (34 – 37°C) gehalten. Durch einen differentiellen Druckwandler (Spirometer Pod und PowerLab 4/35, ADInstruments) erfolgte die permanente Überwachung der Spontanatmung der Tiere. Für die Kalzium-Bildgebung spontaner Netzwerkaktivität wurde die Gabe von Isofluran nach Abschluss der chirurgischen Präparation gestoppt und graduell durch ein Lachgas-Sauerstoffgemisch ersetzt (Endkonzentration: 3:1). Für alle anderen Experimente wurde entweder Isofluran in reinem Sauerstoff oder eine Kombination aus Isofluran und Lachgas-Sauerstoffgemisch als Anästhetikum verwendet, um die Rate schlafbedingter Tierbewegungen zu reduzieren und damit die Stabilität der Aufzeichnungen zu erhöhen. Die Steuerung der Dosis richtete sich dabei nach der Spontanatmung des Tieres, sodass eine mittlere Respirationsrate von rund 90 – 110 min⁻¹ erzielt wurde.

3.8.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Für alle fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, mit Ausnahme der Weitfeld-Epifluoreszenzmessungen (10× Wasserimmersionsobjektiv, Zeiss; Anregungsquelle: Xenon-Gasentladungslampe Lambda LS, Sutter Instrument; Detektor: 12-bit CCD-Kamera Rolera-XR, QImaging; Filterset: 472/30 nm Anregung, 495 nm Dichroit, 496 nm

Emission; Aufzeichnung: Streampix 5, NorPix, 74,14 Hz, 170 × 130 Pixel, 1134 × 867 μm²; Kapitel 4.2.2), wurde ein 20× Wasserimmersionsobjektiv verwendet (XLUMPLFLN 20XW, Olympus). Die zweiphotonengestützte Aufzeichnung neuronaler Aktivität erfolgte mittels zweidimensionaler Rasterscans (Z-Stapel mit einer Bildebene; Abtastung: 256 × 256 Pixel; 11,6 Hz oder 512 × 512 Pixel; 3,4 Hz) oder Spiralscans (Voxel- und Einzelzell-basierte Scans mit 10 Hz, Kapitel 3.7).

Im Rahmen der Identifikation glutamaterger und GABAerger Neurone (Kapitel 4.2.1) wurden Z-Stapel entlang der neokortikalen Schichten I und II/III aufgezeichnet (515 × 512 Pixel, 300 μm entlang der Z-Achse, Abstand der Bildebenen 2 – 5 μm, 3 – 5 Bildmittelungen). Für einen Vergleich von Fluoreszenzintensitäten (Fluoreszenzfärbung: rot fluoreszierendes Protein tdTomato oder synthetischer Kalziumindikator OGB1) verschiedener Zellen erfolgte die Berechnung eines Fluoreszenzindex nach folgender Gleichung:

$$FI = \frac{F_{Soma} - F_{Hintergrund}}{F_{Soma} + F_{Hintergrund}} \quad (3.19)$$

F_{Soma} und $F_{Hintergrund}$ repräsentieren Absolutwerte gemessener Fluoreszenzen einer manuell definierten Kreisregion im jeweiligen Fluoreszenzbild (10 Pixel Durchmesser, Pixeldimension: 0,42 × 0,42 μm²). $F_{Hintergrund}$ wurde in unmittelbarer Umgebung eines ausgewählten Zellsomas (F_{Soma}) markiert. Für alle *in vivo* Daten wurden Zellen zunächst visuell identifiziert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen, wenn (1) $F_{Soma(OGB1)} \leq F_{Hintergrund(OGB1)} + 2 \cdot SD_{Hintergrund(OGB1)}$ oder (2) Grauwertsättigung in mindestens einem der markierten Pixel auftrat. Mithilfe der Summe von 1 – 3 Gaußfunktionen wurde eine Regressionsanalyse der FI-Verteilungen durchgeführt:

$$f(FI) = a \cdot e^{-0,5 \cdot \left(\frac{FI-b}{w}\right)^2} + c \quad (\text{mit } c = 0). \quad (3.20)$$

3.8.5 Visuelle Stimulation

Visuelle Stimuli wurden mittels Matlab 7.1 (Mathworks Inc.) und der Psychophysics Toolbox, Version 3.0.9 [83] generiert. Die Synchronisation erfolgte dabei unter Verwendung der selbst entwickelten Steuerungssoftware 2PLSMC (Anhang A). Die Stimuli wurden auf einem Computerbildschirm angezeigt und im Abstand von 25 cm vor dem kontralateralen (rechten) Auge platziert, um annähernd 87° × 60° des visuellen Feldes abzudecken. Ein Durchgang visueller Stimulation bestand aus: 1) fünf Sekunden homogenem Graubild mittlerer Intensität (*prä-Stimulus*), 2) fünf Sekunden driftendem Rechteckwellengitter (0,04 Zyklen pro Grad, 2 Hz) und 3) fünf Sekunden homogenem Graubild mittlerer Intensität (*post-Stimulus*). Die Präsentation des driftenden Rechteckwellengitters erfolgte in vier orthogonalen Orientierungen und acht daraus

abgeleiteten Richtungen in einer pseudo-zufälligen Reihenfolge über acht Durchläufe. Spontane und sensorisch evozierte Kortexaktivität (Kalziummessungen) wurde mit einem zweidimensionalen Rasterscan erfasst (Z-Stapel mit einer Bildebene, Bildrate: 8 Hz, 256 × 256 Pixel).

3.9 Statistik

Statistische Analysen wurden unter Verwendung von OriginPro 8 / 9, Microsoft Excel 2003 / 2010 und SPSS Statistics 19 durchgeführt. Wenn im Text keine weiteren Hinweise vermerkt sind, beziehen sich Daten auf den arithmetischen Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM). Der Shapiro-Wilk Test wurde zur Prüfung auf Normalverteilung der Daten verwendet. Parametrische Testprozeduren wurden auf normalverteilte Daten angewendet. Andernfalls erfolgte die Verwendung von nicht-parametrischen Tests. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant interpretiert.

4 Ergebnisse

4.1 Genauigkeit der Laserfokusposition

Verwendung eines artifiziellen Referenzobjektes

Für die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Bestimmung der Positioniergenauigkeit der Fluoreszenzanregung eines 2PLSM wurde zunächst ein Referenzobjekt bestehend aus in Agar eingebetteten, fluoreszierenden Polystyrol-Sphären (Engl.: *beads*) angefertigt (10 μm Durchmesser, Kapitel 3.6.1), da dies häufig in der Laserscanningmikroskopie als Testobjekt eingesetzt wird. Dieses Präparat wurde mittels des optimierten Voxelscans (Kapitel 3.5) über zehn Minuten abgetastet, um Längenänderungen in den Intensitätsprofilen der durch die Scantrajektorie geschnittenen *beads* zu identifizieren und Positionsinstabilitäten zu bestimmen (Abbildung 4.1). Obgleich die meisten Schnittgeraden keine Längenänderung aufwiesen, konnte in einem Bruchteil eine Positionsabweichung durch eine Längenänderung über das gesamte Messintervall detektiert werden (Abbildung 4.1B, Beispiele 1 – 4 *versus* 5). Während der ersten zwei Minuten erreichten die Änderungen $-2,5 \mu\text{m}$ bis $+1,8 \mu\text{m}$ (Standardabweichung: $0,48 \mu\text{m}$). Zusätzlich änderte sich die Standardabweichung der Längenänderungen signifikant über die Zeit (Spearman's Rangkorrelationskoeffizient: 0,99; $n = 120$ Zeitintervalle; Abbildung 4.1C), welches auf einen Anstieg der Positioniergenauigkeit hindeutet. Da eine Änderung (oder die Abwesenheit einer Änderung) der Länge der Schnittgeraden nicht uneindeutig mit einer Positioniergenauigkeit im dreidimensionalen Raum verbunden ist, können die Vektoren potentieller Positionsabweichungen mit dieser Methode nicht eindeutig abgeleitet werden. Im Folgenden soll das neue Verfahren zur Quantifizierung absoluter Positionsabweichungen der drei Raumachsen (Kapitel 3.6) angewendet werden.

Hardwarebedingte Zeitverzögerungen

Ein Positionierungsprozess bedingt eine zeitabhängige Antwort auf eine angeforderte Position. Aufgrund von Massenträgheit und Signalverarbeitung müssen zwei Zeitverzögerungen in Betracht gezogen werden: 1) Steuer- *versus* Referenzpositionssignal t_{Rj} und 2) Steuer- *versus* Rückkopplungssignal t_{Fj} . Es ist daher essentiell, potentielle Zeitverzögerungen aller Raumachsen zu quantifizieren bevor Rückkopplungs- mit Referenzsignalen verglichen werden können. Im verwendeten 2PLSM konnten Verzögerungen dieser Art festgestellt werden. Es ergab sich für die X-Achse eine Zeitverzögerung zwischen Steuer- und Referenzsignal von $77,5 \pm 0,8 \mu\text{s}$ (Mittelwert \pm SD, $n = 11$ Scandurchläufe, Abbildung 4.2A). Für die Y-Achse ergab sich eine signifikant größere Verzögerung, welche höchstwahrscheinlich aufgrund des höheren Massenträgheitsmoments des auf dem Galvanometer montierten Spiegels entsteht ($79,5 \pm 0,5 \mu\text{s}$;

Mittelwert \pm SD; Mann-Whitney U Test: $t_{Rx} - t_{Ry}$; $P < 0,001$; $n = 11$ Scandurchläufe). Für beide Achsen ergab sich eine noch größere Zeitverzögerung der Rückkopplungssignale gegenüber den Steuersignalen, was darauf hinweist, dass die Schaltkreise der Rückkopplungssignale eine zusätzliche Verzögerung erzeugen (t_{Fx} : $83,2 \pm 1,2 \mu\text{s}$; t_{Fy} : $85,4 \pm 0,8 \mu\text{s}$; Mittelwert \pm SD; paarweise, zweiseitige Wilcoxon Vorzeichenrangtests: $t_{Rx} - t_{Fx}$ und $t_{Ry} - t_{Fy}$; $P < 0,001$; $n = 11$ Scandurchläufe). Die daraus resultierende Zeitdifferenz zwischen Rückkopplungs- und Referenzsignal war für beide Achsen ähnlich (X-Achse: $5,7 \pm 0,5 \mu\text{s}$; Y-Achse: $5,9 \pm 0,5 \mu\text{s}$; Mittelwert \pm SD; Mann-Whitney U Test; $P > 0,05$; $n = 11$ Scandurchläufe).

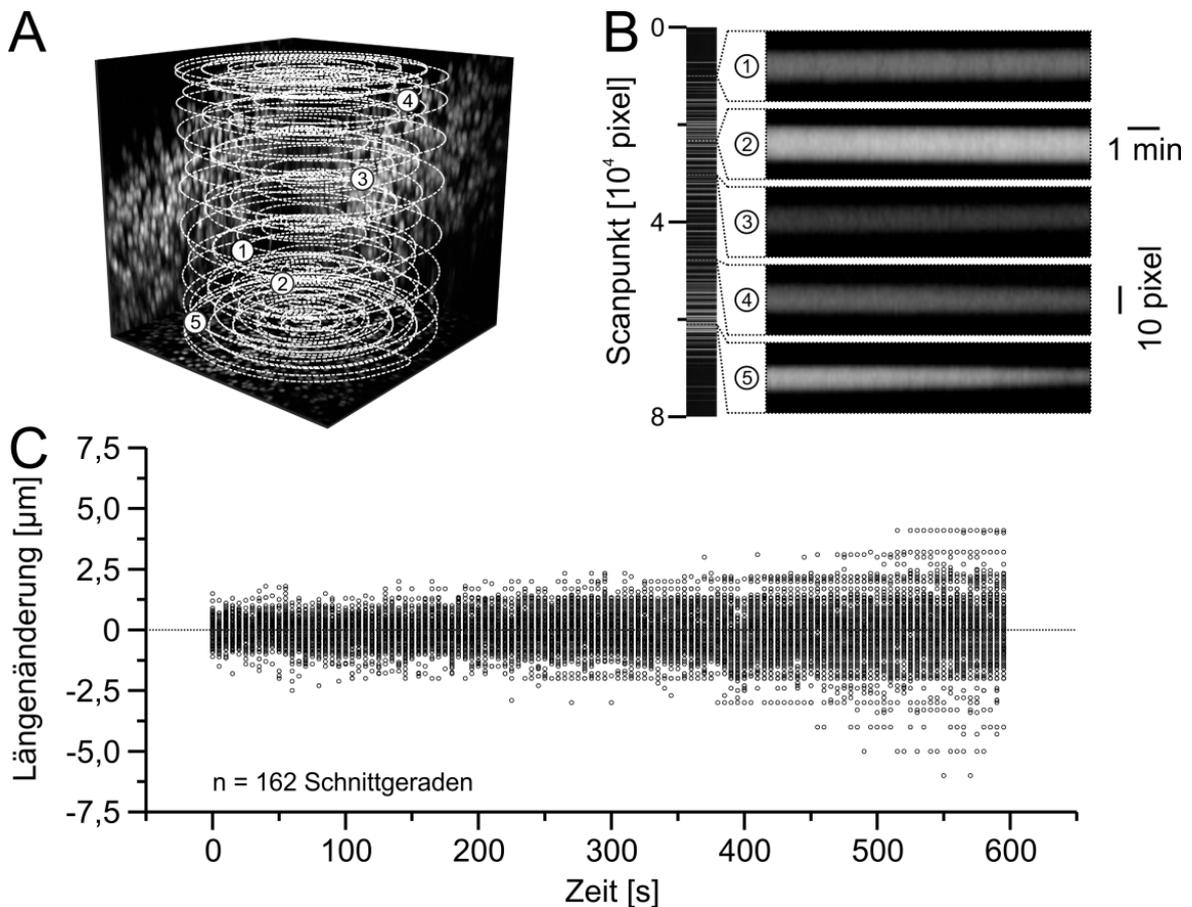


Abbildung 4.1: Längenänderung der Schnittgeraden aus Scantrajektorie mit fluoreszierenden *beads* als Maß dreidimensionaler Scaninstabilität. A – Dreidimensionale Projektion von Intensitätsdaten eines Z-Stapels (Projektion maximaler Intensitäten in der XY-, XZ- und YZ-Ebene) und von einer spiralförmigen Raumtrajektorie (weiß, gestrichelte Linie). Positionen von fluoreszierenden *beads* in B sind mit den Zahlen 1 – 5 markiert. Würfelmaße: $500 \times 500 \times 200 \mu\text{m}^3$ (XYZ). B – Beispiele von *bead*-Intensitätsprofilen, gemessen an unterschiedlichen Positionen auf der Raumtrajektorie über 10 Minuten. 10 Pixel \triangleq 10 μm . C – Längenänderung von *bead*-Schnittgeraden über die Zeit. Die gepunktete Linie repräsentiert eine detektierte Änderung von 0 μm . Man beachte, dass eine Änderung von Null nicht notwendiger Weise eine Positionsstabilität anzeigt, da die Schnittgerade durch einen sphärischen *bead* nicht eindeutig definiert ist. Modifiziert nach [76].

Die Zeitverzögerung zwischen axialem Referenz- und Steuersignal war um zwei Größenordnungen größer als die entsprechende Zeitverzögerung bei der X- und Y-Achse (t_{Rz} : $9,3 \pm 0,6$ ms; Mittelwert \pm SD; $n = 20$ Scandurchläufe; Abbildung 4.2B). Zusätzlich gab es eine Tendenz, dass niedrigere Zeitverzögerungen aus höheren Amplituden der Steuersignale \hat{u}_{Cz} resultieren. Ebenso wie für die lateralen Achsen wiesen die axialen Rückkopplungssignale eine zusätzliche Verzögerungskomponente auf (t_{Fz} : $9,8 \pm 0,6$ ms; Differenz $t_{Fz} - t_{Rz}$: $0,5 \pm 0,0$ ms; Mittelwert \pm SD; zweiseitiger t-Test: $t_{Rz} - t_{Fz}$; $P < 0,001$; $n = 20$ Scandurchläufe).

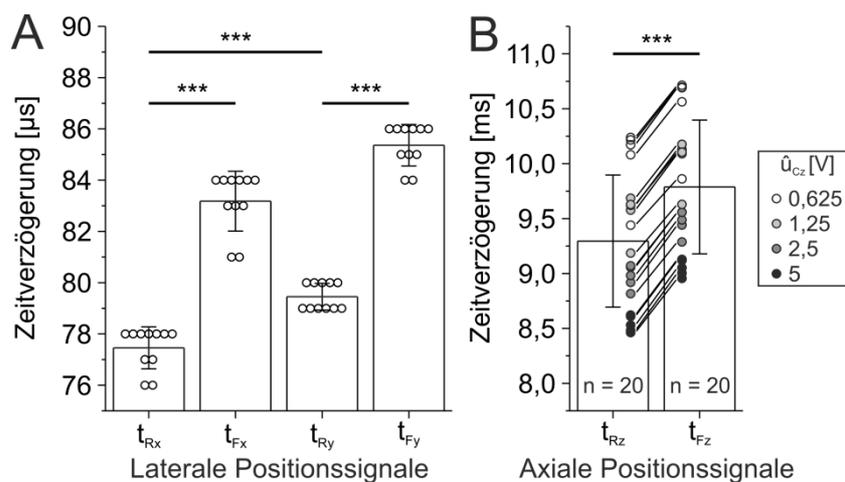


Abbildung 4.2: Hardwarebedingte Zeitverzögerungen gemessener Positionssignale gegenüber den Steuersignalen (t_{Rx} – Referenzsignal der X-Achse, t_{Fx} – Rückkopplungssignal der X-Achse, t_{Ry} – Referenzsignal der Y-Achse, t_{Fy} – Rückkopplungssignal der Y-Achse, t_{Rz} – Referenzsignal der Z-Achse, t_{Fz} – Rückkopplungssignal der Z-Achse). A – Laterale Messungen. Daten sinusförmiger Ansteuerungen wurden zusammengefasst (Amplituden: 62 – 248 μ m, Frequenzen: 1 – 2000 Hz). B – Axiale Messungen. Daten sind zusammengefasst von sinusförmigen Ansteuerungen (Amplituden: 25 – 200 μ m, Frequenzen: 1 – 20 Hz). Jedes Symbol repräsentiert Zeitverzögerungen eines Scandurchlaufs. *** $P < 0,001$. Angaben in Mittelwert \pm SD. Modifiziert nach [76].

Positionskalibrierung

Die Positionsabweichungen der Rückkopplungssignale wurden durch die Subtraktion jeder Referenzposition von einer verzögerungskorrigierten, rückgekoppelten Position ermittelt. Hierfür erfolgte eine Skalierung der Rückkopplungssignale in Mikrometer durch Einbezug berechneter Werte linearer Regressionsfunktionen (Abbildung 4.3). Unter Verwendung langsamer, dreieckförmiger Steuersignale (X- und Y-Achse: 1 Hz; Z-Achse: 0,02 Hz) wurden definierte Referenzpositionen angefahren, sodass die parallel dazu aufgezeichneten Rückkopplungssignale linear zu diesen Positionen angepasst werden konnten. Für alle drei Raumachsen ergab sich ein linearer Zusammenhang (X-Achse: $u_{Fx} = 6,21 \cdot 10^{-3} \text{ V}/\mu\text{m} \cdot p_{Rx} - 1,45 \text{ V}$; Y-Achse: $u_{Fy} = 6,20 \cdot 10^{-3} \text{ V}/\mu\text{m} \cdot p_{Ry} - 1,46 \text{ V}$; $u_{Fz} = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ V}/\mu\text{m} \cdot p_{Rz} - 2,1 \cdot 10^{-2} \text{ V}$; Abbildung 4.3). Die linearen Funktionen zugrunde legend konnten für diesen nahezu stationären Fall keine Positionsabweichungen größer als

$\pm 2,5 \mu\text{m}$ festgestellt werden (X-Achse: $-1,11 \mu\text{m}$ bis $+0,98 \mu\text{m}$; Y-Achse: $-0,88 \mu\text{m}$ bis $+1,38 \mu\text{m}$; Z-Achse: $-2,26 \mu\text{m}$ bis $+2,05 \mu\text{m}$).

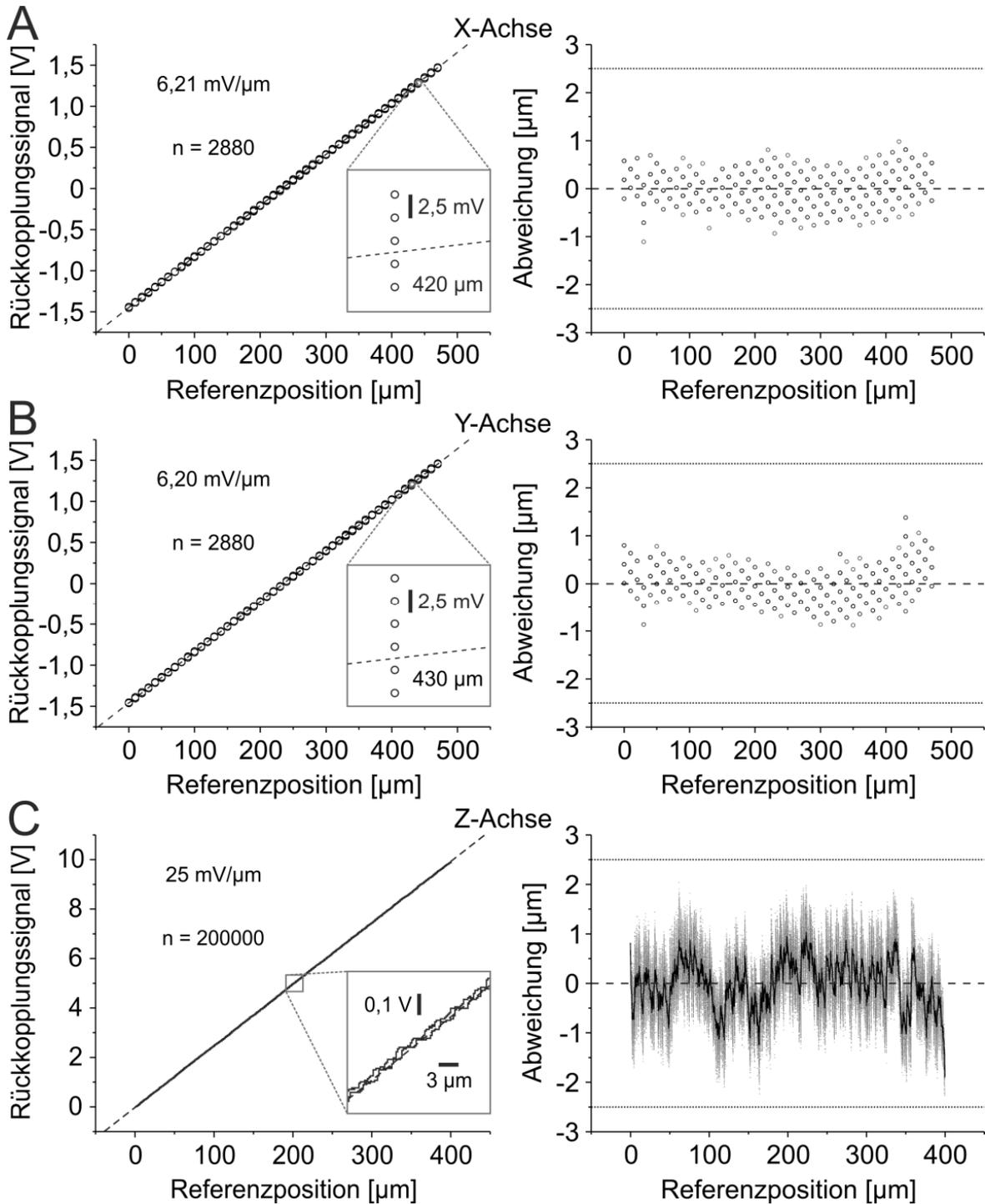


Abbildung 4.3: Kalibrierung der Rückkopplungssignale. Links: Kalibrierung der rückgekoppelten Spannungen auf Referenzpositionen (lineare Regression). Gestrichelte Linien repräsentieren die Regressionsfunktionen. Kasten: Vergrößerter Ausschnitt. Rechts: Abweichungen der Rückkopplungssignale von Referenzpositionen auf Grundlage der linearen Regressionsfunktion. Gestrichelte Linien entsprechen einer Abweichung von $\pm 0 \mu\text{m}$. Gepunktete Linien entsprechen einer Abweichungsgrenze von $\pm 2,5 \mu\text{m}$. A, B – Kalibrierung diskreter, lateraler Positionen. Jedes Symbol repräsentiert eine analysierte Skalenstrich-Position. Man beachte, dass Datenpunkte verdeckt übereinander liegen. C – Kontinuierliche Kalibrierung axialer Positionen. Rechts: Graue Punkte

repräsentieren Rohdaten. Die schwarze Linie wurde aus dem gleitenden Mittelwert der Rohdaten berechnet (Fenstergröße: 250 Abtastwerte). Modifiziert nach [76].

Laterale Positioniergenauigkeit

Für die Bestimmung der Genauigkeit der lateralen Rückkopplungssignale wurden eindimensionale Scantrajektorien unterschiedlichen Typs (Dreieck, Sägezahn, gedämpfter und ungedämpfter Sinus), Amplitude (62 – 248 μm) und Frequenz (1 – 2000 Hz) getestet. Dafür wurden die Positionsabweichungen über jeweils 30 Scanperioden pro Scandurchlauf für die X-Achse (Abbildung 4.4) und Y-Achse (Abbildung 4.5) berechnet.

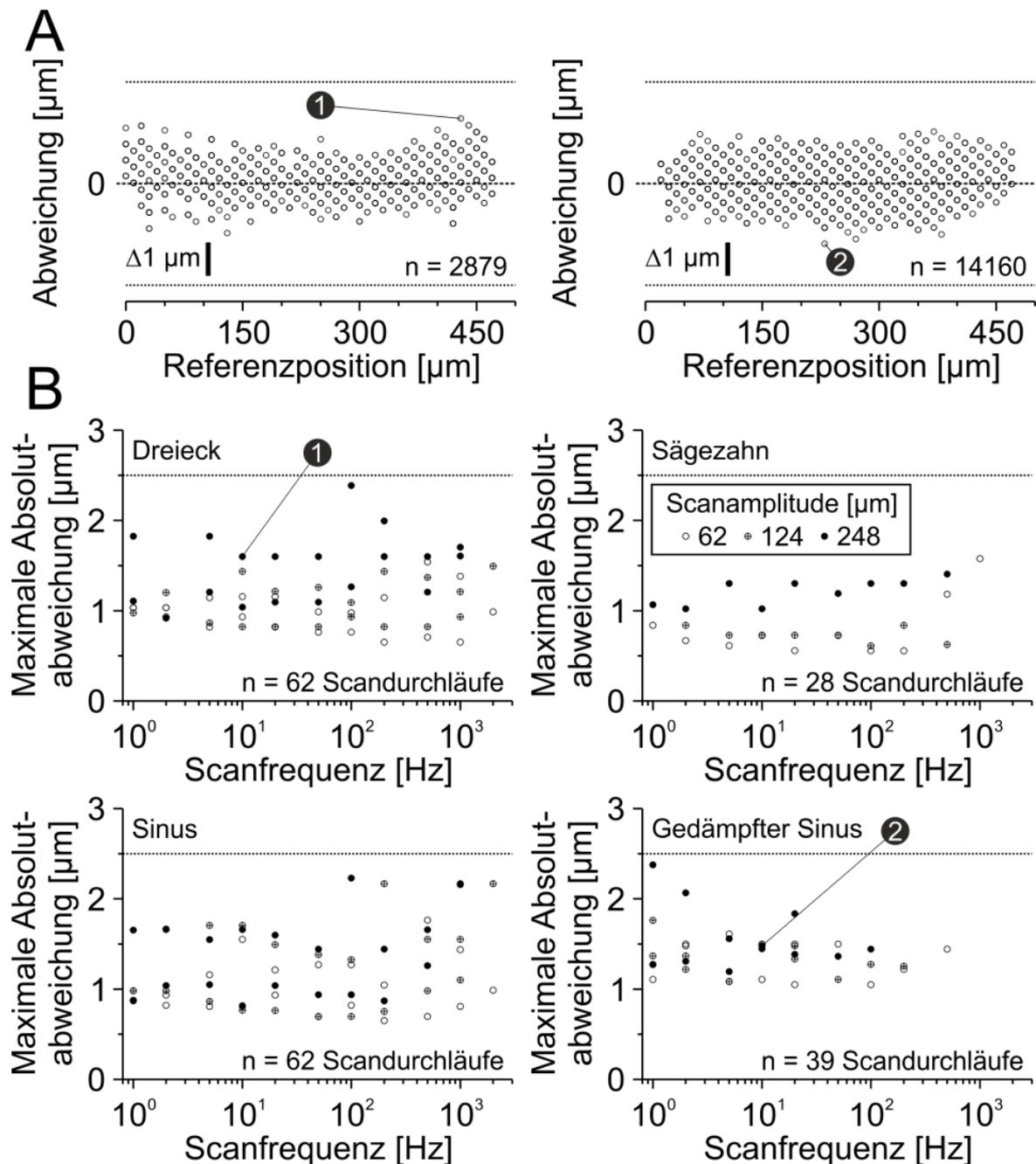


Abbildung 4.4: Die Positioniergenauigkeit der X-Achse ist kleiner als $\pm 2,5 \mu\text{m}$. A – Beispiele von zwei verschiedenen Scandurchläufen. Links: dreieckförmiger Scan, 248 μm Scanamplitude, 10 Hz Scanfrequenz. Rechts: gedämpfter Sinusscan, 248 μm Scanamplitude, 10 Hz Scanfrequenz. Man

beachte, dass die maximalen Absolutabweichungen von jedem Scandurchlauf für das Grenzwertkriterium in B verwendet wurden (Marker 1 und 2). Gestichelte Linien entsprechen einer Abweichung von $\pm 0 \mu\text{m}$. Jedes Symbol repräsentiert eine analysierte Position. B – Zusammenfassung der Ergebnisse für jeden Scantyp. Jedes Symbol repräsentiert die maximale Absolutabweichung aus einem einzelnen Scandurchlauf. Man beachte, dass Datenpunkte verdeckt übereinander liegen. Gepunktete Linien entsprechen einer Abweichungsgrenze von $\pm 2,5 \mu\text{m}$. Modifiziert nach [76].

Alle getesteten Steuersignale entlang der X-Achse resultierten in Positionsabweichungen kleiner gleich $2,5 \mu\text{m}$ (maximale Absolutabweichung: $2,39 \mu\text{m}$; $n = 482346$ Positionen von 191 Scandurchläufen; Abbildung 4.4B). Das 0,999-Quantil der Absolutabweichungen jedes Scans entlang der X-Achse war $\leq 1,6 \mu\text{m}$. Demnach ist die Genauigkeit der überwiegenden Mehrheit an Positionen höher als die maximale Absolutabweichung.

Anschließend erfolgte die Analyse der Positionsabweichungen der Y-Achse. Alle getesteten Steuersignale entlang der Y-Achse resultierten in Positionsabweichungen $\leq 2,5 \mu\text{m}$ (maximale Absolutabweichung: $2,38 \mu\text{m}$; $n = 484042$ Positionen von 193 Scandurchläufen; Abbildung 4.5B). Das 0,999-Quantil der Absolutabweichungen jedes Scans entlang der Y-Achse war kleiner gleich $1,74 \mu\text{m}$. Demnach ist die Genauigkeit der breiten Mehrheit an Positionen höher als die maximale Absolutabweichung.

Zusammenfassend ist die Genauigkeit der rückgekoppelten Positionen der X- und Y-Achse mindestens $\pm 2,5 \mu\text{m}$ für dreieck-, sägezahn-, sinus- und gedämpfte sinusförmige Scans unterschiedlicher Scanamplitude ($62 - 248 \mu\text{m}$) und -frequenz ($1 - 2000 \text{ Hz}$). Darüber hinaus ist die Korrektur hardwarebedingter Zeitverzögerungen zwischen den Rückkopplungssignalen und den Referenzsignalen essentiell für diese Genauigkeit.

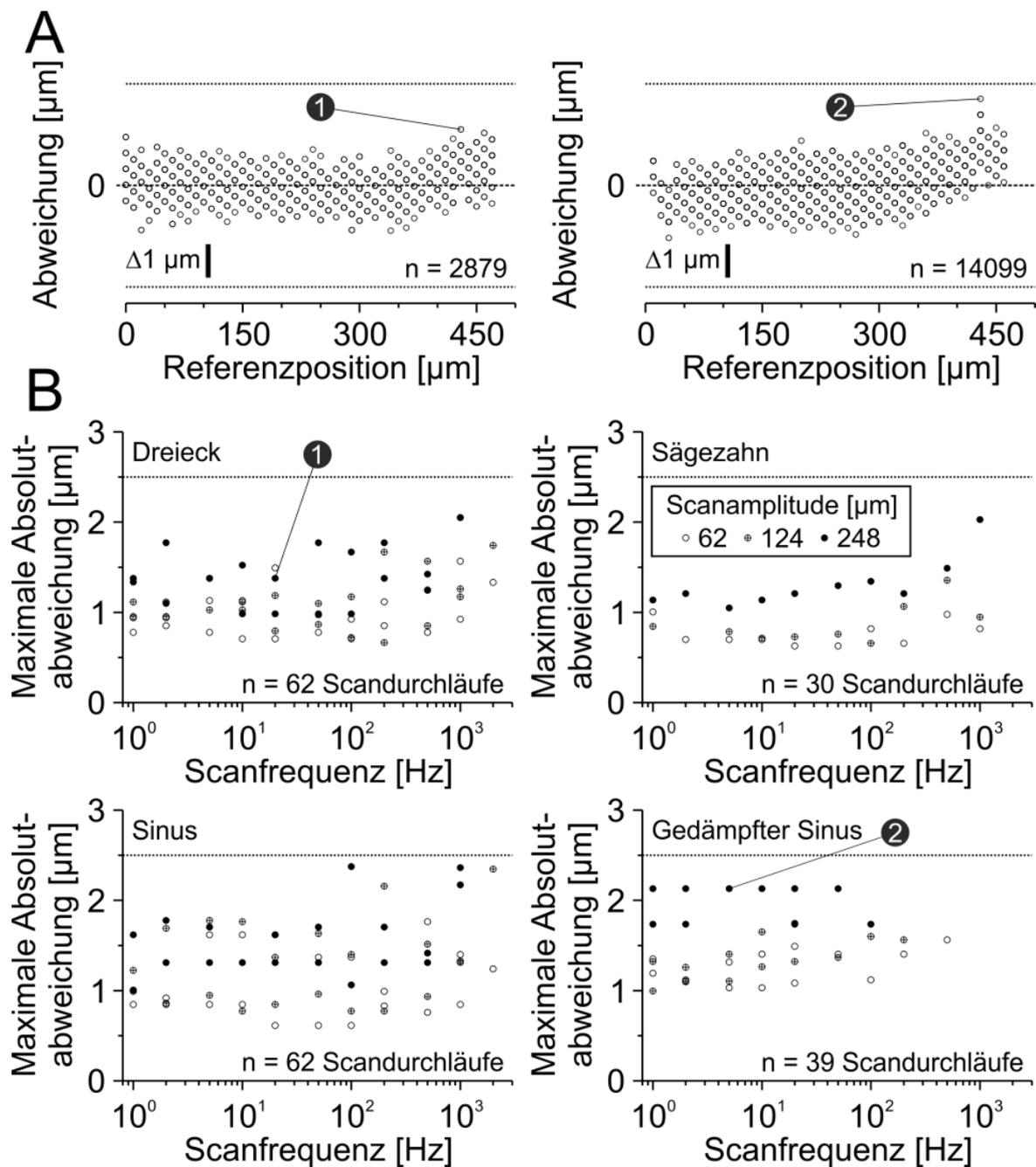


Abbildung 4.5: Die Positioniergenauigkeit der Y-Achse ist kleiner als $\pm 2,5 \mu\text{m}$. A – Beispiele von zwei verschiedenen Scandurchläufen. Links: dreieckförmiger Scan, $248 \mu\text{m}$ Scanamplitude, 20 Hz Scanfrequenz. Rechts: gedämpfter Sinusscan, $248 \mu\text{m}$ Scanamplitude, 5 Hz Scanfrequenz. Man beachte, dass die maximalen Absolutabweichungen von jedem Scandurchlauf für das Grenzwertkriterium in B verwendet wurden (Marker 1 und 2). Gestrichelte Linien entsprechen einer Abweichung von $\pm 0 \mu\text{m}$. Jedes Symbol repräsentiert eine analysierte Position. B – Zusammenfassung der Ergebnisse für jeden Scantyp. Jedes Symbol repräsentiert die maximale Absolutabweichung aus einem einzelnen Scandurchlauf. Man beachte, dass Datenpunkte verdeckt übereinander liegen. Gepunktete Linien entsprechen einer Abweichungsgrenze von $\pm 2,5 \mu\text{m}$. Modifiziert nach [76].

Axiale Positioniergenauigkeit

In einem nächsten Schritt erfolgte die Bestimmung der Genauigkeit von axialen Rückkopplungssignalen. Einen maßgeblichen Nachteil bei der Verwendung einer

mechanischen Fokussiereinrichtung stellt die zu erwartende Ungenauigkeit unter hohen Beschleunigungen der Last dar. Im vorliegenden Fall wurde ein Piezo-Aktor verwendet, dessen Last (Objektiv) einseitig an einen Hebelarm befestigt ist, der senkrecht zur optischen Achse steht. Es sind also hauptsächlich Positionsabweichungen aufgrund eines wirkenden Drehmoments zu erwarten, dass die Last dynamisch gegen die optische Achse kippt. Die axiale Positioniergenauigkeit sollte demnach von der Masse und der Geometrie der Last abhängig sein.

Um Beschleunigungen des Aktors zu minimieren, werden bei Spiralscans sinusförmige Fokussier-Steuersignale verwendet [7]. Daher wurden Steuersignale des Typs Sinus mit Amplituden von 0,625 – 5 V (kalibriert: 25 – 200 μm , Abbildung 4.3C) und Frequenzen zwischen 1 – 20 Hz entlang der Z-Achse getestet. Die Positionsabweichungen wurden jeweils von 50 gemittelten Perioden eines Scandurchlaufs ermittelt (Abbildung 4.6). Bis zu einer Frequenz von 2 Hz zeigte keiner der an einem regulären Objektiv-Phantom (Kapitel 3.6.3) getesteten Scans Absolutabweichungen größer 2,5 μm (maximale Absolutabweichung: 2,21 μm ; $n = 156$ Scandurchläufe, reguläres Objektiv-Phantom in Abbildung 4.6B). Nach Erhöhung von Amplitude und Frequenz stiegen auch die maximalen Absolutabweichungen auf bis zu 15 μm an ($n = 260$ Scandurchläufe, reguläres Objektiv-Phantom). Zusätzlich konnte eine Hysterese bei hohen Beschleunigungen beobachtet werden (Scanfrequenz: 20 Hz, Scanamplitude: 200 μm , Abbildung 4.6A), welches eine Abhängigkeit der Absolutabweichungen von der Referenztrajektorie (Amplitude und Richtung) impliziert. Zusammenfassend belegen die Daten einen Einfluss der Last-Beschleunigung auf die axiale Positioniergenauigkeit.

In einem nächsten Schritt wurden die Messungen mit einer minimalen Last des Piezo-Aktors wiederholt, um den Einfluss der Objektivmasse zu untersuchen. Interessanterweise waren die Abweichungen gegenüber dem regulären Phantom erhöht, mit Ausnahme von Scans im Bereich von 50 – 200 μm bei einer Frequenz von 20 Hz („ohne“ *versus* „reguläres“ Objektiv-Phantom in Abbildung 4.6B und Abbildung 4.7). Letztere Daten belegen einen Einfluss der Objektivmasse auf die axiale Positioniergenauigkeit.

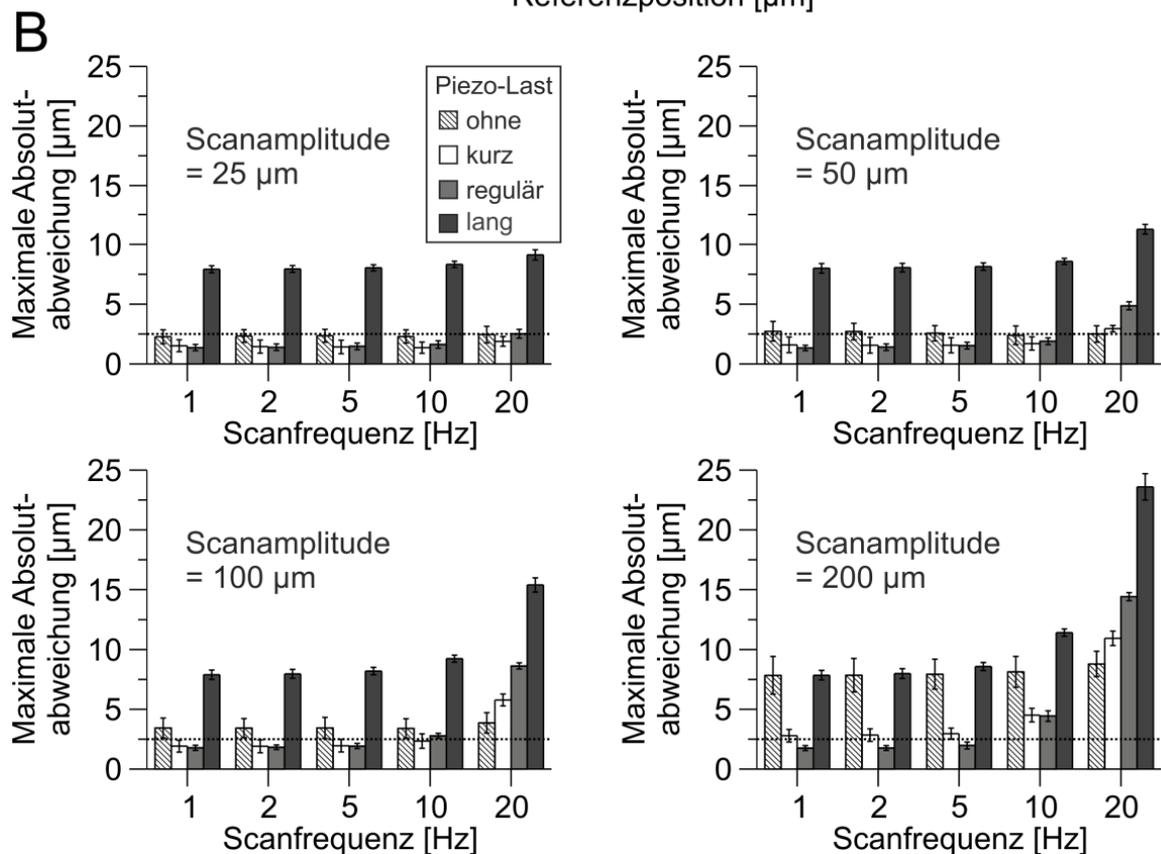
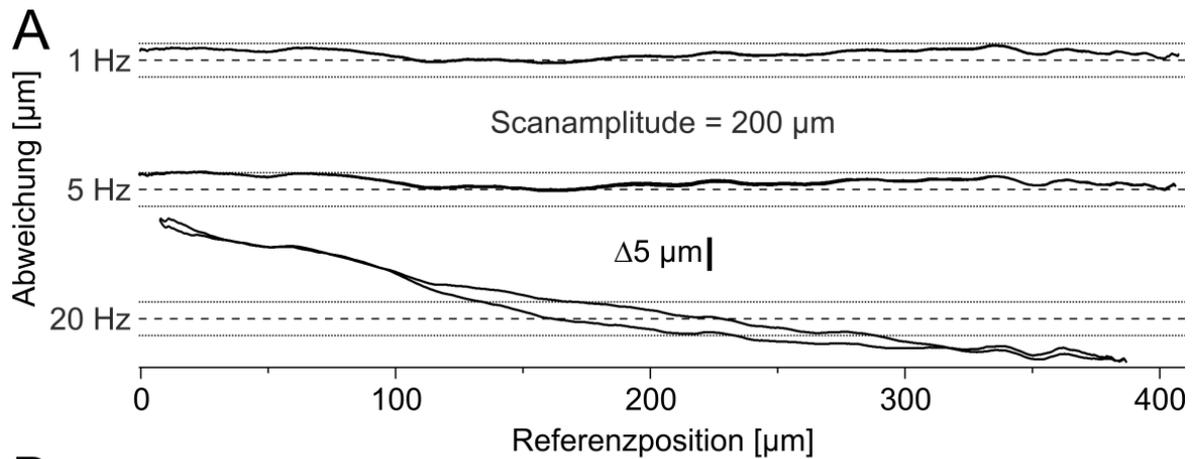


Abbildung 4.6: Die axiale Positioniergenauigkeit ist abhängig von Scanparametern und Objektiv-eigenschaften. A – Positionsabweichungen von drei Scandurchläufen mit unterschiedlichen Scanfrequenzen bei gleicher Amplitude von 200 μm (Sinus, reguläres Objektiv-Phantom). Eine Hysterese tritt bei einer Scanfrequenz von 20 Hz auf, wohingegen die Abweichungen bei 1 Hz und 5 Hz in beiden Bewegungsrichtungen ähnlich sind. Gestrichelte Linien entsprechen einer Abweichung von $\pm 0 \mu\text{m}$. B – Maximale Absoluteabweichungen von vier Objektiv-Phantomen (Piezo-Last), bei unterschiedlichen Scanamplituden und -frequenzen ($n = 13$ Scandurchläufe). Gepunktete Linien entsprechen einer Abweichungsgrenze von $\pm 2,5 \mu\text{m}$. Angaben in Mittelwert \pm SD. Modifiziert nach [76].

Um in einem weiteren Schritt den Einfluss des Massenschwerpunktes unabhängig von der Masse selbst zu untersuchen, wurden zwei weitere Objektiv-Phantome getestet deren Masse der des regulären Phantoms entsprechen und deren Länge halb bzw. doppelt so groß war (kurzes und langes Objektiv-Phantom). Wohingegen das kurze Phantom vergleichbare und kleinere Positionsabweichungen aufwies (kurzes versus reguläres

Objektiv-Phantom in Abbildung 4.6B) lagen alle Scandurchläufe unter Verwendung des langen Phantoms oberhalb der 2,5µm-Toleranzgrenze (maximale Absolutabweichung: $\geq 7,22 \mu\text{m}$; $n = 260$ Scandurchläufe). Vergleicht man die maximalen Absolutabweichungen aller Phantome unter maximaler Beschleunigung („ohne“: $8,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$, „kurz“: $10,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$, „regulär“: $14,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$, „lang“: $23,6 \pm 1,1 \mu\text{m}$, Amplitude: $200 \mu\text{m}$, Frequenz: 20 Hz , Mittelwert \pm SD, $n = 13$ Scandurchläufe), ergeben sich größere Positionsabweichungen mit steigender Masse und Länge des Phantoms [Einweg Varianzanalyse (ANOVA): $P < 0,001$; $n = 13$ Scandurchläufe, *post hoc* Bonferroni paarweise Vergleiche: „regulär“ – „ohne“: $P < 0,001$; „regulär“ – „kurz“: $P < 0,001$; „regulär“ – „lang“: $P < 0,001$; Abbildung 4.7].

Zusammenfassend wird die axiale Positioniergenauigkeit der Piezo-Fokussiereinrichtung von der Beschleunigung des Objektivs bestimmt, sodass der Einfluss von Masse und Geometrie für jeden Objektivtyp und jede Scankonfiguration vor Anwendung eines Scans getestet werden sollte.

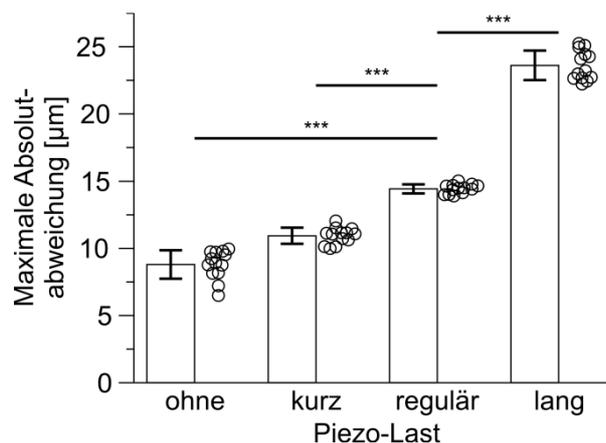


Abbildung 4.7: Maximale Absolutabweichungen von vier Objektiv-Phantomen bei einer sinusförmigen Bewegung entlang der Z-Achse mit einer Amplitude von $200 \mu\text{m}$ und einer Frequenz von 20 Hz . Die Abweichungen sind von der Objektivmasse und -länge abhängig (ANOVA: $P < 0,001$; $n = 13$ Scandurchläufe dargestellt als Kreise; *post hoc* Bonferroni paarweise Vergleiche: „regulär“ – „ohne“: $P < 0,001$; „regulär“ – „kurz“: $P < 0,001$; „regulär“ – „lang“: $P < 0,001$). *** $P < 0,001$. Angaben in Mittelwert \pm SD. Modifiziert nach [76].

Elektromagnetische Wechselwirkungen

Zur Identifikation elektromagnetischer Wechselwirkungen zwischen den drei Positioniereinrichtungen wurden Änderungen der Rückkopplungssignale unter Ansteuerung aller Achsen (X-, Y- und Z-Achse) gegen die Ansteuerung einzelner Achsen (X-, Y- oder Z-Achse) untersucht (paarweise Differenzbildung aller Abtastwerte über 50 Scanperioden mit anschließender Berechnung der maximalen Absolutabweichung je Signalpaar). Zwei Scantrajektorien, deren Positioniergenauigkeit in den vorangestellten lateralen und axialen Untersuchungen bestätigt werden konnte, wurden dabei getestet: 1) Spiralscan maximaler Scanfrequenz (Scan 1): $125 \times 125 \times 50 \mu\text{m}^3$, 20 Hz und 2) Spiralscan

maximaler Scanamplitude (Scan 2): $500 \times 500 \times 400 \mu\text{m}^3$, 5 Hz. In insgesamt 30 Vergleichen je Achse und Scantyp konnten lediglich zwei Ausreißer detektiert werden (Y-Achse, Scan 2; Z-Achse, Scan 2; Abbildung 4.8). Diese konnten als elektrische Artefakte in dem Y- bzw. Z-Rückkopplungssignal jeweils eines Scandurchlaufes mit nur einer angesteuerten Achse identifiziert werden, welches eine Wechselwirkung zwischen den Achsen ausschließt. Die Dauer der elektrischen Störungen betragen $90 \mu\text{s}$ und $800 \mu\text{s}$. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass keine signifikante elektromagnetische Wechselwirkung zwischen den Galvanometern und dem Piezo-Aktor besteht.

