

Diplomarbeit

Etablierung eines Meßsystems zur Analyse der Ca^{2+} -Regulation in einzelnen humanen Endothelzellen

Marcus Ohlhaut

2. Februar 1996

Physikalisches Institut der
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

Lehrstuhl für Experimentelle Physik V (Biophysik)
Prof. Dr. A. Haase

Meinen Eltern

*A rule of thumb might