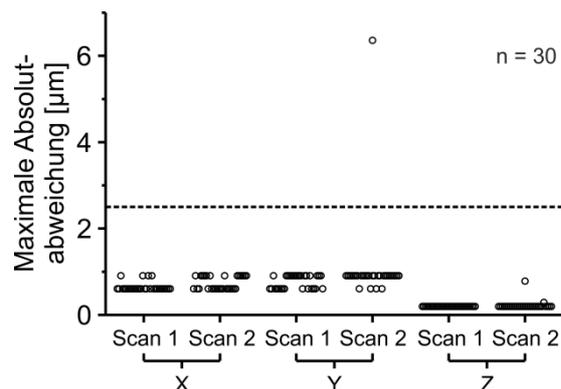


Abbildung 4.8: Elektromagnetische Wechselwirkungen zwischen Galvanometern und Piezo-Aktor. Die aufgetragenen Abweichungen resultieren jeweils aus der maximalen Absolutabweichung von zwei Scandurchläufen (paarweise Differenzbildung aller Abtastwerte über 50 Scanperioden). Im jeweils ersten Durchlauf wurden alle Achsen regulär angesteuert. Im jeweils zweiten Durchlauf wurde nur eine Achse (X-, Y- oder Z-Achse) angesteuert. Scan 1: Spiralscan, $125 \times 125 \times 50 \mu\text{m}^3$, 20 Hz. Scan 2: Spiralscan, $500 \times 500 \times 400 \mu\text{m}^3$, 5 Hz.

Festlegung finaler Scanparameter

Nach der theoretischen Optimierung der Spiralscans in Kapitel 3.5 blieb die Frage offen, ob die ausgewählten Scans eine der Applikation entsprechend hohe Positioniergenauigkeit aufweisen. Da die lateralen Rückkopplungssignale für alle getesteten Fälle hinreichend genau sind, begrenzt lediglich die Z-Komponente den Einsatz spezifischer Scan-Vorschriften. Die positionsabhängigen Abweichungen von jeweils 13 Scandurchläufen für eine Amplitude A_z von $100 \mu\text{m}$ bzw. $50 \mu\text{m}$ sind in Abbildung 4.9 dargestellt (reguläres Objektiv-Phantom, $f_{scan} = 10 \text{ Hz}$). Aus den Daten geht hervor, dass für einen Scan mit $A_z = 100 \mu\text{m}$ im Bereich der Referenzpositionen 0 bis $75 \mu\text{m}$, bzw. 150 bis $175 \mu\text{m}$ hohe Positionsabweichungen auftreten können, die wiederum die Genauigkeit der lateralen Positionsbestimmung beeinflussen (Hebelarm). Im Mittel sind die Abweichungen jedoch unterhalb der gegebenen Toleranzgrenze. Zudem ist der Scan für die Auswertung von Volumenelementen einer Kantenlänge von $l_{Voxel} = 25 \mu\text{m}$ vorgesehen, sodass die ursprüngliche Genauigkeitsanforderung von $\pm 2,5 \mu\text{m}$ bei geforderter Einzelzellauflösung hier erhöht werden könnte. Der Einsatz eines Scans mit $A_z = 100 \mu\text{m}$ erscheint für den Voxel-basierten Ansatz als vertretbar. Der für die Erfassung von Einzelzellaktivität

optimierte Scan erweist sich aufgrund der reduzierten Amplitude A_z als ganzheitlich positionsgenau und einsetzbar (Abbildung 4.9B). Vor der Anwendung beider Scans muss zunächst noch deren Hardwarekompatibilität und Langzeitstabilität geprüft werden.

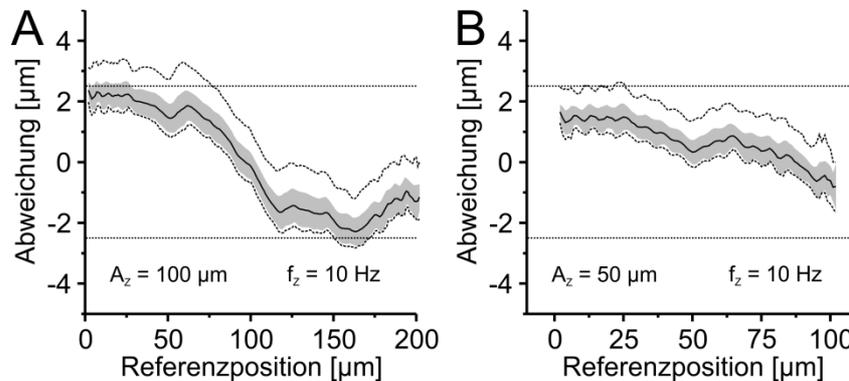


Abbildung 4.9: Positionsabweichungen entlang der Z-Achse in Abhängigkeit von der Referenzposition und der Scanamplitude A_z (reguläres Objektiv-Phantom). A – $A_z = 100 \mu\text{m}$, B – $A_z = 50 \mu\text{m}$. Durchgezogene schwarze Linien und graue Flächen repräsentieren Mittelwert \pm SD. Gestrichelte Linien entsprechen den maximalen Abweichungen aus 13 Scandurchläufen. Gepunktete Linien markieren eine Toleranzgrenze von $\pm 2,5 \mu\text{m}$.

Hardwarekompatibilität und Langzeitstabilität der Positionssignale

Die Positions-Rückkopplungssignale konnten, wie zuvor beschrieben, mittels externer Referenzpositionen validiert werden. Im Folgenden soll die Langzeitstabilität der vorgesehenen Scans anhand von Änderungen dieser Positionssignale über die Zeit quantifiziert werden. Darüber hinaus geben die Rückkopplungssignale der beiden Galvanometer Aufschluss über die Hardwarekompatibilität eines Scans. Konkret würde eine fehlerhafte Ansteuerung bzw. eine Überlastung dazu führen, dass die Galvanometer-Steuereinheit die Spannungsversorgung unterbricht. In diesem Fall entstünde ein messbares Nachschwingen bis der Rotor in seiner Nullposition stoppt. Dieser Zustand konnte in keinem Scandurchlauf der optimierten Scans festgestellt werden ($n = 239$, Dauer der Scandurchläufe ≥ 2 min).

Weiterhin muss jedoch sichergestellt werden, dass die Positionierung 1) während einer Aktivitätsmessung von typischerweise zwei Minuten stabil (Grenzwert: $4,3 \mu\text{m}$ je Raumposition, entspricht einer Überlagerung einer maximalen Absolutabweichung von $2,5 \mu\text{m}$ je Achse) bleibt und 2) auch über aufeinander folgende Scandurchläufe stabil bleibt. Zunächst wurden alle 80000 Scanpunkte bzw. Raumpositionen von 140 Voxel-scans und 95 Einzelzellscans auf deren Änderung der drei Rückkopplungssignale über eine Scandauer von 2 min untersucht. In 10 von 140 und 10 von 95 Scans konnten absolute Positionsabweichungen $> 4,3 \mu\text{m}$ identifiziert werden. Alle detektierten Abweichungen konnten aufgrund ihrer Kinetik und ihrer raumzeitlichen Abgrenzung als elektromagnetische Artefakte klassifiziert und damit von tatsächlichen Positionsabweichungen unterschieden werden (Abbildung 4.10, sowie Abschnitt

Elektromagnetische Wechselwirkungen). Jeweils von 1150 Scanperioden wurde diejenige mit der größten Absolutabweichung verworfen, wodurch der geforderte Grenzwert eingehalten werden konnte (Abbildung 4.10E). Des Weiteren erwiesen sich die Rückkopplungssignale als stabil zwischen den Scandurchläufen (Festlegung der Referenz-Raumpositionen anhand der Positionen der ersten Periode des ersten Scans einer Scanserie). Darüber hinaus wurden die Daten der Voxel- und Einzelzellscans an jeweils vier unterschiedlichen Tagen erhoben. Keiner der 140 bzw. 95 Scans wies in jeweils 1149 Perioden absolute Positionsabweichungen $>4,3 \mu\text{m}$ auf. Referenz-Raumpositionen wurden anhand des ersten Scans des ersten Tages festgelegt. Auch unter Verwendung längerer Scanintervalle (10 min) erwiesen sich die Positionssignale als stabil (Abbildung 4.10E). Da die mittels Spiralscan aufgezeichneten Positionssignale mit denen der Z-Stapel zur Positionsrekonstruktion abgeglichen werden müssen, wurde in einem letzten Schritt geprüft, ob diese ebenfalls stabil sind. Auch dies konnte anhand von sechs analysierten Z-Stapeln bestätigt werden (Abbildung 4.10E).

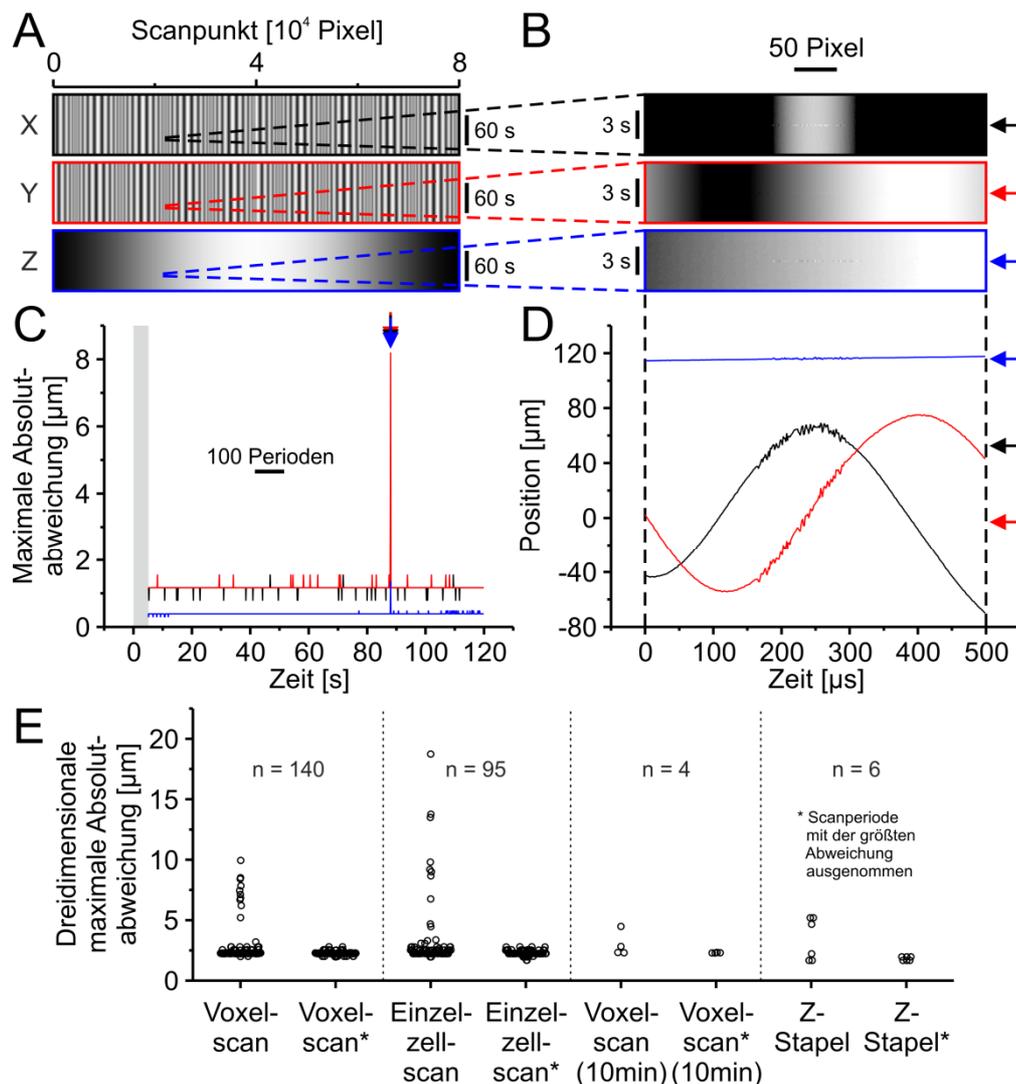


Abbildung 4.10: Stabilität der rückgekoppelten Positionssignale. A – Beispiel der Positionsdaten eines Voxel-scans über zwei Minuten. Lineare Skalierung der Intensitäten: $-250 \mu\text{m} / -250 \mu\text{m} / 0 \mu\text{m}$ (Schwarz,

X / Y / Z) bis 250 μm / 250 μm / 200 μm (Weiß, X / Y / Z). B – Vergrößerung aus A zeigt eine isolierte Positionsabweichung in allen drei Positionssignalen. Lineare Skalierung der Intensitäten: 50 μm / 50 μm / 114 μm (Schwarz, X / Y / Z) bis 70 μm / 70 μm / 117 μm (Weiß, X / Y / Z). C – Signifikante Positionsabweichungen treten nur in einzelnen Perioden eines Scans auf (Pfeile). D – Positionsabweichungen sind raumzeitlich begrenzt. Der Zeitverlauf ist synchron zu einer Periode (Pfeile) aus B bzw. C dargestellt. E – Quantifizierung. Signifikante Positionsabweichungen in vereinzelt Scandurchläufen (Dauer: 2 min sofern nicht abweichend beschriftet) beschränken sich auf einzelne Perioden.

Zusammenfassend sind die Rückkopplungssignale für die getesteten Spiralscans und Z-Stapel hochgradig stabil (dreidimensionale maximale Absolutabweichung aller getesteten Scans: 2,8 μm ; n = 245 Scandurchläufe; Artefakte ausgeschlossen). Sind die Positionsdaten einer spezifischen Scanvorschrift einmalig bekannt, können diese auf alle Scandurchläufe unter der gleichen Vorschrift als Positionskalibrierung angewendet werden.

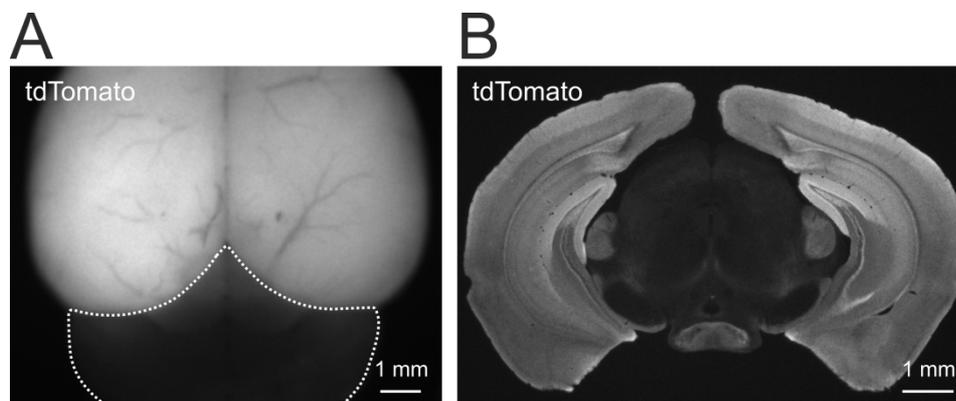


Abbildung 4.11: tdTomato-Fluoreszenz der $\text{Emx1}^{\text{IREScre}}:\text{Ai14}$ Mauslinie. A – *Ex vivo* Weitfeld-Fluoreszenzbilder eines isolierten Hirns von einer $\text{Emx1}^{\text{IREScre}}:\text{Ai14}$ Maus. Im Kleinhirn und dem Hirnstamm wurde nahezu keine tdTomato-Fluoreszenz detektiert (gepunktete Linie). B – Histologischer Schnitt einschließlich des visuellen Kortex einer $\text{Emx1}^{\text{IREScre}}:\text{Ai14}$ Maus. Man beachte die starke Ausprägung der tdTomato-Fluoreszenz im Neo- und Allokokortex. Modifiziert nach [82].

4.2 Netzwerkaktivität im visuellen Kortex der Maus *in vivo*

4.2.1 Identifikation glutamaterger und GABAerger Neurone

Für eine *in vivo* Identifikation glutamaterger und GABAerger Neuronen wurden $\text{Emx1}^{\text{IREScre}}$ Mäuse [78] mit einem Ai14 Cre-Reporterstamm [80] gekreuzt, in dem das rot fluoreszierende Protein tdTomato unter einer Cre-vermittelten Rekombination exprimiert wird [82]. Aus Arbeiten von Gorski und Kollegen geht hervor, dass die Cre-Expression in $\text{Emx1}^{\text{IREScre}}$ Mäusen hauptsächlich in kortikalen Arealen, nicht aber (bzw. schwach) in subkortikalen Regionen ausgeprägt ist [78]. Damit übereinstimmend wiesen Weitfeld-Epifluoreszenzmessungen isolierter Gehirne (Abbildung 4.11A) und aldehydfixierter histologischer Hirnschnitte (Abbildung 4.11B) von $\text{Emx1}^{\text{IREScre}}:\text{Ai14}$ Mäusen eine

ausgedehnte tdTomato-Expression im Neokortex auf, während im Kleinhirn und Hirnstamm nahezu keine tdTomato-Fluoreszenz vorhanden war. Anschließend erfolgte die Untersuchung der tdTomato-Expression *in vivo* unter Verwendung der Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie.

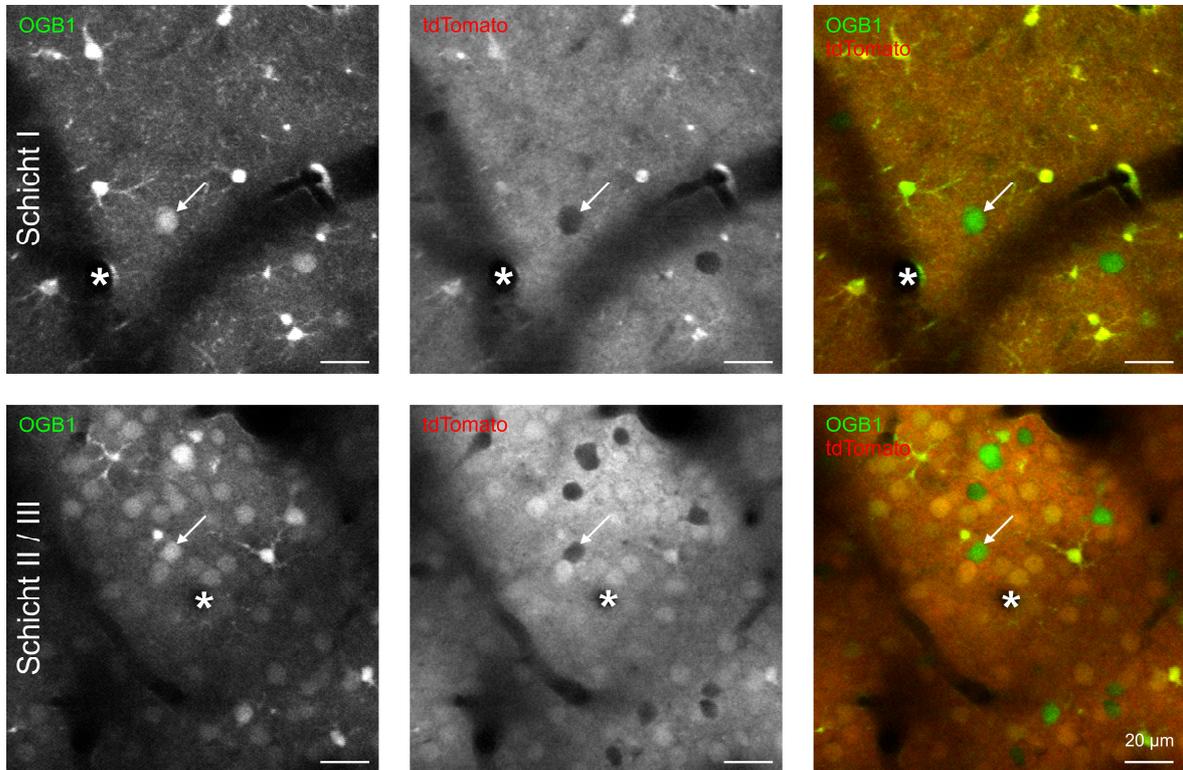


Abbildung 4.12: Unterscheidung tdTomato-negativer und tdTomato-positiver Zellen *in vivo*. Dargestellt sind Zweiphotonenfluoreszenzbilder der kortikalen Schicht I (oben) und Schicht II/III (unten). Die Pfeile zeigen auf eine tdTomato-negative, aber OGB1-positive Zelle. Sterne markieren quer-geschnittene Blutgefäße. Modifiziert nach [82].

Zur Erfassung neuronaler Netzwerkaktivität *in vivo* wurden die Zellen der $Emx1^{IREScre:Ai14}$ Mäuse zusätzlich in der Zielregion mit OGB1-beladen (Kapitel 3.3). Zwei Klassen OGB1-gefärbter Zellsomata konnten auf Grundlage der tdTomato-Färbung identifiziert werden: 1) Somata, die zusätzlich eine tdTomato-Fluoreszenz aufwiesen und 2) Somata, in denen offensichtlich keine tdTomato-Expression vorlag (Abbildung 4.12). Letztere waren leicht durch den negativen Kontrast zu dem umgebenden Neuropil zu identifizieren. Weiterreichende Auswertungen zeigten, dass der Hauptanteil tdTomato-positiver Zellen in kortikaler Schicht I vermutlich Astrozyten waren (gestützt durch morphologische Merkmale und einer vergleichbar hohen OGB1-Intensität [66,84], Abbildung 4.12 oben), wohingegen die meisten Schicht II/III tdTomato-positiven Zellen eine neuronale Morphologie aufwiesen (Abbildung 4.12 unten). Anschließend erfolgten Analysen der tdTomato-Fluoreszenzintensitäten von OGB1-gefärbten Somata in Z-Stapeln (ausgehend von der Pia Mater bis zu einer fokalen Tiefe von 300 µm), um statistisch festzustellen, ob tdTomato-positive und -negative Zellen einer bestimmten Zellpopulation angehören

(Kapitel 3.8.4). In fünf von fünf untersuchten Tieren zeigten die FI(tdTomato) Verteilungen zwei eindeutig unterscheidbare Maxima. In jedem der fünf Fälle hatte eine Regressionsanalyse der Verteilungen basierend auf der Summe von zwei Gaußfunktionen ein höheres Bestimmtheitsmaß als eine Analyse mit einer einzelnen Gaußfunktion ($P < 0,001$, F-test). In zwei von fünf Fällen konnte sogar eine zweite tdTomato-positive Population mit einem höheren FI(tdTomato) Mittelwert festgestellt werden, von der die meisten Zellen als vermutliche kortikale Schicht I Astrozyten klassifiziert wurden. In letzteren beiden Fällen war die Regressionsfunktion aus der Summe von drei Gaußfunktionen qualitativ höherwertig als die mit lediglich zwei Gaußfunktionen ($P < 0,01$, F-test). Der optimierte Grenzwert für die tdTomato-Klassifikation lag nahe $FI(tdTomato) = 0$ ($-0,01 \pm 0,01$, $n = 5$ Mäuse). Auf der Basis der angepassten Gaußfunktionen wurden $2,1\% \pm 0,5\%$ der tdTomato-negativen Population falsch als tdTomato-positive Zellen klassifiziert (Reichweite: 0,5% – 3,0% in 5 Mäusen). Der Anteil falsch tdTomato-negativer Zellen war noch geringer ($0,3\% \pm 0,1\%$, Reichweite: 0,1% – 0,6% in 5 Mäusen). Um eine allgemein gültige Klassifikation ableiten zu können, wurden anschließend die Daten aller fünf untersuchten Tiere zusammengefasst ($n = 1950$ Zellen von 5 Mäusen, Abbildung 4.13). Auf Basis eines optimierten FI(tdTomato) Grenzwertes von $-0,005$ als Klassifikator ergaben sich eine Spezifität von 98,2% und eine Sensitivität von 99,8%. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass die FI(tdTomato) Verteilung nicht für jeden Einzelfall bestimmt werden muss. Unter Verwendung des oben genannten Grenzwertkriteriums wurden rund 16,4% aller OGB1-gefärbten Zellen als tdTomato-negativ klassifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zellen der oberen Schichten des primären visuellen Kortex mit einer hohen Zuverlässigkeit unter Verwendung des tdTomato-Klassifikators in zwei eindeutige Zellpopulationen eingeteilt werden können.

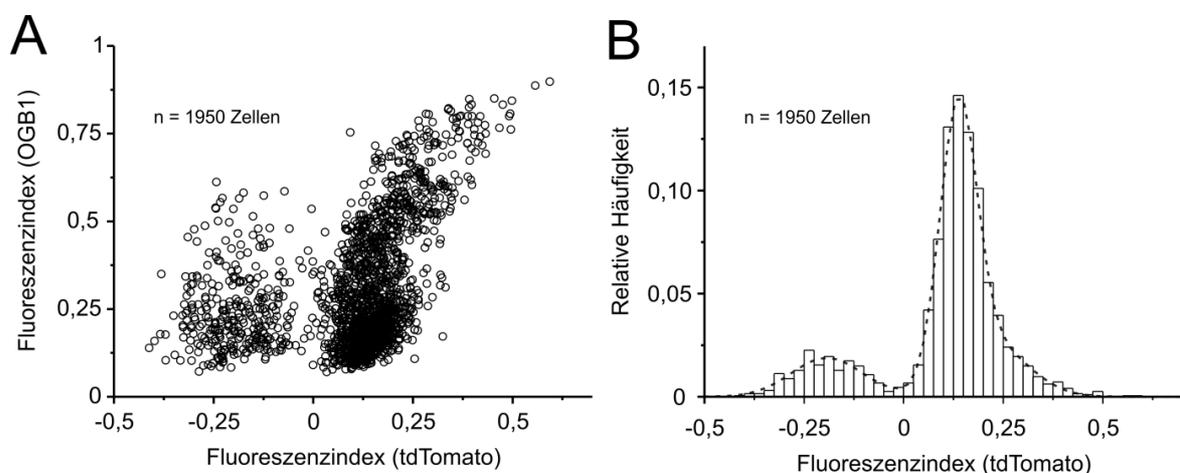


Abbildung 4.13: Klassifikation tdTomato-negativer und tdTomato-positiver Zellen *in vivo* mittels Fluoreszenzindex FI. A – Fluoreszenzindizes für OGB1 aufgetragen gegen die Fluoreszenzindizes für tdTomato (zusammengefasste Daten von fünf Tieren). Es sind deutlich zwei voneinander verschiedene

Zellpopulationen zu erkennen. Jedes Symbol repräsentiert eine einzelne Zelle. B – Verteilung des Fluoreszenzindex für tdTomato (zusammengefasste Daten von fünf Tieren). Die gestrichelte Linie repräsentiert eine Regressionsfunktion aus der Summe von drei Gaußfunktionen. Modifiziert nach [82].

Aus Arbeiten von Gorski und Kollegen ist bekannt, dass EMX1 nur von glutamatergen Neuronen (und Gliazellen), nicht aber von GABAergen Neuronen exprimiert wird [78]. Diese Daten führen zu der Annahme, dass tdTomato-negative Zellen die Population der GABAergen Neurone repräsentieren. Um diese These zu überprüfen, wurden Daten immunhistochemischer Schnittpräparate von $Emx1^{IREScre:Ai14}$ Mäusen mit intrinsischer tdTomato-Färbung und jeweils zwei weiteren Fluoreszenzmarkern analysiert. Analog zu den *in vivo* Experimenten erfolgte die Auswertung innerhalb der oberen 300 μm des visuellen Kortex. Zunächst wurden die $FI(tdTomato)$ von NeuN-positiven Zellen (Schnittfärbung: neuronaler Marker NeuN, tdTomato und Zellkernmarker DAPI) berechnet (Abbildung 4.14A,D). Die resultierenden $FI(tdTomato)$ wiesen eine eindeutig bimodale Verteilung mit nahezu keiner Überschneidung auf (abgeschätzte Sensitivität und Spezifität: >99,6%, $n = 1678$ Zellen von 3 Mäusen, Abbildung 4.14D). Mit Hilfe einer Regressionsanalyse (Summe von zwei Gaußfunktionen) wurde ein Grenzwert von $FI(tdTomato) = -0,225$ festgelegt und zur weiteren Klassifikation in tdTomato-positive und -negative Zellen verwendet. Entsprechend waren 12,4% der NeuN-positiven Zellen tdTomato-negativ. Dabei konnten tdTomato-negative Zellen leichter vom Neuropil (Hintergrund) differenziert werden als tdTomato-positive Zellen. Eine Verschiebung der tdTomato-positiven Population in Richtung $FI(tdTomato) = 0$, verglichen zu den *in vivo* Daten, spiegelt diese Beobachtung wider (Abbildung 4.14A,D und Abbildung 4.13B). Um den Anteil GABAerger Neurone zu untersuchen, wurden Schnittpräparate mit einer GAD67 Färbung verwendet (Schnittfärbung: GABAerger Marker GAD67, tdTomato und DAPI). Die $FI(tdTomato)$ Verteilung GAD67-positiver Zellen war unimodal. Unter Verwendung des oben getroffenen Grenzwertkriteriums waren 98,0% der GAD67-positiven Zellen tdTomato-negativ ($n = 203$ Zellen von 3 Mäusen, Abbildung 4.14B,E). Um den Anteil von Astrozyten zu untersuchen wurden Schnittpräparate mit einer GFAP Färbung verwendet (Schnittfärbung: astrozytischer Marker GFAP, tdTomato und DAPI). 97,6% aller GFAP-positiven Astrozyten wurden als tdTomato-positiv klassifiziert ($n = 168$ Zellen von 3 Mäusen, Abbildung 4.14C,F). Im Anschluss wurde die Analyse umgekehrt, indem die Markerzugehörigkeit (NeuN, GAD67 und GFAP) tdTomato-negativer / DAPI-positiver Zellen bestimmt wurde. Offensichtliche Blutgefäße und Endothelzellen wurden dabei von der Analyse ausgeschlossen. 99,1% aller tdTomato-negativer / DAPI-positiver Zellen waren NeuN-positiv ($n = 225$ Zellen von 3 Mäusen) und damit neuronalem Ursprung. Zusätzlich waren 92,4% der tdTomato-negativen / DAPI-positiven Zellen GAD67-positiv ($n = 236$ Zellen von 3 Mäusen) und wurden auf dieser Grundlage als

GABAerge Neurone identifiziert. Letzterer Prozentsatz stellt wahrscheinlich eine Unterschätzung dar, da in Fällen einer mehrdeutigen Identifikation eine Zelle als GAD67-negativ klassifiziert wurde. Mit diesen Daten übereinstimmend gab es keine tdTomato-negative / DAPI-positive Zelle, die GFAP-positiv und damit glialen Ursprungs war (n = 314 Zellen von 3 Mäusen). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass tdTomato-negative Zellen hauptsächlich GABAerg sind, wohingegen glutamaterge und astrozytische Zellen der tdTomato-positiven Population angehören.

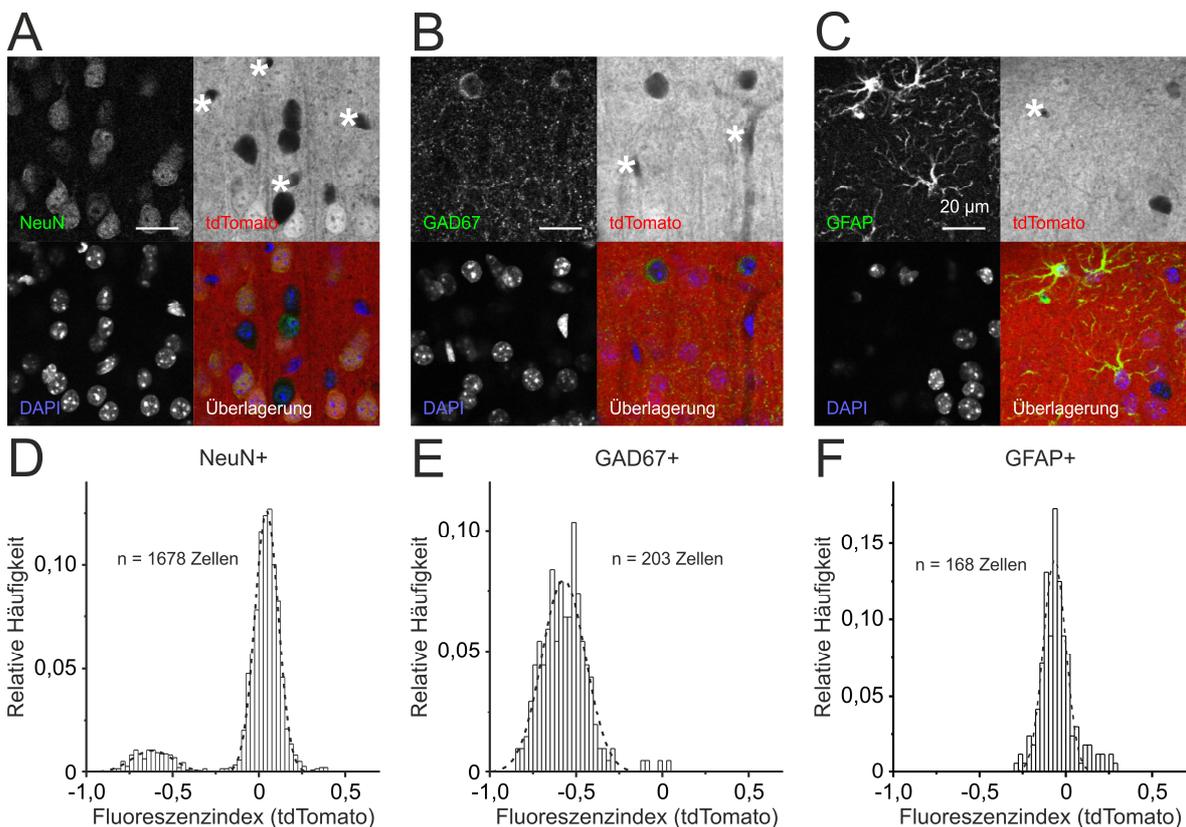


Abbildung 4.14: tdTomato-negative Zellen sind GABAerge Interneurone. A – C – Fluoreszenzbilder immunohistochemischer Hirnschnitte mit endogenem tdTomato, Zellkernmarker DAPI und neuronalem Marker NeuN (A), oder interneuronalem Marker GAD67 (B) oder Astrozytenmarker GFAP (C). Sterne markieren Blutgefäße / Endothelzellen. D – F – Verteilungen des tdTomato-Fluoreszenzindex für NeuN-positive (D), GAD67-positive (E) und GFAP-positive (F) Zellen (zusammengefasste Daten von 3 Tieren). Modifiziert nach [82].

Um die Anwendung der tdTomato-Expression für die *in vivo* Identifikation von glutamatergen und GABAergen Neurone während kortikaler Kalziummessungen zu validieren, wurde abschließend eine visuelle Stimulation an einer *Emx1^{IREScree}:Ai14* Maus durchgeführt. Spontane Kalziumtransienten konnten in den meisten durch tdTomato klassifizierte Neuronen beobachtet werden (Abbildung 4.15A,B). Die gemessene Spontanaktivität war ein Indikator für Zellvitalität und einer funktionellen Integration im kortikalen Netzwerk. Zusätzlich konnten somatische Kalziumtransienten durch visuelle Stimulation des kontralateralen Auges evoziert werden. Abbildung 4.15C,D demonstriert diese Beobachtung anhand von zwei Neuronen. Die Kalziumantworten des ersten, als

tdTomato-positiv klassifizierten Neurons, waren hochgradig richtungsselektiv, d.h. von der Richtung des präsentierten Stimulationsmusters abhängig. Das zweite Neuron wurde als GABAerg identifiziert und wies ein richtungsunabhängiges Antwortverhalten auf. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Arbeiten von Kerlin und Kollegen aus dem Jahr 2010 [8], die zeigten, dass alle Subtypen GABAerger Neurone im Gegensatz zu exzitatorischen Neuronen ein richtungsunabhängiges Antwortverhalten aufweisen.

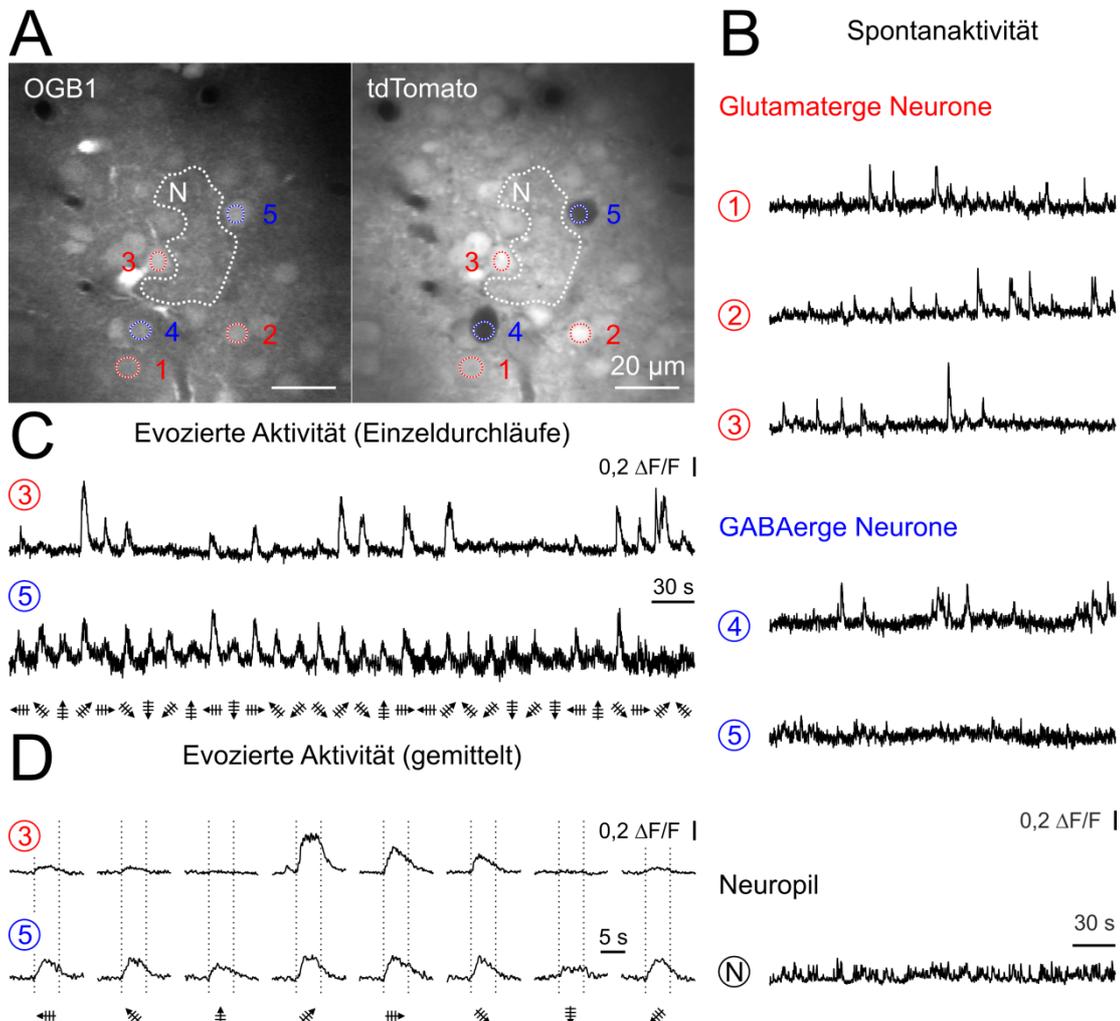


Abbildung 4.15: Spontane und visuell evozierte Kalziumtransienten in GABAergen und glutamatergen Schicht II/III Neuronen. A – OGB1- und tdTomato-Fluoreszenzbilder von Schicht II/III des primären visuellen Kortex einer $EMX1^{IREScre};Ai14$ Maus ($140 \mu\text{m}$ unterhalb der Pia Mater). Rote Zahlen und Umrandungen bezeichnen glutamaterge Neurone. Blaue Zahlen und Umrandungen markieren GABAerge Neurone. N repräsentiert eine lokal begrenzte Region von Neuropil (gepunktete Linie). B – Beispielspuren spontaner Kalziumtransienten von markierten Zellen und dem Neuropil aus (A). C – Beispielspuren visuell evozierter Kalziumtransienten in glutamatergen und GABAergen Neuronen. Orientierung und Richtung driftender Rechteckwellengitter zur visuellen Stimulation sind unter den Spuren vermerkt. Die Spuren entsprechen kontinuierlichen Aufzeichnungen. D – Gemittelte Kalziumtransienten der Zellen aus C als Resultat visueller Stimulation mit driftenden Rechteckwellengittern acht unterschiedlicher Stimulationsrichtungen ($n = 8$ Einzeldurchläufe je Richtung). Gepunktete Linien repräsentieren Beginn und Ende der Stimulationen. Modifiziert nach [82].

Zusammenfassend ermöglicht die EMX1^{IREScr}:Ai14 Mauslinie eine zuverlässige Identifikation von GABAergen und glutamatergen Neuronen im Rahmen von *in vivo* Kalziummessungen im visuellen Kortex der Maus. Erregende und hemmende Beiträge einzelner Neurone können damit für simultan abgeleitete neuronale Netzwerkaktivität direkt bestimmt werden.

4.2.2 Wirkung von GABA im neonatalen Kortex *in vivo*

GABA wirkt hauptsächlich depolarisierend auf Neurone der kortikalen Platte *in vivo*

Um zu untersuchen, ob GABA unreife kortikale Neurone *in vivo* depolarisiert, wurden zunächst 2PLSM-gestützte Patch-Clamp-Messungen an spontan atmenden, kopffixierten Mäusen 3 – 4 Tage nach der Geburt unter Isoflurananästhesie durchgeführt [85]. Alle Zellen, die in die Analysen einfließen, konnten aufgrund ihrer Fähigkeit Aktionspotentiale zu generieren als Neurone identifiziert werden. Zur Verifizierung einer effizienten Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren in den gemessenen Neuronen wurden sogenannte *whole-cell voltage-clamp* Messungen (Ganzzelleableitungen im Spannungsklemm-Modus) durchgeführt und gleichzeitig eine 100 mM GABA-Lösung aus einer epidural platzierten Glaspipette injiziert (5 s lange Druckapplikation, Pipettenwiderstand: 3 – 6 M Ω , nominaler Druck: 69 kPa, Verwendung eines automatisierten "Toohey Spritzer" Drucksystem). Die Applikation von GABA resultierte in einer ausgeprägten und vollständig reversiblen Reduktion des Membranwiderstandes von 749 ± 104 M Ω auf 46 ± 10 M Ω (Einweg-ANOVA mit wiederholten Messungen, Huynh-Feldt korrigiert: $P < 0,001$, $n = 9$ Neurone, $\eta_p^2 = 0,84$; Kontrolle *versus* GABA: $P < 0,001$, GABA *versus* Auswaschung: $P < 0,01$, Kontrolle *versus* Auswaschung: $P > 0,95$, *post hoc* Bonferroni-korrigierte, paarweise Vergleiche; Abbildung 4.16A,B). Demnach wurden Kanäle der Zellmembran reversibel geöffnet. In separaten Experimenten sollte die Frage beantwortet werden, ob die Anwendung des beschriebenen Applikationsprotokolls adäquat für eine Initiierung von Aktionspotentialen in Zellen der kortikalen Platte ist. Unter Verwendung von *cell-attached* Messungen in *loose-seal* ($n = 7$, Sealwiderstand ≤ 1 G Ω) und *tight-seal* ($n = 5$, Sealwiderstand > 1 G Ω) *voltage-clamp*-Konfiguration zeigte keines der getesteten Neurone Aktionsströme nach Druckapplikation von GABA, wohingegen alle Zellen Aktionsströme nach Druckapplikation von Glutamat aufwiesen (Abbildung 4.16C,D). Gleichbedeutend war GABA nicht in der Lage eine überschwellige Depolarisation in diesen Zellen auszulösen. Dementsprechend wurden alle anschließenden Experimente in Abwesenheit von Antagonisten spannungsgesteuerter Natriumkanäle durchgeführt. Um nichtinvasiv die Polarität der GABA-induzierten Änderungen des Membranpotentials zu untersuchen, erfolgten anschließend *cell-attached current-clamp*-Messungen (*cell-attached* Messungen im Stromklemm-Modus) [57,86]. In 10 von 15 gemessenen

Neuronen (n = 12 Zellen der kortikalen Platte, n = 3 Zellen der marginalen Zone) induzierte die Applikation von GABA eine monophasische Membrandepolarisation (Abbildung 4.16E,F). Eine Hyperpolarisation nach Applikation von GABA konnte in zwei Zellen beobachtet werden (eine dieser Zellen zeigte eine biphasische Antwort, die zunächst hyperpolarisierend und anschließend depolarisierend war; Zelle 10 in Abbildung 4.16F). Inkonsistente Antworten mit einer Tendenz in Richtung Depolarisation konnten in weiteren drei Zellen (Zellen 6, 11, und 12 in Abbildung 4.16F) detektiert werden. Die mittlere Potentialänderung betrug $+6,7 \pm 1,5$ mV und war signifikant von Null verschieden (n = 15 Zellen; $P < 0,001$; Einstichproben t-Test mit Nullhypothese: Mittelwert = 0). Folglich erweist sich GABA als hauptsächlich depolarisierend in Neuronen der kortikalen Platte am postnatalen Tag 3 – 4.

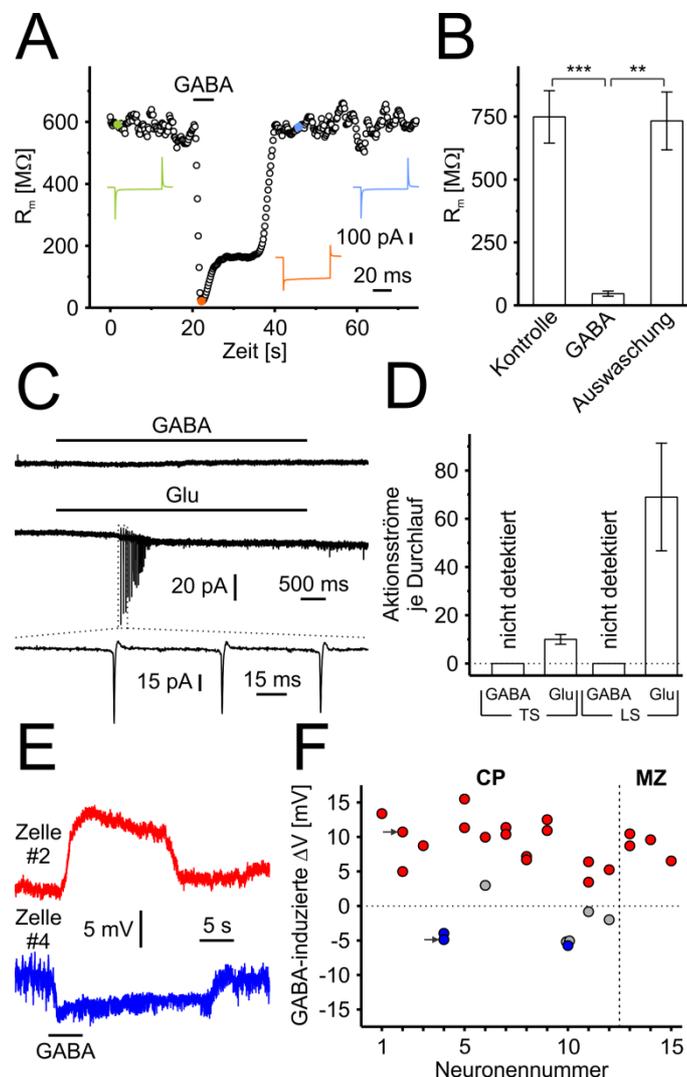


Abbildung 4.16: GABAerge Depolarisation in unreifen Neuronen *in vivo*. A – Beispielantwort des Membranwiderstandes (R_m , gleitender Mittelwert über fünf Durchläufe) nach Druckapplikation von GABA (100 mM, 5 s) mittels einer epiduralen Pipette. Die zugrundeliegende Messung der Stromstärke durch hyperpolarisierende Rechteckspannungen (-10 mV) ist in den kleinen, farbigen Graphen dargestellt. B – Quantifizierung (n = 9 Zellen, Einweg-ANOVA mit wiederholten Messungen, Huynh-Feldt korrigiert: $P < 0,001$; *post hoc* Bonferroni-korrigierte, paarweise Vergleiche: Kontrolle – GABA:

$P < 0,001$, GABA – Auswaschung: $P < 0,01$, Kontrolle – Auswaschung: $P > 0,95$). C – *Cell-attached voltage-clamp*-Messungen eines einzelnen Neurons, welches nacheinander GABA (oben, 100 mM, 5 s) und Glutamat (unten, 100 mM, 5 s) ausgesetzt wurde. D – Anzahl der Aktionsströme je Durchlauf in Antwort auf GABA und Glutamat in *tight-seal* (TS, $n = 5$) und *loose-seal* (LS, $n = 7$) Konfiguration. E – *Cell-attached current-clamp*-Messungen von zwei verschiedenen Neuronen belegen, dass eine Druckapplikation von GABA (100 mM, 5 s) eine Depolarisation (Zelle #2), respektive eine Hyperpolarisation (Zelle #4), hervorrufen kann. C, E – Von Ventilöffnungen / -schließungen hervorgerufene, elektromagnetische Artefakte wurden zur Verbesserung der Übersichtlichkeit abgeschnitten. F – Quantifizierung. Jede Zelle wurde in 1 – 3 Durchläufen getestet. Jedes Symbol repräsentiert einen einzelnen Durchlauf. Depolarisierende Antworten sind durch rote und hyperpolarisierende Antworten durch blaue Symbole gekennzeichnet. Grauschattierte Symbole repräsentieren Durchläufe mit Amplituden kleiner als 3SD Grundlinienrauschen. Pfeile zeigen auf die Durchläufe in E. CP – Kortikale Platte ($n = 12$ Zellen). MZ – Marginale Zone ($n = 3$ Zellen). B – ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Modifiziert nach [85].

Abwesenheit GABA-induzierter somatischer Kalziumtransienten

Bisherige Studien an neonatalen Hirnschnitten belegten wiederholt, dass eine Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren einen depolarisationsabhängigen Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration in unreifen Neuronen auslösen kann [45,57,87,88]. Unter Anwendung der Zweiphotonen-Kalzium-Bildgebung wurde als nächstes untersucht, ob der gleiche Mechanismus funktionell in der oberen kortikalen Platte *in vivo* vorhanden ist (Abbildung 4.17A,B). In einer initialen Experimentalserie wurde den Versuchstieren das analgetisch-sedativ wirkende Lachgas (N₂O) verabreicht, um 1) potentielle Komplikationen konventioneller Anästhetika (welche dafür bekannt sind die Generierung von Kalziumwellen in jungen Nagern zu beeinflussen [23,26]) oder 2) potentielle Komplikationen in nicht anästhesierten Tieren [89] zu umgehen. Im Einklang mit den Beobachtungen, dass GABA keine Aktionspotentiale initiiert (siehe vorheriger Abschnitt), löste eine Druckapplikation von GABA (100 mM) aus einer epidural positionierten Pipette in den meisten Glutamat-sensitiven Zellen keine somatischen Kalziumtransienten aus (Abbildung 4.17C). Am postnatalen Tag 3 – 4 betragen die GABA-induzierten relativen Änderungen der Fluoreszenz ($\Delta F/F_0$) $0,01 \pm 0,00$ ($P > 0,15$; $n = 204$ Zellen von 5 Mäusen; Einstichproben Wilcoxon Vorzeichenrangtest mit Nullhypothese: Median = 0; Abbildung 4.17D). Auf Basis eines $\Delta F/F_0$ -Grenzwertkriteriums wurde eine von 204 Zellen als GABA-reaktiv klassifiziert. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich unter Ausdehnung der Druckapplikationsdauer um einen Faktor von fünf (sechs von 204 Zellen wurden als GABA-reaktiv klassifiziert; $\Delta F/F_0 = 0,01 \pm 0,01$; $P > 0,95$; $n = 204$ Zellen; Einstichproben Wilcoxon Vorzeichenrangtest). Nach einer sich an die Experimente anschließenden Präparation von akuten Hirnschnitten der *in vivo* gefärbten Hirnregion erfolgte eine Wiederholung des Experiments unter *in vitro* Bedingungen (Abbildung 4.18A-F). Um die Unterschiede effektiver Konzentrationen von GABA und Glutamat im Bereich der

Zielzellen zu reduzieren wurden die Konzentrationen der Agonisten in der Applikationspipette auf 1 mM reduziert und die Applikationsintervalle entsprechend der Amplituden Glutamat-induzierter Kalziumtransienten *in vitro* an die Amplituden der *in vivo* Experimente angepasst ($\Delta F/F_0$ *in vivo*: $1,45 \pm 0,03$; n = 204 Zellen; $\Delta F/F_0$ *in vitro*: $1,46 \pm 0,02$; n = 407 Zellen von 10 Hirnschnitten und 5 Mäusen; $P > 0,45$; Mann-Whitney U-Test; Abbildung 4.18E,F). Im Einklang mit Daten von nativen Hirnschnitten [45,57] löste die Applikation von GABA signifikante Kalziumtransienten in Glutamat-sensitiven Zellen aus (GABA-induzierte $\Delta F/F_0$: $0,40 \pm 0,01$; $P < 0,001$; n = 407 Zellen von 10 Hirnschnitten und 5 Mäusen; Einstichproben Wilcoxon Vorzeichenrangtest mit Nullhypothese: Median = 0; Abbildung 4.18C-F). Nach Normalisierung auf die Amplituden der Glutamat-Antworten unterschieden sich die GABA-induzierten $\Delta F/F_0$ signifikant zwischen Zellen eines intakten Kortex und denen der Hirnschnitte (*in vivo*: $0,00 \pm 0,00$; n = 204 Zellen; *in vitro*: $0,29 \pm 0,01$; n = 407 Zellen; $P < 0,001$; Mann-Whitney U-Test). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass GABA *in vivo* spannungsgesteuerte Kalziumkanäle am postnatalen Tag 3 – 4 nicht effektiv aktiviert.

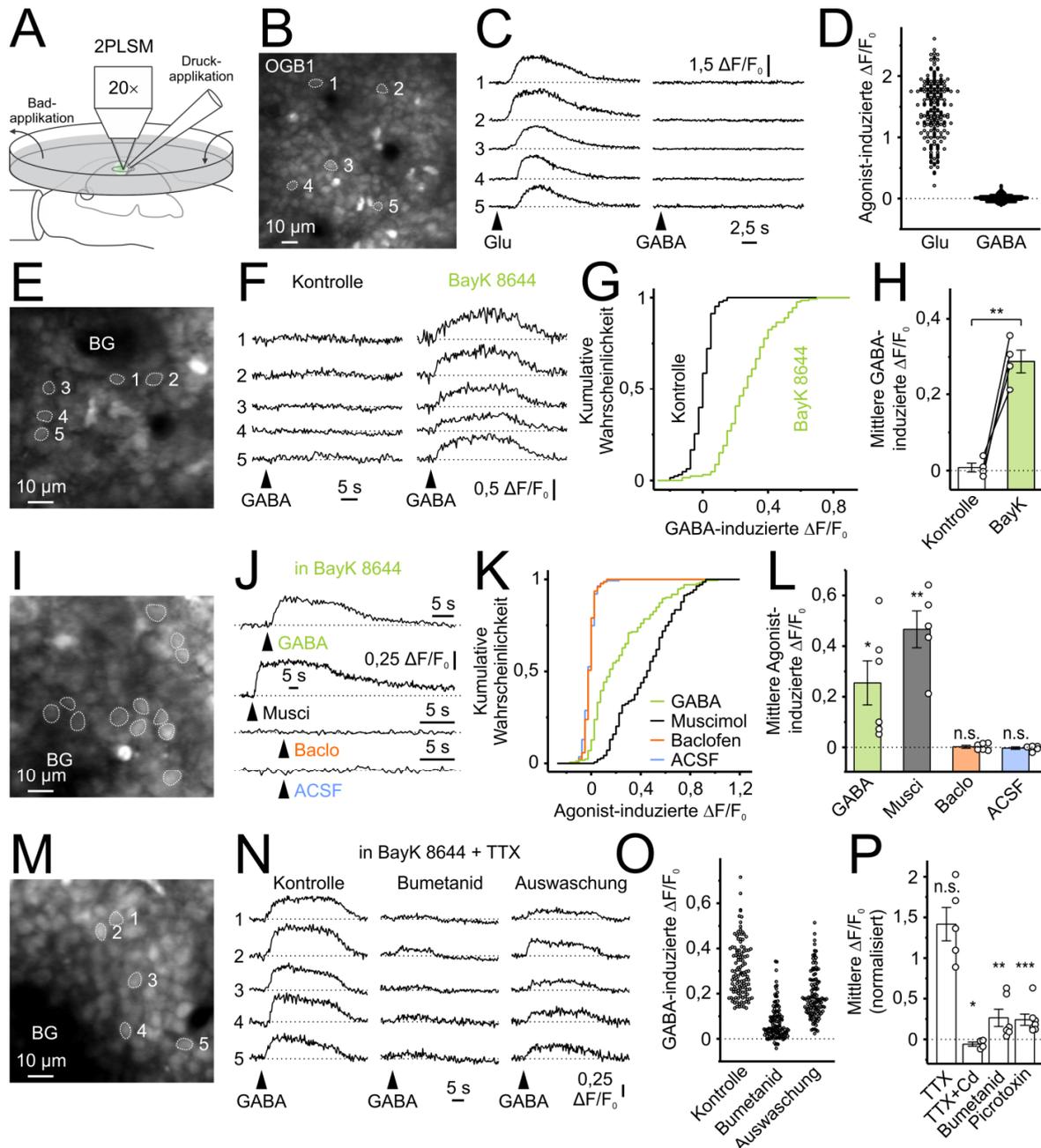


Abbildung 4.17: GABA-induzierte, somatische Kalziumtransienten in Gegenwart von BayK 8644 *in vivo*. A – Experimenteller Aufbau. B, E, I, M – Zweiphotonenfluoreszenzbilder von OGB1-gefärbten Zellen der kortikalen Platte *in vivo*. BG – Blutgefäß. C – Einzelzell-Kalziumantworten nach Druckapplikation von Glutamat (Glu, 100 mM, 0,3 s) und GABA (100 mM, 0,3 s). D – Amplitudenverteilungen der Fluoreszenzänderungen $\Delta F/F_0$. Jedes Symbol repräsentiert eine einzelne Zelle ($n = 204$ Zellen von 5 Mäusen). F – GABA-induzierte Kalziumantworten in Abwesenheit (Kontrolle) und Gegenwart von BayK 8644 (20 μM). G – $\Delta F/F_0$ -Amplitudenverteilungen ($n = 126$ Zellen von 4 Mäusen). H – Mittlere $\Delta F/F_0$ -Amplituden je Tier ($P < 0,01$; $n = 4$ Mäuse, gepaarter t-Test). J – Kalziumantworten (Mittelung aus den in I dargestellten 12 Zellen) nach Applikation von GABA (100 mM), GABA_A-Agonist Muscimol (Musci, 5 mM), GABA_B-Agonist Baclofen (Baclo, 5 mM) und ACSF. Die Zeitachsen sind unterschiedlich skaliert. K – $\Delta F/F_0$ -Amplitudenverteilungen (GABA: $n = 172$ Zellen, Muscimol: $n = 139$ Zellen, Baclofen: $n = 172$ Zellen, ACSF: $n = 139$ Zellen). L – Mittlere $\Delta F/F_0$ -Amplituden je Tier (GABA: $P < 0,05$, $n = 6$ Mäuse; Muscimol: $P < 0,01$, $n = 5$ Mäuse; Baclofen: $P > 0,95$, $n = 6$ Mäuse; ACSF: $P > 0,4$, $n = 5$ Mäuse; Einstichproben Wilcoxon Vorzeichenrangtests). N – GABA-induzierte Kalziumantworten

sind sensitiv gegenüber dem NKCC1-Blocker Bumetanid (50 μM). O – GABA-induzierte $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ -Amplitudenverteilungen einzelner Zellen (n = 122 Zellen, 6 Mäuse). P – Mittlere GABA-induzierte $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ -Amplituden je Tier (auf Kontrollen normalisiert). GABA-induzierte Kalziumtransienten waren unabhängig von spannungsgesteuerten Natriumkanälen (TTX: $P > 0,15$; n = 5 Mäuse), aber waren sensitiv gegenüber Antagonisten spannungsgesteuerter Kalziumkanäle (TTX+ CdCl_2 : $P < 0,05$; n = 4 Mäuse, Bonferroni-korrigierte gepaarte t-Tests), NKCC1 (Bumetanid: n = 6; ANOVA mit wiederholten Messungen: $P < 0,001$; Bonferroni Test: $P < 0,01$) und GABA_A-Rezeptoren (Picrotoxin: $P < 0,001$; n = 7; gepaarter t-Test). Picrotoxin und Bumetanid wurden in Gegenwart von TTX getestet. I – P – Experimente wurden in Gegenwart von BayK 8644 durchgeführt. H, L, P – * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; n.s. – nicht signifikant. Modifiziert nach [85].

GABA-induzierte Kalziumtransienten in Gegenwart von BayK 8644

Bisherige Untersuchungen akuter Hirnschnitte zeigten, dass GABA-evozierte Kalziumtransienten in Zellen der kortikalen Platte hauptsächlich durch die Aktivierung spannungsgesteuerter L-Typ-Kalziumkanäle [87] vermittelt werden. Diese besitzen einen Aktivierungsgrenzwert, der beträchtlich positiver als das typische Membranpotential ist. Demzufolge könnten vergleichsweise moderate Depolarisationen die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration unangetastet lassen. Daher sollte als nächstes die Detektions-sensitivität gegenüber GABA-induzierten Depolarisationen durch Erhöhung des spannungsgesteuerten, Kalziumkanal-vermittelten Kalziumdurchflusses verbessert werden. Um dies zu erreichen, erfolgte der Einsatz des ausgiebig charakterisierten Modulators BayK 8644, der die mittlere Öffnungsdauer der L-Typ spannungsgesteuerten Kalziumkanäle erhöht und den Aktivierungsgrenzwert in Richtung eines negativeren Potentials verschiebt [90]. In nativen, neokortikalen Hirnschnitten der Maus am postnatalen Tag 3 – 4 und im Einklang mit Daten vom *Bulbus olfactorius* [91] erhöhte BayK 8644 (20 μM) konsistent die Amplituden GABA-induzierter Kalziumtransienten in der oberen kortikalen Platte ($\Delta\text{F}/\text{F}_0$ in Kontrolle: $0,35 \pm 0,09$; $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ in BayK 8644: $0,79 \pm 0,07$; $P < 0,01$; n = 5 Hirnschnitte; gepaarter t-Test; Abbildung 4.18G-J). Als nächstes wurde der Effekt von BayK 8644 *in vivo* durch Perfusion der *Dura mater* mit einer BayK 8644-Lösung (20 μM gelöst in ACSF) getestet (im Folgenden als Badapplikation bezeichnet). In der Tat führte die Badapplikation von BayK 8644 zu deutlich messbaren GABA-induzierten Kalziumtransienten *in vivo*. Die mittlere GABA-induzierte $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ in Glutamat-sensitiven Zellen betrug $0,01 \pm 0,01$ in Kontrolle und $0,29 \pm 0,03$ in Gegenwart von BayK 8644 ($P < 0,01$; n = 4 Mäuse mit 126 Zellen, gepaarter t-Test; Abbildung 4.17E-H). Als nächstes wurde untersucht, ob die Induktion von Kalziumtransienten durch epidurale Druckapplikation von GABA in Gegenwart von BayK 8644 sensitiv gegenüber dem konventionellen Anästhetikum Isofluran ist. Die mittleren Amplituden GABA-induzierter Kalziumtransienten wiesen keine signifikante Änderung auf (N_2O : $0,28 \pm 0,04$; $\text{N}_2\text{O} + \text{Isofluran}$: $0,24 \pm 0,17$; $P > 0,8$; n = 3 Mäuse mit 92 Zellen; gepaarter t-Test). Da die Zugabe von Isofluran eine erhöhte mechanische Stabilität der Messungen bewirkt, wurde

letztgenannte Anästhesie für weitere pharmakologische Charakterisierungen verwendet. In Glutamat-sensitiven Zellen und in Gegenwart von BayK 8644 konnten GABA-induzierte Kalziumtransienten ($\Delta F/F_0$: $0,25 \pm 0,09$; $P < 0,001$; $n = 6$ Mäuse mit 172 Zellen) mit dem spezifischen GABA_A-Rezeptor-Agonisten Muscimol nachgebildet werden (5 mM; $\Delta F/F_0$: $0,47 \pm 0,07$; $P < 0,001$; $n = 5$ Mäuse mit 139 Zellen, Einstichproben Wilcoxon Vorzeichenrangtest mit Nullhypothese: Median = 0; Abbildung 4.17I-L). In diesen Experimenten betrug der Anteil Agonist-sensitiver Zellen (definiert als $\Delta F/F_0 > 3SD$ der Einzelzell-Amplituden nach Druckapplikation von ACSF, entspricht einem $\Delta F/F_0 > 0,13$) 55% für GABA und 95% für Muscimol. Im Gegensatz zu Muscimol konnten keine signifikanten Kalziumtransienten nach Druckapplikation des spezifischen GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen (5 mM; $\Delta F/F_0$: $0,00 \pm 0,01$; $P > 0,95$; $n = 6$ Mäuse mit 172 Zellen) oder einer reiner ACSF-Lösung ($\Delta F/F_0$: $-0,00 \pm 0,00$; $P > 0,4$; $n = 5$ Mäuse mit 139 Zellen, Einstichproben Wilcoxon Vorzeichenrangtest mit Nullhypothese: Median = 0; Abbildung 4.17J-L) detektiert werden. Des Weiteren wurden in GABA-sensitiven Zellen die GABA-induzierten Kalziumtransienten nicht durch den Blocker spannungsgesteuerter Natriumkanäle Tetrodotoxin in ihrer Amplitude vermindert (TTX; 3 μ M; $\Delta F/F_0$: $142 \pm 21\%$ verglichen zur Kontrolle; $P > 0,15$; $n = 5$ Mäuse mit 102 Zellen; Abbildung 4.17P). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass eine Aktionspotential-abhängige Anregung des neuronalen Netzwerkes nicht an der Generierung dieser Kalziumtransienten beteiligt ist. Wiederum konnten die GABA-induzierten Kalziumtransienten vollständig nach Zugabe des Breitspektrum-Antagonisten der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle CdCl₂ (200 – 300 μ M) blockiert werden, welches eine Abhängigkeit von einer Depolarisation impliziert ($\Delta F/F_0$: $-5,9 \pm 2,6\%$ verglichen zur Kontrolle; $n = 4$ Mäuse mit 82 Zellen; $P < 0,05$; gepaarte t-Tests mit Bonferroni Korrektur; Abbildung 4.17P). In neokortikalen Neuronen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Kotransporter NKCC1 die intrazelluläre Konzentration freier Chlorid-Ionen oberhalb einer passiven Verteilung hält [44,49,87]. Damit übereinstimmend reduzierte eine Badapplikation des NKCC1-Inhibitors Bumetanid (50 μ M) die Amplituden GABA-induzierter Kalziumtransienten in GABA-sensitiven Zellen auf $26 \pm 11\%$, welche partiell während der Auswaschung von Bumetanid auf $67 \pm 9,0\%$ zurückkehrten (Einweg-ANOVA mit wiederholten Messungen: $P < 0,001$; $n = 6$ Mäuse mit 122 Zellen; $\eta_p^2 = 0,86$; Kontrolle *versus* Bumetanid: $P < 0,01$; Bumetanid *versus* Auswaschung: $P < 0,01$; *post hoc* Bonferroni-korrigierte, paarweise Vergleiche; Abbildung 4.17M-P). Letztere Experimente wurden in Gegenwart von TTX durchgeführt, um rekurrente Exzitation zu unterdrücken. Eine Beteiligung der GABA_A-Rezeptoren wurde weiterhin durch die Beobachtung gestützt, dass eine Badapplikation des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Picrotoxin (250 μ M) die Amplituden GABA-induzierter Kalziumtransienten auf $24 \pm 6,8\%$ reduziert ($P < 0,001$; $n = 7$ Mäuse mit 111 Zellen;

paarweiser t-Test; vier von sieben Mäusen wurden zuvor einer Bumetanid-Applikation ausgesetzt; Abbildung 4.17P). Zusammenfassend belegen die Daten einen depolarisierenden Effekt einer GABA_A-Rezeptor-Aktivierung in der überwiegenden Mehrheit an Zellen der kortikalen Platte *in vivo* in einem Mausalter von 3 - 4 Tagen nach der Geburt.

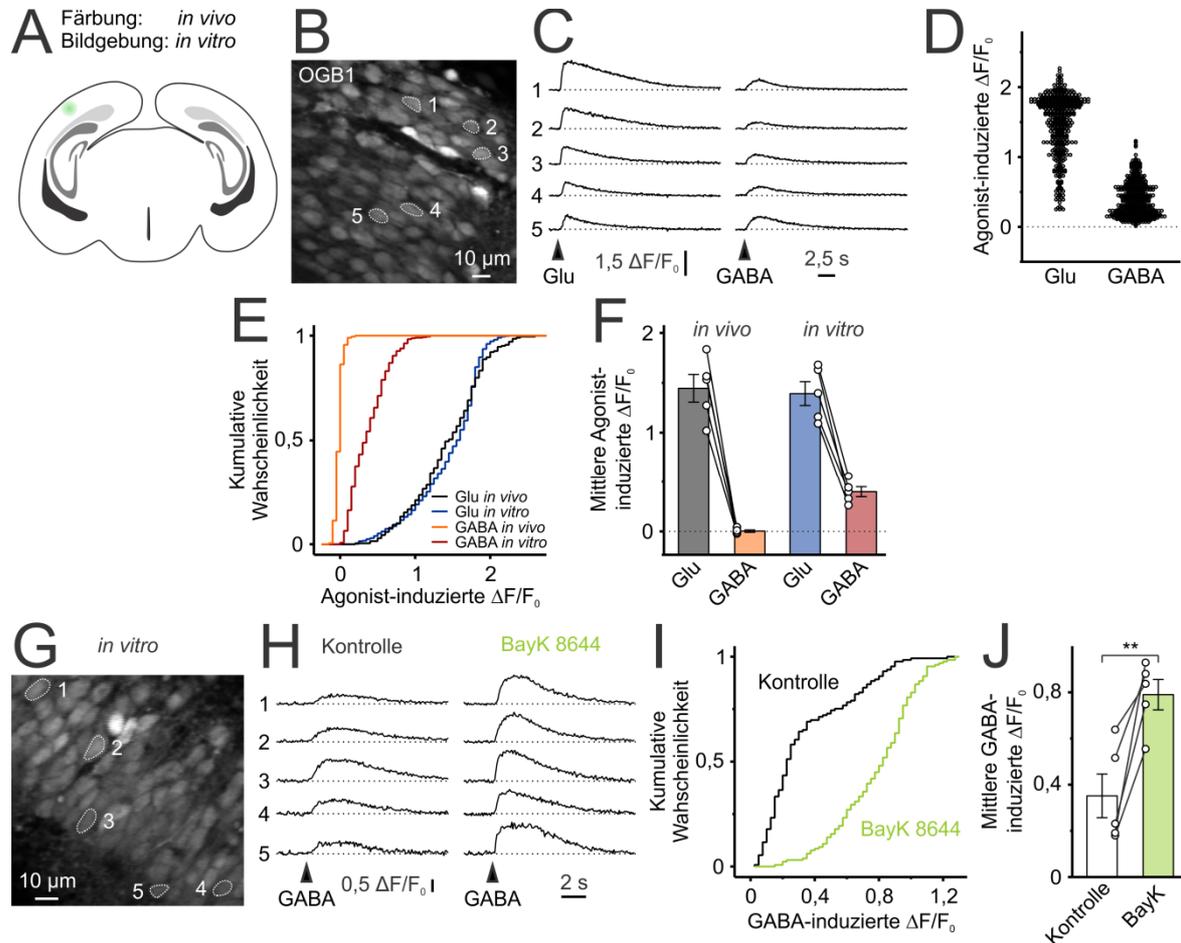


Abbildung 4.18: GABA induziert somatische Kalziumtransienten in Zellen der kortikalen Platte im postnatalen Alter von 3 – 4 Tagen *in vitro*. A – F – Die Beladung der Zellen mit dem Kalziumindikator OGB1 wurde *in vivo* durchgeführt. Die Experimente wurden zunächst *in vivo* (siehe auch Abbildung 4.17A-D) und anschließend in akuten Hirnschnitten *in vitro* durchgeführt. A – Experimenteller Aufbau. B – Zweiphotonenfluoreszenzbild OGB1-gefärbter Zellen der kortikalen Platte *in vitro*. C – *In vitro* Einzelzell-Kalziumantworten nach Druckapplikation von Glutamat (Glu, 1 mM) und GABA (1 mM). D – Amplitudenverteilungen der Fluoreszenzänderungen $\Delta F/F_0$. Jedes Symbol repräsentiert eine einzelne Zelle (n = 407 Zellen von 10 Hirnschnitten und 5 Mäusen). E – Kumulative Einzelzell- $\Delta F/F_0$ -Amplitudenverteilungen von Glutamat- und GABA-induzierten Kalziumantworten (*in vivo*: n = 204 Zellen, *in vitro*: n = 407 Zellen). F – Mittlere $\Delta F/F_0$ - Amplituden je Tier (n = 5 Mäuse). G – Zweiphotonenfluoreszenzbild OGB1-gefärbter Zellen der kortikalen Platte *in vitro*. H – *In vitro* Einzelzell-Kalziumantworten nach Druckapplikation von GABA (1 mM) in Abwesenheit (Kontrolle) und Gegenwart von BayK 8644 (20 μ M). I – GABA-induzierte Einzelzell- $\Delta F/F_0$ -Amplitudenverteilungen (n = 129 Zellen von 5 Hirnschnitten und 3 Mäusen). J – Mittlere GABA-induzierte $\Delta F/F_0$ -Amplituden je Hirnschnitt (P < 0,01; n = 5 Hirnschnitte, gepaarter t-Test). ** P < 0,01. Modifiziert nach [85].

Synaptisch induzierte Exzitation ist abhängig von glutamatergem Eingang

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob eine synaptische GABAerge Aktivierung Aktionspotentiale in unreifen kortikalen Zellen induzieren kann. Zu diesem Zweck wurde eine wiederholte elektrische Stimulation (25 Pulse, 50 Hz) mit einer niederohmigen extrazellulären Glaselektrode, die in der oberen kortikalen Platte platziert wurde, durchgeführt. Zunächst erfolgte die Anwendung der Zweiphotonen-Kalzium-Bildgebung (Abbildung 4.19A,B) als sekundärer Indikator für die Ausbildung von Aktionspotentialen [24]. Mit intakter GABAerger und glutamaterger Transmission induzierte die elektrische Stimulation Kalziumtransienten in der breiten Mehrheit an untersuchten Zellen (70 von 73 Zellen von 3 Mäusen; 45 dieser Zellen reagierten in jedem von drei Durchläufen; Abbildung 4.19C). Nach Badapplikation der ionotropen Glutamat-Rezeptor-Antagonisten DNQX (50 μ M) und APV (250 μ M) wurden die Stimulations-induzierten Kalziumtransienten in allen Zellen mit Ausnahme einer blockiert (Zelle #49 in Abbildung 4.19C). Die Aktivierung dieser Zelle erfolgte höchstwahrscheinlich auf antidrome Weise, da die Kalziumantworten auch nach Zugabe des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Gabazin (40 μ M) weiterhin bestehen blieben. Diese Daten deuten an, dass eine afferente GABAerge Stimulation allein nicht ausreicht, um somatische Kalziumtransienten in Zellen der oberen kortikalen Platte zu induzieren. Mit dieser Schlussfolgerung übereinstimmend ist es nicht möglich somatische Kalziumtransienten in Zellen der oberen kortikalen Platte durch lokale Applikation von GABA mit einer in der kortikalen Platte platzierten Pipette auszulösen (Abbildung 4.20). Einzelne Aktionspotentiale können sich einer OGB1-basierten Detektion mittels Kalzium-Bildgebung entziehen [24]. Daher wurden zusätzlich 2PLSM-gestützte *cell-attached*-Messungen in der oberen kortikalen Platte durchgeführt. Alle in die Analyse einbezogenen Zellen wurden aufgrund ihrer Fähigkeit Aktionspotentiale zu generieren als Neurone identifiziert. Mit intakter GABAerger und glutamaterger Transmission löste eine wiederholte elektrische Stimulation (25 Pulse, 50 Hz) Aktionspotentiale in 4 von 5 Neuronen aus (Abbildung 4.19D-F). Die mittlere Anzahl an Aktionsströmen je Durchlauf und Zelle betrug $4,9 \pm 1,7$ ($n = 5$ Neurone, Abbildung 4.19G). Im Gegensatz dazu konnten in keinem der untersuchten Neurone Aktionspotentiale in paralleler Gegenwart von DNQX und APV induziert werden ($n = 7$ Neurone, Abbildung 4.19D-G). Zusammenfassend sind synaptisch induzierte Aktionspotentiale am postnatalen Tag 3 – 4 *in vivo* größtenteils von glutamatergem, nicht aber von GABAergem synaptischen Eingang abhängig.

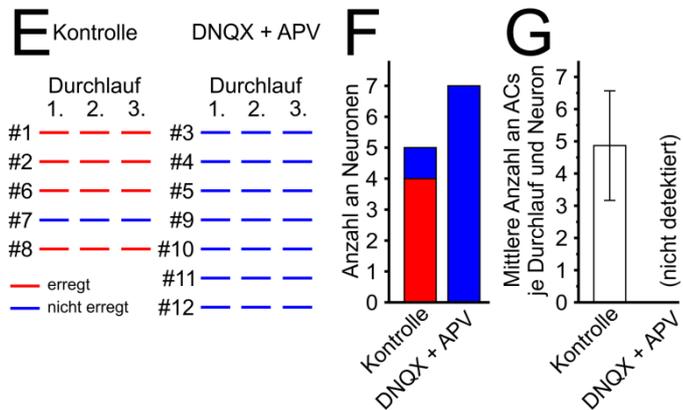
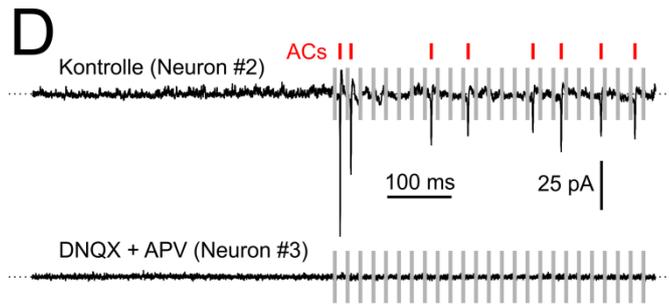
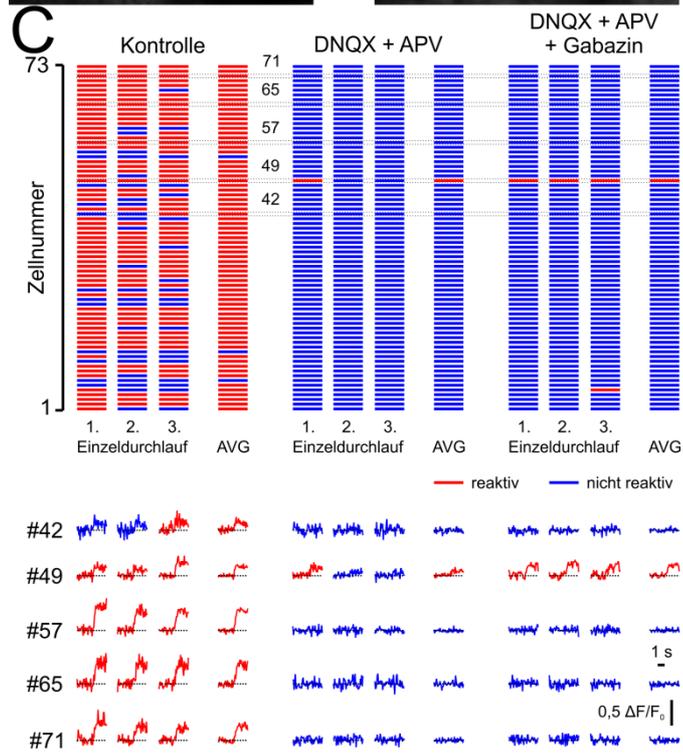
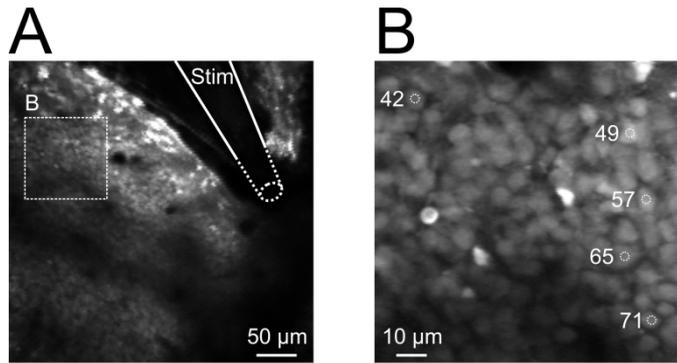


Abbildung 4.19: Mangel an somatischen Kalziumtransienten und Aktionspotentialen nach GABAerger, afferenter Stimulation *in vivo*. A – Zweiphotonenfluoreszenzbilder von OGB1-gefärbten Zellen der kortikalen Platte *in vivo* nach Positionierung einer extrazellulären Stimulationselektrode (Stim). B – FOV während der Aufzeichnung, wie in A durch ein gestricheltes Rechteck angedeutet. C – Oben: Für Einzeldurchläufe und gemittelte Kalziumsignale (AVG) der Zellen wurde jeweils eine Klassifizierung in reaktiv (rot) und nicht reaktiv (blau) auf Basis eines Amplitudengrenzwertkriteriums durchgeführt. Jeder Stimulationsdurchlauf bestand aus 25 Rechteckpulsen mit einer Frequenz von 50 Hz. Alle einbezogenen Zellen wurden in ACSF (Kontrolle, links), der Gegenwart von DNQX (50 μM) und APV (250 μM , Mitte) sowie der Gegenwart von DNQX, APV und Gabazin (40 μM , rechts) gemessen. Unten: Beispielspuren von fünf Zellen, die in B markiert sind. In Gegenwart von DNQX und APV wurden alle Antworten mit Ausnahme von einer Zelle blockiert (#49). D – *cell-attached voltage-clamp*-Messungen von zwei verschiedenen Neuronen in ACSF (Kontrolle) und in Gegenwart von DNQX und APV. Jeder Stimulationsdurchlauf bestand aus 25 Rechteckpulsen mit einer Frequenz von 50 Hz. Stimulationsartefakte wurden in der Abbildung zur Übersichtlichkeit abgeschnitten (graue Balken). Aktionsströme (ACs) wurden durch rote, vertikale Linien markiert. E – Zusammenfassung erregter (rot) und nicht erregter (blau) Neurone ($n = 5$ Zellen in Kontrolle, $n = 7$ Zellen in DNQX und APV). F – Absolute Anzahl erregter und nicht erregter Neurone. G – Mittlere Anzahl an Aktionsströmen je Neuron und Durchlauf. Modifiziert nach [85].

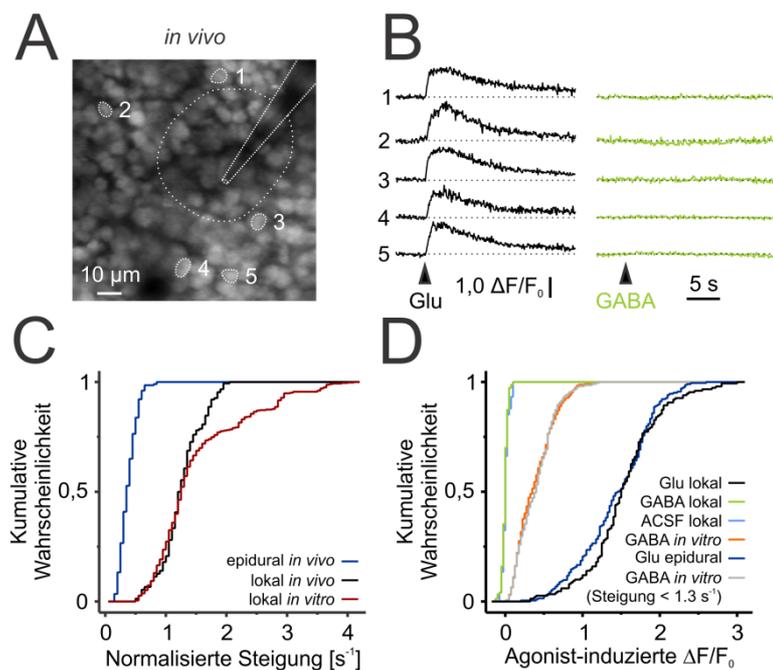


Abbildung 4.20: Eine lokale GABA-Applikation innerhalb der kortikalen Platte löst keine somatischen Kalziumtransienten im postnatalen Alter von 3–4 Tagen *in vivo* aus. A – Zweiphotonenfluoreszenzbilder von OGB1-gefärbten Zellen der kortikalen Platte *in vivo*. Die für die Druckapplikation verwendete Pipette ist schematisch eingezeichnet. Zellen nahe der Pipettenspitze wurden aufgrund von druckassoziierten Bewegungsartefakten (gepunktete Linie) von der Analyse ausgeschlossen. B – Einzelzell-Kalziumantworten nach Druckapplikation von Glutamat (Glu, 10 mM, 40 ms) und GABA (10 mM, 40 ms). C – Verteilungen normalisierter Anstiege Glutamat-induzierter Antworten durch epidurale ($n = 406$ Zellen) oder lokale ($n = 150$ Zellen) Applikation *in vivo* und lokaler Applikation *in vitro* ($n = 203$ Zellen). Kalziumantworten lokaler Applikationen von Glutamat *in vivo* weisen eine signifikant schnellere Anstiegskinetik, verglichen zu epiduralen Applikationen auf. Weiterhin stimmen die Kinetiken größtenteils mit denen lokaler Applikationen *in vitro* überein (Abbildung 4.18C). D –

Einzelzell- $\Delta F/F_0$ -Amplitudenverteilungen nach lokaler Applikation von Glutamat (n = 150 Zellen), GABA (n = 150 Zellen) oder ACSF (n = 74 Zellen) *in vivo* und GABA *in vitro* (n = 406 Zellen, gleiche Zellen wie in Abbildung 4.18E). *In vivo* konnten keine eindeutigen GABA-vermittelten (10 mM, 30 – 40 ms) Kalziumtransienten in auf Glutamat reagierenden Zellen festgestellt werden (GABA-induzierte $\Delta F/F_0$: $0,01 \pm 0,00$; Glutamat-induzierte $\Delta F/F_0$: $1,55 \pm 0,04$; n = 150 Zellen von 6 Ableitungsorten und 3 Mäusen). Für die Vergleichbarkeit der $\Delta F/F_0$ -Verteilungen nach GABA-Applikation *in vitro* von Zellen mit normalisierten Anstiegen Glutamat-induzierter Antworten $<1,3 \text{ s}^{-1}$ (n = 212 Zellen) und epiduralen Applikationen von Glutamat *in vivo* (n = 204 Zellen, gleiche Zellen wie in Abbildung 4.18E) sind diese ebenfalls dargestellt. Modifiziert nach [85].

Spontane neokortikale Netzwerkaktivität *in vivo*

Als nächstes sollte untersucht werden, inwieweit GABA in der Generierung kortikaler Netzwerkaktivität involviert ist. Daher wurden Weitfeld-Kalziummessungen in 3 – 4 Tage alten Mäusen ($\text{Emx1}^{\text{IREScre}}:\text{GCaMP3}^{\text{LSL}}$) durchgeführt, die den genetisch kodierten Kalziumindikator GCaMP3 in glutamatergen Zellen homogen über den gesamten Kortex exprimieren (Abbildung 4.21A,B) [26,78,79]. Zur Analyse der Fluoreszenzdaten wurde der betrachtete Ausschnitt des Kortex ($\sim 1 \text{ mm}^2$) in ein rechteckiges Raster aus Zielregionen (ROIs) unterteilt (Abbildung 4.21C). Bei Verwendung von N_2O als Anästhetikum konnte in allen Versuchstieren spontane Netzwerkaktivität in Form von raumzeitlichen Clustern, bestehend aus Kalziumtransienten, detektiert werden (n = 21 Mäuse, Abbildung 4.21B-D und Anhang E – V2). Einzelzell-Zweiphotonen-Kalziummessungen in $\text{Emx1}^{\text{IREScre}}:\text{GCaMP3}^{\text{LSL}}$ Mäusen bestätigten, dass diese Clusteraktivität auch die obere kortikale Platte einschloss (n = 5 Mäuse, Abbildung 4.22A-D). Eine Besonderheit gegenüber OGB1-gefärbten Zellsomata besteht dabei in der Aussparung des Zellkerns, sodass GCaMP3-exprimierende Zellen in Fluoreszenzbildern als ringförmige Strukturen mit dunklem Zentrum sichtbar sind (Abbildung 4.22A). Um die beobachteten Aktivitätsereignisse einem bekannten elektrophysiologischen Korrelat zuordnen zu können, wurden parallel zu der Kalzium-Bildgebung extrazelluläre Ableitungen in einem breiten Frequenzbereich (0,1 – 6000 Hz) durchgeführt (n = 4 Mäuse). Zu diesem Zweck kam eine niederohmige Glaselektrode zum Einsatz, die 2PLSM-gestützt in der oberen kortikalen Platte platziert wurde (Abbildung 4.21E,F). Aktivitätsereignisse, die in der Nähe der Pipettenspitze auftraten, wurden von Feldpotentialänderungen begleitet (Abbildung 4.21G). Eine FFT- (Engl.: *fast Fourier transform*) und eine Wavelet-basierte Zeitfrequenz-Analyse ergaben, dass die Ereignisse in den meisten Fällen aus spindelförmigen Oszillationen mit einer dominanten Frequenz im Theta-Band (4 – 8 Hz) und seltener bzw. schwächer im Alpha-Band (8 – 13 Hz) bestand, die typischerweise in einer Delta-Welle eingebettet waren (Abbildung 4.21H). Die spindelförmigen Oszillationen wurden meist durch rhythmische, sogenannte *multi-unit* Entladungen, die phasengekoppelt zu dem Minimum der Oszillation waren, begleitet (Abbildung 4.21H). In manchen Fällen waren die

spindelartigen Oszillationen weniger deutlich ausgeprägt (<3 Zyklen) oder nicht messbar und die Delta-Komponente dominant. Interessanterweise konnte die Theta-Oszillation teilweise im simultan abgeleiteten GCaMP3-Signal beobachtet werden (Ereignis #1 und #2 in Abbildung 4.21H). Zusammenfassend stimmen die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kalziumcluster mit den bisher berichteten *spindle bursts* im visuellen Kortex von neonatalen Ratten überein [4,21,92].

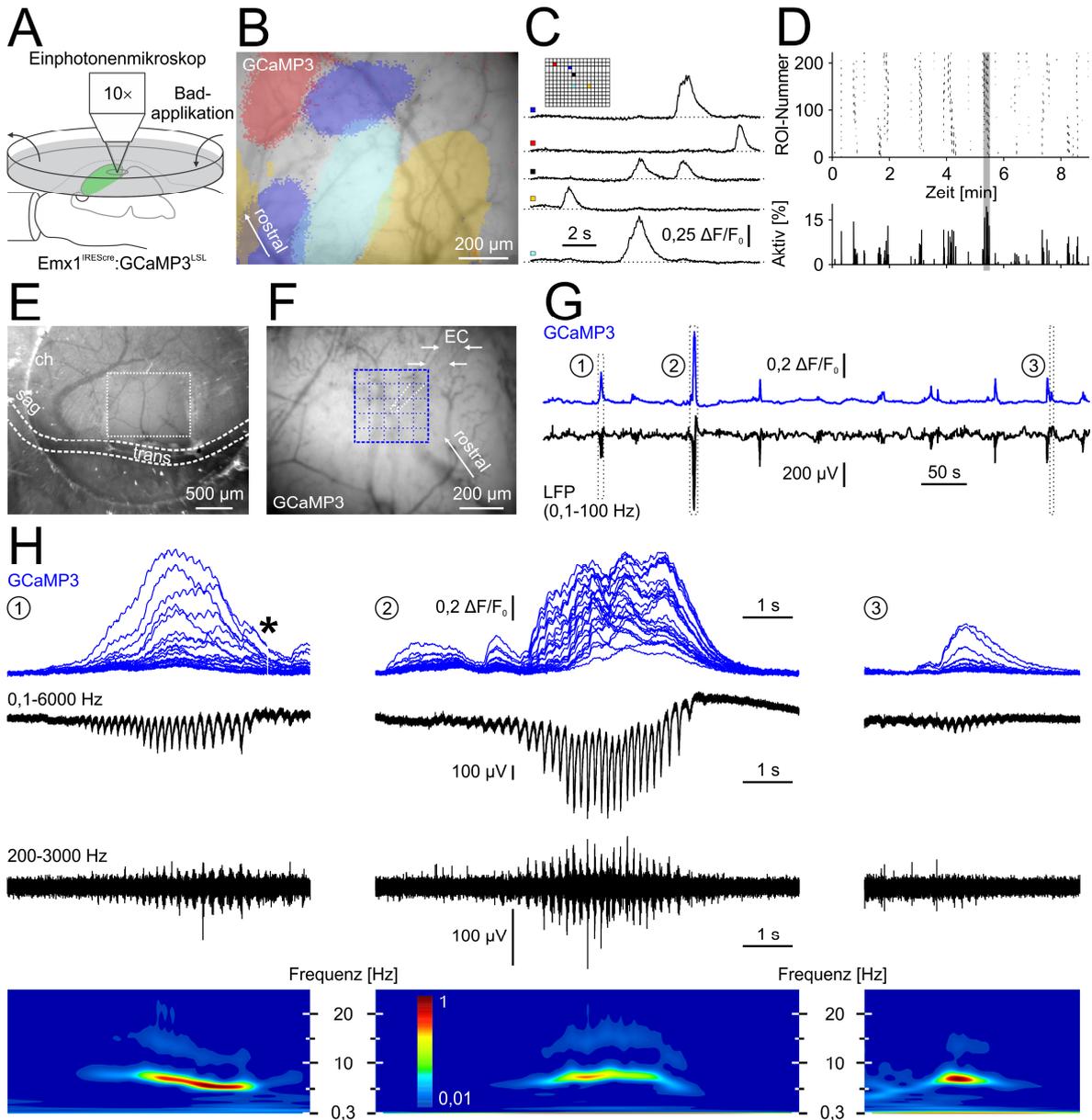


Abbildung 4.21: Spontane Aktivitätsereignisse im neonatalen, okzipitalen Neokortex *in vivo*. A – Experimenteller Aufbau. B – GCaMP3-Fluoreszenz überlagert mit der Flächenausbreitung von vier räumlich begrenzten Clusterereignissen (farbkodiert). Die binären Flächenausbreitungen wurden von $\Delta F/F_0$ -Bildsequenzen (gemittelt über 10 Bilder) als maximale Intensitätsprojektionen mit einem Grenzwert von 25% der Spitzenamplitude berechnet. C – $\Delta F/F_0$ -Beispielspuren von individuellen ROIs. Die Farbkodierung entspricht den markierten Ereignissen aus B. Das Rechteck repräsentiert das FOV in B und markiert die Positionen der ROIs von denen die Beispielspuren stammen. In den Spuren sind mehrere raumzeitlich begrenzte Kalziumcluster erkennbar. D – Oben: Rasterplot der Zeitpunkte an

denen Spitzenwerte der Kalziumtransienten in individuellen ROIs auftraten. Das in C dargestellte Zeitintervall ist grau markiert. Unten: Zeitlich übereinstimmende Darstellung der Beteiligungsrate der ROIs (Summe aller Spitzenwerte in gleitenden Intervallen von 10 Bildern). E – *In vivo* Ansicht auf eine Kraniotomie (~1,2 mm²) oberhalb des okzipitalen Kortex. Das FOV während der Fluoreszenzmessungen (dargestellt in F) ist durch ein gepunktetes Rechteck markiert (trans: *Sinus transversus*, sag: *Sinus sagittalis superior*, ch: Rand der Messkammer). F – GCaMP3-Fluoreszenzbild nach Positionierung einer extrazellulären Elektrode (EC). G – Simultane Beispielspuren von GCaMP3-Fluoreszenz (Mittelung aus den 25 ROIs in F, Hochpassfilterung bei 0,01 Hz) und lokalem Feldpotential (LFP, Bandpassfilterung bei 0,1 – 100 Hz). LED-Synchronisationspulse (Synchronisation der optischen mit den elektrischen Ableitungen) wurden für die Übersichtlichkeit abgeschnitten. H – Simultane GCaMP3-Fluoreszenz (oben, Darstellung einer Überlagerung von 25 ROIs aus F), extrazelluläres Breitbandsignal (0,1 – 6000 Hz), *Multi-unit*-Aktivität (200 – 3000 Hz) und *Morlet wavelet*-Spektrum von drei in G markierten Zeitintervallen. Der Stern in Ereignis 1 repräsentiert ein ausgeschnittenes Intervall eines einzelnen LED-Synchronisationspulses. Modifiziert nach [85].

Die bisher erwähnten Messungen wurden mit intakter *Dura mater*, unter vorheriger Entfernung des darüberliegenden Schädelknochens durchgeführt. Nahezu identische Clusteraktivität konnte mit intaktem Schädel, also ohne Durchführung einer Kraniotomie, beobachtet werden (n = 3 Mäuse, Abbildung 4.22E-K). Zusätzlich waren ähnliche raumzeitliche Cluster aus Kalziumtransienten (mit moderat höherer Frequenz und niedrigerer Clustergröße) in Abwesenheit von N₂O sichtbar (60 min nach Ausschleichen von Isofluran, n = 3 Mäuse, Abbildung 4.22H-K). In Einklang mit bisherigen Daten werden die Cluster aus Kalziumtransienten vollständig von Isofluran unterdrückt (Abbildung 4.22H-K, siehe auch [23,26]). Zusätzlich sind die Ereignisse vollständig abhängig von Aktionspotentialen (Abbildung 4.22L-O).

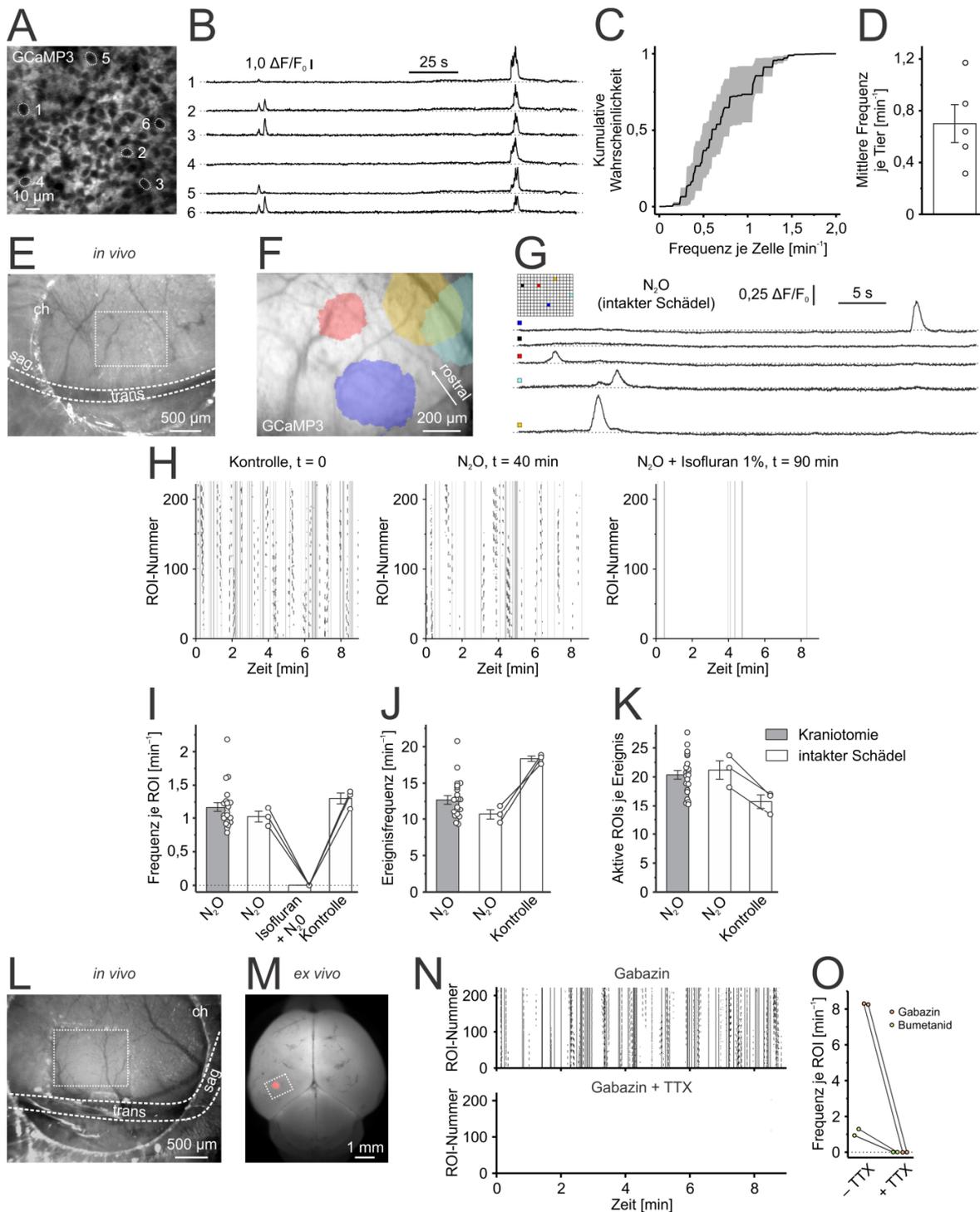


Abbildung 4.22: Grundlegende Eigenschaften spontaner Aktivitätsereignisse im neonatalen, okzipitalen Neokortex *in vivo*. A – Zweiphotonenfluoreszenzbild GCaMP3 exprimierender Zellen der kortikalen Platte *in vivo*. B – $\Delta F/F_0$ -Beispielspuren von sechs individuellen Zellen dargestellt in A. C – Kumulative Verteilung der Frequenz spontaner, somatischer Kalziumtransienten einzelner Zellen. Mittelwert (durchgezogene Linie) \pm SEM (schattierte Fläche) von fünf Mäusen. D – Mittlere Frequenz spontaner, somatischer Kalziumtransienten je Zelle und Tier ($n = 5$ Mäuse). Jedes Symbol repräsentiert ein einzelnes Tier. E – *In vivo* Ansicht (unter Weitfeld-Beleuchtung) der Messkammer (ch), die auf den intakten Schädelknochen einer Maus aufgeklebt wurde. Das FOV während der Fluoreszenzmessungen ist durch ein gepunktetes Rechteck markiert (trans: *Sinus transversus*, sag: Übergang in *Sinus sagittalis superior*). F – Überlagerung der GCaMP3-Fluoreszenz (gemessen durch

den intakten Schädel) mit den Flächenausbreitungen von vier räumlich begrenzten Clusterereignissen (farbkodiert). G – $\Delta F/F_0$ -Beispielspuren von individuellen ROIs. Das Rechteck repräsentiert das FOV aus F und markiert die Positionen der ROIs von denen die Beispielspuren stammen. H – Beispiel eines Rasterplots von einem Tier (gleiches wie in E – G) 60 min nach Ausschleichen von Isofluran (Kontrolle, links), in Gegenwart von N_2O (Mitte) und $N_2O + 1\%$ Isofluran (rechts). Zeitintervalle mechanischer Instabilität, die von der Analyse ausgeschlossen wurden, sind durch graue, vertikale Linien markiert. I – K – Quantifizierung. Die analysierten Parameter zeigten ähnliche Ergebnisse in Gegenwart von N_2O , unabhängig davon ob eine Kraniotomie durchgeführt wurde oder nicht. Isofluran blockierte die Spontanaktivität vollständig. Graue Balken reflektieren die Daten von 21 Mäusen aus Abbildung 4.23. L – *In vivo* Beispiel einer Kraniotomie ($\sim 1,2 \text{ mm}^2$) über dem okzipitalen Kortex, welche für die Experimente, gezeigt in Abbildung 4.23, angewandt wurde. Das FOV während der Fluoreszenzmessungen ist durch ein gepunktetes Rechteck markiert. M – *Ex vivo* Transmissionsbild eines isolierten Maushirns überlagert mit der Emission eines rot fluoreszierenden Positionsmarkers (JPW 1114), der *in vivo* nach der Aktivitätsmessung injiziert wurde. Das projizierte FOV während der Aktivitätsmessungen ist durch ein gepunktetes Rechteck markiert. N – Rasterplot der Zeitpunkte von Spitzenwerten der Kalziumtransienten aller ROIs in Gegenwart von Gabazin (oben) und Gabazin + TTX ($3 \mu\text{M}$, unten). Während des gesamten Experiments wurde N_2O verabreicht. Die Daten stammen von dem gleichen Tier präsentiert in L, M und Abbildung 4.23I. Für die Übersichtlichkeit wurden Intervalle mechanischer Instabilität nicht dargestellt. O – Quantifizierung des Effektes von TTX auf die Frequenz von Kalziumtransienten je ROI. Jedes Symbolpaar repräsentiert ein einzelnes Tier ($n = 2$ in Bumetanid, $n = 2$ in Gabazin). Modifiziert nach [85].

Einfluss GABAerger Transmission auf neokortikale Netzwerkaktivität *in vivo*

Unter Verwendung von Weitfeld GCaMP3-basierter Kalzium-Bildgebung wurde zunächst die Abhängigkeit der Clusteraktivität von intaktem NKCC1-Transport geprüft. Nach Badapplikation von Bumetanid ($50 \mu\text{M}$) blieben die Ereignisfrequenz ($P > 0,2$; $n = 5$ Mäuse; gepaarter t-Test; Abbildung 4.23C) und die Ereignisgröße (quantifiziert anhand der mittleren Anzahl an aktiven ROIs je Ereignis; $P > 0,9$; gepaarter t-Test; Abbildung 4.23D) unverändert. Zusätzlich änderte sich auch die Frequenz spontaner Kalziumtransienten je ROI nicht ($P > 0,15$; gepaarter t-Test; Abbildung 4.23A,B). Wie zuvor gezeigt, reduziert die gleiche Konzentration an Bumetanid jedoch signifikant die Amplitude GABA-induzierter Kalziumtransienten auf Einzelzellniveau (Abbildung 4.17M-P). Damit kann das Ausbleiben der Wirkung von Bumetanid auf die Netzwerkaktivität nicht auf mangelnde Penetration der Substanz in das Gewebe zurückgeführt werden. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass synaptisch freigesetztes GABA während der Netzwerkaktivität keinen essentiellen, exzitatorischen Beitrag zur Steuerung der Clusteraktivität liefert. Als nächstes wurde der Effekt einer Steigerung der intrakortikalen GABA_A-Rezeptorvermittelten Transmission untersucht. Eine Badapplikation des Benzodiazepins Diazepam ($70 \mu\text{M}$) bewirkte eine starke Inhibierung spontaner Netzwerkaktivität, welche in einer Reduktion der Frequenz spontaner Kalziumtransienten je ROI resultierte ($P < 0,001$; $n = 6$ Mäuse, gepaarter t-Test; Abbildung 4.23E,F). Der Effekt war hauptsächlich räumlicher Natur, da Diazepam konsistent die mittlere Ereignisgröße reduzierte ($P < 0,01$; gepaarter

t-Test; Abbildung 4.23H), während die Ereignisfrequenz unangetastet blieb ($P > 0,1$; gepaarter t-Test; Abbildung 4.23G). Des Weiteren wurde der Effekt von endogen freigesetztem GABA durch Blockierung der GABA_A-Rezeptoren mit Gabazin (40 μ M) untersucht. Durch die Badapplikation von Gabazin konnte ein neuer Typ synchronisierter und Aktionspotential-abhängiger Aktivität detektiert werden (Abbildung 4.22N,O), welcher häufig den kompletten Messbereich einschloss (Abbildung 4.23I). Zusätzlich waren die Ereignisfrequenz ($P < 0,001$; gepaarter t-Test; Abbildung 4.23K) und die Ereignisgröße deutlich erhöht ($P < 0,001$; gepaarter t-Test; Abbildung 4.23L). Entsprechend war auch die Frequenz spontaner Kalziumtransienten je ROI im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ohne Gabazin größer ($P < 0,001$; gepaarter t-Test; Abbildung 4.23I,J). Abschließend sollte untersucht werden, ob extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren [93] einen Beitrag an der Gabazin-induzierten Disinhibition der kortikalen Clusteraktivität leisten. Der Fokus lag dabei auf den α 5-Untereinheit-enthaltenden GABA_A-Rezeptoren, da diese früh in der Entwicklung exprimiert werden [94] und erst kürzlich eine Beteiligung dieser Untereinheit an tonischen GABAergen Strömen im gleichen Tieralter (postnataler Tag 2 – 4) berichtet wurde [95]. In Folge einer Badapplikation des α 5-Untereinheit-spezifischen, inversen Agonisten L-655,708 (1 μ M) wurde die Netzwerkaktivität disinhibiert. Die Frequenz spontaner Kalziumtransienten je ROI war unter diesen Bedingungen gegenüber der Kontrolle erhöht ($P < 0,05$; $n = 5$ Mäuse; gepaarter t-Test; Abbildung 4.23M,N). Dieser Effekt war größtenteils räumlicher Natur, da die mittlere Ereignisgröße erhöht war ($P < 0,01$; gepaarter t-Test; Abbildung 4.23P) während die Ereignisfrequenz unverändert blieb ($P > 0,4$; gepaarter t-Test; Abbildung 4.23O). Diese Daten erlauben den Schluss, dass die Aktivierung von α 5-Untereinheit enthaltender GABA_A-Rezeptoren einen Einfluss auf die räumliche Begrenzung kortikaler Kalziumcluster besitzt. Zusammenfassend hat die GABAerge Transmission im Alter 3 – 4 Tagen nach der Geburt *in vivo* eine inhibierende Funktion auf Netzwerkebene.

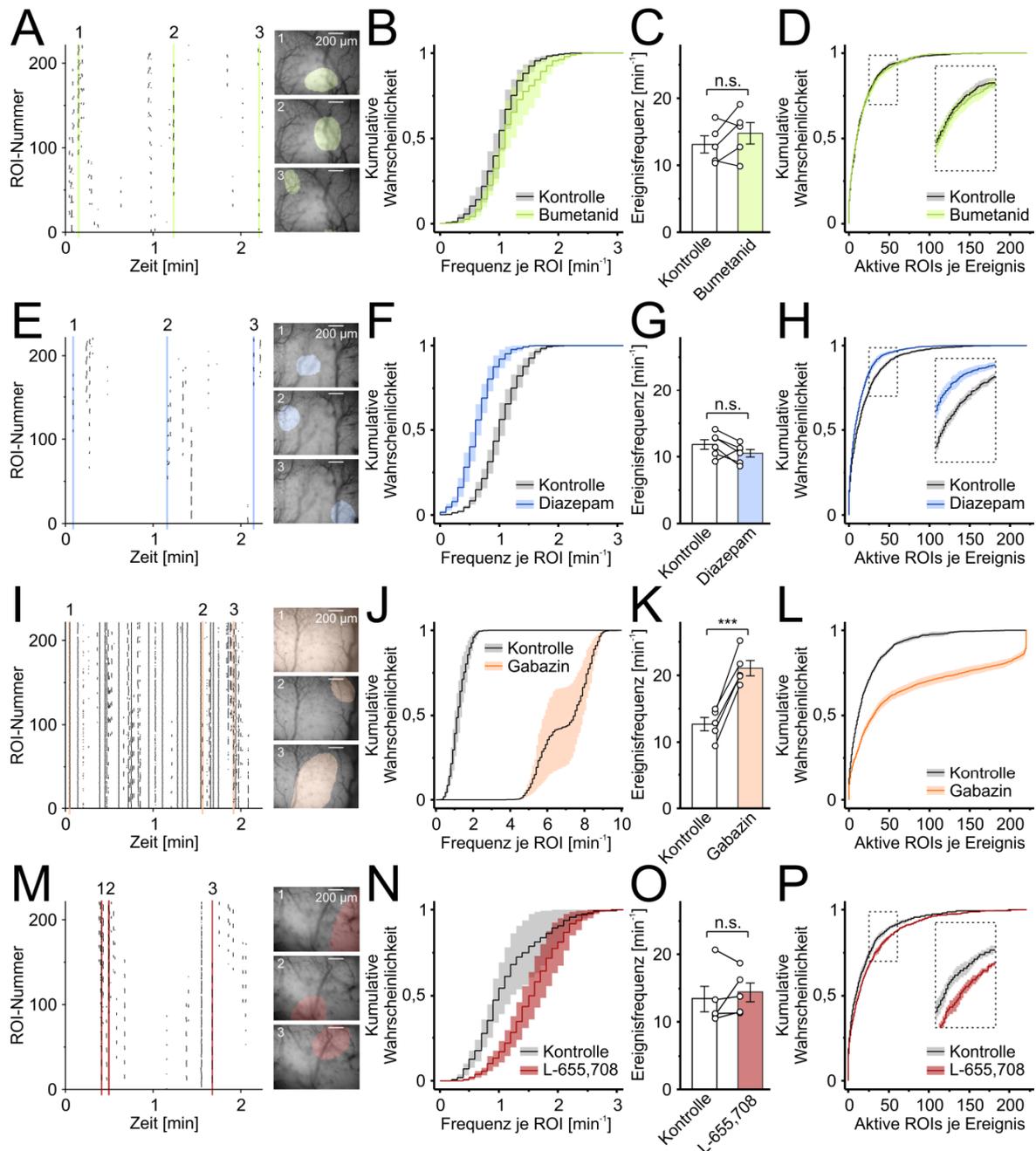


Abbildung 4.23: Einfluss GABAerger Transmission auf neokortikale Netzwerkaktivität *in vivo*. A, E, I, M – Beispiele von Rasterplots in Gegenwart von Bumetanid (A), Diazepam (E), Gabazin (I) und L-655,708 (M) von vier verschiedenen Mäusen. Auf der rechten Seite sind drei GCaMP3-Fluoreszenzbilder mit jeweils einer Überlagerung binärer Flächenausbreitungen der links markierten Aktivitätsereignisse (1 – 3) dargestellt. B, F, J, N – Verteilungen der Frequenz von Kalziumtransienten je ROI. Mittelwert (durchgezogene Linie) \pm SEM (schattierte Fläche). C, G, K, O – Ereignisfrequenz Kontrolle *versus* Bumetanid ($P > 0,2$; $n = 5$ Mäuse), Kontrolle *versus* Diazepam ($P > 0,1$; $n = 6$ Mäuse), Kontrolle *versus* Gabazin ($P < 0,001$; $n = 5$ Mäuse) und Kontrolle *versus* L-655,708 ($P > 0,4$; $n = 5$ Mäuse; gepaarte t-Tests). Jedes Symbol repräsentiert ein einzelnes Tier. *** $P < 0,001$; n.s. – nicht signifikant. D, H, L, P – Verteilungen der Anzahl aktiver ROIs je Aktivitätsereignis. Mittelwert (durchgezogene Linie) \pm SEM (schattierte Fläche). Gepunktete Rechtecke in D, H und P repräsentieren eine vergrößerte Darstellung. Modifiziert nach [85].

4.2.3 Dreidimensionale Netzwerkaktivität im neonatalen Kortex

Voxel-basierte Aktivitätsmessungen

Anknüpfend an die Epifluoreszenzmessungen in Kapitel 4.2.2 galt es nun die zweidimensional charakterisierten Kalziumcluster im dreidimensionalen Raum zu untersuchen. Um zunächst eine Erfassung vieler Aktivitätsereignisse bei einer hohen Messstabilität zu erzielen, wurde der optimierte Voxelscan (Kapitel 3.5) eingesetzt. Die Dauer eines Scans war typischerweise auf zwei Minuten festgelegt, sodass anschließend mit Hilfe der Scanvorschau (Anhang A) Positionsabweichungen des Zielvolumens manuell korrigiert werden konnten. Für den Abgleich zwischen Morphologie und den aufgezeichneten Voxel-Aktivitätsdaten wurde ein hochauflösender Z-Stapel (512 × 512 Pixel, 496 × 496 μm², 101 Ebenen in einem Abstand von 2 μm, fünf Bildmittelungen, 2 Hz Bildabtastrate) verwendet. Gemäß den morphologischen Bilddaten konnten die Voxel in folgende Gruppen unterteilt werden: 1) Voxel der marginalen Zone, 2) Voxel der oberen kortikalen Platte und 3) von der Analyse auszuschließende Voxel (z.B.: Gefäßstrukturen, Abbildung 4.24A,B). Für alle mit dem Spiralscan erfassten Voxel mit mindestens 20 Scanpunkten und einer zugewiesenen Morphologie wurden die Aktivitätsverläufe berechnet (Abbildung 4.24C). Die Extraktion der Aktivitätszustände der Voxel erfolgte mittels eines *template-matching*-Algorithmus (Kapitel 3.7.1). In Abbildung 4.24D ist die Verteilung der Scanpunkte pro Voxel, gemittelt aus vier Experimenten, dargestellt. Anhand der dreidimensionalen Darstellung wird deutlich, dass aufgrund der sinusförmigen Bewegung entlang der Z-Achse die höchste Anzahl an Scanpunkten pro Voxel in den Umkehrpunkten des Scans erzielt wird. Aufgrund der spiralförmigen Raumtrajektorie entsteht eine breite Verteilung mit zwei lokalen Maxima (erstes Maximum: 27; zweites Maximum: 54). Demzufolge variieren die Anzahl der Scanpunkte und damit auch die Signalqualität durch Berechnung der Aktivitätssignale eines Voxels aus allen verfügbaren Scanpunkten pro Voxel in Abhängigkeit von der Voxelposition. Zur Reduktion falsch-positiver Aktivitätszustände wurden nur Voxel mit mindestens 20 Scanpunkten analysiert. Die resultierende Volumenabdeckung betrug 52% (*versus* 66% unter Einbezug aller Voxel mit mindestens einem Scanpunkt in einem gescannten Zylindervolumen).

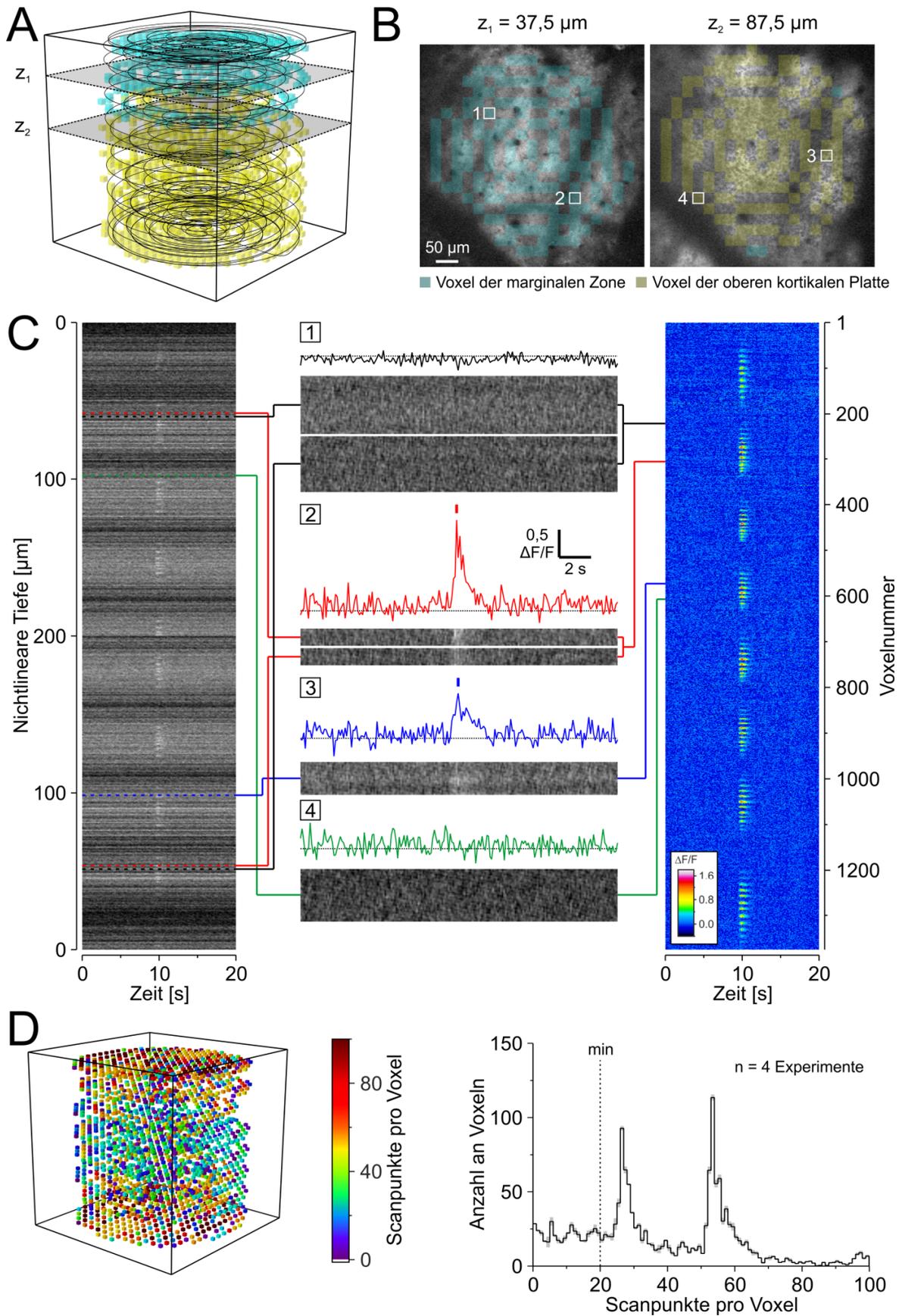


Abbildung 4.24: Messung neonataler Netzwerkaktivität mittels Voxelscan. **A** – Projektion des Spiralscans (schwarze Linie) und der gescannten Voxel (hellblaue und gelbe Würfel) im dreidimensionalen Raum ($500 \times 500 \times 200 \mu\text{m}^3$, XYZ). Die überlagerten Ebenen z_1 und z_2 entsprechen den Ebenen in **B**. **B** – Beispielebenen eines Z-Stapels. Die gescannten Voxel aus **A** sind als hellblaue

und gelbe Quadrate überlagert mit den Bilddaten dargestellt. Die Aktivität der markierten Voxel 1 – 4 ist in C dargestellt. C – Links: Rohdaten eines Spiralscans über 20 s (Linienplot). Mitte: Intensitätsverläufe (Aktivität) der in B markierten Voxel. Man beachte, dass die Verläufe aus mehreren Bildpunkten des Spiralscans gemittelt werden (Grauwertbilder). Detektierte Kalziumtransienten sind mittels eines vertikalen Balkens über den Verläufen gekennzeichnet. Rechts: Falschfarbenbild der Aktivität aller gescannten Voxel. D – Links: Dreidimensionale Projektion der Scanpunkt-Verteilung. Jeder farbige Würfel repräsentiert einen gescannten Voxel. Dimensionen des Volumens: $(500 \times 500 \times 200 \mu\text{m}^3, XYZ)$. Rechts: Scanpunkt-Verteilung der Voxel aus vier Experimenten. min – Definierte Untergrenze an Scanpunkten für nachgestellte Analysen. Voxel mit weniger als einem Scanpunkt sind nicht dargestellt.

Aus vier Experimenten konnten insgesamt 312 Aktivitätsereignisse abgeleitet werden. Ein aus den Aktivitätszuständen der Voxel gewonnenes Aktivitätsmuster wurde als Ereignis zusammengefasst, wenn mindestens zwei Voxel in einem maximalen zeitlichen Abstand von 0,5 s jeweils einen Kalziumtransient aufwiesen. Dabei wurde die minimale Dauer eines Aktivitätsereignisses auf 0,1 s festgelegt. Der durchschnittliche Anteil mechanisch instabiler Perioden aufgezeichneter Voxelscans betrug $14,3\% \pm 2,4\%$ ($n = 4$ Mäuse). Diese Perioden wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen (siehe Kapitel 3.7.1). Abbildung 4.25A zeigt beispielhaft die Aktivitätsverläufe von sechs Voxel eines Experiments. Deutlich sind zeitlich begrenzte Koaktivierungen einzelner Voxel erkennbar (Abbildung 4.25A-B). Unter Verwendung von dreidimensionalen Rekonstruktionen isolierter Ereignisse kann mit Hilfe aktiver *versus* inaktiver Voxel ein Eindruck der räumlichen Struktur und Ausdehnung der Ereignisse vermittelt werden – aktive Areale sind entlang der XY-Ebene von inaktiven Arealen abgegrenzt, wobei eine vollständige Ausbreitung der Aktivität entlang der Z-Achse und damit über verschiedene kortikale Schichten in der überwiegenden Mehrheit der Aktivitätsereignisse beobachtet werden kann (Abbildung 4.25C-D). Die mittlere Frequenz spontaner Kalziumtransienten einzelner Voxel lag bei $0,22 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ ($n = 4$ Mäuse, Abbildung 4.25E). Unter Isofluran-Anästhesie konnte die Spontanaktivität vollständig unterdrückt werden ($0,00 \pm 0,00 \text{ min}^{-1}$, $n = 4$ Mäuse). Im Vergleich zu der Aktivität einzelner Voxel lag die mittlere Frequenz spontaner Aktivitätsereignisse bei $1,94 \pm 0,44 \text{ min}^{-1}$ ($n = 4$ Mäuse, Abbildung 4.25F). Daraus lässt sich schließen, dass ein Voxel durchschnittlich an jedem neunten Ereignis beteiligt ist. Damit übereinstimmend betrug die durchschnittliche Beteiligungsrate von Voxel an Aktivitätsereignissen $0,12 \pm 0,01$ ($n = 4$ Mäuse, Abbildung 4.25G). Da die Aktivität einzelner Voxel Isofluran-sensitiv war, lag auch die Frequenz der Ereignisse unter Isofluran bei $0,03 \pm 0,03$ ($n = 4$ Mäuse, Abbildung 4.25F). Zusammenfassend konnte erstmalig spontane Netzwerkaktivität im visuellen Kortex neonataler Mäuse unter Verwendung von Voxel-Elementen dreidimensional abgeleitet werden. Im Folgenden soll der Fokus vorrangig auf der räumlichen Charakteristik der Kalziumcluster liegen.

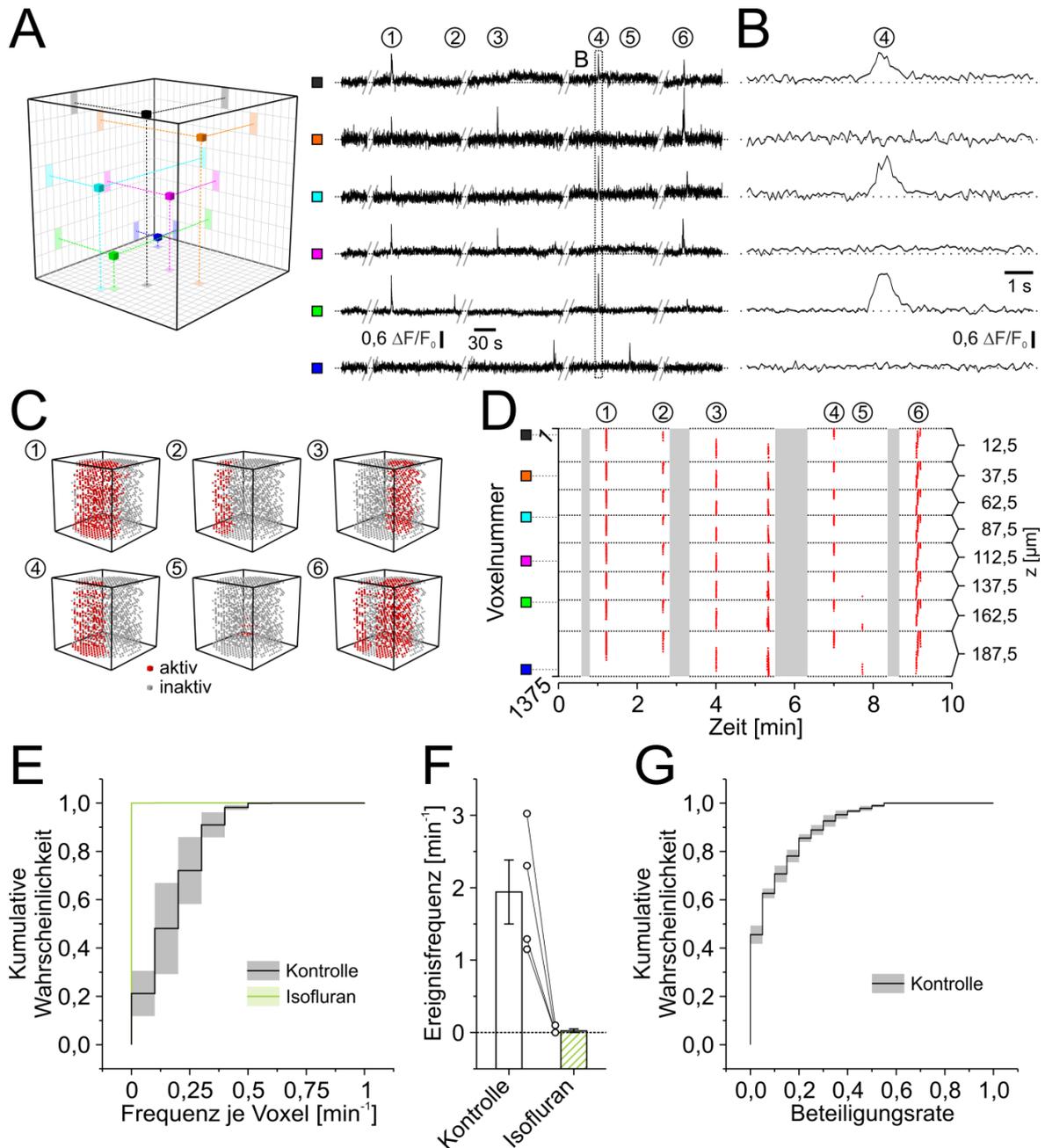


Abbildung 4.25: Zeitliche Charakteristik neonataler Netzwerkaktivität im dreidimensionalen Raum. A – Links: Positionen von Voxeln im dreidimensionalen Raum. Volumen: $500 \times 500 \times 200 \mu\text{m}^3$, XYZ. Rechts: Aktivitätsverläufe der links abgebildeten Voxel. Man beachte, dass die Verläufe aufgrund von Driftkorrekturen nach Intervallen von rund zwei Minuten unterbrochen sind. B – Vergrößerte Darstellung des in A markierten Intervalls. C – Dreidimensionale Rekonstruktionen der in A und B markierten Aktivitätsereignisse. Volumina: $500 \times 500 \times 200 \mu\text{m}^3$, XYZ. D – Rasterplot der Aktivität über 10 min. Jeder Punkt repräsentiert einen aktiven Voxel zu einem bestimmten Zeitpunkt. Graue Flächen: Keine aufgezeichneten Aktivitätsdaten in diesem Zeitintervall. E, F, G – Quantifizierung der Messungen von vier Mäusen. E – Kumulative Verteilung der Aktivitätsfrequenz einzelner Voxel. F – Mittlere Frequenz der Aktivitätsereignisse. G – Kumulative Verteilung der Voxel-Beteiligung an Aktivitätsereignissen.

Dazu wurde die Ausbreitung der Aktivitätsereignisse entlang der drei Raumachsen untersucht (Abbildung 4.26). Dabei wurden 190 Ereignisse von vier Mäusen einbezogen,

die mindestens 48 aktive Voxel aufwiesen. Diese Anzahl entspricht einem Aktivitätsereignis mit durchschnittlich sechs aktiven Voxeln pro Ebene entlang der Z-Achse. In Abbildung 4.26A ist die relative Voxelaktivität für jedes Ereignis entlang der drei Raumachsen dargestellt. Die relative Aktivität berechnet sich aus der Summe aller aktiven Voxel in einer Ebene (definiert durch die jeweilige Achsenposition) dividiert durch die Summe aller Voxel dieser Ebene (Wertebereich: 0 – 1). Für 190 untersuchte Ereignisse ergaben sich entlang der X- und Y-Achse unterschiedliche Grade der Aktivierung sowohl innerhalb, als auch zwischen den Ereignissen. Für die Z-Achse ergibt sich innerhalb der Aktivitätsereignisse eine nahezu einheitliche Aktivierung. Die Ereignisse selbst weisen unterschiedliche Grade der Aktivierung auf. Betrachtet man bei einem Ereignis die Distanz der am weitesten voneinander entfernten aktiven Voxel als Maß der räumlichen Ausbreitung, ergeben sich die in Abbildung 4.26B-D dargestellten Verteilungen. Aus den Daten der X-Achse geht hervor, dass die meisten Aktivitätsereignisse räumlich begrenzt sind (Median: 150 μm ; Minimum: 25 μm ; Maximum: 475 μm , Abbildung 4.26B). Auch entlang der Y-Achse sind die Ereignisse überwiegend räumlich begrenzt (Median: 200 μm ; Minimum: 25 μm ; Maximum: 500 μm , Abbildung 4.26C). Im Gegensatz dazu zeigt die breite Mehrheit der Aktivitätsereignisse Ausbreitungen entlang der kompletten Z-Achse (Median: 200 μm ; Minimum: 25 μm ; Maximum: 200 μm , Abbildung 4.26D). Die mittlere Voxel-Beteiligung aller 190 Aktivitätsereignisse betrug $0,18 \pm 0,01$ (Abbildung 4.26E-F). Unter Einbezug der morphologischen Identität der aktiven Voxel eines Ereignisses, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der mittleren Voxel-Beteiligungen zwischen marginaler Zone und oberer kortikaler Platte (MZ: $0,17 \pm 0,02$; UCP: $0,19 \pm 0,01$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: MZ \neq UCP; $P > 0,2$; $n = 4$ Experimente). In Einklang mit den zweidimensionalen Fluoreszenzdaten aus Kapitel 4.2.2, kann die Beschränkung der räumlichen Ausbreitung neonataler Netzwerkaktivität in der XY-Ebene bestätigt werden. Die dreidimensionalen Messungen enthüllen eine weite Ausbreitung dieser Aktivität entlang der Z-Achse (200 μm). Die Aktivierung der Voxel erfolgt dabei gleichermaßen in der marginalen Zone und in der oberen kortikalen Platte. Abgeleitet von der rein räumlichen Betrachtung, ergibt sich die Frage, inwieweit diese Ausbreitung einen zeitabhängigen Prozess darstellt. Aufgrund der Scanfrequenz von 10 Hz sind Aussagen bezüglich der Ereignisdynamik auf diskrete 100 ms-Zeitpunkte beschränkt. Folglich konnte eine robuste raumzeitliche Analyse lediglich auf Aktivitätsereignisse mit einer hohen Ereignisdauer (>1 s) angewendet werden. Zusätzlich durfte der Schwerpunkt des Ereignisses über die gesamte Ereignisdauer die Grenzen des Zielvolumens nicht überschreiten.

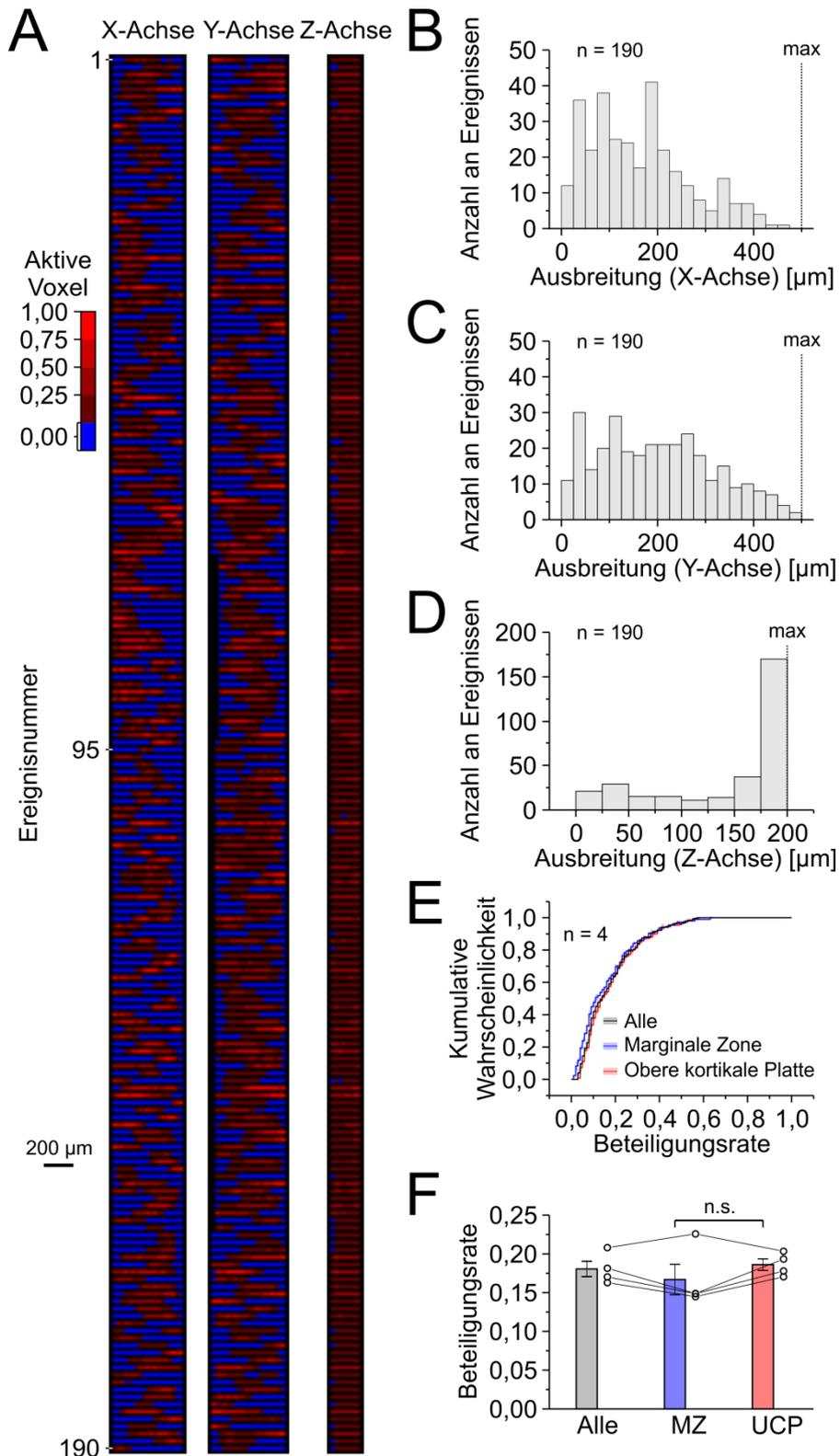


Abbildung 4.26: Räumliche Charakteristik neonataler Netzwerkaktivität im dreidimensionalen Raum. A – Räumliche Ausbreitung aller Aktivitätsereignisse entlang der drei Raumachsen. B – F – Quantifizierung. Ausbreitung entlang der X- (B), Y- (C) und Z-Achse (D). max – Detektionsgrenze. E – Kumulative Verteilungen der Beteiligung von Voxeln an Aktivitätsereignissen. F – Die mittlere Beteiligung zwischen marginaler Zone (MZ) und oberer, kortikaler Platte (UCP) unterscheidet sich nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: MZ ≠ UCP; $P > 0,2$; n = 4 Experimente). n.s. – nicht signifikant.

In Abbildung 4.27 sind zwei Beispiele der raumzeitlichen Charakteristik neonataler Netzwerkaktivität abgebildet. Zwei Klassen von Aktivitätsereignissen konnten identifiziert werden: 1) statische Ereignisse ohne Veränderung des Aktivitätsschwerpunktes (Abbildung 4.27A-B) und 2) dynamische Ereignisse mit veränderlichen Aktivitätsschwerpunkt (Abbildung 4.27C-D). Der Aktivitätsschwerpunkt definiert sich aus dem arithmetischen Mittel aller Koordinaten aktiver Voxel zu einem bestimmten Zeitpunkt. Absolute Änderungen des Schwerpunktes beziehen sich auf den zeitlich ersten Schwerpunkt eines Aktivitätsereignisses. Statische Ereignisse entwickelten typischerweise eine Aktivierung um einen stationären Schwerpunkt, resultierend aus einer sich ausbreitenden und ansteigenden Fluoreszenzintensität um diesen Punkt bis zu einem Intensitätsmaximum und einem anschließenden Abfall der Intensität zurück auf das Niveau der Hintergrundintensität (Abbildung 4.27A). Korrelationen zwischen den drei Raumkomponenten der absoluten Änderung des Aktivitätsschwerpunktes und der Zeit ergaben geringe, bzw. keine signifikanten Zusammenhänge (Spearman-Korrelation; X-Achse: $\rho_x = 0,65$; $P < 0,05$; Y-Achse: $\rho_y = 0,09$; $P > 0,05$; Z-Achse: $\rho_z = -0,52$; $P > 0,05$; Abbildung 4.27B). Folglich gibt es keinen bzw. einen schwachen Einfluss der Zeit auf die Position des Schwerpunktes dieser Klasse von Aktivitätsereignissen. Dynamische Ereignisse entwickelten analog zu den statischen Ereignissen ein Aktivitätsmaximum (Abbildung 4.27C). Die Aktivitätsschwerpunkte zeigten jedoch eine signifikante Änderung über die Zeit entlang aller drei Raumdimensionen (Spearman-Korrelation; X-Achse: $\rho_x = 1,00$; $P < 0,001$; Y-Achse: $\rho_y = -0,93$; $P < 0,001$; Z-Achse: $\rho_z = -0,94$; $P < 0,001$; Abbildung 4.27D). Folglich gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Position des Schwerpunktes der Aktivität und der Zeit. Interessanterweise gab es in der Tat Aktivitätsereignisse, die eine negative Korrelation zwischen der Z-Komponente des Aktivitätsschwerpunktes und der Zeit aufwiesen, was eine Ausbreitung der Ereignisse von der Oberfläche des Kortex in tieferliegende Schichten andeutet. Die breite Mehrheit der Aktivitätsereignisse konnte jedoch aufgrund deren geringen Dauer (< 1 s) nicht analysiert werden (296 von 319 Ereignissen aus vier Mäusen). Die Ereignisdauer wurde mit Hilfe der Anstiegszeit quantifiziert (Kapitel 3.7.1, Abbildung 4.27E-F). Die mittlere Ereignisdauer betrug 200 ms (Median; Minimum: 100 ms; Maximum: 2200 ms; $n = 319$ Ereignisse aus vier Mäusen, Abbildung 4.27E). Dabei waren 16 Ereignisse mit einer Dauer von mindestens 1000 ms zugehörig zu der Gruppe der 190 Ereignisse mit mindestens 48 aktiven Voxeln (Abbildung 4.27F). Zusammenfassend konnten zwei Klassen von Ereignissen der spontanen Netzwerkaktivität identifiziert werden: statische und dynamische Aktivitätsereignisse. Die breite Mehrheit der Ereignisse wies eine geringe Dauer von weniger als eine Sekunde auf, sodass für eine Analyse der Ereignisdynamik eine höhere Scanfrequenz benötigt wird.

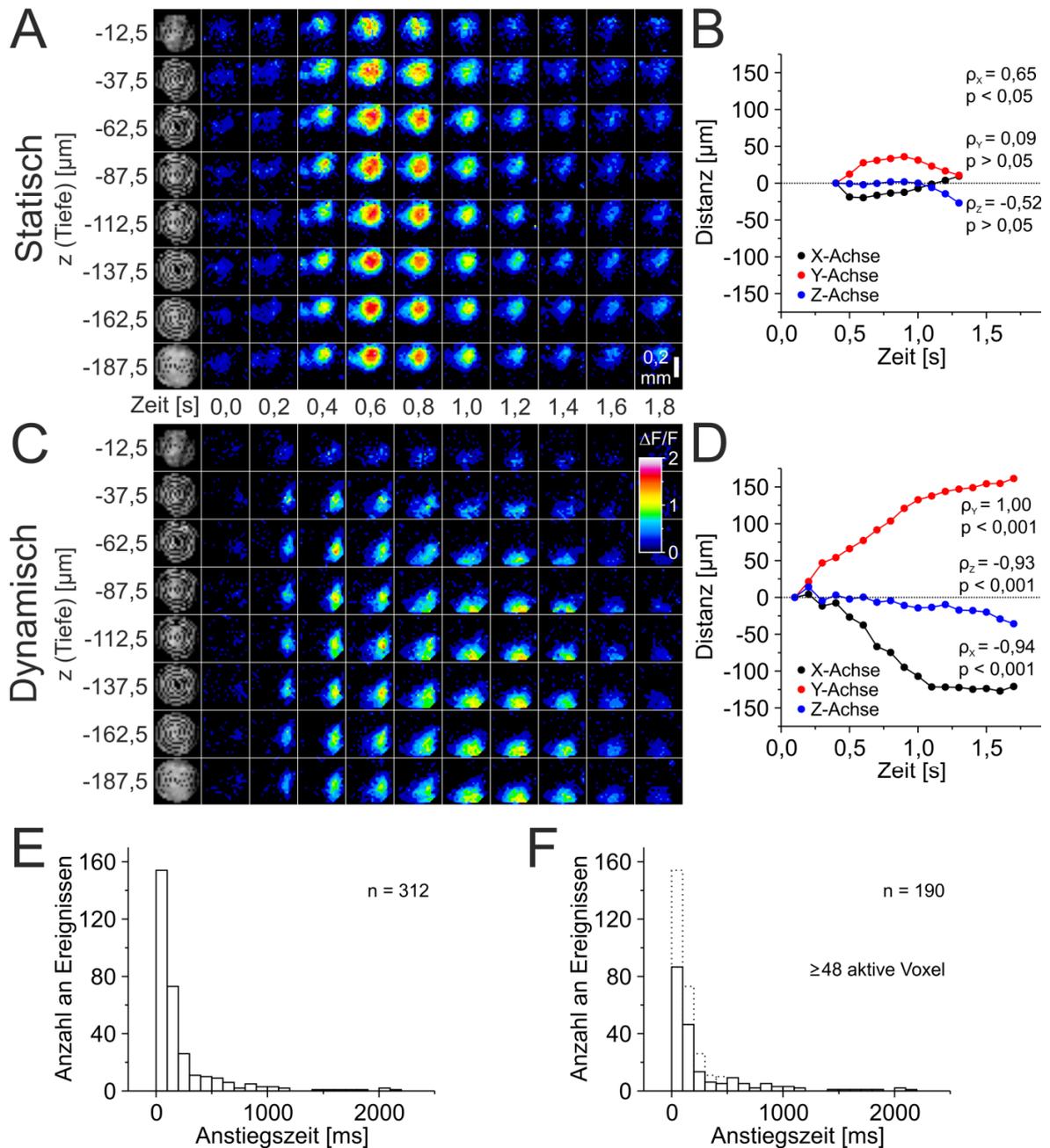


Abbildung 4.27: Raumzeitliche Charakteristik neonataler Netzwerkaktivität im dreidimensionalen Raum. Beispiele eines statischen (A) und eines dynamischen Ereignisses (C). Zur besseren Darstellung wurden Bildpunkte ohne Messwert aus Nachbarmesswerten interpoliert (mindestens ein Voxel-Nachbar, Hintergrund-Fluoreszenz in der ersten Spalte ausgenommen). B, D – Absolute Änderungen des Aktivitätsschwerpunktes über die Zeit, unterteilt in drei Raumachsen. B – Quantifizierung des in A gezeigten Ereignisses. Der Schwerpunkt bleibt nahezu konstant (Spearman-Korrelation; X-Achse: $P < 0,05$; Y-Achse: $P > 0,05$; Z-Achse: $P > 0,05$). D – Quantifizierung des in C gezeigten Ereignisses. Der Schwerpunkt ändert sich signifikant (Spearman-Korrelation; X-, Y- und Z-Achse: $P < 0,001$). E – Anstiegszeit aller Aktivitätsereignisse aus vier Tieren. F – Anstiegszeit von Aktivitätsereignissen mit mindestens 48 aktiven Voxeln aus E. Die gepunkteten Balken repräsentieren die Verteilung der Ereignisse aus E ohne Mindestaktivitäts-Kriterium der Voxel.

Abschließend sollte die Frage beantwortet werden, welchen Grad der Dichtheit die Aktivitätsereignisse aufweisen. Unter Verwendung der gegebenen Voxeldefinition wurden

Subvolumina von $25 \times 25 \times 25 \mu\text{m}^3$ eines Ereignisses dahingehend untersucht, ob diese in Ihrer unmittelbaren Nachbarschaft vorwiegend aktive oder inaktive Subvolumina besitzen (maximal 26 Nachbarn = 9 Voxel oberhalb + 8 Voxel in gleicher Ebene + 9 Voxel unterhalb, Abbildung 4.28A). Aufgrund der spiralförmigen Scantrajektorie gibt es zwangsläufig Voxel, die durch ihre räumliche Lage in der Spiraltrajektorie weitaus weniger Nachbarn aufweisen. Um einen geeigneten unteren Grenzwert für die Anzahl an vorhandenen Nachbarn festzulegen, wurde zunächst die Anzahl an Nachbarn für jedes Voxel aus vier Experimenten bestimmt (Abbildung 4.28B). Die mittlere Anzahl an Voxelnachbarn lag bei $12,12 \pm 0,25$ ($n = 4$ Mäuse). Unter Verwendung eines Grenzwertes von mindestens zehn Nachbarn, konnten 78% der Voxel in die Analyse einbezogen werden. Zur Quantifizierung der Dichtheit von Aktivitätsereignissen wurde ein Nachbarschaftsindex verwendet. Dieser Index berechnet sich aus der Anzahl aktiver Nachbarn dividiert durch die Anzahl aller (bekannten) Nachbarn eines Voxels (Wertebereich: 0 – 1). In Abhängigkeit von dem Aktivitätszustand des zentralen Voxels selbst unterscheidet man den Nachbarschaftsindex von aktiven und inaktiven Voxeln. Ein hoher Index eines aktiven Voxels würde bedeuten, dass vorwiegend aktive Voxel in dessen Nachbarschaft liegen. Wiederum würde ein niedriger Index vorwiegend inaktive Nachbarn eines inaktiven Voxels anzeigen. Liegen aktive und inaktive Nachbarschaftsindizes eines solchen Falls vor, ließe dies auf eine hohe Dichtheit eines Aktivitätsereignisses schließen. Für eine konkrete Anwendung auf die gemessene Aktivität wurden die mittleren Verteilungen der Nachbarschaftsindizes für alle Aktivitätsereignisse berechnet und mit einer Simulation verglichen (Abbildung 4.28C-D). Die Simulation bestand darin, zufällige dreidimensionale Aktivitätsmuster mit der gleichen durchschnittlichen Beteiligungsrates von Voxeln wie die der gemessenen Ereignisse zu generieren ($0,18 \pm 0,01$; mindestens 48 aktive Voxel pro Ereignis; $n = 4$ Mäuse) und für dieses Muster die Nachbarschaftsindizes zu berechnen (Kapitel 3.7.1, $n = 4 \times 100$ Simulationsdurchläufe). Die relativen Verteilungen der simulierten Indizes für aktive und inaktive Voxel waren identisch normalverteilt und zeichneten sich durch ein globales Maximum bei $0,18 \pm 0,00$ aus ($n = 4$; Abbildung 4.28C-D). Die Verteilungen der experimentell bestimmten Nachbarschaftsindizes hoben sich deutlich von den simulierten Verteilungen ab (inaktiv: $0,05 \pm 0,00$; aktiv: $0,79 \pm 0,01$; $n = 4$ Mäuse). Besagte Werte deuten an, dass die Aktivitätsereignisse auf Skalierung der Voxel eine hohe Dichtheit aufweisen. Die Beteiligung einzelner Zellen an diesen dreidimensional strukturierten Aktivitätsmustern bleibt zunächst offen. Um diese Frage zu untersuchen, wurden weitere Spiralscans mit Einzelzellauflösung durchgeführt.

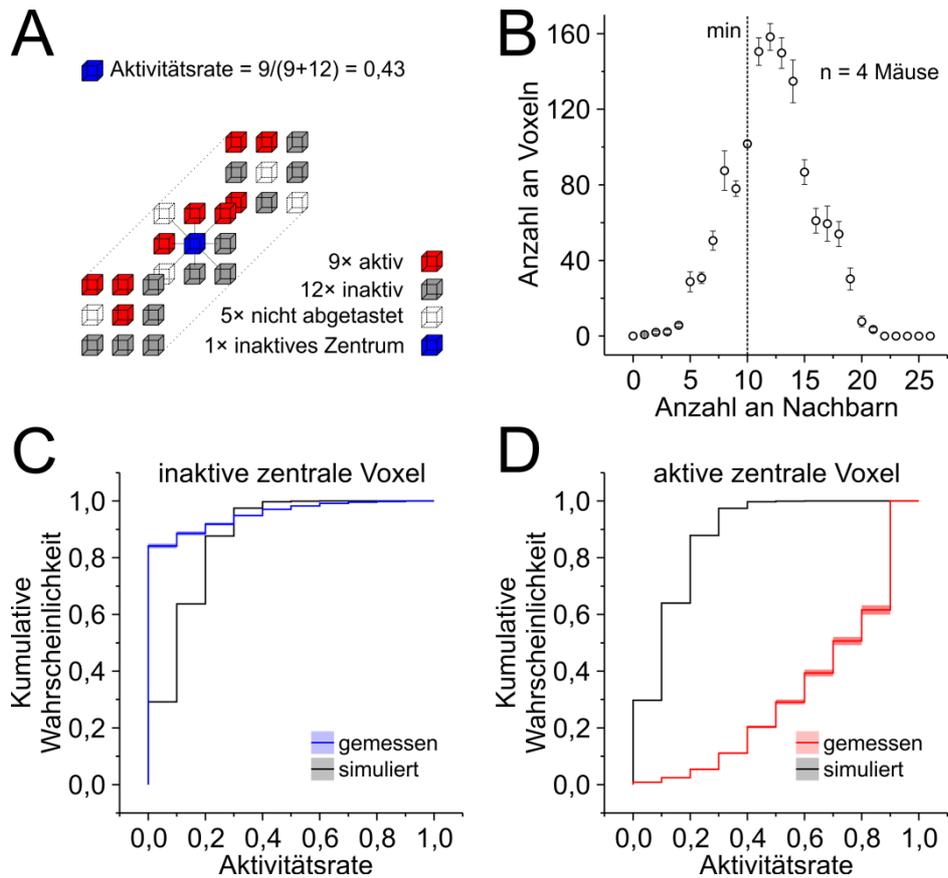


Abbildung 4.28: Dichte neonataler Aktivitätsereignisse von vier Experimenten. **A** – Beispielhafte Berechnung der Aktivitätsrate benachbarter Voxel als Maß der Aktivitätsdichte eines Ereignisses (Nachbarschaftsindex). **B** – Festlegung der minimalen Anzahl an Voxel-Nachbarn für eine ausreichende Trennschärfe der Aktivitätsdichte (min). **C, D** – Kumulative Verteilungen der Aktivitätsdichte, gemittelt über vier Tiere. **C** – Inaktive Voxel-Zentren. **D** – Aktive Voxel-Zentren.

Aktivitätsmessungen mit Einzelzellauflösung

Durch Reduktion des Zielvolumens auf $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ konnten optimierte Spiralscans mit Einzelzellauflösung eingesetzt werden. Aufgrund der erhöhten Anforderung an die räumliche Auflösung erhöhen sich gleichermaßen die Anforderungen an die Korrektur von Positionsabweichungen dieses Volumens. Um diese zu erfüllen war ein Abgleich von Morphologie und zellulären Aktivitätsdaten in einem engeren Zeitrahmen als zwei Minuten vorzunehmen. Daher wurde eine ereignisbasierte Dauer der Spiralscans definiert. Konkret erfolgte die Aufzeichnung der Spiraldaten innerhalb der kortikalen Platte, bis visuell in der Live-Vorschau von 2PLSMC ein Aktivitätsereignis vom Experimentator detektiert wurde. Im direkten Anschluss wurde ein Z-Stapel aufgezeichnet, der zur Identifikation der gescannten Zellen verwendet wurde (Kapitel 3.7.2). Diese Vorgehensweise ermöglichte eine Minimierung von Positionsabweichungen zwischen den morphologischen Bilddaten und den zellulären Aktivitätsdaten. Abbildung 4.29A-C zeigt die Rekonstruktion der Aktivität einzelner Zellen unter Verwendung der jeweiligen Zellpositionen aus dem Z-Stapel. Nach Mittelung der Intensitätsdaten aller

Scanpunkte einer identifizierten Zelle erfolgte die Detektion der Aktivitätszustände der Zelle mittels eines Schwellenwertverfahrens (Kapitel 3.7.2, Abbildung 4.29C). Anhand des Zeitverlaufs der Aktivitätszustände konnte die Beteiligung individueller Zellen an Aktivitätsereignissen bestimmt werden. In Abbildung 4.29D sind die Verteilung der Scanpunkte pro Zelle sowie die Volumenabdeckung dargestellt (n = 52 Ereignisse von vier Experimenten). Das Beispiel der dreidimensionalen Darstellung der Scanpunkte pro Zelle (Abbildung 4.29D) verdeutlicht den bereits von den Voxelscans bekannten Effekt, dass aufgrund des Verlaufs der Scantrajektorie die höchste Anzahl an Scanpunkten pro Zelle in den Umkehrpunkten der Trajektorie erzielt werden. Es resultiert eine breite, positionsabhängige Verteilung der Scanpunkte pro Zelle (Median: 17). Der unter realen Messbedingungen mit dem Kalziumindikator GCaMP3 identifizierte durchschnittliche Zellradius von 3,5 μm wurde dabei als Definition für den maximalen Abstand der Scanpunkte zu potentiellen Zellmittelpunkten verwendet (für einen Vergleich des Zellradius siehe auch Kapitel 4.2.2). Da der angenommene Radius von 5,0 μm aus Kapitel 3.5 nun unterschritten wird, ergibt sich eine Verteilung der Scanpunkte pro Zelle, die deutlich linksverschoben gegenüber simulierten Daten mit einem Radius von 5,0 μm ist (Kapitel 3.7.2, Median der Simulation mit $r = 5,0 \mu\text{m}$: 45, n = 400 Simulationen-durchläufe). Eine Simulation mit einem Radius von 3,5 μm und einer variierenden Zelldichte ($5,0 \cdot 10^5 \pm 1,9 \cdot 10^5$ Zellen/ mm^3) zufällig platzierter Zellen zeigt vergleichbare Ergebnisse gegenüber den Messungen (Median der Simulation mit $r = 3,5 \mu\text{m}$: 18, n = 400 Simulationen-durchläufe). Dies lässt darauf schließen, dass die adaptierte Definition des Zelldurchmessers maßgeblich zur festgestellten Linksverschiebung beiträgt. Um den Großteil der Zellen nicht von der Analyse auszuschließen, wurden folglich die Aktivitätszustände aller Zellen mit mindestens einem Scanpunkt pro Zelle bestimmt. Die resultierende Volumenabdeckung aller in einem zentrischen Zylinder innerhalb des Z-Stapels detektierter Zellen betrug $88,5\% \pm 0,2\%$ (Zylinderradius: 50 μm , Zylinderhöhe: 100 μm ; n = 52 Ereignisse von vier Experimenten). Es konnte von bis zu 693 glutamatergen (EMX1-positiven) Zellen (390 ± 20 ; n = 52 Ereignisse von vier Experimenten) simultan Aktivität abgeleitet werden.

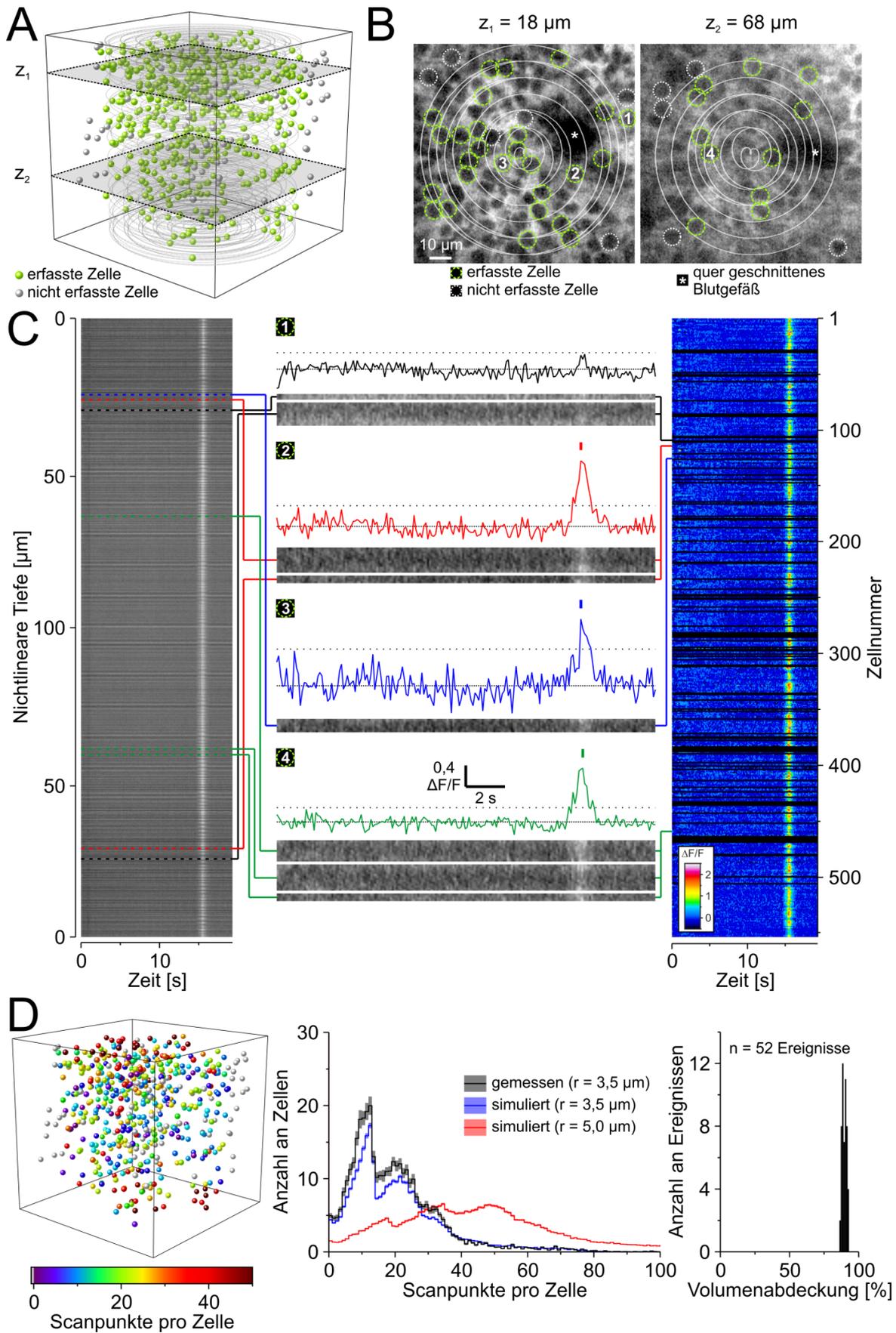


Abbildung 4.29: Messung neonataler Netzwerkaktivität mittels Einzelzellscan. A – Projektion des Spiralscans (graue Linie) der erfassten (grüne Kugeln) und nicht erfassten Zellen (weiße Kugeln) im dreidimensionalen Raum ($100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$, XYZ). Die überlagerten Ebenen z_1 und z_2 entsprechen

den Ebenen in B. B – Beispielebenen eines Z-Stapels. Die Zellen aus A sind als grüne und weiße Kreise überlagert mit den Bilddaten des Z-Stapels und der Spiraltrajektorie (graue Linie) dargestellt. Die Aktivität der markierten Zellen 1 – 4 ist in C dargestellt. C – Links: Rohdaten eines Spiralscans über ~20 s (Linienplot). Mitte: Intensitätsverläufe (Aktivität) der in B markierten Zellen. Man beachte, dass die Verläufe aus mehreren Bildpunkten des Spiralscans gemittelt werden (Grauwertbilder). Detektierte Kalziumtransienten sind mittels eines vertikalen Balkens über den Verläufen gekennzeichnet. Die gepunktete Linie entspricht dem Schwellenwert des Detektionsalgorithmus. Rechts: Falschfarbenbild der Aktivität aller im Z-Stapel identifizierter Zellen. Schwarze Zeilen repräsentieren nicht erfasste Zellen. D – Links: Dreidimensionale Projektion der Scanpunkt-Verteilung eines Beispielergebnisses. Jede farbige Kugel repräsentiert eine Zelle. Dimensionen des Volumens: (100 × 100 × 100 μm³, XYZ). Mitte: Scanpunkt-Verteilung der Zellen aus vier Experimenten und simulierten Daten. Parameter r repräsentiert den maximalen Abstand eines Scanpunkts zum Zellmittelpunkt. Rechts: Volumenabdeckung von 52 detektierten Aktivitätsereignissen aus vier Experimenten.

Unter Verwendung der Einzelzellscans konnten insgesamt 88 Aktivitätsereignisse in 12 Zielvolumina von vier Mäusen abgeleitet werden. Die mittlere Frequenz der Ereignisse betrug $0,36 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ (88 visuell detektierte Ereignisse aus vier Mäusen, Abbildung 4.30C). 52 dieser Ereignisse konnten dank einer ausreichenden Positionsstabilität für weitere Analysen verwendet werden (41,0% ± 7,6% der Ereignisse wurden aufgrund mechanischer Instabilität verworfen, n = 4 Mäuse). Abbildung 4.30A-B zeigt beispielhaft die Aktivität von 12 Zellen aus zwei Zielvolumina während zwei verschiedenen Aktivitätsereignissen. Deutlich sind zeitlich begrenzte Koaktivierungen einzelner Zellen erkennbar. Die dreidimensionalen Rekonstruktionen der aktiven *versus* inaktiven Zellen (Abbildung 4.30B) vermitteln einen Eindruck der räumlichen Struktur der Aktivitätsereignisse mit Einzelzellauflösung: Entgegen der Beobachtungen auf Skalierungsebene der Voxelscans existieren hier Ereignisse mit geringerer Aktivitätsdichte (Ereignisse 13 und 14 in Abbildung 4.30B). Andere Ereignisse wiesen wiederum eine Beteiligung nahezu aller Zellen des Volumens mit scharfen Abgrenzungen zu inaktiven Subpopulationen auf (Ereignisse 23 und 24 in Abbildung 4.30B). Die durchschnittliche Zell-Beteiligungsrate lag bei 19,37% (n = 52 Ereignisse aus vier Mäusen, Abbildung 4.30D). Zur beispielhaften Veranschaulichung der Dynamik der Aktivitätsereignisse soll die farbkodierte Animation auf der beiliegenden DVD dienen (Anhang E – V3). Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzänderungen in Abhängigkeit von der Zeit (Intervall: 1,9 s) für alle Zellen eines Zielvolumens (Ereignis 26 in Abbildung 4.31). Deutlich ist eine Ausbreitung der Aktivität über die gesamte Z-Achse in einer scharf entlang X- und Y-Achse abgegrenzten Subpopulation von Zellen sichtbar. Der wahre Schwerpunkt dieses dargestellten Ereignisses liegt höchstwahrscheinlich außerhalb des FOV. Zur Unterscheidung zwischen solchen randständig und den zentral aufgezeichneten Aktivitätsereignissen wurde die Distanz des Aktivitätsschwerpunktes zu dem Schwerpunkt aller gemessenen Zellen

verwendet. War die Distanz kleiner oder gleich $15\ \mu\text{m}$ und waren mindestens 30 Zellen an dem Ereignis beteiligt, wurde das Ereignis als Zentralereignis klassifiziert. Andernfalls gehörte das Aktivitätsereignis zu Klasse der Randereignisse. In Abbildung 4.31 ist die Klassifikation aller 52 Ereignisse dargestellt. Auch unter den 24 Zentralereignissen gibt es Ereignisse mit Subpopulationen, die eine geringe Zellbeteiligung aufweisen. Um die Dichtheit der Aktivitätsereignisse auf Einzelzellebene weiter zu untersuchen, wurde der bereits für die Voxel-basierten Spiralscans eingeführte Nachbarschaftsindex in modifizierter Form verwendet. Dabei wurde die Nachbarschaft einer Zelle in einem kugelförmigen Bereich des sechsfachen Zellradius, ausgehend vom Zellmittelpunkt definiert. Der Nachbarschaftsindex ergab sich aus der Anzahl der aktiven *versus* aller Nachbarn einer Zelle (Abbildung 4.32A). Alle Zellen mit mindestens zehn Nachbarn wurden in die Analyse einbezogen (mittlere Anzahl an Nachbarn: $17,3 \pm 1,7$; $n = 12$ Zielvolumen von vier Mäusen; Abbildung 4.32B). Die Nachbarschaftsindizes aller 52 Aktivitätsereignisse wurden gemäß des Aktivitätszustandes der betrachteten Zelle in inaktiv und aktiv unterteilt. Des Weiteren erfolgte eine Differenzierung zwischen Rand- und Zentralereignissen (Abbildung 4.32C-D). Als Referenz wurde für jede Gruppe die Verteilung des Index mittels zufälliger Aktivität der gleichen mittleren Zell-Beteiligungsrate simuliert (siehe Methoden, mittlere Zell-Beteiligungsrate für Randereignisse: $0,11 \pm 0,02$; $n = 28$; mittlere Zell-Beteiligungsrate für Zentralereignisse: $0,65 \pm 0,06$; $n = 24$). Die relativen Verteilungen der simulierten Nachbarschaftsindizes für aktive und inaktive Zellen sind identisch normalverteilt und zeichnen sich durch ein globales Maximum aus (Randereignisse: $0,11 \pm 0,00$; Zentralereignisse: $0,65 \pm 0,00$; $n = 400$ Simulationsdurchläufe). Inaktive Zellen der gemessenen Randereignisse besitzen durchschnittlich rund 5% aktive Nachbarzellen, wohingegen die aktiven Zellen rund 25% aktive Nachbarn besitzen (Nachbarschaftsindex inaktiver Zellen: $0,07 \pm 0,01$; Nachbarschaftsindex aktiver Zellen: $0,26 \pm 0,04$; $n = 28$ Randereignisse in 4 Mäusen; Abbildung 4.32C-D). Dies deutet an, dass die Randereignisse eine Struktur aufweisen, aber eine geringe Dichtheit besitzen. Folglich sind die Übergänge von Aktivitätsereignissen zu inaktiven Arealen eher kontinuierlich statt diskret. Inaktive Zellen der gemessenen Zentralereignisse besitzen durchschnittlich rund 45% aktive Nachbarzellen, wohingegen die aktiven Zellen rund 70% aktive Nachbarn besitzen (Nachbarschaftsindex inaktiver Zellen: $0,46 \pm 0,06$; Nachbarschaftsindex aktiver Zellen: $0,71 \pm 0,05$; $n = 24$ Zentralereignisse in 4 Mäusen; Abbildung 4.32C-D). Besagte Werte deuten an, dass die Aktivitätsereignisse auf Ebene von einzelnen Zellen keine homogene Dichtheit aufweisen. Ereignisse mit einer Beteiligung von bis zu 100% aller Zellen belegen jedoch, dass eine maximale Dichtheit im Zentrum der Aktivität erreichbar ist.

Zusammenfassend konnte erstmalig spontane Netzwerkaktivität im visuellen Kortex neonataler Mäuse mit Einzelzellauflösung dreidimensional abgeleitet werden. Die beobachteten Aktivitätsereignisse weisen eine dreidimensionale Struktur auf, wobei deren Dichte in Rand- und Zentralzonen deutlich voneinander abweichen.

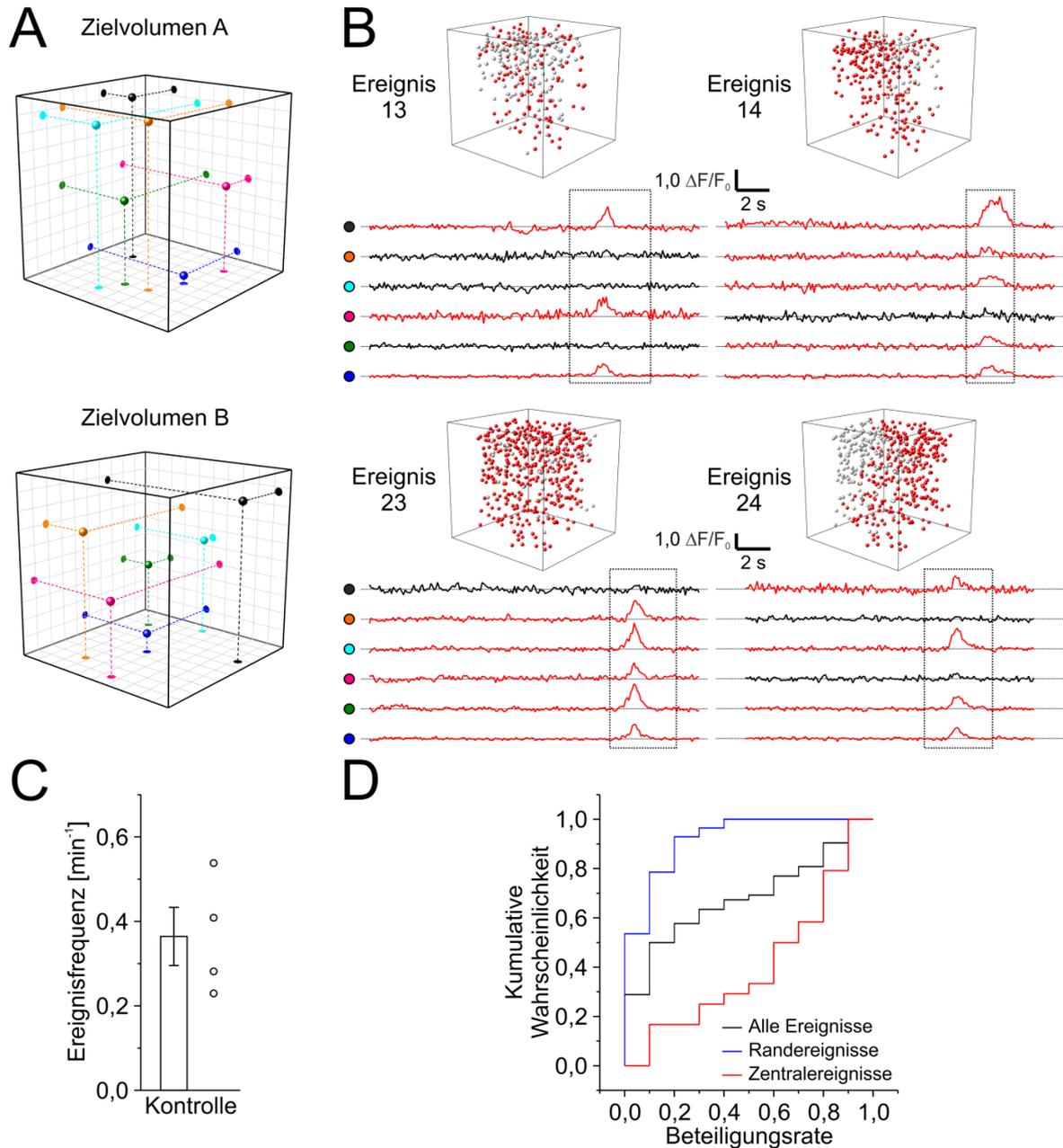
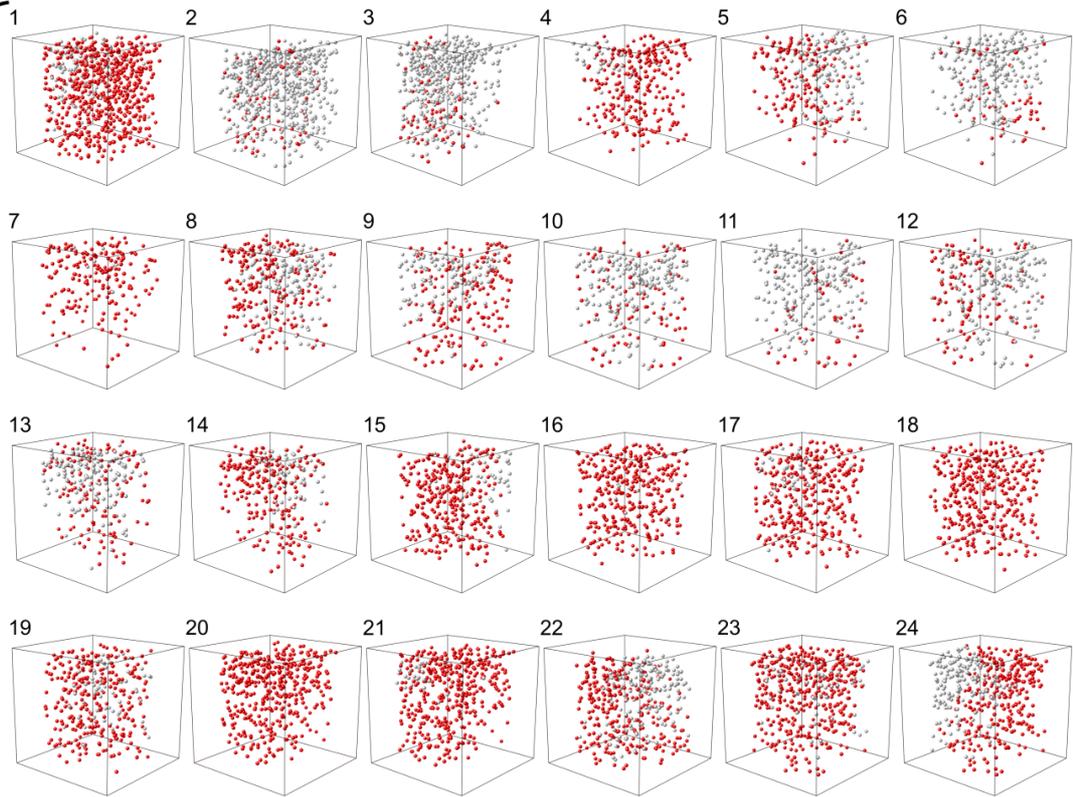


Abbildung 4.30: Zeitliche Charakteristik neonataler Netzwerkaktivität im dreidimensionalen Raum mit Einzelzellauflösung. A – Positionen von Beispielzellen im dreidimensionalen Raum. Volumen: $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$, XYZ. B – Aktivitätsverläufe der in A abgebildeten Zellen, gezeigt an je zwei isolierten Aktivitätsereignissen. Eine dreidimensionale Rekonstruktionen jedes Aktivitätsereignisses ist über den $\Delta F/F_0$ -Verläufen der Zellen abgebildet (Volumen: $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$, XYZ). Rote Verläufe und Kugeln repräsentieren aktive Zellen. C – Mittlere Frequenz der Aktivitätsereignisse aus vier Experimenten. D – Kumulative Verteilung der Zell-Beteiligung an Aktivitätsereignissen (28 Randereignisse und 24 Zentralereignisse aus vier Tieren).

Zentralereignisse



Randereignisse

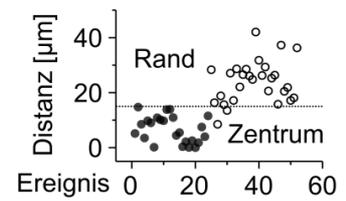
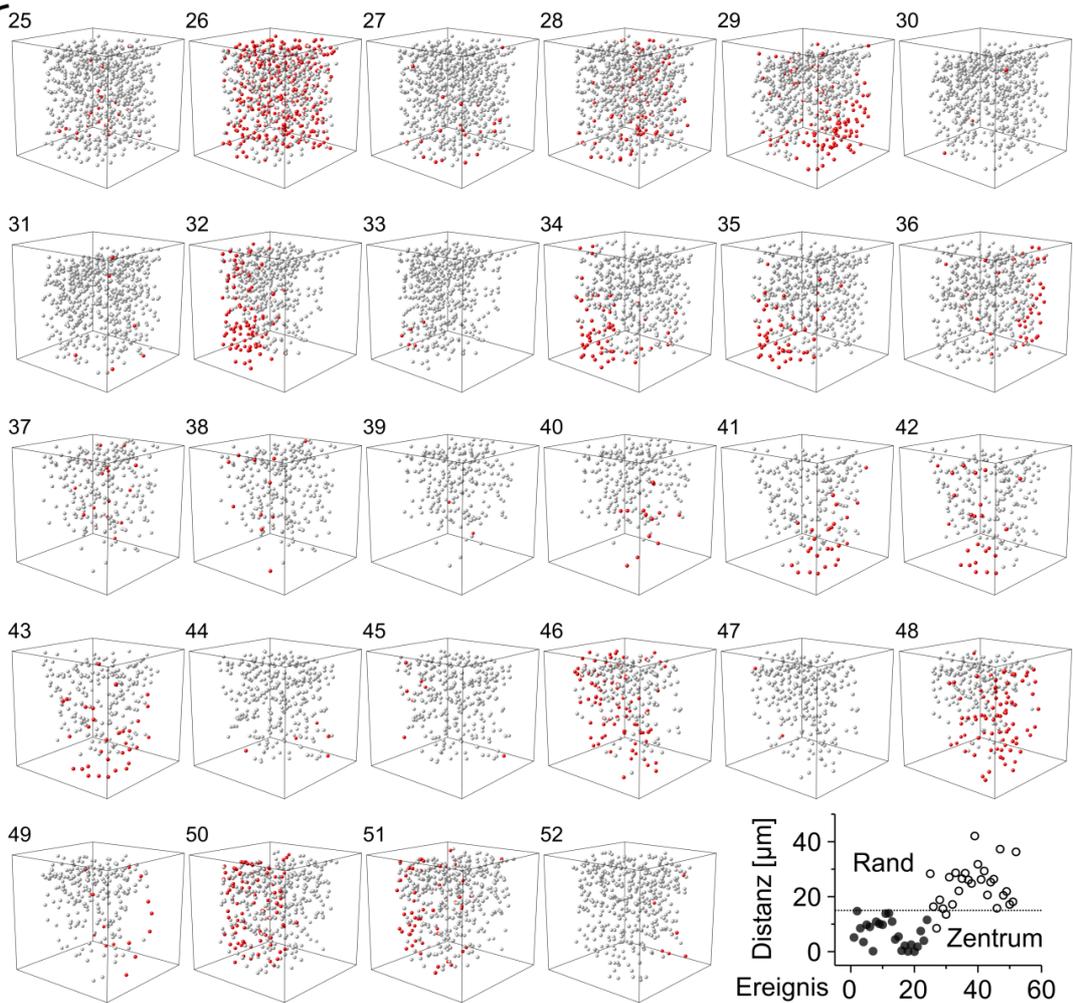


Abbildung 4.31: Dreidimensionale Rekonstruktion von 52 neonatalen Aktivitätsereignissen aus vier Experimenten. Die Ereignisse wurden in Zentral- und Randereignisse klassifiziert (anhand der Position des Aktivitätsschwerpunktes und der Mindestanzahl aktiver Zellen, siehe Graph unten rechts). Volumina: $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$, XYZ. Graph: Der Index „Ereignis“ entspricht der Nummerierung der 52 Volumina. Die gestrichelte Linie stellt den Grenzwert der Distanz (Abstand des Aktivitätsschwerpunktes zum Schwerpunkt aller detektierten Zellen) dar. Ausgefüllte Kreise entsprechen Ereignissen mit mindestens 30 aktiven Zellen.

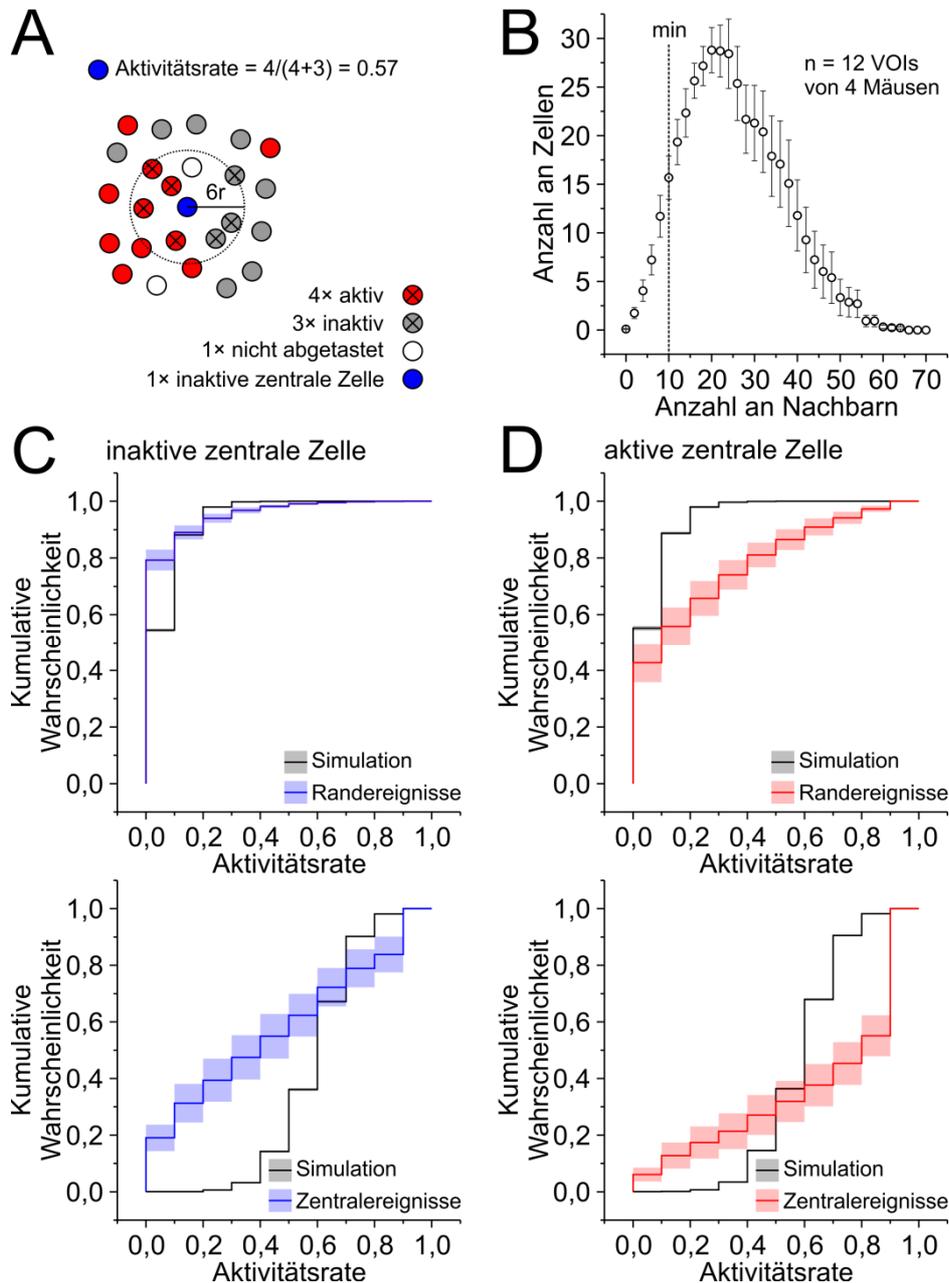


Abbildung 4.32: Dichte zellulär aufgelöster Aktivitätsereignisse. A – Beispielhafte Berechnung der Aktivitätsrate benachbarter Zellen als Maß der Aktivitätsdichte eines Ereignisses. r – Zellradius. B – Festlegung der minimalen Anzahl an Zell-Nachbarn für eine ausreichende Trennschärfe der Aktivitätsdichte. C, D – Kumulative Verteilungen der Aktivitätsdichte. Oben: Randereignisse ($n = 28$). Unten: Zentralereignisse ($n = 24$). C – Inaktive Zell-Zentren. D – Aktive Zell-Zentren.

5 Diskussion

5.1 Genauigkeit der Laserfokusposition

Abweichungen der Laserfokusposition eines Laserscanningmikroskops lassen sich in Rasterscans schnell durch eine visuelle Überprüfung erfasster Fluoreszenzbilder identifizieren (z.B.: diskontinuierliche Fluoreszenzverläufe in bekannten kontinuierlichen Strukturen eines Referenzobjektes) und korrigieren [96,97]. Scans, die typischerweise für die Messung dreidimensionaler Netzwerkaktivität mit Einzelzellauflösung verwendet werden, besitzen keine ausreichende räumliche Auflösung für einen Bildaufbau, da das Zielvolumen mit einer kontinuierlichen Raumtrajektorie und / oder diskontinuierlich abgetastet wird [15]. Die bisher eingesetzten Referenzobjekte [68,98] sind auf bildgebende (zweidimensionale) Scanverfahren ausgerichtet und erlauben keine Quantifizierung absoluter, dreidimensionaler Laserfokuspositionen. Ein dreidimensionales, fluoreszierendes Referenzobjekt mit einem eineindeutigen Positionsmuster entlang aller drei Raumdimensionen wäre ein idealer Standard zur Validierung individueller Scanmodi. Fluoreszierende *beads* unterhalb der optischen Auflösungsgrenze (z.B.: 0,2 μm Durchmesser) werden häufig zur Bestimmung positionsbedingter Veränderungen der Punktbildfunktion (Engl.: *point spread function*, PSF), also der räumlichen Auflösung von 2PLSMs, verwendet [11,13,15,61,68,99,100]. Der Nachteil solcher Zielstrukturen ist die Begrenztheit quantitativer Aussagen (Positionsabweichungen größer als der *bead*-Durchmesser sind nicht quantifizierbar). Wenn die *beads* darüber hinaus geometrisch identisch sind, kann ihre Position nicht eineindeutig bestimmt werden. Neben der Verwendung von Referenzobjekten und der indirekten Bestimmung der Fokusposition aus Rückkopplungssignalen der verwendeten Positioniereinrichtungen [7,12,70,71] gibt es eine weitere Möglichkeiten zur Positionsbestimmung: Das Ausbleichen eines homogen fluoreszierenden Kunststoffobjektträgers [69]. Der Nachteil dieser Methode liegt in dem Mangel einer zeitaufgelösten Positioniergenauigkeit, da die Trajektorie lediglich nach einem begrenzten Zeitintervall bewertet werden kann und damit mögliche Hysteresen die Quantifizierung der Positioniergenauigkeit weiter erschweren.

Die Komplexität einer Positionsbestimmung lässt sich durch die Beschränkung auf eine Raumdimension wesentlich reduzieren. Dies hat jedoch zu Folge, dass eine gegenseitige Beeinflussung der drei Raumkomponenten nicht untersucht werden kann. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Positionsabweichungen entlang der Z-Achse stellen möglicherweise eine solche Beeinflussung dar, da das suggerierte Kippen des Objektivs an einem Piezo-Aktor auch zu einer Positionsänderung in der lateralen Ebene führt. Parallelmessungen der Rückkopplungssignale eines Galvanometer-Piezo-basierten Systems wiesen keinen Unterschied gegenüber Einzelmessungen auf und deuten an,

dass alle drei Positioniereinrichtungen zumindest keine elektromagnetische Wechselwirkung eingehen. Während der Aufzeichnung der Rückkopplungssignale traten Ausreißer in Form von kurzzeitigen Positionssprüngen mit geringer Häufigkeit auf. Diese wurden auf Basis deren zu schnellen Kinetik für eine tatsächliche Positionsänderung der Galvanometer oder des Piezo-Aktors und deren stochastischen Auftretens als elektromagnetische Artefakte erkannt (Fremdquellen wie zum Beispiel im Labor befindliche Tiefkühl- und Kühlgeräte kommen dabei als Ursache in Frage). Zur Eliminierung dieser Artefakte wurden in den späteren Stabilitätsmessungen alle damit verbundenen Ausreißer verworfen (siehe Abbildung 4.10). Für eine systematische Untersuchung der Artefaktursache wäre eine Deaktivierung aller im Labor befindlichen und nicht für die Messung benötigten elektromagnetischen Quellen denkbar.

Während einer Positionierung können Zeitverzögerungen aufgrund sequentieller Signalweiterleitung, -verarbeitung und -filterung auftreten. Diese Verzögerungen müssen vor der Bestimmung von Positionen zu einem definierten Zeitpunkt identifiziert werden. Eine hohe zeitliche Genauigkeit ist gerade bei schnellen Positioniervorgängen essentiell, welches die Auswertung der Positioniergenauigkeit der X- und Y-Achse demonstriert. In genannten Messungen betrug die absolute Zeitdifferenz gegenüber den Referenzmessungen etwa $6 \mu\text{s}$ für beide Rückkopplungssignale, welche ohne Korrektur zu scheinbaren Positionsabweichungen von bis zu $10 \mu\text{m}$ führte (0,999-Quartil der Positionsabweichungen der X-Achse ohne Korrektur der Zeitverzögerung: $9,86 \mu\text{m}$, Y-Achse: $9,97 \mu\text{m}$). Die Ursache dieser Verzögerung ist unbekannt, könnte aber durch Signalverarbeitungen der Rückkopplungsschaltung der Galvanometersteuerung oder dem Positionsdetektor der Galvanometer selbst entstehen. Während die Standardabweichung der lateralen Zeitverzögerungen im Bereich des Abtastintervalls lag ($<1 \mu\text{s}$), war die Standardabweichung der axialen Zeitverzögerungen drei Größenordnungen größer ($0,6 \text{ ms}$). Darüber hinaus ergaben sich ausgedehntere Verzögerungen bei kleineren Amplituden der Steuersignale. Die Zeitverzögerungen der Referenz- und Rückkopplungssignale gegenüber den Steuersignalen lagen im Bereich von 10 ms . Die Zeitversätze repräsentieren eine Summation aus verzögerter Signalübertragung und trägheitsbedingter Sprungantwort des Piezo-Aktors. Da man höhere Reaktionszeiten unter Verwendung größerer Sprünge erwarten würde, bleibt die Ursache des beobachteten Effekts der Amplituden des Steuersignals gegenwärtig unklar. Sowohl das Referenz- als auch das Rückkopplungssignal wiesen diese Abweichung auf, sodass eine zusätzliche konstante Verzögerungskomponente des Rückkopplungssignals identifiziert werden konnte ($0,5 \pm 0,0 \text{ ms}$). Diese Komponente war im Vergleich zu derjenigen der X- und Y-Achse sehr hoch, entspricht aber den Herstellerangaben: Der Rückkopplungssignalausgang wird zusätzlich mit einem Tiefpass zur Rauschunterdrückung gefiltert (1. Ordnung, passiv, $R = 10 \text{ k}\Omega$, $C = 10 \text{ nF}$).

Die lateralen Rückkopplungssignale wiesen keine Positionsabweichungen oberhalb der festgelegten Grenze von $\pm 2,5 \mu\text{m}$ auf. Durch eine Differenzbildung zwischen Rückkopplungs- und Referenzsignal konnten massenträgheitsbedingte, axiale Instabilitäten detektiert werden. Die kapazitive Positionsmessung des Piezo-Aktors ist bauartbedingt nahe der Basis des Aktors montiert, welches eine geringe Sensitivität gegenüber distalen Effekten eines Hebelarms erklären könnte. Die gemessenen Abweichungen des regulären Objektiv-Phantoms liegen innerhalb der Spezifikation des Herstellers mit einem maximalen Kippwinkel von $500 \mu\text{rad}$ bei einer Amplitude von $200 \mu\text{m}$ und einer Frequenz von 20 Hz ($\sim 17 \mu\text{m}$ Abweichung unter Einbezug eines Hebelarms von 34 mm , Abbildung 4.6A). Vergleichsweise größere Positionsabweichungen konnten unter Verwendung des langen Phantoms und der nahezu masselosen Kontrolle beobachtet werden. Im letzteren Fall treten höchstwahrscheinlich zusätzliche Instabilitäten wie beispielsweise ein Überspringen auf, da der Aktor aufgrund der reduzierten Masse eine reduzierte Trägheit erfährt. Im Fall des langen Phantoms erhöht der tiefere Massenschwerpunkt im Vergleich zum regulären und kurzen Phantom das am Drehpunkt des Hebelarms des Piezo-Aktors wirkende Trägheitsmoment, sodass bei gleichen Beschleunigungen höhere Kippwinkel und folglich größere Positionsabweichungen auftreten. Um die Beschränkungen eines einseitig montierten Aktors zu umgehen, könnten alternativ Ringaktoren verwendet werden, die allerdings eine geringere Reichweite der axialen Positionierung zur Folge hätten.

Da die Lasertriangulation auf der Detektion einer diffusen Reflexion einer Zielfläche beruht, muss dieses Ziel einen hohen Grad an Lichtstreuung bei gleichzeitig ebener Oberfläche aufweisen. Ein guter Kompromiss konnte mit sandgestrahltem Messing, sandgestrahltem Aluminium und sandgestrahlter Bronze erzielt werden. Entsprechend wurden die Objektiv-Phantome aus diesen Materialien gefertigt und an der Zielfläche (Boden) sandgestrahlt. Zur Reduktion von Speckle (optische Interferenzen des Triangulationslasers bei Reflexion an der Zieloberfläche) erfolgte eine Mittelung der Rohdaten. Der geschätzte Maximalfehler der Triangulationsmessung betrug $\pm 2,3 \mu\text{m}$. Für die Abschätzung wurden folgende Fehler einbezogen: 1) $\pm 0,4 \mu\text{m}$ (kalibriert), durch das Analog-Digital-gewandelte Rückkopplungssignal (entspricht $\pm 9,0 \text{ mV}$ des ADU mit einer Auflösung von $4,9 \text{ mV}$ in einem Bereich von $\pm 10 \text{ V}$, unter Einbezug einer Rauschreduktion durch Signalmittelung), 2) $\pm 1,8 \mu\text{m}$ (kalibriert) durch das Analog-Digital-gewandelte Referenzsignal (entspricht $\pm 9,0 \text{ mV}$ des ADU mit einer Auflösung von $4,9 \text{ mV}$ in einem Bereich von $\pm 10 \text{ V}$, unter Einbezug einer Rauschreduktion durch Signalmittelung), 3) Auflösungsgrenze des Triangulationssensors: $\pm 0,1 \mu\text{m}$.

Der geschätzte Maximalfehler der Reflexionsmessung betrug $\pm 2,4 \mu\text{m}$. Für die Abschätzung wurden folgende Fehler einbezogen: 1) $\pm 1,1 \mu\text{m}$ (kalibriert), durch das

Analog-Digital-gewandelte Rückkopplungssignal (entspricht $\pm 8,8$ mV des ADU mit einer Auflösung von 2,4 mV in einem Bereich von ± 5 V), 2) $\pm 1,0$ μm hervorgerufen durch eine fehlerhafte Spitzenwertdetektion des PMT Signals (Annahme: ± 1 Sample Detektionsgenauigkeit und mindestens 10 Abtastwerte je 10 μm Abstand der Skalenstriche), 3) $\pm 0,1$ μm durch horizontale Fehlausrichtung des Objektmikrometers, 4) Fertigungsgenauigkeit der Skalenstriche: $\pm 0,2$ μm .

Für die Abschätzung der Detektionsgrenzen gemessener Positioniergenauigkeiten lateraler und der axialer Rückkopplungssignale wurden isolierte Fehlerkomponenten der jeweiligen Messkette aufsummiert. Verglichen zu den Vorgaben des Leitfadens GUM (Engl.: *guide to the expression of uncertainty in measurement*) wurden dementsprechend Maximalfehler als Abschätzung der Messungenauigkeit statt geometrische Fehlerkombinationen verwendet [101]. Die Ungenauigkeit der lateralen Messungen wurde zudem durch die Anwendung statistischer Analysen (verteilungsunabhängige Extremwerte und Quantile) ermittelt. Dabei lagen alle Messwerte innerhalb des zuvor abgeschätzten Toleranzbereiches der Messung, sodass keine Positionsabweichungen im Rahmen der gegebenen Messungenauigkeit festgestellt werden konnten. Im Rahmen der Triangulationsmessungen zur Bestimmung axialer Positionsabweichungen wurde zudem eine Signalmittelung sowohl für die Abschätzung der Detektionsgrenzen als auch für die erhobenen Messdaten einbezogen, um den Fehlerbeitrag durch Speckle zu minimieren. Ebenso wurden Zeitverzögerungen gemessener Positionssignale in die Analysen einbezogen (Korrektur systematischer Fehler laut [101]). Die Messung der axialen Positioniergenauigkeit offenbarte eine Abhängigkeit von der beschleunigten Last des Piezo-Aktors, die sich von dem abgeschätzten Toleranzbereich der Messung abhob. Die Vergleichbarkeit der dargestellten Messergebnisse könnte in auf dieser Arbeit aufbauenden Untersuchungen durch eine vertiefende Anwendung des GUM und dessen mathematische Betrachtungen der Fehlerkombination und -fortpflanzung erhöht werden. Ziel der hier verwendeten Abschätzung der Messunsicherheit war die Definition einer Detektionsgrenze, um wiederum die Einhaltung einer biologisch motivierten Toleranz der Messunsicherheit zu bewerten. Die Messungen stehen im Einklang mit den vorherigen Abschätzungen und stützen damit die Wahl einer eher pragmatischen, statt einer erschöpfenden Fehlerbetrachtung.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Reflexionsmessung ist auf die Analyse diskreter Positionen beschränkt. Hohe Beschleunigungen entstehen hauptsächlich an den Umkehrpunkten einer Galvanometerrotationsbewegung. Die Abweichungen an diesen Punkten können mit der Reflexionsmessung nicht bestimmt werden, da die Detektion der Skalenstriche eine minimale Bewegungsänderung erfordert. Daher wurden Scans verschiedener Amplitude und Frequenz eingesetzt, um die gleichen Referenzpositionen

mit verschiedenen Beschleunigungen abzutasten. Die demonstrierte Verwendung eines kommerziellen Objektmikrometers ermöglicht die Anwendung der Reflexionsmessung für verschiedene Bauarten von 2PLSMs. Es ist darüber hinaus vorstellbar, diese Technik für die Kalibrierung von Positionierungseinrichtungen ohne Rückkopplungssignale (z.B.: akustooptische Modulatoren) zu verwenden [13,16].

Die Stabilität der Rückkopplungssignale war für die getesteten Scans bemerkenswert hoch. Nicht nur zwischen einzelnen Scandurchläufen (verschiedener Scans) sondern auch im Verlauf mehrerer Tage resultierten gleiche Steuerspannungen in gleichen Positionssignalen. Die Stabilitätsmessungen beziehen sich dabei ausschließlich auf die drei Positioniereinrichtungen. Positionsabweichungen eines Zielvolumens gegenüber dem Objektiv können mit diesen Messungen nicht detektiert werden. Die Detektion [15] bzw. Korrektur [102,103] von Bewegungsartefakten zählen zu den größten Herausforderungen dreidimensionaler Aktivitätsmessungen mittels Zweiphotonenmikroskopie *in vivo*. Da diese Artefakte weniger systematischer sondern biologisch stochastischer Natur sind, ist es aktuell nicht möglich, diese vollständig zu korrigieren. Die im Rahmen dieser Arbeit implementierte Software 2PLSMC unterstützt den Experimentator bei der frühzeitigen Detektion von Bewegungsartefakten während der Aufzeichnung von Linienscans (Live-Vorschau) und ermöglicht eine landmarkenbasierte, manuelle Korrektur jeweils zwischen zwei Aufzeichnungen (bildbasierte Scanvorschau). Langsame Driftkomponenten können dabei durch kurze Messintervalle (≤ 2 min) und anschließende Kontrolle bzw. Korrektur der Position mittels Scanvorschau minimiert werden. Die beschriebene Prozedur beruht auf der Prävention von Bewegungsartefakten in Scandaten, die im Rahmen von dreidimensionalen Linienscans *post hoc* nur schwierig oder gar nicht korrigiert werden können [103].

Neben 2PLSMC existieren weitere frei zugängliche Softwarepakete, die dreidimensionale Aktivitätsmessungen ermöglichen, z.B. ScanImage [96] und Helioscan [104]. Letzteres ist hochgradig flexibel und kompatibel mit vielen Bauarten von 2PLSMs. Darüber hinaus kann der Benutzer die Software modular erweitern (objektorientierte Programmstruktur). Gegenüber diesen beiden Softwarepaketen bietet 2PLSMC folgende Vorteile: 1) validierte dreidimensionale Scanpositionen durch Auslesen der Rückkopplungssignale von bis zu drei Positioniereinrichtungen, 2) Optimierung von Spiralscans (Scangenerator), 3) Unterstützung bei der Detektion von Bewegungsartefakten. 2PLSMC kann derzeit nur für den Betrieb Galvanometer-Piezo-basierter 2PLSMs eingesetzt werden.

5.2 Netzwerkaktivität im visuellen Kortex der Maus *in vivo*

5.2.1 *In vivo* Identifikation glutamaterger und GABAerger Neurone

Emx1^{IREScree}:Ai14 Mäuse, die das rot fluoreszierende Protein tdTomato nach Cre-vermittelter Rekombination exprimieren, eignen sich für eine Unterscheidung GABAerger und glutamaterger Neurone im Kortex *in vivo*. Da die Expression von tdTomato in diesen Tieren nicht nur auf Zellsomata exzitatorischer Neurone und Gliazellen des Kortex begrenzt ist, sondern sich auch auf deren Dendriten und Axone erstreckt, weist das umgebende Neuropil eine intensive Fluoreszenzfärbung auf. Dies hat wiederum zur Folge, dass sich die Population ungefärbter Somata (GABAerge Neurone) von der gefärbter Somata (glutamaterge Neurone) visuell durch einen Negativkontrast unterscheiden lässt.

Der Entschluss, die Emx1^{IREScree} Mauslinie zur Generierung einer neuen Mauslinie für die „inverse“ Identifikation GABAerger Interneurone zu verwenden, begründet sich auf Studien, die belegen, dass die gesamte glutamaterge, nicht aber die GABAerge, Population von Neuronen in diesen Mäusen eine Cre-Expression aufweist [78]. Der Anteil tdTomato-negativer Neurone der oberen Schicht des Neokortex betrug in der eigenen Studie 12%. Auf Grundlage ihrer GAD67-Immunreaktivität sind diese Neurone sehr wahrscheinlich GABAerge Interneurone. Studien an der R26R Cre-Reporterlinie (12%, [78,105]) und vorherige Abschätzungen (10 – 20%, [106]) ergaben vergleichbare Anteile GABAerger Neurone bezogen auf Zellen neuronalen Ursprungs im Kortex von Nagern. Die Ergebnisse unterstützen indirekt die Auffassung, dass die Effizienz der Rekombination in Emx1^{IREScree}:Ai14 Mäusen sehr hoch ist. Wenngleich ein exakter Vergleich zum intakten Kortex nicht möglich ist, war der Anteil tdTomato-negativer Zellen *in vivo* ähnlich (16% aller OGB1-gefärbten Zellen). Eine Möglichkeit, Astrozyten formell von glutamatergen Neuronen (beide tdTomato-positiv) zu differenzieren, bestünde in einer zusätzlichen Färbung mit Sulforhodamin 101 [107,108]. Da Astrozyten aufgrund einer erhöhten OGB1-Fluoreszenzintensität und ihrer charakteristischen Morphologie leicht anhand der OGB1-Färbung identifiziert werden können [66,84], wurde in der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet.

Die kürzlich publizierte tdTomato-exprimierende Ai14 Cre-Reporterlinie wurde aus folgenden Gründen verwendet: 1) hohe tdTomato-Expression nach Cre-vermittelter Rekombination [80], 2) erhebliche Helligkeit und Photostabilität von tdTomato [109], 3) keine bekannte Toxizität von tdTomato [110], 4) spektrale Eigenschaften [109], die für eine parallele Kalzium-Bildgebung geeignet sind (geringe Überlappung des Emissionsspektrums von tdTomato mit denen von häufig verwendeten Kalziumindikatoren; daher Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnis) und 5) Akkumulation des tdTomato-Proteins

im ganzen Zytoplasma inklusive der Neuriten. In den meisten Fällen konnten die Somata tdTomato-positiver Neurone *in vivo* deutlich vom Neuropil unterschieden werden. In Aldehyd-fixierten histologischen Hirnschnitten war dies seltener der Fall. Wenngleich der Grund für diese Beobachtung unbekannt ist, war eine Unterscheidung tdTomato-positiver und -negativer Zellen in allen Schnittpräparationen auf Basis des eingeführten Fluoreszenzindex möglich (Kapitel 3.8.4).

Neben dem Anwendungsfeld der *in vivo* Kalzium-Bildgebung (Abbildung 4.15) könnte die vorgestellte Identifikationsmethode für gezielte Einzelzellelektrophysiologie *in vivo* interessant sein [111]. Während die Expression genetisch kodierter Fluoreszenzproteine unter einem GABAergen Promotor nur die Identifikation GABAerger Zellen ermöglicht, erlaubt der aktuelle Ansatz die Visualisierung GABAerger und glutamaterger Zellen in einer einzigen Mauslinie. Da die Methode die Cre-loxP Technologie zur Expression der fluoreszierenden Proteine verwendet, könnte eine zusätzliche *Emx1*^{IRESc^{re}}-abhängige Gen-*knock-out*-Strategie angewandt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Cre-Expression in *Emx1*^{IRESc^{re}} Mäusen schon in der embryonalen Entwicklung stattfindet [78] und sich daher für Studien der frühen Entwicklung eignet (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.2.3). In Parvalbumin-Cre [112] und CaMKIIalpha-Cre [113] Mäusen ist dies beispielsweise nicht der Fall. Die meisten genetisch kodierten Fluoreszenzproteine, die aktuell im Rahmen von *in vivo* Studien verwendet werden, weisen keine ausgeprägte Toxizität auf. Subtile Veränderungen physiologischer Parameter können aber im Allgemeinen nicht ausgeschlossen werden. Diese potentielle Fehlerquelle kann zumindest in Bezug auf GABAerge Interneurone in *Emx1*^{IRESc^{re}}:Ai14 Mäusen umgangen werden, da die Zellidentifikation anhand einer fehlenden Reporterexpression (inverse Identifikation) durchgeführt wird. Zusätzlich wird die GABA-Synthese in dieser Mauslinie nicht durch die Expression beeinträchtigt. Als Konsequenz wird der GABA-Gehalt, wie für die häufig verwendete GAD67-GFP-Linie beschrieben [34,35], nicht vermindert.

5.2.2 Wirkung von GABA im neonatalen Kortex *in vivo*

Zwei voneinander unabhängige Befunde deuten darauf hin, dass GABA als depolarisierender Neurotransmitter im sich entwickelnden, okzipitalen Neokortex der Maus im Alter von 3 – 4 Tagen nach der Geburt wirkt: 1) 2PLSM-gestützte Patch-Clamp-Messungen einzelner Zellen ergaben, dass GABA die meisten der untersuchten Neurone depolarisiert. 2) Die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren löst in Gegenwart von BayK 8644, das die Sensitivität gegenüber Aktivierungen L-Typ spannungsgesteuerter Kalziumkanäle erhöht, in der überwiegenden Mehrheit der Zellen der kortikalen Platte somatische Kalziumtransienten aus.

Die pharmakologische Hemmung von NKCC1 führte dabei zu einer deutlichen Verminderung der Amplituden GABA-evozierter Kalziumtransienten. Dies deutet an, dass

die sekundär-aktive Chloridakkumulation durch NKCC1 wichtig für die funktionelle Wirkung der GABAergen Transmission *in vivo* ist. Die Beobachtung unterstützt zudem die Ansicht, dass die GABA_A-Rezeptor-abhängige Depolarisation hauptsächlich von Chloridionen (und nicht von Bikarbonationen [114]) getragen wird. Es sollte an dieser Stelle noch einmal betont werden, dass die Superfusion der *Dura mater* mit in ACSF gelösten Pharmaka (in dieser Arbeit als Badapplikation bezeichnet) die Blut-Hirn-Schranke umgeht. Dies ist vor allem für den NKCC1-Blocker Bumetanid relevant, da dieser nur schwerlich die Blut-Hirn-Schranke durchdringt [115]. Es existieren weitere Hinweise, dass eine intrazelluläre NKCC1-abhängige Akkumulation von Chlorid im intakten Hirn stattfindet. So führten fokale Injektionen von Bumetanid zu einer Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit GABAerger Interneurone in Schicht I des Kortex im Alter von 0 – 3 Tagen nach der Geburt *in vivo* [116]. Darüber hinaus zeigt die eigene Studie [85], dass in Gegenwart von BayK 8644 55% bzw. 95% der analysierten Zellen somatische Kalziumtransienten nach Applikation von GABA bzw. dem GABA_A-Agonisten Muscimol generieren. Dies deutet auf eine zumindest schwach depolarisierende Wirkung von GABA hin, die unter Kontrollbedingungen (ohne BayK 8644) nicht in der Lage ist, spannungsgesteuerte Kalziumkanäle zu aktivieren. Im Neokortex von Nagern lösen GABA_B-Rezeptoren keine hyperpolarisierenden postsynaptischen Antworten bis zum Ende der ersten postnatalen Woche aus [117]. Die Aktivierung von metabotropen GABA-Rezeptoren kann demnach nicht als Erklärung für den beobachteten Unterschied zwischen GABA und Muscimol herangezogen werden. Höchstwahrscheinlich stellt dies einen unterschiedlichen Grad der Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren dar (möglicherweise aufgrund der Tatsache, dass GABA und nicht Muscimol ein Substrat für GABA-Transporter ist). Diese Überlegung einbeziehend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die GABAerge Transmission in der Mehrheit der unreifen Neurone der kortikalen Platte im Alter von 3 – 4 Tagen nach der Geburt depolarisierend ist. Im Gegensatz dazu belegt eine Studie an Interneuronen im Kleinhirn, dass die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren durch einen alternativen Mechanismus (regulatorische Volumenabnahme, Engl.: *regulatory volume decrease reaction*) zu einem Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration führt [118]. Da die GABA_A-Rezeptor-abhängigen Kalziumtransienten in der aktuellen Studie vollständig durch den Antagonisten CdCl₂ der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle blockiert wurden, ist dieses Szenario im vorliegenden Fall allerdings unwahrscheinlich. Theoretisch könnte eine transiente GABA_A-Rezeptor-abhängige Hyperpolarisation zur Erhöhung einer exzitatorischen Leitfähigkeit führen, die wiederum einen depolarisationsabhängigen Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration verursacht [119]. Diese Möglichkeit konnte durch

elektrophysiologische Messungen weitestgehend ausgeschlossen werden, da in den meisten Zellen eine monophasische GABA-vermittelte Depolarisation beobachtet wurde. Unter Kontrollbedingungen (in Abwesenheit von BayK 8644) konnten epidurale und lokale (intraparenchymale) Druckapplikationen von GABA_A-Rezeptor-Agonisten größtenteils keinen Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentrationen *in vivo* hervorrufen. Dieser Befund steht im deutlichen Gegensatz zu bisherigen *in vitro* Studien an der kortikalen Platte [45,57,87,88] und den *in vitro* Daten der aktuellen Studie. Die Beobachtung kann nicht ausreichend durch eine Desensibilisierung von GABA_A-Rezeptoren und / oder spannungsgesteuerten Kalziumkanälen aufgrund einer langsamen Applikationskinetik erklärt werden, da selbst Badapplikationen von GABA *in vitro* (mit wesentlich langsameren Konzentrationsänderungen von GABA im Vergleich zur lokalen Druckapplikation) deutliche somatische Kalziumtransienten hervorrufen [87,120]. Zusätzlich konnte eine synaptische Stimulation in Gegenwart von ionotropen Glutamat-Rezeptor-Antagonisten auch keine somatischen Kalziumtransienten induzieren. Im Einklang mit dem Mangel an GABA-induzierten Kalziumtransienten konnten die Druckapplikation von GABA und die Stimulation GABAerger Synapsen keine Aktionspotentiale auslösen. Diese Daten legen nahe, dass die GABA_A-Rezeptor-vermittelte Depolarisation *in vivo* im Alter von 3 – 4 Tagen nach der Geburt hauptsächlich unterschwellig ist, d. h. keinen direkten exzitatorischen Effekt aufweist. Interessanterweise waren die pharmakologischen Eigenschaften GABA-evozierter Kalziumtransienten in Gegenwart von BayK 8644 nahezu identisch zu denen von Hirnschnittpräparationen [57,87]. Dies unterstützt die Ansicht, dass die unterschiedlichen Effekte von GABA auf die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration *in vivo* verglichen zu *in vitro* hinsichtlich einer zugrundeliegenden Depolarisation eher quantitativer statt qualitativer Natur sind. Es ist aktuell unbekannt, welche Faktoren diese Diskrepanz verursachen. Eine mögliche Erklärung könnte eine langsame Kinetik der sekundär-aktiven Aufnahme von Chlorid in unreifen Neuronen [121] in Verbindung mit einer höheren Chloridleitfähigkeit *in vivo* gegenüber *in vitro* (z.B. durch synaptische [21] oder extrasynaptische GABA_A-Rezeptor-Aktivierung) darstellen [122]. Aktuell wird kontrovers diskutiert, ob traumatische Verletzungen möglicherweise die Ergebnisse von *in vitro* Präparationen beeinflussen [55,89]. Worin könnte die Funktion einer unterschwellig depolarisierenden GABAergen Transmission für die kortikale Entwicklung bestehen? Theoretische Überlegungen und experimentelle Hinweise legen nahe, dass das Umkehrpotential für GABA_A-Rezeptor-vermittelte Ströme (welches selbst aktivitätsabhängig ist [123]) an der zeitlichen Koordinierung von Aktionspotentialen (Engl.: *spike timing*) beteiligt ist [124]. Die GABA-vermittelte Depolarisation könnte durch die Modulation bestimmter Formen synaptischer Plastizität (solche, die abhängig von der zeitlichen Koordinierung von Aktionspotentialen

sind, Engl.: *spike timing dependent plasticity*) einen Einfluss auf die Entwicklung haben, ohne die Netzwerkaktivität in größerem Ausmaß zu verändern. Interessanterweise postuliert eine kürzlich publizierte Studie eine solche Langzeitwirkung der GABAergen Depolarisation auf die Plastizität kortikaler Netzwerke im visuellen Kortex von Ratten [125].

In elektrophysiologischen und bildgebenden Studien wurden *spindle bursts* [21] bzw. Kalziumwellen [26], die jeweils durch retinale Wellen ausgelöst werden, als das vorherrschende Muster neuronaler Aktivität im sich entwickelnden visuellen Kortex von Nagern identifiziert. Unter Verwendung simultaner Weitfeld-Epifluoreszenzmessungen und extrazellulärer Ableitungen konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass diese Netzwerkmuster homologe Ereignisse repräsentieren. Im Einklang mit Studien des visuellen Kortex von Ratten [21,92] waren keine Gamma-Oszillationen detektierbar (wie beispielsweise für den somatosensorischen und motorischen Kortex beschrieben [126]). Darüber hinaus war die Generierung der Kalziumcluster im okzipitalen Kortex unabhängig von NKCC1, ungeachtet des beobachteten Effektes auf zellulärer Ebene. Die Bedingungen, unter denen eine unterschwellige GABAerge Depolarisation die Generierung von Aktionspotentialen fördern (fazilitierende Wirkung von GABA) oder inhibieren kann, wurden in rechnergestützten Modellierungen und experimentellen Studien *in vitro* umfassend charakterisiert [123,127-130]. Die Ergebnisse eigener Untersuchungen zeigen, dass die fazilitierende GABA-Wirkung, sofern vorhanden, für die Generierung der kortikalen Netzwerkaktivität nicht essentiell ist. Diese Schlussfolgerung wird auch durch vorherige Daten zu *spindle bursts* im somatosensorischen Kortex bekräftigt [19]. Die eigenen Befunde legen nahe, dass *spindle bursts* nicht dem *in vivo* Pendant NKCC1-abhängiger Aktivität *in vitro* (*giant depolarizing potentials*) entsprechen [43,44]. Es könnte daher spekuliert werden, dass die beobachteten Kalziumcluster der aktuellen Studie ein Analogon der *in vitro* gemessenen frühen Netzwerkoszillationen (Engl.: *early network oscillations*) darstellen [43,45]. Diese weisen allerdings eine größere räumliche Ausbreitung als die Kalziumcluster auf. Da die aktuelle Studie auf den visuellen Kortex und ein postnatales Alter von 3–4 Tagen fokussiert war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass NKCC1 (oder die GABAerge Depolarisation) eine ausgeprägtere Rolle bei der Generierung von Netzwerkaktivität zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt der Entwicklung bzw. in anderen Hirnarealen einnimmt [131]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass endogenes GABA über GABA_A-Rezeptoren eine starke Inhibition kortikaler Kalziumcluster bewirkt, indem sowohl die Frequenz des Auftretens als auch die räumliche Ausbreitung begrenzt werden. Teilweise wird dieser Effekt über $\alpha 5$ -GABA_A-Rezeptoren vermittelt, wodurch eine Rolle von peri- bzw. extrasynaptischer GABAerger Transmission nahegelegt wird [93]. Eine offene Frage-

stellung bleibt, ob $\alpha 5$ -GABA_A-Rezeptoren phasisch (durch GABA-*spillover* nach synaptischer Freisetzung) und / oder tonisch (durch lokal vorhandene GABA im Extrazellulärraum) aktiviert werden. Die aktuellen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu mehreren (aber nicht allen [43]) *in vitro* Studien, die belegen, dass die Blockierung von GABA_A-Rezeptoren in kortikalen Hirnschnitten großflächige Kalziumwellen teilweise unterdrückt [45-47]. Allerdings stehen die Daten im Einklang mit Befunden zu *spindle bursts* im intakten somatosensorischen Kortex [19]. Betrachtet man die durchgeführten Messungen auf Einzelzell- und Netzwerkebene zusammen, ergibt sich für die depolarisierende GABAerge Transmission eine zusätzliche inhibitorische Funktion auf Netzwerkebene, die sehr wahrscheinlich auf einem GABA_A-Rezeptor-abhängigen Anstieg der Membranleitfähigkeit (Engl.: *shunting inhibition*) beruht. Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit Ergebnissen mathematischer Modelle und experimenteller *in vitro* Daten [129,130].

Welche funktionelle Relevanz könnte diese beschriebene frühe Netzwerkaktivität haben? Es wird angenommen, dass die sequentielle Aktivierung entsprechender retinaler und kortikaler Areale wichtig für die Entwicklung retinotoper Karten ist, wie kürzlich für den *Colliculus superior* belegt wurde [28]. Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen darüber hinaus die Ansicht, dass die kortikale GABAerge Transmission eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der raumzeitlichen Spezifität dieser Koaktivierung einnimmt.

5.2.3 Dreidimensionale Netzwerkaktivität im neonatalen Kortex

Parallele Einzelzelleitungen von mehreren hundert Zellen bei gleichzeitiger Lokalisation der Zellpositionen *in vivo* sind ohne die Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie nur bedingt realisierbar. Mithilfe dreidimensional angeordneter Elektroden ist es möglich, solche Messungen elektrophysiologisch durchzuführen [31,32,132]. Dabei definieren die Anzahl und die Anordnung der Elektroden nicht nur den räumlichen Detektionsbereich von Aktionspotentialen (analog der Volumenabdeckung von Linienscans der Zweiphotonenmikroskopie), sondern auch das Volumen des dabei verdrängten Hirngewebes [133]. Ein Vorteil dieser Methode sind die festgelegten Positionen der Messelektroden, die nur durch die Genauigkeit des Herstellungsprozesses eingeschränkt werden. Ein weiterer Vorteil ist die hohe zeitliche Auflösung, mit der einzelne Aktionspotentiale detektiert werden können. Als Nachteil dieses invasiven Verfahrens erweist sich die Identifikation und Bestimmung der Position von Zellen, die entweder anhand der gemessenen Aktivitätsverläufe rekonstruiert oder *post hoc* bestimmt werden müssen. Nichtinvasive, optische Ansätze versuchen die Grenzen der klassischen Zweiphotonenmikroskopie beispielsweise durch parallele Fluoreszenzdetektion von Kalziumtransienten unter Verlust von Tiefenschärfe zu erweitern [17,67]. Durch das

Parallelisieren von Aktivitätsmessungen kann eine höhere zeitliche Auflösung erzielt werden. Eine Schwierigkeit dieser Verfahren liegt dabei hauptsächlich in einer hohen Sensitivität gegenüber optischer Streuung des zu untersuchenden Gewebes, infolge dessen nur geringe Schichttiefen im intakten Gehirn mit einem ausreichenden Signal-Rausch-Verhältnis erreichbar sind.

Spiralscans ermöglichen eine dreidimensionale Erfassung neonataler Netzwerkaktivität im visuellen Kortex der Maus in der ersten postnatalen Woche bis in die obere kortikale Platte. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels optimierter Einzelzellscans neuronale Aktivität in einem Volumen von $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ von bis zu 693 glutamatergen Zellen simultan abgeleitet werden. Dabei wurden im Mittel rund 90% der visuell detektierten EMX1-positiven Zellen von der Aktivitätsmessung erfasst. Da die Zelldichte der oberen kortikalen Platte der Maus im Alter von 3 – 4 Tagen nach der Geburt entwicklungsbedingt sehr hoch ist (entsprechend hohe optische Streuung), ist ein Vergleich zu bisherigen zellulären Simultanableitungen im adulten Gehirn bedingt möglich. Studien an 60 – 90 Tage alten Mäusen mit vergleichbaren Volumina und Abtastraten (10 Hz) erzielten Parallelableitungen von 70 – 150 Neuronen (84% visuell detektierter Zellen) [12]. Diskontinuierliche Scans mittels akustooptischer Modulatoren in Volumina von $400 \times 400 \times 500 \mu\text{m}^3$ bzw. $200 \times 200 \times 100 \mu\text{m}^3$ ermöglichten simultane Aktivitätsmessungen von 532 und 411 Zellen bei Abtastraten von jeweils 56 Hz und 122 Hz [13,15]. Letzteres Verfahren beinhaltete auch eine zusätzliche bildbasierte Detektion von Bewegungsartefakten (kurzzeitiger Rasterscan einer Gefäßstruktur innerhalb einer Periode der diskontinuierlichen Abtastung), die in Linienscans direkt durch die kontinuierliche Abtastung des Zielvolumens abgeleitet werden kann. Ändert sich die Position des Zielvolumens, wird auch das Intensitätsprofil des Scans verändert. Aufgrund der geringen räumlichen Auflösung kann die ursprüngliche Intensitätsinformation nicht rekonstruiert werden. Eine zeitlich hochaufgelöste Abtastung mehrerer Bildebenen eines Volumens (Rasterscan) wäre am geringsten von Artefakten betroffen, da diese auf Basis der bereits vorhandenen Aktivitäts- und Positionsdaten korrigiert werden könnten. Bisher konnten vier Ebenen im Abstand von $30 \mu\text{m}$ mit einer Abtastrate von 60 Hz parallel aufgezeichnet werden (Ableitung von $\sim 100 - 200$ Zellen) [9]. Letztere Studie zeigte, dass eine theoretische Ableitung von bis zu 16 Ebenen parallel möglich wäre. Dies würde beispielsweise für die Erfassung aller Zellen entlang der Z-Achse mit einem Durchmesser von $10 \mu\text{m}$ in Volumina mit Z-Ausdehnungen von $< 80 \mu\text{m}$ ausreichen (Nyquist-Shannon-Abtasttheorem). Eine wesentlich höhere raumzeitliche Effizienz (Maximierung der Anzahl erfasster Zellen bei maximaler Abtastrate mit einem ausreichenden Signal-Rausch-Verhältnis zur Bestimmung der Aktivitätsverläufe der Zellen) weisen dagegen gezielte, diskontinuierliche Scanverfahren auf, in denen die Aktivität nur von relevanten Zellsomata

aufgezeichnet wird. Die Minimierung der räumlichen Auflösung führt wiederum zu einer Reduktion der Wahrscheinlichkeit, Bewegungsartefakte zu detektieren. Darüber hinaus muss die Korrektur von optischen Aberrationen akustooptischer Modulatoren, die beispielsweise zu positionsabhängigen Änderungen der räumlichen Auflösung führen, vorgenommen werden [13,15,16,68]. Alternativ bieten Galvanometer-basierte Mikroskope, wie auch in dieser Arbeit demonstriert, eine moderate raumzeitliche Effizienz, bei gleichzeitig hoher Wahrscheinlichkeit Bewegungsartefakte zu detektieren. In Kombination mit einer schnellen Galvanometer-basierten Fokussierung entlang der Z-Achse (*remote scanning*, Bandbreite: 2,7 kHz) [70] wäre der Einsatz aberrationsfreier Linienscans ohne beschleunigungsabhängige Effekte eines Piezo-Aktors möglich. Die Z-Komponente der Scantrajektorie könnte in diesem Fall ohne die Beschränkung auf sinusförmige Verläufe zusammen mit den Galvanometern für die laterale Positionierung optimiert werden, um eine höhere raumzeitliche Effizienz zu erzielen bei gleichzeitigem Erhalt der Detektions-sensitivität gegenüber Artefakten. Unabhängig davon sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass die Positionsvalidierung bisher nicht validierter (nicht-bildbasierter) Scanverfahren vor einer Applikation mit einer definierten Positioniergenauigkeit durchgeführt werden muss.

Ursprünglich war eine zellspezifische Messung spontaner Netzwerkaktivität im visuellen Kortex der Maus in der ersten postnatalen Woche unter Verwendung des Kalziumindikators OGB1 und der $Emx1^{IREScre}:Ai14$ Mäuselinie geplant. Aufgrund folgender Nachteile wurde von diesem Vorhaben Abstand genommen: 1) reduziertes Signal-Rausch-Verhältnis der Kalziumtransienten einzelner Zellen aufgrund hoher optischer Streuung des neonatalen Kortex verglichen zu späteren Zeitpunkten der Entwicklung [82], 2) inhomogene OGB1-Färbung für Volumina von $\geq 100 \mu\text{m}$ Kantenlänge, 3) hohe Variabilität der OGB1-Färbung zwischen verschiedenen Versuchstieren trotz Standardisierung und visueller Kontrolle der OGB1-Injektion und 4) erschwerte *in vivo* Klassifikation tdTomato-positiver und -negativer Zellen nach erfolgter OGB1-injektion, da sich die Fluoreszenzemissionsspektren von OGB1 und tdTomato überlagerten (*crosstalk*). Verglichen zu $Emx1^{IREScre}:Ai14$ Mäusen der dritten postnatalen Woche lag bei Mäusen der ersten postnatalen Woche eine geringere tdTomato-Expression vor. Dies führte dazu, dass eine höhere Anregungslaserintensität zur Identifikation tdTomato-positiver und -negativer Zellen benötigt wurde. Wiederum erhöhte sich dadurch die parallele Anregung von OGB1, die aufgrund der Filterkonfiguration der beiden PMTs des verwendeten 2PLSMs (Reflexionsfilter OGB1: 535/50 nm, nachgeschalteter Reflexionsfilter tdTomato: 610/75 nm) den tdTomato-Kontrast zwischen tdTomato-positiven / OGB1-positiven und tdTomato-negativen / OGB1-positiven Zellen erheblich verringerte. Eine bessere spektrale Trennung von tdTomato und OGB1 könnte beispielsweise durch einen dichroitischen

Spiegel in Kombination mit zwei Filtern, die auf die Emissionsspektren optimiert sind, erzielt werden. Unter Beibehaltung der aktuellen Filterkonfiguration war es naheliegend, die Vorteile des zellspezifischen Kalziumindikators GCaMP3 der Weitfeld-Epifluoreszenzmessungen ebenfalls für die dreidimensionalen Zweiphotonenmessungen zu nutzen ($Emx1^{IREScre}:GCaMP3^{LSL}$): 1) keine zusätzliche Injektion eines Kalziumindikators, 2) homogene Expression von GCaMP3 in EMX1-positiven Zellen des Neokortex, 3) geringe Variabilität der Fluoreszenzintensitäten zwischen verschiedenen Versuchstieren und 4) höheres Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber OGB1 aufgrund eines größeren dynamischen Bereiches [134,135]. Eine zeitgleiche Erfassung der GABAergen Zellpopulation war folglich nicht mehr möglich – die Cre-Expression beschränkte sich auf glutamaterge Neurone und Gliazellen. Aufgrund der vergleichsweise schnellen Kinetik der beobachteten Aktivität (Dauer der Kalziumtransienten pro Zelle: $\sim 1 - 2$ s) ist diese sehr wahrscheinlich neuronalen und nicht astroglialen Ursprungs [107]. GCaMP3 besitzt eine geringe Sensitivität gegenüber einzelnen Aktionspotentialen [74]. Höchstwahrscheinlich handelt es sich daher bei den aufgezeichneten Kalziumclustern um massive Depolarisationen begleitet von multiplen Aktionspotentialen. Über die Aktivitätsmuster GABAerger Zellen (10 – 20% aller Neurone der oberen kortikalen Platte [106]) kann anhand dieser Messungen keine Aussage getroffen werden. Eine Beteiligung von GABAergen Interneuronen an der spontanen Netzwerkaktivität während der frühen Entwicklung des Kortex wird durch folgende Befunde nahegelegt: 1) GABAerge Neurone nehmen an *spindle bursts* im visuellen Kortex der Ratte teil [21] und 2) es besteht eine inhibitorische Wirkung der GABAergen Transmission auf Kalziumcluster im visuellen Kortex der Maus (Steuerung der räumlichen Ausbreitung der Netzwerkaktivität) [85]. Die räumliche Begrenzung spontaner Kalziumcluster in der horizontalen Ebene, die bereits in den Weitfeld-Epifluoreszenzmessungen beobachtet werden konnte, bestätigte sich auch in den Voxel-basierten Spiralscans. Die zusätzliche vertikale Komponente deutete dabei auf eine geringe Begrenzung innerhalb der oberen kortikalen Schichten (marginale Zone und obere kortikale Platte) hin. Da sich die GCaMP3 Färbung auch auf die Dendriten der Pyramidenzellen der kortikalen Platte erstreckt, die in die marginale Zone projizieren [136], stammt die detektierte Aktivität der marginalen Zone vermutlich von pyramidalen Dendriten. Es ist jedoch auch denkbar, dass die in der marginalen Zone befindlichen Cajal-Retzius Zellen an den Kalziumclustern beteiligt sind. Interessanterweise konnten in einem Teil der Aktivitätsereignisse Ausbreitungen beginnend in oberflächlichen, übergehend in tieferliegende kortikale Regionen beobachtet werden, welches einer entgegengesetzten Ausbreitung in den pyramidalen Dendriten entsprechen würde. Da die zeitliche (10 Hz) und die räumliche Auflösung für quantitative Auswertungen der Ereignisdynamiken nicht ausreichend hoch genug ist (nahezu

simultane Ausbreitung entlang der kompletten Z-Achse), kann über die vertikale Dynamik der Aktivitätsmuster derzeit nur spekuliert werden. Die Schwierigkeit besteht darin, dass die Ausbreitung vergleichsweise schnell in großen Arealen stattfindet. Ist das gemessene Volumen zu klein, können Positionsänderungen des Aktivitätsschwerpunktes nicht korrekt bestimmt werden, sobald das Zentrum der Aktivität außerhalb des Volumens liegt. Jedoch waren deutliche Änderungen der Aktivitätsschwerpunkte über die Zeit in der horizontalen Ebene in einem Teil der Ereignisse, wie auch zuvor in Weitfeld-Epifluoreszenzmessungen [26,85], zu verzeichnen (Abbildung 4.27). Diese räumlich begrenzte, zeitlich abhängige Ausbreitung in kortikalen Arealen könnte wie bereits für den *Colliculus superior* bekannt zur Ausreifung retinotoper Karten beitragen [28-30]. Aus dem somatosensorischen Kortex der Ratte ist bekannt, dass *spindle bursts* hauptsächlich in der kortikalen Platte entstehen [137], vorwiegend horizontal begrenzt sind [19] und entlang der vertikalen Ebene in kolumnenartigen Mustern organisiert sind [20]. Wenngleich viele Parallelen zu der Aktivität im somatosensorischen Kortex bestehen, konnte in dieser Arbeit mit einem optischen Ansatz eine quasisimultane Ausbreitung von Kalziumclustern innerhalb der marginalen Zone und der oberen kortikalen Platte des visuellen Kortex der Maus mit hoher räumlicher Auflösung beobachtet werden. Dabei war die Aktivierung auf der Skalierung von Voxeln einer Kantenlänge von 25 μm hochgradig homogen und wies deutliche Begrenzungen in der horizontalen Ebene auf. Innerhalb der oberen kortikalen Platte konnte auch eine hohe Beteiligung einzelner Zellen verzeichnet werden, die eine massive Koaktivierung der Kalziumcluster auf zellulärer Ebene belegen.

Die hohe Zelldichte des Kortex in der frühen Entwicklung erschwert eine Auswertung der Kalziummessungen auf zellulärer Ebene. Eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale verschiedener Zellen ist praktisch unvermeidlich, kann aber durch die Verringerung des Auswerteradius der Zellen minimiert werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird durch die Abwesenheit einer GCaMP3 Färbung in den Zellkernen zusätzlich vermindert. Eine zukünftige Optimierung der Spiralscans auf kleinere Zellradien könnte dem Verlust an Signal-Rausch-Verhältnis entgegenwirken. Dafür müsste die Punktdichte der Scantrajektorie erhöht werden. Mit den aktuell verwendeten Positioniereinrichtungen ließe sich dies unter Beibehaltung der zeitlichen Auflösung von 10 Hz und der Größe des Zielvolumens nicht um Größenordnungen ändern, da die Grenzen der Hardware bereits ausgeschöpft sind. Um eine zelluläre Auflösung zu erzielen, wurde das Volumen des Einzelzellscans verglichen zu den Weitfeld- und Voxel-Messungen erheblich reduziert. Dies brachte zwei Nachteile mit sich: 1) Deutliche Verminderung der Wahrscheinlichkeit für die Detektion ohnehin niederfrequenter Aktivitätsereignisse, 2) Erhöhung der Anfälligkeit gegenüber Bewegungsartefakten (durchschnittlich 14% der Voxel-scans und 41% der Einzelzellscans wurden verworfen, siehe Kapitel 4.2.3). Um dem Missverhältnis

zwischen Signal und Artefakten entgegen zu wirken kann die effektive Gesamtdauer der Messung (Summe aller einzelnen Messintervalle) eines Experimentes maximiert werden. Die limitierenden Faktoren sind dabei: 1) Über die Zeit kumulierende Phototoxizität und Photobleichung innerhalb untersuchter Zielvolumina (zeitlich begrenzte Messbarkeit eines Zielvolumens), 2) maximale Anzahl messbarer Zielvolumina (Abhängig von optisch zugänglichen Arealen) und 3) Maximale Aufrechterhaltung der Narkose der Versuchstiere mittels Lachgas (Beschränkung auf Versuchsebene). Eine zeitbasierte Analyse der hochgradig artefaktbehafteten Einzelzellscans erwies sich darüber hinaus als nicht praktikabel. Resultierend wurde eine ereignisbasierte Auswertung zellulärer Daten durchgeführt, die wiederum dazu führt, dass Ereignisse mit einer geringen Zellbeteiligung übersehen werden können. Bisherige Daten (EEG [21,85], Weitfeld-Epifluoreszenzmessungen [26,85], 2D-Rasterscans [6,85] und 3D-Scans dieser Arbeit) bestätigen, dass die vorherrschende Aktivitätsform im neonatalen Kortex allerdings aus massiven Koaktivierungen zellulärer Verbände besteht.

In der klassischen Neurobiologie wird die Aktivität neuronaler Netze untersucht. Studien von neuroglialen Netzwerken belegen, dass Gliazellen die neuronale Erregbarkeit und die synaptische Transmission beeinflussen können [138]. Zukünftig könnte beispielsweise die potentiell langsamere Aktivität EMX1-positiver Astrozyten in $Emx1^{IREScre:GCaMP3^{LSL}}$ Mäusen in Untersuchungen der spontanen Netzwerkaktivität einbezogen werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Dreidimensionale Scanverfahren, die in der Zweiphotonenmikroskopie zur Erfassung neuronaler Netzwerkaktivität in definierten Zielvolumina mit Einzelzellauflösung angewendet werden, erfordern eine subzelluläre Positioniergenauigkeit der Fokusposition des Anregungslasers. Mit bisherigen Verfahren konnte diese Genauigkeit nicht eindeutig [7] bzw. nicht zeitaufgelöst [69] quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Quantifizierung der Positioniergenauigkeit auf Basis von Reflexions- und Triangulationsmessungen entwickelt. Die Messwerte konnten dabei simultan zu den Positions-Rückkopplungssignalen eines Galvanometer-Piezo-basierten Zweiphotonenmikroskops aufgezeichnet werden. Dies ermöglichte einen direkten, zeitaufgelösten Abgleich von internen Rückkopplungspositionen mit externen Referenzpositionen (lateral: reflektierende Skalenstriche eines Objektmikrometers, axial: Abstandsmessung des beweglichen Objektivs zu einem stationären Triangulationssensor). Für alle getesteten Trajektorien betrug die laterale Positioniergenauigkeit $<\pm 2,5 \mu\text{m}$. Die axiale Positioniergenauigkeit war dagegen von der Objektivbeschleunigung, -masse und -geometrie abhängig. Folglich wird nicht nur die Anwendbarkeit bestimmter Scantrajektorien sondern auch die Benutzung bestimmter Objektivtypen eingeschränkt.

Das Hauptanwendungsgebiet des vorgestellten Verfahrens zur Quantifizierung der lateralen Positioniergenauigkeit wird in Linien-Scanverfahren gesehen, die keinen regulären Bildaufbau besitzen (z.B.: spiralförmige oder arbiträre Linienscans). In morphologischen Studien (beispielsweise bei der Identifikation bestimmter Zellpopulationen [82]), die mit Hilfe der Laserscanningmikroskopie durchgeführt werden, erfolgt der Bildaufbau typischerweise mit Hilfe von Rasterscans, bei denen sich die Positionsinformationen direkt aus den Bildinformationen extrahieren lassen. Ist jedoch eine zeitlich hochaufgelöste Abtastung ganzer Volumina erforderlich, werden Linienscans [7,12,70] oder diskontinuierliche Scanverfahren [10,13,15,16,68] angewendet, die keinen Bildaufbau und folglich auch keine offensichtliche Positionsinformation enthalten. Es ist daher erforderlich die Positioniergenauigkeit jeder Scantrajektorie zu quantifizieren und mit den Anforderungen der Applikation abzugleichen. Die quantifizierbare Genauigkeit der vorgestellten Reflexionsmessung hängt hauptsächlich von folgenden Parametern ab, die anwendungsspezifisch optimiert werden können: 1) Bandbreite und Frequenz der Abtastung des Reflexionssignals, 2) Abtastrate und Bittiefe der Analog-Digital-Wandlung des Rückkopplungssignals, 3) Breite der Skalenstriche eines als Referenzobjekt eingesetztes Objektmikrometers (vorzugsweise unterhalb der optischen Auflösung des Mikroskops) und 4) Abstand der Skalenstriche des Objektmikrometers (dieser definiert die Anzahl diskreter Positionen, deren Genauigkeit quantifiziert werden kann).

Das vorgestellte Verfahren zur Quantifizierung der Positioniergenauigkeit der Z-Achse, basierend auf einer optischen Abstandsmessung, kann für alle Mikroskope angewendet werden, die mechanische Bewegungen zur Fokussierung des Objektivs verwenden. Die Methode ist daher auch für die Validierung dreidimensionaler Techniken, die X-Y-Rasterscans mit Z-Bewegungen des Objektivs kombinieren anwendbar (z.B.: Z-Stapel oder gekippte Rasterscans [8]). Die Hauptfehlerkomponente der dargelegten axialen Positionsmessungen lag in der Auflösung des verwendeten Analog-Digital-Wandlers. Sind höhere Genauigkeiten ($<2,3 \mu\text{m}$) für beispielsweise subzelluläre Kalziummessungen erforderlich, kann die Verwendung eines höher auflösenden Wandlers (z.B.: 16 oder 32 bit) eine Reduktion des Maximalfehlers erzielen. Zusätzlich könnte der Einfluss von Speckle-Rauschen, verursacht von einer diffusen Reflexion des Triangulationslaserstrahls auf einer rauen Zieloberfläche, durch verstärkte Mittelung der Referenzpositionen reduziert werden. Dies wäre für Anwendungen praktikabel, die keine hohen Anforderungen an die zeitliche Auflösung stellen.

Eine weitere, in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode ermöglichte erstmalig die gleichzeitige Identifikation GABAerger und glutamaterger Neurone *in vivo* durch eine intensive Soma- und Neuropil-Färbung EMX1-positiver Zellen mit dem genetisch kodierten rot fluoreszierenden Protein tdTomato im Kortex der Maus. Wenngleich eine zuverlässige Identifikation nach Injektion des Kalziumindikators OGB1 in der ersten postnatalen Woche nicht möglich war, ist die Technik ab der dritten postnatalen Woche anwendbar. Die neue Identifikationsmethode stellt eine potentielle Bereicherung auf dem Anwendungsfeld der *in vivo* Kalzium-Bildgebung und der gezielten Einzelzell-Elektrophysiologie dar. Die Umgehung einer reduzierten GABA-Synthese durch eine fehlende Reporterexpression in GABAergen Interneuronen ist für Studien GABAerger Zellpopulationen relevant. Darüber hinaus können neben der Cre-vermittelten Expression von tdTomato Fluoreszenzproteine anderer Mauslinien eingekreuzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde auf diese Weise die Aktivität glutamaterger Neurone mittels des genetisch kodierten Kalziumindikators GCaMP3 gemessen.

Während der letzten drei Dekaden häuften sich Beweise auf eine depolarisierende Wirkung des Neurotransmitters GABA während der frühen Entwicklung des Gehirns [42,139]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von optischen und elektrophysiologischen Methoden erstmalig die Wirkung von GABA im unreifen Gehirn des Säugetiers *in vivo* untersucht. Dabei konnte eine vorherrschend depolarisierende Wirkung von GABA auf zellulärer Ebene bei gleichzeitig inhibitorischer Wirkung auf Ebene neuronaler Netzwerke im intakten Kortex von Mäusen im Alter von 3 – 4 Tagen nach der Geburt nachgewiesen werden. Die genauen Mechanismen dieser dualen Wirkung sind bisher unbekannt. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete (unterschwellig)

depolarisierende Wirkung von GABA *in vivo* im Vergleich zur ausgeprägten depolarisierenden Wirkung *in vitro* könnte eine langsame Kinetik der sekundär-aktiven Aufnahme von Chlorid in unreifen Neuronen [121] in Verbindung mit einer höheren Chloridleitfähigkeit darstellen [122]. Ein GABA_A-Rezeptor-abhängiger Anstieg der Membranleitfähigkeit (*shunting inhibition*) liefert eine sehr wahrscheinliche Erklärung für den inhibierenden Effekt auf Netzwerkebene. Es sind fortführende Studien erforderlich, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu bestimmen.

Die Ausreifungsprozesse neuronaler Schaltkreise während der frühen Hirnentwicklung sind stark aktivitätsabhängig [2-4]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die raumzeitliche Spezifität der zu diesem Zeitpunkt vorherrschenden spontanen kortikalen Netzwerkaktivität maßgeblich von GABAerger Transmission bestimmt wird. Da die räumliche Ausdehnung dieser Netzwerkaktivität bisher nur unvollständig charakterisiert ist, wurden zusätzlich dreidimensionale Untersuchungen mit Hilfe von Spiralscans im visuellen Kortex der Maus durchgeführt. Die Scans wurden dabei auf die Hardwarelimitierungen eines Galvanometer-Piezo-basierten Zweiphotonenmikroskops optimiert. Eine für Einzelzellmessungen ausreichende Positioniergenauigkeit konnte für alle drei Raumkomponenten der Scantrajektorien nachgewiesen werden ($<\pm 2,5 \mu\text{m}$). Zusätzliche Messungen ergaben eine hohe Stabilität der Positionsbestimmung innerhalb eines Experiments und im Vergleich zu Experimenten an anderen Tagen. Auftretende Bewegungsartefakte, die während der *in vivo* Messungen spontaner Netzwerkaktivität unvermeidlich sind, konnten computergestützt detektiert und manuell korrigiert werden, sodass Datensätze mit unbestimmten Positionsangaben von den Analysen ausgeschlossen werden konnten. Dreidimensionale Aktivitätsmessungen in den oberen Schichten des visuellen Kortex von neonatalen Mäusen, die GCaMP3 in EMX1-positiven Zellen exprimierten, ergaben folgende Erkenntnisse: 1) die frühe neuronale Netzwerkaktivität weist einen hohen Grad an Koaktivierung glutamaterger Neurone in zylindrischen Volumina von 100 μm Höhe und einem Radius von 50 μm auf, 2) die Aktivität umfasste die oberen laminaren Schichten (marginale Zone und obere kortikale Platte) des Kortex und war gleichzeitig entlang der horizontalen Ebene räumlich begrenzt und 3) es existieren mindestens zwei Klassen von Aktivitätsereignissen bezüglich der räumlichen Ausbreitung (statische und dynamische Ereignisse). Zukünftig könnte eine höhere zeitliche Auflösung der Spiralscans ($>10 \text{ Hz}$) eine quantitative Auswertung der dynamischen Ausbreitung von Aktivitätsereignissen ermöglichen. Da die Volummessungen im Rahmen dieser Arbeit auf die Leistungsfähigkeit einer Piezo-basierten Einrichtung zur Fokussierung des Objektivs entlang der Z-Achse begrenzt war, könnte alternativ eine Positioniereinrichtung mit einer höheren Bandbreite, bei gleichbleibend hoher Positioniergenauigkeit ohne Objektivbewegungen, eingesetzt werden (z.B.:

remote scanning [70]). Auch die Verwendung neu entwickelter Fluoreszenzfarbstoffe mit niedrigeren Anstiegs- und Abklingzeiten, wie zum Beispiel GCaMP6f [135], sollten für Messungen mit einer hohen zeitlichen Auflösung in Betracht gezogen werden. Zu einer Steigerung des Signal-Rausch-Verhältnisses könnten darüber hinaus genetisch kodierte Fluoreszenzproteine von großem Nutzen sein, die im Gegensatz zu GCaMP auch eine Färbung des Zellkerns ermöglichen. Die Aktivität der GABAergen Zellpopulation konnte in bisherigen dreidimensionalen Messungen an Mäusen in der ersten postnatalen Woche, basierend auf der GCaMP3-Expression in EMX1-positiven Zellen, nicht erfasst werden und könnte für zukünftige Studien von Interesse sein. Es ist denkbar, die vorgestellte Identifikation mittels tdTomato in Kombination mit einer unspezifischen OGB1-Färbung zu optimieren (z.B.: bessere spektrale Filterung oder Rekonstruktion von Zellidentitäten durch tdTomato-Fluoreszenzdaten vor der Injektion von OGB1) oder alternative Fluoreszenzproteine bzw. andere Mauslinien zu diesem Zweck zu verwenden.

In Weitfeld-Epifluoreszenzmessungen bewirkte die Modulation der GABAergen Transmission eine Änderung der räumlichen Ausbreitung von Aktivitätsereignissen in der horizontalen Ebene. In diesem Zusammenhang ist auch ein potentieller Einfluss dieser Transmission auf die Ausbreitung der neonatalen Netzwerkaktivität in verschiedenen laminaren Schichten des Kortex von Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode an einem selbst zusammengebauten Zweiphotonenmikroskop entwickelt, die eine Validierung der Positioniergenauigkeit dreidimensionaler Scanverfahren ermöglicht. Positionsvalidierte, dreidimensionale Scans konnten zur zellspezifischen Messung neuronaler Aktivität in Form von raumzeitlich koordinierten somatischen Kalziumtransienten im unreifen visuellen Kortex der Maus angewendet werden. Zukünftige Anwendungen, die spezifische Fluoreszenzmarker und -indikatoren anderer (Zell-) Strukturen, anderer Hirnareale und / oder anderer Zeitpunkte der Entwicklung involvieren, sind dabei denkbar. Ein weiteres Anwendungsgebiet liegt in der Charakterisierung pathophysiologischer Veränderungen neuronaler Netzwerkaktivität in der Umgebung von Hirnläsionen nach Durchblutungsstörungen oder degenerativen Veränderungen sowie epileptischer Koaktivierungen von Neuronen [140]. Darüber hinaus wäre die Methode für Langzeitstudien an neuro(-glialen) Ensembles und deren Entwicklung von Aktivitätsmustern geeignet. Durch die Quantifizierbarkeit der Positioniergenauigkeit wären dabei auch repetitive Messungen an identifizierten Zellpopulationen vorstellbar.

Literaturverzeichnis

1. Hubel, D.H. und T.N. Wiesel, "Republication of The Journal of Physiology (1959) 148, 574-591: Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. 1959", The Journal of Physiology, 2009, **587**(Pt 12): S. 2721-2732.
2. Khazipov, R. und H.J. Luhmann, "Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents", Trends in Neurosciences, 2006, **29**(7): S. 414-418.
3. Egorov, A.V. und A. Draguhn, "Development of coherent neuronal activity patterns in mammalian cortical networks: common principles and local heterogeneity", Mechanisms of Development, 2013, **130**(6-8): S. 412-423.
4. Colonnese, M.T., et al., "A conserved switch in sensory processing prepares developing neocortex for vision", Neuron, 2010, **67**(3): S. 480-498.
5. Vanhatalo, S., et al., "Slow endogenous activity transients and developmental expression of K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 in the immature human cortex", European Journal of Neuroscience, 2005, **22**(11): S. 2799-2804.
6. Golshani, P., et al., "Internally mediated developmental desynchronization of neocortical network activity", The Journal of Neuroscience, 2009, **29**(35): S. 10890-10899.
7. Göbel, W., B.M. Kampa, und F. Helmchen, "Imaging cellular network dynamics in three dimensions using fast 3D laser scanning", Nature Methods, 2007, **4**(1): S. 73-79.
8. Kerlin, A.M., et al., "Broadly tuned response properties of diverse inhibitory neuron subtypes in mouse visual cortex", Neuron, 2010, **67**(5): S. 858-871.
9. Cheng, A., et al., "Simultaneous two-photon calcium imaging at different depths with spatiotemporal multiplexing", Nature Methods, 2011, **8**(2): S. 139-142.
10. Grewe, B.F., et al., "Fast two-layer two-photon imaging of neuronal cell populations using an electrically tunable lens", Biomedical optics express, 2011, **2**(7): S. 2035-2046.
11. Dal Maschio, M., et al., "Three-dimensional *in vivo* scanning microscopy with inertia-free focus control", Optics letters, 2011, **36**(17): S. 3503-3505.
12. Kampa, B.M., et al., "Representation of visual scenes by local neuronal populations in layer 2/3 of mouse visual cortex", Frontiers in Neural Circuits, 2011, **5**: S. 18.
13. Katona, G., et al., "Fast two-photon *in vivo* imaging with three-dimensional random-access scanning in large tissue volumes", Nature Methods, 2012, **9**(2): S. 201-208.

14. Ducros, M., et al., "Encoded multisite two-photon microscopy", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, **110**(32): S. 13138-13143.
15. Cotton, R.J., et al., "Three-dimensional mapping of microcircuit correlation structure", Frontiers in Neural Circuits, 2013, **7**: S. 151.
16. Fernández-Alfonso, T., et al., "Monitoring synaptic and neuronal activity in 3D with synthetic and genetic indicators using a compact acousto-optic lens two-photon microscope", Journal of Neuroscience Methods, 2014, **222**: S. 69-81.
17. Quirin, S., et al., "Simultaneous imaging of neural activity in three dimensions", Frontiers in Neural Circuits, 2014, **8**: S. 29.
18. Khazipov, R., et al., "Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex", Nature, 2004, **432**(7018): S. 758-761.
19. Minlebaev, M., Y. Ben-Ari, und R. Khazipov, "Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex *in vivo*", Journal of Neurophysiology, 2007, **97**(1): S. 692-700.
20. Yang, J.W., et al., "Three patterns of oscillatory activity differentially synchronize developing neocortical networks *in vivo*", The Journal of Neuroscience, 2009, **29**(28): S. 9011-9025.
21. Hanganu, I.L., Y. Ben-Ari, und R. Khazipov, "Retinal waves trigger spindle bursts in the neonatal rat visual cortex", The Journal of Neuroscience, 2006, **26**(25): S. 6728-6736.
22. Colonnese, M.T. und R. Khazipov, "'Slow activity transients" in infant rat visual cortex: a spreading synchronous oscillation patterned by retinal waves", The Journal of Neuroscience, 2010, **30**(12): S. 4325-4337.
23. Adelsberger, H., O. Garaschuk, und A. Konnerth, "Cortical calcium waves in resting newborn mice", Nature Neuroscience, 2005, **8**(8): S. 988-990.
24. Kerr, J.N., D. Greenberg, und F. Helmchen, "Imaging input and output of neocortical networks *in vivo*", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, **102**(39): S. 14063-14068.
25. Rochefort, N.L., et al., "Sparsification of neuronal activity in the visual cortex at eye-opening", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, **106**(35): S. 15049-15054.
26. Ackman, J.B., T.J. Burbridge, und M.C. Crair, "Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system", Nature, 2012, **490**(7419): S. 219-225.
27. Wong, R.O., et al., "Early functional neural networks in the developing retina", Nature, 1995, **374**(6524): S. 716-718.

28. Chandrasekaran, A.R., et al., "Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse", *The Journal of Neuroscience*, 2005, **25**(29): S. 6929-6938.
29. Zhang, J., et al., "Visual map development depends on the temporal pattern of binocular activity in mice", *Nature Neuroscience*, 2012, **15**(2): S. 298-307.
30. Xu, H.P., et al., "Spatial pattern of spontaneous retinal waves instructs retinotopic map refinement more than activity frequency", *Developmental Neurobiology*, 2015, **75**(6): S. 621-640.
31. Buzsáki, G., "Large-scale recording of neuronal ensembles", *Nature Neuroscience*, 2004, **7**(5): S. 446-451.
32. Riera, J.J., T. Goto, und R. Kawashima, "A methodology for fast assessments to the electrical activity of barrel fields *in vivo*: from population inputs to single unit outputs", *Frontiers in Neural Circuits*, 2014, **8**: S. 4.
33. Langer, D. und F. Helmchen, "*Post hoc* immunostaining of GABAergic neuronal subtypes following *in vivo* two-photon calcium imaging in mouse neocortex", *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 2012, **463**(2): S. 339-354.
34. Tamamaki, N., et al., "Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse", *The Journal of Comparative Neurology*, 2003, **467**(1): S. 60-79.
35. Morishima, T., et al., "GABA imaging in brain slices using immobilized enzyme-linked photoanalysis", *Neuroscience Research*, 2010, **67**(4): S. 347-353.
36. Wang, Y., et al., "Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in vesicular GABA transporter (VGAT)-venus transgenic mouse", *Neuroscience*, 2009, **164**(3): S. 1031-1043.
37. Kameyama, K., et al., "Difference in binocularity and ocular dominance plasticity between GABAergic and excitatory cortical neurons", *The Journal of Neuroscience*, 2010, **30**(4): S. 1551-1559.
38. Krnjević, K. und J.W. Phillis, "Ionophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex", *The Journal of Physiology*, 1963, **165**: S. 274-304.
39. Curtis, D.R., et al., "GABA, bicuculline and central inhibition", *Nature*, 1970, **226**(5252): S. 1222-1224.
40. Ben-Ari, Y., et al., "GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations", *Physiological Reviews*, 2007, **87**(4): S. 1215-1284.
41. Ben-Ari, Y., et al., "Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones", *The Journal of Physiology*, 1989, **416**: S. 303-325.

42. Ben-Ari, Y., et al., "The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders", *The Neuroscientist*, 2012, **18**(5): S. 467-486.
43. Allène, C., et al., "Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex", *The Journal of Neuroscience*, 2008, **28**(48): S. 12851-12863.
44. Rheims, S., et al., "Excitatory GABA in rodent developing neocortex *in vitro*", *Journal of Neurophysiology*, 2008, **100**(2): S. 609-619.
45. Garaschuk, O., et al., "Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex", *Nature Neuroscience*, 2000, **3**(5): S. 452-459.
46. Conhaim, J., et al., "Bimodal septal and cortical triggering and complex propagation patterns of spontaneous waves of activity in the developing mouse cerebral cortex", *Developmental Neurobiology*, 2010, **70**(10): S. 679-692.
47. Conhaim, J., et al., "Developmental changes in propagation patterns and transmitter dependence of waves of spontaneous activity in the mouse cerebral cortex", *The Journal of Physiology*, 2011, **589**(Pt 10): S. 2529-2541.
48. Represa, A. und Y. Ben-Ari, "Trophic actions of GABA on neuronal development", *Trends in Neurosciences*, 2005, **28**(6): S. 278-283.
49. Wang, D.D. und A.R. Kriegstein, "GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation", *The Journal of Neuroscience*, 2008, **28**(21): S. 5547-5558.
50. Young, S.Z., et al., "NKCC1 knockdown decreases neuron production through GABA(A)-regulated neural progenitor proliferation and delays dendrite development", *The Journal of Neuroscience*, 2012, **32**(39): S. 13630-13638.
51. Hübner, C.A. und K. Holthoff, "Anion transport and GABA signaling", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2013, **7**: S. 177.
52. Kaila, K., et al., "Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease", *Nature Reviews Neuroscience*, 2014, **15**(10): S. 637-654.
53. Rheims, S., et al., "GABA action in immature neocortical neurons directly depends on the availability of ketone bodies", *Journal of Neurochemistry*, 2009, **110**(4): S. 1330-1338.
54. Holmgren, C.D., et al., "Energy substrate availability as a determinant of neuronal resting potential, GABA signaling and spontaneous network activity in the neonatal cortex *in vitro*", *Journal of Neurochemistry*, 2010, **112**(4): S. 900-912.
55. Dzhala, V., et al., "Traumatic alterations in GABA signaling disrupt hippocampal network activity in the developing brain", *The Journal of Neuroscience*, 2012, **32**(12): S. 4017-4031.

56. Ruusuvuori, E., et al., "Spontaneous network events driven by depolarizing GABA action in neonatal hippocampal slices are not attributable to deficient mitochondrial energy metabolism", *The Journal of Neuroscience*, 2010, **30**(46): S. 15638-15642.
57. Kirmse, K., O.W. Witte, und K. Holthoff, "GABA depolarizes immature neocortical neurons in the presence of the ketone body β -hydroxybutyrate", *The Journal of Neuroscience*, 2010, **30**(47): S. 16002-16007.
58. Tyzio, R., et al., "Depolarizing actions of GABA in immature neurons depend neither on ketone bodies nor on pyruvate", *The Journal of Neuroscience*, 2011, **31**(1): S. 34-45.
59. Khakhalin, A.S. und C.D. Aizenman, "GABAergic transmission and chloride equilibrium potential are not modulated by pyruvate in the developing optic tectum of *Xenopus laevis* tadpoles", *PLoS ONE*, 2012, **7**(4): S. e34446.
60. Valeeva, G., F. Valiullina, und R. Khazipov, "Excitatory actions of GABA in the intact neonatal rodent hippocampus *in vitro*", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2013, **7**: S. 20.
61. Diaspro, A., G. Chirico, und M. Collini, "Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy", *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2005, **38**(2): S. 97-166.
62. Denk, W., et al., "Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy", *Journal of Neuroscience Methods*, 1994, **54**(2): S. 151-162.
63. Diaspro, A., et al., "Multi-photon excitation microscopy", *BioMedical Engineering OnLine*, 2006, **5**: S. 36.
64. Bovetti, S., C. Moretti, und T. Fellin, "Mapping brain circuit function *in vivo* using two-photon fluorescence microscopy", *Microscopy Research and Technique*, 2014, **77**(7): S. 492-501.
65. Mammano, F. und M. Bortolozzi, "Ca²⁺ Imaging: Principles of Analysis and Enhancement" in "Calcium measurement methods" von A.N. Verkhratskii und O.H. Petersen, 2010, Humana: New York; London, S. 57-80.
66. Stosiek, C., et al., "*In vivo* two-photon calcium imaging of neuronal networks", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, **100**(12): S. 7319-7324.
67. Dana, H., et al., "Hybrid multiphoton volumetric functional imaging of large-scale bioengineered neuronal networks", *Nature Communications*, 2014, **5**: S. 3997.
68. Reddy, G.D., et al., "Three-dimensional random access multiphoton microscopy for functional imaging of neuronal activity", *Nature Neuroscience*, 2008, **11**(6): S. 713-720.

69. Katona, G., et al., "Roller Coaster Scanning reveals spontaneous triggering of dendritic spikes in CA1 interneurons", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(5): S. 2148-2153.
70. Botcherby, E.J., et al., "Aberration-free three-dimensional multiphoton imaging of neuronal activity at kHz rates", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, **109**(8): S. 2919-2924.
71. Lillis, K.P., et al., "Two-photon imaging of spatially extended neuronal network dynamics with high temporal resolution", *Journal of Neuroscience Methods*, 2008, **172**(2): S. 178-184.
72. Montagu, J., "Galvanometric and Resonant Scanners" in "Handbook of Optical and Laser Scanning" von G.F. Marshall und G.E. Stutz, 2012, CRC: London; New York, 2. Auflage, S. 393-448.
73. Litynski, J. und A. Blume, "Piezo Scanning" in "Handbook of Optical and Laser Scanning" von G.F. Marshall und G.E. Stutz, 2012, CRC: London; New York, 2. Auflage, S. 637-667.
74. Tian, L., et al., "Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators", *Nature Methods*, 2009, **6**(12): S. 875-881.
75. Göbel, W., "3D laser-scanning techniques for two-photon calcium imaging of neural network dynamics *in vivo*", Dissertation, 2008, Zürich: Eidgenössische Technische Hochschule.
76. Kummer, M., et al., "Method to quantify accuracy of position feedback signals of a three-dimensional two-photon laser-scanning microscope", *Biomedical Optics Express*, 2015, **6**(10): S. 3678-3693.
77. Adobe, "Developer Resources - TIFF", <http://partners.adobe.com/public/developer/tiff/index.html#spec>, Stand: 18.01.2010, letzter Zugriff: 07.08.2015, veröffentlicht von: Adobe Systems.
78. Gorski, J.A., et al., "Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage", *The Journal of Neuroscience*, 2002, **22**(15): S. 6309-6314.
79. Zariwala, H.A., et al., "A Cre-dependent GCaMP3 reporter mouse for neuronal imaging *in vivo*", *The Journal of Neuroscience*, 2012, **32**(9): S. 3131-3141.
80. Madisen, L., et al., "A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain", *Nature Neuroscience*, 2010, **13**(1): S. 133-140.
81. Garaschuk, O., R.I. Milos, und A. Konnerth, "Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging *in vivo*", *Nature Protocols*, 2006, **1**(1): S. 380-386.

82. Kummer, M., et al., "Reliable *in vivo* identification of both GABAergic and glutamatergic neurons using Emx1-Cre driven fluorescent reporter expression", *Cell Calcium*, 2012, **52**(2): S. 182-189.
83. Kleiner, M., "Psychtoolbox-3", <http://psychtoolbox.org/>, Stand: 14.07.2014, letzter Zugriff: 07.08.2015, veröffentlicht von: unbekannt.
84. Eichhoff, G., B. Brawek, und O. Garaschuk, "Microglial calcium signal acts as a rapid sensor of single neuron damage *in vivo*", *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, **1813**(5): S. 1014-1024.
85. Kirmse, K., et al., "GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex *in vivo*", *Nature Communications*, 2015, **6**: S. 7750.
86. Perkins, K.L., "Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices", *Journal of Neuroscience Methods*, 2006, **154**(1-2): S. 1-18.
87. Yamada, J., et al., "Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1", *The Journal of Physiology*, 2004, **557**(Pt 3): S. 829-841.
88. Owens, D.F., et al., "Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging", *The Journal of Neuroscience*, 1996, **16**(20): S. 6414-6423.
89. Ben-Ari, Y., et al., "Refuting the challenges of the developmental shift of polarity of GABA actions: GABA more exciting than ever!", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2012, **6**: S. 35.
90. Hess, P., J.B. Lansman, und R.W. Tsien, "Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists", *Nature*, 1984, **311**(5986): S. 538-544.
91. Darcy, D.P. und J.S. Isaacson, "L-type calcium channels govern calcium signaling in migrating newborn neurons in the postnatal olfactory bulb", *The Journal of Neuroscience*, 2009, **29**(8): S. 2510-2518.
92. Hanganu, I.L., et al., "Cholinergic modulation of spindle bursts in the neonatal rat visual cortex *in vivo*", *The Journal of Neuroscience*, 2007, **27**(21): S. 5694-5705.
93. Brickley, S.G. und I. Mody, "Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease", *Neuron*, 2012, **73**(1): S. 23-34.
94. Heinen, K., et al., "GABAA receptor maturation in relation to eye opening in the rat visual cortex", *Neuroscience*, 2004, **124**(1): S. 161-171.

95. Sebe, J.Y., et al., "Robust tonic GABA currents can inhibit cell firing in mouse newborn neocortical pyramidal cells", *European Journal of Neuroscience*, 2010, **32**(8): S. 1310-1318.
96. Pologruto, T.A., B.L. Sabatini, und K. Svoboda, "ScanImage: flexible software for operating laser scanning microscopes", *BioMedical Engineering OnLine*, 2003, **2**: S. 13.
97. Chen, S., et al., "Software controlling algorithms for the system performance optimization of confocal laser scanning microscope", *Biomedical Signal Processing and Control*, 2010, **5**(3): S. 223-228.
98. Corbett, A.D., et al., "Quantifying distortions in two-photon remote focussing microscope images using a volumetric calibration specimen", *Frontiers in Physiology*, 2014, **5**: S. 384.
99. Grewe, B.F., et al., "High-speed *in vivo* calcium imaging reveals neuronal network activity with near-millisecond precision", *Nature Methods*, 2010, **7**(5): S. 399-405.
100. Kirkby, P.A., K.M. Srinivas Nadella, und R.A. Silver, "A compact Acousto-Optic Lens for 2D and 3D femtosecond based 2-photon microscopy", *Optics Express*, 2010, **18**(13): S. 13721-13745.
101. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM), "Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement", <http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html>, Stand: 09.2008, letzter Zugriff: 15.11.2015, veröffentlicht von: JCGM.
102. Paukert, M. und D.E. Bergles, "Reduction of motion artifacts during *in vivo* two-photon imaging of brain through heartbeat triggered scanning", *The Journal of Physiology*, 2012, **590**(Pt 13): S. 2955-2963.
103. Chen, J.L., et al., "Online correction of licking-induced brain motion during two-photon imaging with a tunable lens", *The Journal of Physiology*, 2013, **591**(Pt 19): S. 4689-4698.
104. Langer, D., et al., "HelioScan: a software framework for controlling *in vivo* microscopy setups with high hardware flexibility, functional diversity and extendibility", *Journal of Neuroscience Methods*, 2013.
105. Soriano, P., "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain", *Nature Genetics*, 1999, **21**(1): S. 70-71.
106. Rudy, B., et al., "Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons", *Developmental Neurobiology*, 2011, **71**(1): S. 45-61.
107. Nimmerjahn, A., et al., "Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex *in vivo*", *Nature Methods*, 2004, **1**(1): S. 31-37.

108. Kang, J., et al., "Sulforhodamine 101 induces long-term potentiation of intrinsic excitability and synaptic efficacy in hippocampal CA1 pyramidal neurons", *Neuroscience*, 2010, **169**(4): S. 1601-1609.
109. Drobizhev, M., et al., "Two-photon absorption properties of fluorescent proteins", *Nature Methods*, 2011, **8**(5): S. 393-399.
110. Shaner, N.C., et al., "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein", *Nature Biotechnology*, 2004, **22**(12): S. 1567-1572.
111. Komai, S., et al., "Two-photon targeted patching (TPTP) *in vivo*", *Nature Protocols*, 2006, **1**(2): S. 647-652.
112. Hippenmeyer, S., et al., "A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling", *PLOS Biology*, 2005, **3**(5): S. e159.
113. Tsien, J.Z., et al., "Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain", *Cell*, 1996, **87**(7): S. 1317-1326.
114. Kaila, K., et al., "The role of bicarbonate in GABAA receptor-mediated IPSPs of rat neocortical neurones", *The Journal of Physiology*, 1993, **464**: S. 273-289.
115. Löscher, W., M. Puskarjov, und K. Kaila, "Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments", *Neuropharmacology*, 2013, **69**: S. 62-74.
116. Inada, H., et al., "GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice", *PLoS ONE*, 2011, **6**(12): S. e27048.
117. Bony, G., et al., "Non-hyperpolarizing GABAB receptor activation regulates neuronal migration and neurite growth and specification by cAMP/LKB1", *Nature Communications*, 2013, **4**: S. 1800.
118. Chavas, J., et al., "Osmotic tension as a possible link between GABA(A) receptor activation and intracellular calcium elevation", *Neuron*, 2004, **44**(4): S. 701-713.
119. Aizenman, C.D. und D.J. Linden, "Regulation of the rebound depolarization and spontaneous firing patterns of deep nuclear neurons in slices of rat cerebellum", *Journal of Neurophysiology*, 1999, **82**(4): S. 1697-1709.
120. Pfeffer, C.K., et al., "NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development", *The Journal of Neuroscience*, 2009, **29**(11): S. 3419-3430.
121. Achilles, K., et al., "Kinetic properties of Cl⁻ uptake mediated by Na⁺-dependent K⁺-2Cl⁻ cotransport in immature rat neocortical neurons", *The Journal of Neuroscience*, 2007, **27**(32): S. 8616-8627.

122. Marchetti, C., et al., "Modeling spontaneous activity in the developing spinal cord using activity-dependent variations of intracellular chloride", *The Journal of Neuroscience*, 2005, **25**(14): S. 3601-3612.
123. Kolbaev, S.N., H.J. Luhmann, und W. Kilb, "Activity-dependent scaling of GABAergic excitation by dynamic Cl⁻ changes in Cajal-Retzius cells", *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 2011, **461**(5): S. 557-565.
124. Valeeva, G., et al., "Temporal coding at the immature depolarizing GABAergic synapse", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2010, **4**.
125. Deidda, G., et al., "Early depolarizing GABA controls critical-period plasticity in the rat visual cortex", *Nature Neuroscience*, 2015, **18**(1): S. 87-96.
126. An, S., W. Kilb, und H.J. Luhmann, "Sensory-evoked and spontaneous gamma and spindle bursts in neonatal rat motor cortex", *The Journal of Neuroscience*, 2014, **34**(33): S. 10870-10883.
127. Kolbaev, S.N., et al., "Effect of depolarizing GABA(A)-mediated membrane responses on excitability of Cajal-Retzius cells in the immature rat neocortex", *Journal of Neurophysiology*, 2011, **106**(4): S. 2034-2044.
128. Gullledge, A.T. und G.J. Stuart, "Excitatory actions of GABA in the cortex", *Neuron*, 2003, **37**(2): S. 299-309.
129. Morita, K., K. Tsumoto, und K. Aihara, "Bidirectional modulation of neuronal responses by depolarizing GABAergic inputs", *Biophysical Journal*, 2006, **90**(6): S. 1925-1938.
130. Jean-Xavier, C., et al., "Dual personality of GABA/glycine-mediated depolarizations in immature spinal cord", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**(27): S. 11477-11482.
131. Sipilä, S.T., et al., "The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus", *The Journal of Physiology*, 2006, **573**(Pt 3): S. 765-773.
132. Ogawa, T., et al., "Large-scale heterogeneous representation of sound attributes in rat primary auditory cortex: from unit activity to population dynamics", *The Journal of Neuroscience*, 2011, **31**(41): S. 14639-14653.
133. Du, J., et al., "High-resolution three-dimensional extracellular recording of neuronal activity with microfabricated electrode arrays", *Journal of Neurophysiology*, 2009, **101**(3): S. 1671-1678.
134. Akerboom, J., et al., "Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging", *The Journal of Neuroscience*, 2012, **32**(40): S. 13819-13840.
135. Chen, T.W., et al., "Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity", *Nature*, 2013, **499**(7458): S. 295-300.

136. Gil, V., S. Nocentini, und J.A. Del Río, "Historical first descriptions of Cajal-Retzius cells: from pioneer studies to current knowledge", *Frontiers in Neuroanatomy*, 2014, **8**: S. 32.
137. Minlebaev, M., Y. Ben-Ari, und R. Khazipov, "NMDA receptors pattern early activity in the developing barrel cortex *in vivo*", *Cerebral Cortex*, 2009, **19**(3): S. 688-696.
138. Perea, G., M. Sur, und A. Araque, "Neuron-glia networks: integral gear of brain function", *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014, **8**: S. 378.
139. Theer, P., M.T. Hasan, und W. Denk, "Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ regenerative amplifier", *Optics Letters*, 2003, **28**(12): S. 1022-1024.
140. Ben-Ari, Y. und G.L. Holmes, "Effects of seizures on developmental processes in the immature brain", *The Lancet Neurology*, 2006, **5**(12): S. 1055-1063.
141. 'jtagg82', "Community: Creating very large arrays in LabVIEW: Fragmented Array Library", <https://decibel.ni.com/content/docs/DOC-9321>, Stand: 28.10.2013, letzter Zugriff: 07.08.2015, veröffentlicht von: National Instruments.
142. Blume, P.A., "The LabVIEW style book", 4. Auflage, 2010, New York: Prentice Hall.
143. Warmerdam, F., et al., "LibTIFF - TIFF Library and Utilities", www.libtiff.org, Stand: 23.12.2003, letzter Zugriff: 07.08.2015, veröffentlicht von: unbekannt.
144. 'Nico_MPI', "Labview libtiff implementation", <http://forums.ni.com/t5/LabVIEW/Labview-libtiff-implementation/td-p/929843>, Stand: 31.03.2015, letzter Zugriff: 07.08.2015, veröffentlicht von: National Instruments.

Anhang

A – Implementierung der Steuersoftware 2PLSMC

Zu Beginn dieser Arbeit gab es keine frei verfügbare oder kommerziell erhältliche Software, die die Anforderungen zur Ansteuerung des 2PLSM (Kapitel 2.2.1) vollständig erfüllen konnte. Im Folgenden sollen der Aufbau und die Funktionsweise der entwickelten Software „Zweiphotonen-Laserscanningmikroskopcontroller“ (2PLSMC) dargestellt werden (Anhang E, Implementierung siehe DVD). Aufgrund folgender Vorteile erfolgte die Implementierung in der Programmierumgebung LabVIEW (National Instruments): 1) verfügbare Hardwaretreiber für vorhandene Mikroskop-Komponenten, 2) integriertes Multithreading, 3) modularer Aufbau des Programmcodes durch „Virtual Instruments“ (VIs, Abschnitte von Programmcode) und 4) erleichterte Strukturierung komplexer Projekte durch einen grafischen Systemdesignansatz.

Es sei auf die Problematik des virtuellen Speicher-Managements in LabVIEW (32-bit) hingewiesen. Konkret werden Programmbibliotheken ineffizient in den vom Betriebssystem zugewiesenen virtuellen Speicherraum (2 bzw. 3 GB) platziert, sodass dieser hochgradig fragmentiert wird. Infolge der Initialisierung großer Tupel oder Zeichenketten (>0,5 GB) wird zusammenhängender virtueller Speicher alloziert. Eine hohe Fragmentierung in Kombination mit solchen Allokationen kann daher zu laufzeitabhängigen Pufferüberläufen führen. Eine mögliche Umgehung dieser Problematik bietet die „Fragmented Array Library“ durch gleichsame Fragmentierung großer Tupel und Zeichenketten [141]. In 2PLSMC werden nur kleine Fragmente (wenige MB) der großen Menge an akquirierten Daten im Speicher gepuffert und fortlaufend in einer Datei gespeichert [Abschnitt: Scan (Akquisition)]. Bei dem Export der Daten werden wiederum handhabbare Teile aus einer Datei gelesen und direkt in einer Zielformatdatei abgespeichert (Abschnitt Datei-Export).

Die Implementierung von 2PLSMC basiert auf der Isolierung aller verarbeitenden Threads von einem Benutzeroberflächen-Thread (UI-Thread, Engl.: *user interface*). Zusätzlich erfolgt die Verarbeitung aufgrund der hardwarenahen Applikation vorwiegend in endlichen Zustandsautomaten. Globale Warteschlangen (Queues) dienen dem Transfer von Meldungen und Daten zwischen den Threads nach dem FIFO-Prinzip. Die Software kann neben dem zentralen Modul 2PLSMC MAIN in vier weitere Hauptmodule eingeteilt werden: 1) Scangenerator, 2) Scan (Vorschau), 3) Scan (Akquisition) und 4) Datei-Export (Abbildung A.1):

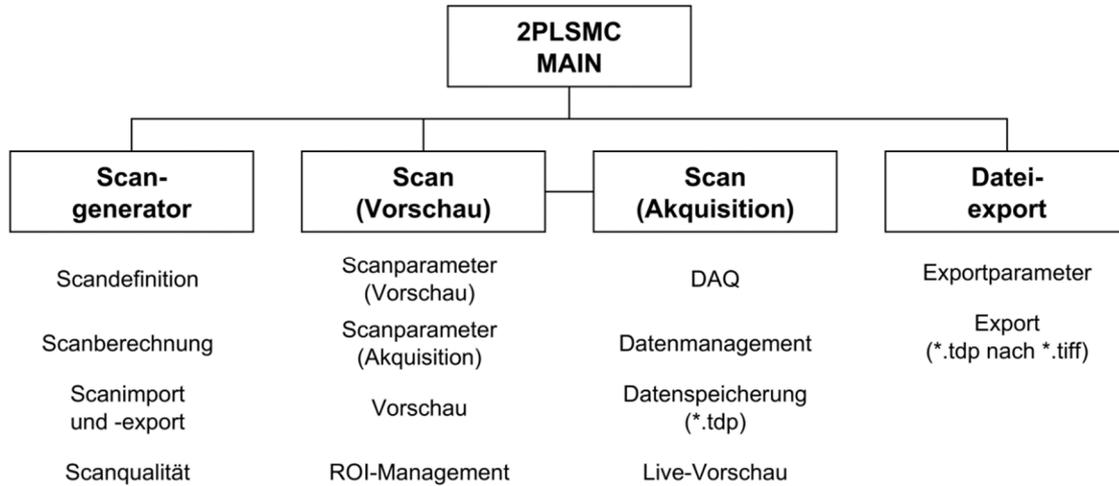


Abbildung A.1: Schematischer Aufbau der Software „2PLSMC“.

2PLSMC MAIN

Das übergeordnete VI 2PLSMC MAIN besteht aus drei Teilen: 1) Initialisierung, 2) paralleler UI-Thread und die Hauptverarbeitungsschleife und 3) Herunterfahren. Die Initialisierung wird bei jedem Programmstart durchlaufen. Alle notwendigen Hardware-Ressourcen (inklusive aller anzusteuernenden Mikroskop-Komponenten) werden in diesem Programmteil für 2PLSMC reserviert. Die Freigabe aller Ressourcen erfolgt beim Herunterfahren des Programms. Das Programmende kann über zwei verschiedene Ereignisse ausgelöst werden: 1) Benutzereingabe: Jederzeit möglich mittels des UI-Threads oder 2) Fehlerfall: Der Benutzer kann bei Ausgabe einer Programmfehlermeldung entscheiden, ob die Software fortfahren oder sofort beendet werden soll. Der überwiegende Teil der VIs in 2PLSMC verfügt über einen sogenannten Fehlereingang und -ausgang. Diese bestehen aus einem LabVIEW spezifischen Datentyp, über den bei Auftreten eines Fehlers innerhalb eines VIs alle fortfolgend verbundenen VIs die Fehlerinformation (Fehlerkennzahl, Ort des Auftretens und Fehlerbeschreibung) erhalten und darauf reagieren können. Nach jedem Durchlauf der Hauptverarbeitungsschleife liest ein endständiges VI den Inhalt dieses fortlaufenden Fehlerspeichers aus und gibt im Fehlerfall eine Fehlermeldung aus. Dieses Vorgehen ist bei der Ansteuerung empfindlicher Hardware-Komponenten essentiell und hat sich als Programmierstandard in LabVIEW durchgesetzt [142]. Eine Zeichenketten-Queue dient der Übertragung der Benutzereingaben von der Benutzeroberflächenschleife zur Hauptverarbeitungsschleife und der Auswahl verschiedener Programmzustände: 1) Leerlauf, 2) Scangenerator, 3) Scan (Vorschau), 4) Datei-Export und 5) Herunterfahren.

Scangenerator

Dieses VI dient dem Erstellen und Speichern benutzerdefinierter dreidimensionaler Scanvorschriften. Vor der Berechnung eines Scans müssen das Scanverfahren

(„Z-Stapel“ oder „Spiralscan“, Kapitel 3.4), die Scanamplituden (Definition des zu scannenden Volumens, Angabe in μm für X-, Y- und Z-Achse) und die Scanfrequenz (Angabe in Hz) festgelegt werden. Je nach Wahl des Scanverfahrens ergeben sich weitere Parameter:

„Z-Stapel“

- Bildhöhe und -breite (Angabe in Pixeln)
- Abstand der Bildebenen entlang der Z-Achse (Angabe in μm)
- Anzahl der Mittelungen pro Bildebene

„Spiralscan“

- Dreidimensionaler Abstand aufeinander folgender Scanpunkte (Angabe in μm)
- Anzahl der Scanebenen
- Anzahl der Spiralwindungen

Einen Sonderfall des Z-Stapels stellt der Bild-Rasterscan dar, wobei lediglich eine Bildebene mit einer höheren Scanfrequenz gescannt wird (zweidimensionaler Scan). Das Pendant im Spiralscan bildet die 2D-Spirale. Im letzteren Sonderfall wird eine einzige Spiralebene mit einer höheren Scanfrequenz gescannt (konstanter Signalverlauf entlang der Z-Achse). Für eine gegebene Hardware (Galvanometer) kann die 2D-Spirale gegenüber dem Bild-Rasterscan eine wesentlich höhere zeitliche Auflösung bei gleichzeitiger Reduktion der räumlichen Auflösung erzielen.

Neben oben aufgelisteten Scanparametern ist die Angabe eines Distanz-Umrechnungsfaktors für jede Raumachse notwendig (Angabe jeweils in $\mu\text{m}/\text{V}$, abhängig von der verwendeten Optik und Scanner-Hardware). Die geforderte Dimensionierung der Scantrajektorie wird dadurch in Steuerspannungen des Mikroskops übertragbar. Sind alle Angaben vollständig, kann die Berechnung der Signalverläufe für den angeforderten Scan durchgeführt werden. Das Speichern aller vorgesehenen Spannungswerte einer vollständigen Periode eines Z-Stapels ist aufgrund deren hohen Anzahl nicht praktikabel. Da die X- und Y-Ansteuerung für jede zu scannende Bildebene identisch ist, beschränkt sich die Berechnung der Signalverläufe auf eine Ebene. Die notwendigen Spannungswerte zur Ansteuerung der Z-Achse werden in Form der beiden Parameter Z-Amplitude und dem Abstand der Bildebenen übertragen und direkt vor der Akquisition einer Ebene berechnet (Abschnitt Scan (Akquisition)). Für Spiralscans werden hingegen alle Signalverläufe benötigt, um die Abstände der Scanpunkte entlang der Raumtrajektorie und die resultierende Scanqualität bewerten zu können. Konkret besteht das Hauptziel der Scan-Berechnungen in der äquidistanten Verteilung der Scanpunkte entlang der spezifizierten Trajektorie, sodass eine konstante Belichtungszeit jeder angefahrenen Raumposition erzielt werden kann. Des Weiteren ist die Anzahl der Scanpunkte pro

definierten Volumenelement (z.B.: einer Zelle) ein maßgeblicher Parameter zur Validierung der Scanqualität (Kapitel 3.5).

Nicht zuletzt dient der Scangenerator dem Im- und Export benutzerdefinierter Scanvorschriften. Oben genannte Signalverläufe und -parameter werden in Abhängigkeit des Scanverfahrens in den Dateiformaten *.ini (Z-Stapel; Tabelle 1, siehe Anhang B) und *.scp (Spiralscan; Tabelle 2, siehe Anhang B) abgespeichert. Dateien dieses Formats können als Voreinstellung für die Scanparameter im Hauptmodul Scan (Vorschau) importiert werden.

Scan (Vorschau)

Dieses VI wird für die Lokalisation eines Zielvolumens und der Vorbereitung dreidimensionaler Scans verwendet. Ein benutzerdefinierter Bild-Rasterscan dient dabei der Orientierung innerhalb des Volumens. Scanparameter können jeweils für die Vorschau, als auch für eine geplante Akquisition direkt durch Benutzereingabe geändert werden. Alternativ ist die Verwendung einer vordefinierten Scanvorschrift mittels des im vorhergehenden Abschnitt erwähnten Dateimports möglich. Darüber hinaus ermöglicht ein Schieberegler *online* die Einstellung eines konstanten Positions-Offsets entlang der Z-Achse (d , Angabe in μm). Auf diese Weise können einzelne XY-Ebenen des Zielvolumens in Form eines kontinuierlich aktualisierten Bildes (Rasterscan entlang einer Ebene) angezeigt werden ($d = 0 \mu\text{m}$ entspricht der obersten Ebene). Eine optionale exponentielle Intensitätsanpassung in Abhängigkeit von besagter Z-Position kompensiert den nichtlinearen Zuwachs an optischer Streuung in tieferliegenden Gewebeschichten. Eine gewebespezifische Anpassung ($I(z)$, Angabe in V) wird nach Eingabe einer Ausgangsintensität (I_0 ; Angabe in V; der Regelbereich des Steuersignals der verwendeten Pockels-Zelle liegt zwischen 0 – 1,6 V und entspricht einer relativen Intensität von 0 – 100%) und einer Dämpfungskonstante (λ_D , Angabe in μm) gemäß der Umkehrung des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet: $I(z) = I_0 \cdot e^{d/\lambda_D}$. Ausgehend von einem realen optisch inhomogenen Gewebe kann nicht in jedem Fall eine optimale Kompensation erzielt werden. Eine vollständige, ortsspezifische Intensitätsanpassung innerhalb des Zielvolumens (XYZ) ist theoretisch mittels der Pockels-Zelle realisierbar, würde allerdings die Online-Auswertung ortsspezifischer Fluoreszenzintensitäten erfordern. Inhomogenitäten in der optisch interferierenden intakten Dura Mater und unterschiedliche Gewebetiefen durch die kortikale Krümmung könnten somit ebenfalls kompensiert werden. Göbel und Kollegen beschreiben ein λ_D von 200 – 250 μm im Kortex 16 – 18 Tage alter Ratten, bzw. 30 – 40 Tage alter Mäuse für die Kompensation zunehmender optischer Streuung entlang der Z-Achse als praktikabel [7]. Das vorherrschend optisch stärker streuende Gewebe des Kortex postnataler Mäuse (3 – 4 Tage) bedarf einer stärkeren Kompensation (λ_D : 150 – 180 μm). Besagte

Tiefenanpassung erfolgt nicht nur in der Vorschau (Bild-Rasterscans), sondern findet auch während der Akquisition dreidimensionaler Datensätze statt. Zur Berechnung eines kompensierenden Intensitätsverlaufs wird jeder vom Z-Signalverlauf des Scans vorgegebene Positionswert entlang der Z-Achse als Momentanwert für d verwendet (unter Einbeziehung des gegebenen Distanz-Umrechnungsfaktors der Z-Achse). Die konstanten Werte für λ_D und I_0 werden aus der Vorschau übernommen.

Für eine valide Zuweisung morphologischer Informationen eines Zielvolumens (z.B.: Zellpositionen) in einem Spiralscan ist die Akquisition eines Z-Stapels im identischen Volumen notwendig. Aufgrund technischer (temperaturbedingter Drift) und biologischer Einflüsse (Bewegungsartefakte) verändert sich die relative Position des Zielvolumens gegenüber dem Objektiv. Eine landmarkenbasierte Online-Bildregistrierung unterstützt den Experimentator bei einer ggf. durchzuführenden Re-Positionierung des Zielvolumens. Konkret besteht während der Anzeige der Vorschau die Möglichkeit, Landmarken (Engl.: *regions of interest*, ROIs, Kreise mit benutzerdefinierten Durchmesser) an jede Position des Zielvolumens zu setzen. Die Adressierung einer definierten Position entlang der Z-Achse erfolgt dabei mittels des Parameters d . Die Raumpositionen werden in einer Matrix gespeichert ($3 \times N_{ROI}$, N_{ROI} Wertepaare aus X-, Y- und Z-Koordinaten) und können jederzeit als Überlagerung im Bild-Rasterscan (für die jeweilige Bildebene) angezeigt und verändert werden (ROI-Management).

Scan (Akquisition)

Dieses VI dient der Ausführung dreidimensionaler Scanvorschriften und der simultanen Speicherung sich daraus ergebender Akquisitionsdaten. Nach Betätigung des „Scan“-Knopfes in dem VI Scan (Vorschau) startet die Akquisition gemäß der angegebenen Scanparameter. Scan (Akquisition) besteht neben der Initialisierung (Vorbereiten einer Akquisition mittels NI-DAQ-Treiber „NI DAQmx 9.4“, Anlegen einer Akquisitionsdatei) und dem Zurücksetzen der Hardware nach einer Akquisition aus vier parallelen Modulen: 1) DAQ, 2) Datenspeicherung, 3) Live-Vorschau (UI-Thread) und 4) visStim. Letzteres dient der Steuerung einer optionalen, visuellen Stimulation des Versuchstieres (zweiter Monitorausgang) über die LabVIEW integrierte Matlab-Konsole und der „Psychophysics Toolbox“ (Kapitel 3.8.5).

Das DAQ-Modul dient der kontinuierlichen (Spiralscan) bzw. endlichen (Z-Stapel) Steuerung der dreidimensionalen Laserfokusposition des 2PLSM und der parallelen Datenakquisition. Ein einseitiger Datentransfer via Queue erfolgt von diesem Modul zum Speichermodul und optional zu der Live-Vorschau (kann in der graphischen Benutzeroberfläche jederzeit aktiviert bzw. deaktiviert werden). Ein Element genannter Queue besteht aus einem zusammenhängend analog-digital gewandelten Block von N_A Abtastwerten ($4 \times N_A$ Matrix aus vorzeichenlosen 16-bit Ganzzahlen, Datenkanäle AI0 –

AI3, Kapitel 3.1). Zur Reduzierung des Speicherverbrauchs wurde ein 16-bit Format (Rohdaten des 12-bit ADU) anstatt des NI-DAQ standardmäßigen rückskalierten 64-bit Format (diskrete Spannungswerte in Form von Gleitkommazahlen) gewählt. Bei vier gewandelten Abtastwerten pro Abtastintervall ergibt sich eine Reduktion des Datenvolumens um einen Faktor von 16. Im Speichermodul werden Datenblöcke gemäß ihrer eingehenden Reihenfolge in einer *.tdp-Datei (Dateiformat siehe Anhang B, Tabelle 3) gespeichert. Die Größe der Blöcke variiert dabei abhängig von der Schreibrate der Elemente in die Queue. Alle fünf Sekunden werden alle in einen Schreibpuffer übertragenen Daten in der Datei gespeichert. Gleichzeitig wird der Verzeichniseintrag der Datei aktualisiert. Besagter Vorgang ist für das Betriebssystem bindend, sodass keine zu großen Datenmengen zu einem undefinierten Zeitpunkt in die Datei geschrieben werden. Neben der Queue und dem Schreibpuffer existieren zwei weitere Puffer, um eine verlustfreie Datenübertragung zu gewährleisten. Dies sind zum einen ein Hardwarepuffer auf der Datenerfassungskarte (NI-6110, Puffergröße: 8192 Abtastwerte) und zum anderen ein Treiberpuffer (10^7 Abtastwerte pro Kanal, entspricht einem maximalen Pufferintervall von 10 s bei einer Abtastrate von 1 MSamples/s, entspricht weiterhin dem 10-fachen des vom Hersteller empfohlenen Standardwertes). Ein potentieller Datenverlust durch Überschreiben von nicht transferierten Daten in letzterem Puffer wird unter Generierung einer Fehlermeldung des NI-DAQ-Treibers signalisiert („Fehler -200279“). Dieser Fall träte beispielsweise ein, wenn das Betriebssystem den DAQ-Thread mehr als 10 s daran hindern würde, Daten von dem Treiberpuffer in die Queue zu transportieren.

Das DAQ-Modul repräsentiert den Kern von 2PLSMC. Zur Synchronisation aller Lese- und Schreibprozesse wird aus dem 20 MHz Basistakt der Datenerfassungskarte NI-6110 ein einziger Takt generiert und verwendet. Die Taktrate entspricht der Abtastrate des vorgegebenen Scans (nächsthöherer oder gleicher von der Hardware generierbare Takt, $10^3 - 10^6$ Hz). Der Start aller Schreibvorgänge ist an eine steigende Flanke des Start-Triggers der Lesevorgänge gebunden. Hardwarebedingt ergibt sich eine konstante Latenz von einem Abtastwert. Vor dem Start der Lesevorgänge werden den analogen Ausgängen die benutzerdefinierten Signalverläufe einer Scanperiode unter Beachtung dieses Zeitversatzes zugewiesen (AO0: X-Position, AO1: Y-Position, AO0 [NI PCI-6711]: Z-Position, AO1 [NI PCI-6711]: Intensität, Kapitel 3.1). Die Berechnung der Signalverläufe für die Intensitätsanpassung (und der Z-Position bei Z-Stapeln) ist dieser Zuweisung voran gestellt. Die Verifikation der Datenakquisition wird in Kapitel 3.2 beschrieben.

Die Live-Vorschau dient der Anzeige von aufgezeichneten Daten des PMT-Kanals (AI0) während einer laufenden Akquisition. Die Darstellung repräsentiert eine Kopie der akquirierten Daten und kann ohne Datenverlust manipuliert werden. Für Z-Stapel entspricht diese kontinuierlich aktualisierte Vorschau dem gemittelten Bild der zuletzt

gescannten Bildebene (Mittelwert aller gemessenen Intensitätswerte einer Bildposition). Für die Spiralscans wird hingegen ein aktuelles Linienbild erzeugt. Eine horizontale Linie des Bildes besteht aus den Intensitätswerten einer Scanperiode in Reihenfolge der Abtastung von links nach rechts. Die zuletzt erfassten Perioden werden kontinuierlich in der letzten Zeile angehängt. Sobald eine neue Periode erfasst wurde, werden alle zuvor erfassten Perioden um eine Zeile nach oben geschoben. Die älteste Periode am oberen Rand der Darstellung wird folglich gelöscht. Da eine Periode eines Spiralscans meist aus mehreren zehntausend Punkten besteht, ist die Darstellung der gesamten Periode nicht praktikabel. Eine alternative räumliche Mittelung (Engl.: *binning*) des Bildes wird nicht durchgeführt, um die maximale räumliche Auflösung zur Erfassung der Bildinformation für den Betrachter zu erhalten. Stattdessen bietet die Software die Möglichkeit, einen benutzerdefinierten Ausschnitt aller erfassten Scanpunkte anzuzeigen. Die Bildanzeige kann jederzeit angepasst werden.

Eine Akquisition endet entweder automatisch nach einer vollständigen Periode (Z-Stapel) oder durch Abbruch des Benutzers. Tritt während eines Experiments eine Positionsänderung des Zielvolumens auf, kann sofort darauf reagiert werden (z. B. mit Neustart der Akquisition) bzw. bei langsamer Drift kann *post hoc* der Datensatz von der Analyse ausgeschlossen werden. Konkret führt die kontinuierliche Bewegung des Spiralscans durch ein Zielvolumen zu einer hohen Sensitivität des akquirierten Intensitätsprofils gegenüber Bewegungsartefakten (messbar in Form von massiven Intensitätsänderungen über die Perioden). Eine zusätzliche Bewegungsdetektion, die beispielsweise bei diskontinuierlichen Scanverfahren angewendet wird [15], ist daher nicht notwendig. In jedem Fall wird für die Positionsrekonstruktion dreidimensionaler Aktivitätsmessungen ein artefaktfreies Paar aus einem funktionellen Linienscan und einem morphologischen Z-Stapel benötigt.

Datei-Export

Dieses VI dient dem offline Export akquirierter Rohdaten (*.tdp) in ein für die Auswertung adäquates Format. Konkret erfolgt die Aufteilung aller erfassten Abtastwerte einer Akquisitionsdatei auf vier mehrseitige TIFF-Dateien (Engl.: *Tagged Image File Format*). In je einer Datei wird ein analoges Eingangssignal gespeichert: 1) *_01.tiff: PMT-Signal, 2) *_02.tiff: Z Feedback oder zweites PMT-Signal, 3) *_03.tiff: X Feedback und 4) *_04.tiff: Y Feedback). Die Dimensionen der Bildstapel (Höhe \times Breite \times Anzahl der Bilder) sind dabei abhängig von dem verwendeten Scanverfahren. Bei einem Z-Stapel definiert die Anzahl der Abtastwerte pro XY-Ebene die Anzahl der Bildpunkte. Die Anzahl der Bilder entspricht der Anzahl gescannter Ebenen. Bei einem Spiralscan entspricht die Anzahl horizontal angeordneter Bildpunkte der Anzahl der Abtastwerte pro Scanperiode. Die Anzahl der Bilder entspricht der Anzahl an gescannten Perioden (1 \times Abtastwerte pro

Scanperiode \times Anzahl der Perioden). Dieser bildbasierte Ansatz bietet eine einfache Möglichkeit der direkten Zuordnung der Intensitätswerte (Datei *_01.tiff) zu Raumpositionen (Dateien *_02.tiff, *_03.tiff und *_04.tiff) bei gleichzeitigem Erhalt der Übersichtlichkeit der Daten. Der Benutzer kann vor dem Export entscheiden, welche der vier Dateien angelegt werden sollen. Der Parameter „Sample-Offset“ (Angabe in μs) ermöglicht das Überspringen von beliebig vielen Abtastwerten (Beginn der Akquisition entspricht $0 \mu\text{s}$, Rundung auf ganzzahlige Vielfache der Abtastrate). Für die erfassten Positionssignale (AI1 – AI3) dienen drei Distanz-Umrechnungsfaktoren zur Skalierung der digitalisierten Rohdatenwerte in die Längeneinheit Mikrometer.

Grundsätzlich bietet LabVIEW die Möglichkeit TIFF-Dateien zu exportieren. Aufgrund der Vielfältigkeit des TIFF-Formats wird der mehrseitige Export jedoch nicht unterstützt. Um unnötige Festplattenzugriffe bei dem Export vieler Einzelbilder zu vermeiden, erfolgt der Zugriff auf die externe Programmbibliothek Libtiff [143] (Version 3.8.2), die den Export von Bildstapeln in eine TIFF-Datei ermöglicht. Dank der Libtiff-Implementierung in LabVIEW [144] ist der direkte Zugriff auf die benötigten Funktionen besagter Bibliothek gegeben. Die im *.tdp-Format gespeicherten Rohdaten liegen in Form von akquirierten Datenpaketen unterschiedlicher Größe vor. Diese Pakete werden vor dem Export aus der Quelldatei gelesen und entsprechend der Bildebene (Z-Stapel) bzw. der Scanperiode (Spiralscan) zusammengesetzt und in eine vorbereitete Zieldatei (*.tiff) geschrieben. Der Vorgang erfolgt unter minimaler Verwendung von Arbeitsspeicher, da die Pakete seriell eingelesen und direkt wieder auf die Festplatte geschrieben werden. Die Intensitätsdaten werden in einem 16-bit Format (Ganzzahl ohne Vorzeichen) und die Positionsdaten in einem 32-bit Format (Gleitkommazahl mit einfacher Genauigkeit von sieben Stellen) gespeichert. Die Auswertung der Bilddaten erfolgt mittels der JAVA-basierten Software ImageJ und zusätzlich implementierten Makros (siehe Anhang E und DVD).

Zusammenfassend ist 2PLSMC eine Software zur Ansteuerung eines Galvanometer- und Piezo-Aktor-basierten 2PLSM. Ihr Fokus liegt auf dem Einsatz kontinuierlicher dreidimensionaler Scanverfahren, namentlich dem Spiralscan. Die Zuordnung von Raumpositionen zu Intensitätswerten erfolgt über einen Z-Stapel und rückgelesene Positionsdaten der Mikroskop-Hardware.

B – Dateiformate der Software 2PLSMC

Tabelle 1: Dateiformat *.ini (Z-Stapel Scanvorschrift)

| Parameter | Inhalt | Datentyp [†] | Größe [Byte] |
|---------------|--|-----------------------|--------------|
| - | - | - | 48 |
| Scanverfahren | Scanverfahren-Kennziffer | U16 | 2 |
| X Frequenz | Signalfrequenz [Hz], X-Achse | DBL | 8 |
| Y Frequenz | Signalfrequenz [Hz], Y-Achse | DBL | 8 |
| Z Frequenz | Bildebenen-Intervall [μm] | DBL | 8 |
| X Amplitude | Signalamplitude [V], X-Achse | DBL | 8 |
| Y Amplitude | Signalamplitude [V], Y-Achse | DBL | 8 |
| Z Amplitude | Signalamplitude [μm], Z-Achse | DBL | 8 |
| Dateipfad | Dateipfad der Scanvorschrift | String | 4 + (1 x N) |
| Averaging | Anzahl der Bildmittelungen | I32 | 4 |
| - | - | - | 104 |

Tabelle 2: Dateiformat *.scp (Spiralscan Scanvorschrift)

| Parameter | Inhalt | Datentyp [†] | Größe [Byte] |
|-----------------|---|-----------------------|--------------|
| Windungen | Anzahl der Spiralwindungen [°] | I32 | 4 |
| XY-Amplitude | Amplitude in der XY-Ebene [V] | DBL | 8 |
| - | - | - | 8 |
| Scanebenen | Anzahl der Scanebenen | I32 | 4 |
| Abstand | Abstand der Scanpunkte [μm] | DBL | 8 |
| Frequenz | Scanfrequenz [Hz] | DBL | 8 |
| Z-Amplitude | Amplitude entlang der Z-Achse [μm] | DBL | 8 |
| Abtastintervall | Abtastintervall [s] | DBL | 8 |
| - | - | - | 24 |
| Scandaten | Matrix aller Steuerspannungen N [V] | 2D-DBL-Matrix | 8 + (8 x N) |

Tabelle 3: Dateiformat *.tdp (Akquisitionsdaten)

| Parameter | Inhalt | Datentyp [†] | Größe [Byte] |
|------------------------|------------------------------------|-----------------------|--------------|
| - | - | - | 16 |
| dt (X Signalverlauf) | Abtastintervall [s] | DBL | 8 |
| Y[N] (X Signalverlauf) | Generierter X Spannungsverlauf [V] | 1D-DBL-Matrix | 4 + (8 × N) |
| - | - | - | 45 |
| dt (Y Signalverlauf) | Abtastintervall [s] | DBL | 8 |
| Y[N] (Y Signalverlauf) | Generierter Y Spannungsverlauf [V] | 1D-DBL-Matrix | 4 + (8 × N) |
| - | - | - | 45 |
| dt (Z Signalverlauf) | Abtastintervall [s] | DBL | 8 |
| Y[N] (Z Signalverlauf) | Generierter Z Spannungsverlauf [V] | 1D-DBL-Matrix | 4 + (8 × N) |
| - | - | - | 77 |
| Scanverfahren | Scanverfahren-Kennziffer | U16 | 2 |
| X Frequenz | Signalfrequenz [Hz], X-Achse | DBL | 8 |
| Y Frequenz | Signalfrequenz [Hz], Y-Achse | DBL | 8 |
| Z Frequenz | Bildebenen-Intervall [µm] | DBL | 8 |
| X Amplitude | Signalamplitude [V], X-Achse | DBL | 8 |
| Y Amplitude | Signalamplitude [V], Y-Achse | DBL | 8 |
| Z Amplitude | Signalamplitude [µm], Z-Achse | DBL | 8 |
| Dateipfad | Dateipfad der Scanvorschrift | String | 4 + (1 × N) |
| Averaging | Anzahl der Bildmittelungen | I32 | 4 |
| - | - | - | 24 |
| Zeitstempel | Zeitstempel der Akquisition | Time Stamp | 32 |
| Abtastrate | Abtastrate der Akquisition [s] | DBL | 8 |
| Messdaten | Matrix aller Abtastwerte N | 2D-U16-Matrix | 8 + (2 × N) |

[†] 1D-[...]-Matrix Eindimensionale Matrix von [...] (vorangestellte Matrixgröße U32)
 2D-[...]-Matrix Zweidimensionale Matrix von [...] (vorangestellte Matrixgröße U32 × U32)
 DBL 64-bit Gleitkommazahl (15 Stellen Genauigkeit)
 I32 / I64 32-bit oder 64-bit Ganzzahl mit Vorzeichen
 String 8-bit Zeichenkette aus N Zeichen mit vorangestellter Matrixgröße (U32)
 Time Stamp 2 × I64 (Sekunden seit 01.01.1904 00:00 Uhr), zwei weitere U64 (Sekundenbruchteile)
 U16 / U32 / U64 Vorzeichenlose 16-bit, 32-bit oder 64-bit Ganzzahl

C – Testprogramm des DAQ-Moduls von 2PLSMC

Das Testprogramm dient der wiederholten automatisierten Erfassung und digitalen Speicherung von einzelnen bzw. vier Spannungssignalen (ADU-Kanäle: AI0, AI1, AI2 und AI3) während simultan einzelne oder drei identische Spannungssignale (DAU-Kanäle: AO0, AO1 und AO0 [NI PCI-6711]) generiert werden (im Folgenden als Akquisition bezeichnet). Die Umsetzung der analogen bzw. digitalen Spannungssignale erfolgt mittels des im DAQ-Modul integrierten LabVIEW Treibermoduls NI-DAQmx (Version 9.4) und zwei Datenerfassungskarten (NI PCI-6110, NI PCI-6711). Die Verläufe der Spannungssignale werden von dem Benutzer anhand von den in Tabelle 4 gelisteten Parametern eingestellt. Zur erleichterten Bedienung können für die Parameter Signalamplitudenreihenfolge und Signalfrequenzreihenfolge Werte aus einzelnen Tabstopp-getrennten Dateien importiert werden. Eine Überprüfung der Wertebereiche erfolgt von dem Programm direkt nach Eingabe der Parameter vom Benutzer. Ebenso wird die Ausführbarkeit einer Akquisition vor dem Start sichergestellt (Ausgabe einer Fehlermeldung und Aufforderung zur Korrektur, wenn nicht zutreffend). Der Benutzer erhält nach der Verarbeitung der Akquisition Informationen über die Dateipfade der gespeicherten Dateien Abstraten für Lese- und Schreibvorgänge sowie Synchronisationsfehler während der Verarbeitung (Lese- ungleich der Schreibrate). Ein Vergleichsmodul unterstützt den Benutzer bei der Offline-Auswertung der erfassten und generierten Daten. Die Speicherung der Rohdaten erfolgt in einem applikations-spezifischen Dateiformat (Dateiendung *.et) in Form von Binärdaten. Die Parameter sind in der Reihenfolge gemäß Tabelle 5 im Big-Endian-Format kodiert.

Tabelle 4: Signalparameter einer Akquisition

| Parameter | Wertebereich |
|------------------------------------|---|
| Signalamplitudenreihenfolge | {[0 – 10 V] ₁ , ..., [0 – 10 V] _N } |
| Signalfrequenzreihenfolge | {[1 – 10000 Hz] ₁ , ..., [1 – 10000 Hz] _N } |
| Signalform | [Sinus / Dreieck / Rechteck / Sägezahn / weißes Rauschen] |
| Spannungskanalkennung | [0 / 1 / 2 / 3 / Alle] |
| Abstraten-Signalfrequenzverhältnis | [3 – 1000000] |
| Anzahl der Signalperioden | [1 – 1000000] |

Die Wertebereiche von Parametern werden von der Software direkt nach der Eingabe geprüft. Im Fall einer Überschreitung wird der eingegebene Wert an den nächstmöglichen Wert angepasst. Zusätzlich wird vor Ausführung einer Akquisition eine Fehlermeldung auf dem primären Bildschirm angezeigt, wenn die Eingabekombination nicht realisierbar ist.

Nach Bestätigung der Fehlermeldung kann der Benutzer die Eingabe wiederholen. Konkret sind die Parameter Signalfrequenz und Abtastraten-Signalfrequenzverhältnis voneinander abhängig. Eine Abtastrate von 1 MHz darf seitens der Hardware nicht überschritten werden, d.h. das Produkt aus der jeweiligen Signalfrequenz und dem Sampleraten-Signalfrequenzverhältnis muss kleiner gleich 1 MHz sein. Weiterhin ist eine Abtastrate unter 1 kHz mit der verwendeten Hardware unzulässig. Demzufolge muss das Produkt aus der jeweiligen Signalfrequenz und dem Abtastraten-Signalfrequenzverhältnis größer gleich 1 kHz sein.

Abgebildete und erfasste Spannungsverläufe werden in dem Dateiformat *.et digital auf einer Festplatte unter dem Verzeichnis „D:\“ gespeichert. Der komplette Datensatz einer Verarbeitungsreihenfolge wird gemäß der Anzahl an Iterationen auf mehrere *.et-Dateien aufgeteilt. Die Nomenklatur der Dateinamen lautet:

„2PLSMET_[JJ]_[MM]_[TT]_[Iterationsschritt]_[Kanal]“.et“. [JJ]_[MM]_[TT] entspricht dem Datum der Datenakquisition (Jahr, Monat, Tag). [Iterationsschritt] stellt eine fortlaufende, dreistellige positive Ganzzahl im Bereich [001 – 999] dar. Der Zusatz [Kanal] ist nur zutreffend, wenn der Parameter Kanal dem Wert „Alle“ entspricht und somit vier erfasste Signalverläufe auf vier Dateien aufgeteilt werden müssen.

Tabelle 5: Dateiformat *.et

| Parameter | Inhalt | Datentyp | Größe [Byte] |
|---------------------------|--|--|--------------|
| Kanalkennung | Kennung verwendeter Spannungskanäle, Wertebereich [0 / 1 / 2 / 3 / Alle] | 32-bit Ganzzahl mit Vorzeichen | 4 |
| t0 (Signalverlauf) | absoluter Startzeitpunkt (Datum, Sekunden) | 64-bit Ganzzahl mit Vorzeichen, vorzeichenlose 64-bit Ganzzahl | 16 |
| dt (Signalverlauf) | Abtastintervall in Sekunden | 64-bit Gleitkommazahl [†] | 8 |
| Y[N] (Signalverlauf) | Generierter Spannungsverlauf | Eindimensionale Matrix von 64-bit Gleitkommazahlen [†] mit vorangestellter Matrixgröße (vorzeichenlose 32-bit Ganzzahl) | 4 + (8 × N) |
| Attribute (Signalverlauf) | Platzhalter für Attribute der Ansteuerungsdaten | Nicht festgelegt | 29 |
| Messdaten[N] | Erfasster Spannungsverlauf | Eindimensionale Matrix von 64-bit Gleitkommazahlen [†] mit vorangestellter Matrixgröße (vorzeichenlose 32-bit Ganzzahl) | 4 + (8 × N) |

[†] 15 Stellen Genauigkeit

Zusätzlich wurde ein Vergleichsmodul implementiert, welches eine Differenzbildung von allen Spannungswerten zweier Signalverläufe durchführt (15 Stellen Genauigkeit). Anhand des Parameters „Offset“ kann der Benutzer die Signalverläufe gegeneinander in

Ein-Sample-Schritten verschieben. Mittels des Parameters „Grenzwert“ (Einheit: mV) wird festgelegt, ab welchem Betrag der jeweiligen Spannungsdifferenz eine Abweichung zwischen beiden Signalverläufen vorliegt. Das Modul bietet folgende Vergleichsmöglichkeiten: a) Vergleich der Daten einer *.et-Datei (erfasste gegen generierte Daten), b) Vergleich der Daten einer *.et-Datei (generierte Daten gegen Idealwerte, unter Angabe eines Referenz-Signalverlaufs nach Programmaufforderung), c) Vergleich der Daten einer *.et-Datei (erfasste Daten gegen Idealwerte, unter Angabe eines Referenz-Signalverlaufs nach Programmaufforderung) und d) Vergleich der Daten zweier *.et-Dateien (erfasste gegen erfasste Daten).

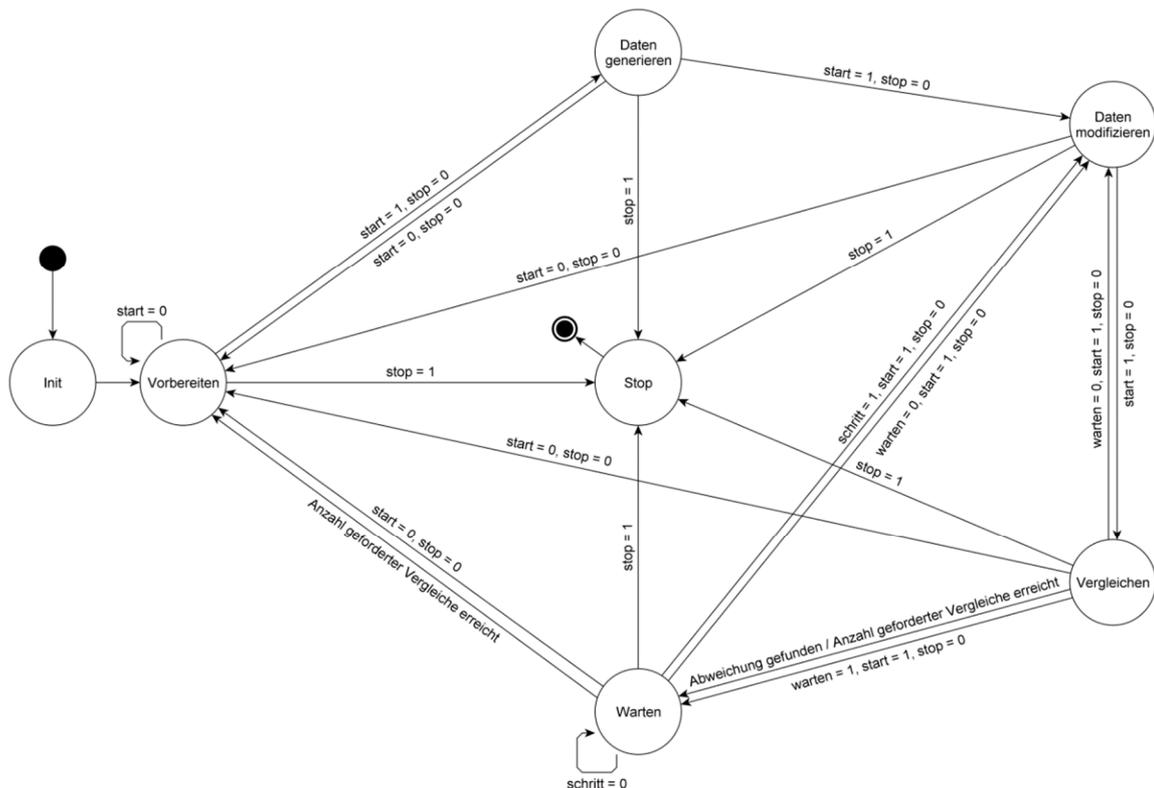


Abbildung C.1: Zustandsdiagramm des Programms zur Überprüfung des Vergleichsmoduls. Zustand „Init“ – Initialisierung des Programms (start = 0, stop = 0, warten = 0). Zustand „Vorbereiten“ – Benutzereingabe der Vergleichsparameter (Vergleichsmodus [a] / b) / c) / d)], Offset [Samples], Grenzwert [mV], Anteil der Störstellen [0 – 1], Anzahl durchzuführender Vergleiche [1 – 2³¹-1]. Zustand „Daten generieren“ – Rohdaten gemäß der Benutzereingabe generieren. Zustand „Daten modifizieren“ – Einbau zufälliger Störstellen in Rohdaten. Zustand „Vergleichen“ – Vergleich der Ergebnisse des zu testenden Vergleichsmoduls mit den bekannten Störstellen. Zustand „Warten“ – Warten auf Interaktion des Benutzers (Anzeigen der Ergebnisse des letzten Vergleichs). Zustand „Stop“ – Beenden des Programms.

Nach einem durchgeführten Vergleich werden folgende Daten angezeigt: 1) Signalverlauf 1 (Signal), 2) Signalverlauf 2 (Referenz), 3) Spannungsdifferenz (= Signal – Referenz), 4) Überschreitungen (alle überschreitenden Differenzen zum Zeitpunkt der Überschreitung [Index] in aufsteigender Reihenfolge) und 5) Vergleich bestanden (Binär).

Um sicherzustellen, dass das Vergleichsmodul fehlerfrei funktioniert, wird ein Zufallsalgorithmus verwendet, der zu vergleichende Signalverläufe an zufälligen Stellen modifiziert (unter Einhaltung des Wertebereiches des ursprünglichen Signalverlaufs) und somit artifizielle Spannungsdifferenzen erzeugt. Die bekannten „Störstellen“ werden anschließend mit den detektierten Überschreitungen des eigentlichen Vergleichsmoduls verglichen. Im Fall einer Abweichung wird eine Fehlermeldung generiert. Das Zustandsdiagramm des beschriebenen Testprogramms ist in Abbildung C.1 dargestellt.

D – Testprotokolle zur Verifikation der Datenakquisition

1. Prüfung von Benutzereingaben

- I. Start der Testsoftware.
- II. Aufrufen des Hardwaretestmenüs.
- III. Vordefinierte Benutzereingaben laut Tabelle 6 durchführen.
- IV. Menü schließen und Programm beenden.
- V. Löschen aller *.et-Dateien aus dem Pfad „D:\“ von der Festplatte.

Der Test gilt als bestanden, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- I. Die resultierende Anzeige stimmt nach der jeweiligen Eingabe mit den Angaben in Tabelle 6 überein, d.h. die Wertebereiche der Eingabeparameter wurden eingehalten.
- II. Fehlermeldungen wurden gemäß Tabelle 6 ausgegeben.
- III. Eingelesene Parameter aus Amplituden- und Frequenzdateien führen zu einer resultierenden Anzeige laut Tabelle 6.

Tabelle 6: Protokoll zur Überprüfung der Benutzereingaben

| Schritt | Benutzeranweisung | Resultierende Anzeige | Anzeige einer Fehlermeldung? |
|---------|---|--------------------------------------|------------------------------|
| 01 | „2“ für Parameter „Kanal“ auswählen | 2 | Nein |
| 02 | „3“ für Parameter „Kanal“ auswählen | 3 | Nein |
| 03 | „1“ für Parameter „Kanal“ auswählen | 1 | Nein |
| 04 | „0“ für Parameter „Kanal“ auswählen | 0 | Nein |
| 05 | „Alle“ für Parameter „Kanal“ auswählen | Alle | Nein |
| 06 | „Sinus“ für Parameter „Signalform“ auswählen | Sinus | Nein |
| 07 | „Dreieck“ für Parameter „Signalform“ auswählen | Dreieck | Nein |
| 08 | „Rechteck“ für Parameter „Signalform“ auswählen | Rechteck | Nein |
| 09 | „Sägezahn“ für Parameter „Signalform“ auswählen | Sägezahn | Nein |
| 10 | „Weißes Rauschen“ für Parameter „Signalform“ auswählen | Weißes Rauschen | Nein |
| 11 | „0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11“ für Parameter „Signalamplituden“ auswählen | 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 10 | Nein |
| 12 | „1; 10; 100; 1000; 10000; 100000“ für Parameter „Signalfrequenzen“ auswählen | 1; 10; 100; 1000; 10000; 100000 | Nein |

| Schritt | Benutzeranweisung | Resultierende Anzeige | Anzeige einer Fehlermeldung? |
|---------|---|--|------------------------------|
| 13 | [...]-Symbol neben dem Parameter „Signalamplituden“ anwählen und Datei „2PSLMET - TEST01 - Amplituden.txt“ auswählen | 9,9999; 1,234; 2,6784; 3,342; 6,23423; 7,12312; 4,1236; 5,9; 8,62; 10; 10; 10; 0,0001; 0; 0,005; 0,9; 1; 0 | Nein |
| 14 | [...]-Symbol neben dem Parameter „Signalfrequenzen“ anwählen und Datei „2PSLMET - TEST01 - Frequenzen.txt“ auswählen | 1; 1; 1; 1; 1; 23; 234; 647; 10000; 10000; 10000; 7445; 35; 21; 888; 567; 1; 1; 1 | Nein |
| 15 | „1“ für Parameter „Sampleraten-Signalfrequenzverhältnis“ auswählen | 3 | Nein |
| 16 | „2“ für Parameter „Sampleraten-Signalfrequenzverhältnis“ auswählen | 3 | Nein |
| 17 | „3“ für Parameter „Sampleraten-Signalfrequenzverhältnis“ auswählen; „BWT starten“ anwählen; Fehlermeldung mit „OK“ bestätigen | 3 | Ja |
| 18 | „Leeres Array“ für Parameter „Signalfrequenzen“ auswählen; „400“ für Parameter „Signalfrequenzen“ auswählen | 400 | Nein |
| 19 | „3“ für Parameter „Sampleraten-Signalfrequenzverhältnis“ auswählen; „BWT starten“ anwählen; auf Anzeige der Meldung „BWT erfolgreich!“ warten und mit „OK“ bestätigen | 3 | Nein |
| 20 | „1000“ für Parameter „Sampleraten-Signalfrequenzverhältnis“ auswählen; „BWT starten“ anwählen; auf Anzeige der Meldung „BWT erfolgreich!“ warten und mit „OK“ bestätigen | 1000 | Nein |
| 21 | „10000“ für Parameter „Sampleraten-Signalfrequenzverhältnis“ auswählen; „BWT starten“; Fehlermeldung mit „OK“ bestätigen anwählen | 10000 | Ja |
| 22 | „40“ für Parameter „Signalfrequenzen“ auswählen | 40 | Nein |
| 23 | „BWT starten“ anwählen; auf Anzeige der Meldung „BWT erfolgreich!“ warten und mit „OK“ bestätigen | - | Nein |
| 24 | „1“ für Parameter „Signalfrequenzen“ auswählen | 1 | Nein |
| 25 | „1“ für Parameter „Signalperioden“ auswählen | 1 | Nein |
| 26 | „2000000“ für Parameter „Sampleraten-Signalfrequenzverhältnis“ auswählen; „BWT starten“ anwählen; auf Anzeige der Meldung „BWT erfolgreich!“ warten und mit „OK“ bestätigen | 1000000 | Nein |

| Schritt | Benutzeranweisung | Resultierende Anzeige | Anzeige einer Fehlermeldung? |
|---------|--|---|------------------------------|
| 27 | „2“ für Parameter „Signalfrequenzen“ auswählen; „BWT starten“ anwählen; Fehlermeldung mit „OK“ bestätigen | 2 | Ja |
| 28 | „0; 1; 10; 100; 1000; 10000; 100000; 1000000; 10000000, 34,5; 40000,34“ für Parameter „Signalfrequenzen“ auswählen | 1; 1; 10; 100; 1000; 10000; 10000; 10000; 10000; 10000; 35; 10000 | Nein |

2. Vergleich erfasster und generierter Signalverläufe

- I. Start des Testprogramms.
- II. Starten des Vergleichstests mit den Einstellungen laut Tabelle 7 (Iteration 1).
- III. Wechsel aller ~10 s in den manuellen Modus und schrittweise Überprüfung von 10 Vergleichsdurchläufen (Stichproben). Anschließend wieder für ~10 s in den automatischen Modus wechseln und Vergleiche automatisch (ohne Visualisierung) durchführen lassen.
- IV. Schritt III solange wiederholen, bis die Meldung „Anzahl durchzuführender Vergleiche erreicht. Test abgeschlossen!“ vom Programm zurückgegeben wird (Bestätigung mit „OK“).
- V. Schritte II bis IV mit den Einstellungen laut Tabelle 7 (Iteration 2 – 6) wiederholen.

Tabelle 7: Einstellungen zum Test der Vergleichsfunktion

| Iteration | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Vergleichsmodus | a) | b) | c) | d) | a) | a) |
| Grenzwert [mV] | 10 ⁻⁴ | 10 ² |
| Offset [Samples] | 0 | 5 | -5 | 10 | -10 | 0 |
| Anteil Störstellen | 10 ⁻³ | 10 ⁻³ | 10 ⁻³ | 10 ⁻³ | 1 | 10 ⁻³ |
| Anzahl Vergleiche | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ³ | 5·10 ⁴ |
| Signalform | Sinus | | | | | |
| Amplitude [V] | 2 | | | | | |
| Frequenz [Hz] | 10 ³ | | | | | |
| Abtastrate / Signalfrequenz | 10 ³ | | | | | |
| Signalperioden | 10 | | | | | |

Der Test gilt als bestanden, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- I. Der manuelle Vergleich jeder einzelnen Stichprobe weist keinen Unterschied auf (Ausnahme siehe Testkriterium III).
- II. Das Programm terminiert ohne Fehlermeldungen (Ausnahme siehe Testkriterium III).
- III. Es müssen alle „Störstellen“ vom Programm detektiert werden, deren Betrag der Spannungsdifferenz größer ist als der angegebene Grenzwert. Wurde mindestens eine zufällig generierte „Störstelle“ mit einer Spannungsdifferenz kleiner gleich dem Grenzwert nicht detektiert, muss das Programm eine entsprechende Fehlermeldung ausgeben (Anzeigen eines richtig negativen Ergebnisses).

Tabelle 8: Benutzereingaben zur Überprüfung der digitalen Speicherung und Zuordnung von Spannungsverläufen

| Iteration | Kanal | Signal- form | Amplituden [V] | Frequenzen [Hz] | Abtaste / Signalfrequenz | Signal- perioden |
|-----------|-------|--------------------|----------------|--|-----------------------------|---------------------|
| 1 | 0 | Rechteck | 1; 2; 3; 4; 5 | 5; 10; 20; 50; 250; 500; 750; 1000; 2000; 5000 | 200 | 10 |
| 2 | 2 | Dreieck | 1; 2; 3; 4; 5 | 5; 10; 20; 50; 250; 500; 750; 1000; 2000; 5000 | 200 | 10 |
| 3 | 3 | Sägezahn | 1; 2; 3; 4; 5 | 5; 10; 20; 50; 250; 500; 750; 1000; 2000; 5000 | 200 | 10 |
| 4 | 1 | Sinus | 1; 2; 3; 4; 5 | 5; 10; 20; 50; 250; 500; 750; 1000; 2000; 5000 | 200 | 10 |
| 5 | Alle | Weißes Rauschen | 1; 2; 3; 4; 5 | (1) | 1000 | 10 |
| 6 | Alle | Weißes Rauschen | 1; 2; 3; 4; 5 | (1) | 2000 | 10 |
| 7 | Alle | Weißes Rauschen | 1; 2; 3; 4; 5 | (1) | 4000 | 10 |
| 8 | Alle | Weißes Rauschen | 1; 2; 3; 4; 5 | (1) | 10000 | 10 |
| 9 | Alle | Weißes Rauschen | 1; 2; 3; 4; 5 | (1) | 50000 | 10 |
| 10 | Alle | Weißes Rauschen | 1; 2; 3; 4; 5 | (1) | 100000 | 10 |
| 11 | Alle | Weißes Rauschen | 1; 2; 3; 4; 5 | (1) | 150000 | 10 |
| 12 | Alle | Weißes Rauschen | 1; 2; 3; 4; 5 | (1) | 200000 | 10 |

| Iteration | Kanal | Signal- form | Amplituden [V] | Frequenzen [Hz] | Abtastrate / Signalfrequenz | Signal- perioden |
|-----------|-------|--------------------|----------------|-----------------|--------------------------------|---------------------|
| 13 | Alle | Weißes Rauschen | 1; 2; 3; 4; 5 | (1) | 300000 | 10 |
| 14 | Alle | Weißes Rauschen | 1; 2; 3; 4; 5 | (1) | 400000 | 10 |

3. Digitale Speicherung und Zuordnung von Spannungsverläufen

- I. Verbindung der analogen Ein- und Ausgänge mittels geschirmter BNC-Kabel und einem BNC-T-Adapter gemäß Abbildung D.1.
- II. Start der Testsoftware mit den Einstellungen laut Tabelle 8 (Iteration 1).
- III. Warten auf Terminierung (Meldung: „BWT war erfolgreich!“).
- IV. Wiederholung der Schritte I bis III mit den Iterationen 2 bis 14 laut Tabelle 8.
- V. Überprüfung der Anzahl aller erzeugten *.et-Dateien im Verzeichnis „D:\“.
- VI. Sichtprüfung der Dateinamen jeder vom Programm erstellten *.et-Datei.
- VII. Vergleich der generierten Spannungsverläufe aller gespeicherten *.et-Dateien mit ihrer Idealreferenz (Parameter laut Tabelle 8; durchzuführen für Iteration 1 bis 4) mithilfe der Vergleichsfunktion (Offset: 0 Sample, Grenzwert: 0 mV). Die Kanalkennung ist mit Tabelle 8 zu vergleichen.
- VIII. Vergleich der gemessenen Spannungsverläufe aller gespeicherten *.et-Dateien mit den generierten Spannungsverläufen der jeweiligen Datei mithilfe der Vergleichsfunktion (Offset: 1 Sample, Grenzwert: 50 mV).
- IX. Löschen aller *.et-Dateien aus dem Pfad „D:\“ von der Festplatte.

Der Test gilt als bestanden, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- I. Es wurden insgesamt 400 *.et-Dateien nach Terminierung des Testprogramms auf der Festplatte gespeichert.
- II. Die *.et-Dateien wurden entsprechend der Dateinamen-Nomenklatur gespeichert.
- III. Die Kanalkennung jeder *.et-Datei stimmt mit „Kanal“ in Tabelle 8 überein.
- IV. Die Vergleichsfunktion konnte in keiner der Dateien eine Abweichung detektieren. Eine Abweichung von ± 50 mV wird in diesem Test für die Messdaten der *.et-Dateien explizit toleriert, da die Verifikation der analogen Ein- und Ausgangsspannungen später in einem weiteren Test erfolgt. Der Vergleich dient an dieser Stelle der eindeutigen Zuordnung einer Eingabekombination. Eine Ausnahme dieses Kriteriums bilden alle Dateien, die in Iteration 1 erstellt wurden, da mit der Kanaleinstellung 0 keine analoge Ausgabe erfolgt.

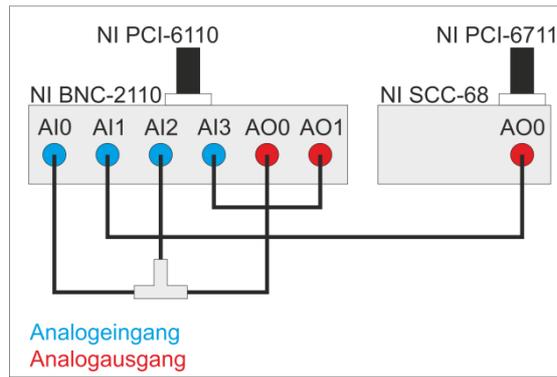


Abbildung D.1: Verbindung der analogen Ein- und Ausgänge.

4. Abbildung von Spannungsverläufen

Die vom Benutzer vorgegebenen Spannungsverläufe müssen an den analogen Ausgängen AO0, AO1 und AO0 [NI PCI-6711] der Akquisitionskarten NI PCI-6110 und NI PCI-6711 mit einer hinreichenden Genauigkeit abgebildet werden. Um dies zu gewährleisten, muss jeweils eine interne Kalibrierung der Hardware (Verwendung der internen Spannungsreferenzquellen der Karten) gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt werden.

Nach erfolgreichem Abschluss sind die Fehlerangaben laut Tabelle 9 sowie Tabelle 10 unter folgenden Annahmen anzuwenden: Spannungsbereich $\pm 10\text{ V}$; gelesener Wert (Sinussignal) 10 V ($7.07\text{ V}_{\text{RMS}}$); Temperatur 25°C (Abweichung in Bezug auf die letzte externe Kalibrierung $<\pm 10^\circ\text{C}$); Signalfrequenz $0,1\text{ MHz}$ und normalverteiltes Rauschen 6σ .

Tabelle 9: Fehlerbudgetierung der analogen Ausgänge (NI PCI-6110)

| Fehlerkomponente | Ablesebedingter Fehler | Bereichsbedingter Fehler |
|---|--|--|
| Spezifizierte Genauigkeit innerhalb einer Signalbandbreite von $0,1\text{ MHz}$ | $0,022\% \times 7,07\text{ V} = 1,56\text{ mV}$ | $5,93\text{ mV}$ (Offset) |
| Nichtlinearität (INL) | - | $16\text{ LSB} = 4,88\text{ mV}$ |
| Rauschen des Systems | - | $1\text{ mV}_{\text{RMS}} \times 6\sigma = 6\text{ mV}$ (Spitze) |
| Einschwingzeit | 0 mV (vernachlässigt) | - |
| Gleichtaktspannung (Annahme: maximal $0,1\text{ V}$) | - | 0 mV |
| Temperaturdrift | Nicht anwendbar, Temperaturbereich wird entsprechend der Spezifikationen eingehalten | |
| Scheitelfaktor | 0 mV (vernachlässigt) | - |
| Summe | $1,56\text{ mV}$ | $16,81\text{ mV}$ |
| Maximaler Fehler | $18,37\text{ mV}$ ($\pm 9,19\text{ mV}$) | |

Tabelle 10: Fehlerbudgetierung der analogen Ausgänge (NI PCI-6711)

| Fehlerkomponente | Ablesebedingter Fehler | Bereichsbedingter Fehler |
|--|--|---|
| Spezifizierte Genauigkeit innerhalb einer Signalbandbreite von 0,1 MHz | $0,0219\% \times 7,07 \text{ V} = 1,55 \text{ mV}$ | $\pm 5,933 \text{ mV} = 11,87 \text{ mV}$ (Offset) |
| Nichtlinearität (INL) | - | 1 LSB = 4,88 mV |
| Rauschen des Systems | - | $0,2 \text{ mV}_{\text{RMS}} \times 6\sigma = 1,20 \text{ mV}$ (Spitze) |
| Einschwingzeit | 0 mV (vernachlässigt) | - |
| Gleichtaktspannung (Annahme: maximal 0,1 V) | - | 0 mV |
| Temperaturdrift | Nicht anwendbar, Temperaturbereich wird entsprechend der Spezifikationen eingehalten | |
| Scheitelfaktor | 0 mV (vernachlässigt) | - |
| Summe | 1,55 mV | 17,95 mV |
| Maximaler Fehler | 19,50 mV ($\pm 9,75 \text{ mV}$) | |

Tabelle 11: Fehlerbudgetierung der analogen Eingänge (NI PCI-6110, Spannungsbereich: $\pm 5 \text{ V}$)

| Fehlerkomponente | Ablesebedingter Fehler | Bereichsbedingter Fehler |
|--|--|--|
| Spezifizierte Genauigkeit innerhalb einer Signalbandbreite von 0,1 MHz | $0,059\% \times 3,54 \text{ V} = 2,09 \text{ mV}$ | 3 mV (Offset) |
| Nichtlinearität (INL) | - | 2 LSB = 4,88 mV |
| Rauschen des Systems | - | $0,5 \text{ LSB}_{\text{RMS}} \times 6\sigma = 7,32 \text{ mV}$ (Spitze) |
| Einschwingzeit | 0 mV (vernachlässigt) | - |
| Gleichtaktspannung (Annahme: maximal 0,1 V) | - | $0,1 \text{ V} \times 10^{(-52/20)} = 0,25 \text{ mV}$ |
| Temperaturdrift | Nicht anwendbar, Temperaturbereich wird entsprechend der Spezifikationen eingehalten | |
| Scheitelfaktor | 0 mV (vernachlässigt) | - |
| Summe | 2,09 mV | 15,45 mV |
| Maximaler Fehler | 17,54 mV ($\pm 8,77 \text{ mV}$) | |

5. Erfassung von Spannungsverläufen

Die an den analogen Eingängen AI0, AI1 AI2 und AI3 der Akquisitionskarte NI PCI-6110 anliegende Spannungen müssen mit einer hinreichenden absoluten Genauigkeit digitalisiert werden. Um dies zu gewährleisten muss eine interne Kalibrierung der Hardware (Verwendung der internen Spannungsreferenzquellen der Karte) gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt werden. Nach erfolgreichem Abschluss sind die

Fehlerangaben laut Tabelle 11 sowie Tabelle 12 unter folgenden Annahmen anzuwenden: Spannungsbereich ± 5 V (bzw. ± 10 V); gelesener Wert (Sinussignal) 5 V ($3,54 V_{\text{RMS}}$) bzw. 10 V ($7,07 V_{\text{RMS}}$); Temperatur 25°C (Abweichung in Bezug auf die letzte externe Kalibrierung $<\pm 10^{\circ}\text{C}$); Signalfrequenz 0,1 MHz und normalverteiltes Rauschen 6σ .

Tabelle 12: Fehlerbudgetierung der analogen Eingänge (NI PCI-6110, Spannungsbereich: ± 10 V)

| Fehlerkomponente | Ablesebedingter Fehler | Bereichsbedingter Fehler |
|--|--|---|
| Spezifizierte Genauigkeit innerhalb einer Signalbandbreite von 0,1 MHz | $0,11\% \times 7,07 \text{ V} = 7,78 \text{ mV}$ | 5,7 mV (Offset) |
| Nichtlinearität (INL) | - | 2 LSB = 9,77 mV |
| Rauschen des Systems | - | $0,5 \text{ LSB}_{\text{RMS}} \times 6\sigma = 14,65 \text{ mV}$ (Spitze) |
| Einschwingzeit | 0 mV (vernachlässigt) | - |
| Gleichtaktspannung (Annahme: maximal 0,1 V) | - | $0,1 \text{ V} \times 10^{(-46/20)} = 0,5 \text{ mV}$ |
| Temperaturdrift | Nicht anwendbar, Temperaturbereich wird entsprechend der Spezifikationen eingehalten | |
| Scheitelfaktor | 0 mV (vernachlässigt) | - |
| Summe | 7,78 mV | 30,62 mV |
| Maximaler Fehler | 38,40 mV ($\pm 19,20$ mV) | |

6. Simultane Abbildung und Erfassung von Spannungsverläufen

Die simultane Abbildung und Erfassung von Spannungsverläufen wurde mithilfe einer RTSI-Verbindung (Engl.: *real-time system integration*) zwischen den Akquisitionskarten NI PCI-6110 und NI PCI-6711 und dem Taktgeber der Karte NI PCI-6110 (20 MHz Basistakt) realisiert. Das entwickelte Testprogramm ist so konzipiert, dass Samplefrequenzen für Lese- und Schreibvorgänge identisch sind. Da die Schreibvorgänge an einer positiven Signalfanke des Start-triggers der Lesevorgänge gestartet werden, existiert ein konstanter Versatz von einem Sample zwischen Lese- und Schreibvorgängen. Dieser bekannte Versatz muss bei der Bewertung der Anforderung berücksichtigt werden.

Die Prüfung der Synchronität soll anhand folgender Testprozedur erfolgen:

- I. Verbindung der analogen Ein- und Ausgänge mittels geschirmter BNC-Kabel und einem BNC-T-Adapter gemäß Abbildung D.1.
- II. Start des Testprogramms mit den Einstellungen: Kanal Alle; Signalform weißes Rauschen; Amplituden 7,07 V; Frequenzen 1 kHz; Abtastraten-Signalfrequenz-Verhältnis 1000; eine Signalperiode).
- III. Warten auf Terminierung (Meldung: „BWT war erfolgreich!“).

- IV. Dreifache Wiederholung der Schritte II und III.
- V. Vergleich der gemessenen Spannungsverläufe mit den generierten Spannungsverläufen als Referenz mittels des Vergleichsmoduls (Offset: „1 Sample“, Grenzwert „20 mV“).
- VI. Vergleich der gemessenen Spannungsverläufe mit den drei parallel gemessenen Spannungsverläufen (Kanäle 0 bis 3 jeweils miteinander vergleichen) mittels des Vergleichsmoduls (Offset: „0 Samples“, Grenzwert „20 mV“).
- VII. Löschen aller *.et-Dateien aus dem Pfad „D:\“ von der Festplatte.

Der Test gilt als bestanden, wenn mit der Vergleichsfunktion keine systematischen Abweichungen festgestellt werden können.

E – Inhaltsverzeichnis der beiliegenden DVD

.Makros

.Auswertung von Einzelzellscans\

vscr_01_cell_points_in_spiral.txt
vscr_02_cell_traces.txt
vscr_03_scan_points_in_zstack.txt
vscr_04_activity_viewer.txt
vscr_05_active_cells_in_zstack.txt
vscr_06_cell_neighbours.txt
vscr_07_cell_traces (SIMULATION).txt
vscr_08_cell_neighbours_batch.txt
vscr_09_points_per_cell_batch.txt

.Auswertung von Voxelscans\

vbss_01_points_per_voxel.txt
vbss_02_points_per_voxel.txt
vbss_03_points_per_voxel.txt
vbss_04_plot_voxel_trace.txt
vbss_05_event_viewer.txt
vbss_06_event_propagation.txt
vbss_07_voxel_interpolation.txt
vbss_09_event_density.txt

.\Programmcode

.\2PLSMA\2PLSMA.lvproj
.\2PLSMC\2PLSM.lvproj
.\2PLSMET\2PLSMET.lvproj
.\2PLSMETC\2PLSMETC.lvproj
.\Libtiff\ ([143,144])
.\Loading_Screen.llb
.\Standard.llb

.\Programme

.\\2PLSMA\2PLSMA.exe
.\\2PLSMC\2PLSMC.exe
.\\2PLSMET\2PLSMET.exe
.\\2PLSMETC\ETCSIM.exe

.\Videomaterial

- V1 – Spiralscan in einer Sulforhodamin-befüllten Glasküvette
(aufgezeichnet mit einer CCD-Kamera)

- V2 – Beispiel zweidimensionaler Weitfeld-Kalziumcluster (siehe auch
„Supplementary Movie 1“ in [85])

- V3 – Animierte Rekonstruktion eines dreidimensionalen Aktivitäts-
ereignisses mit zellulärer Auflösung

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Dr. med. habil.
Knut Kirmse Durchführung (Schwerpunkt: Chirurgie und Elektrophysiologie) und Analyse der *in vivo* und *in vitro* Experimente, Interpretation der Ergebnisse, Design der Studie Kirmse et al. 2015
2. Prof. Dr. rer. nat.
Knut Holthoff Themenwahl, Interpretation der Ergebnisse, Design der Studie Kirmse et al. 2015
3. Prof. Dr.-Ing. habil.
Jens Hauelsen Mitwirkung am Design der Studie Kummer et al. 2015, Entwicklung von Bewertungsstrategien, Interpretation der Ergebnisse
4. Prof. Dr. med.
Otto W. Witte Mitwirkung am Design der Studie Kirmse et al. 2015, Interpretation experimenteller Daten, Beiträge zu Manuskripten
5. Prof. Dr. Olga
Garaschuk,
Dr. Yury Kovalchuk Mitwirkung am Design der Studie Kirmse et al. 2015, Hilfe bei der Etablierung der optischen *in vivo* Ableitungen
6. Sindy Beck,
Ina Ingrisch Präparation histologischer Hirnschnitte
7. Franz Carlsen,
Tom Flossmann,
Jürgen Graf Durchführung der Tests zur Prüfung der Benutzereingaben

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich bin darauf hingewiesen worden, dass die Unrichtigkeit der vorstehenden Erklärung als Täuschungsversuch bewertet wird und gemäß § 7 Abs. 10 der Promotionsordnung den Abbruch des Promotionsverfahrens zur Folge hat.

Ort, Datum

Unterschrift (Michael Kummer)

Thesen

- Die Genauigkeit der lateralen Positionierung des Laserfokus eines Zweiphotonenlaserscanningmikroskops kann mit Hilfe von Reflexionsmessungen und Rückkopplungssignalen der Positioniereinrichtungen validiert werden.
- Die Genauigkeit der axialen Positionierung des Laserfokus eines Zweiphotonenlaserscanningmikroskops kann mit Hilfe einer Lasertriangulation und dem Rückkopplungssignal einer mechanischen Fokussiereinrichtung validiert werden.
- Die Positioniergenauigkeit eines Galvanometer-Piezo-basierenden Zweiphotonenlaserscanningmikroskops wird maßgeblich durch Beschleunigungen der Piezo-Fokussiereinrichtung und dem verwendeten Objektiv begrenzt.
- $Emx1^{IRE^{Scr}}:Ai14$ Mäuse im Alter von 21 – 49 Tagen eignen sich für eine Unterscheidung GABAerger und glutamaterger Neurone im Kortex *in vivo*.
- GABA wirkt auf zellulärer Ebene als depolarisierender Neurotransmitter im sich entwickelnden okzipitalen Neokortex der Maus im Alter von 3 – 4 Tagen.
- GABA wirkt auf Netzwerkebene als inhibitorischer Neurotransmitter im sich entwickelnden okzipitalen Neokortex der Maus im Alter von 3 – 4 Tagen.
- Spiralscans ermöglichen eine dreidimensionale Erfassung neonataler Netzwerkaktivität im visuellen Kortex der Maus in der ersten postnatalen Woche.
- Die neonatale Netzwerkaktivität im visuellen Kortex der Maus weist einen hohen Grad an Koaktivierung glutamaterger Neurone im dreidimensionalen Raum auf.
- Neonatale Aktivitätsereignisse im visuellen Kortex der Maus umfassen die marginale Zone und die obere kortikale Platte bei gleichzeitig räumlicher Begrenzung entlang der horizontalen Ebene.
- Es existieren mindestens zwei Klassen von neuronalen Aktivitätsereignissen mit verschiedenen räumlichen Ausbreitungscharakteristika.

Jena, 26.11.2015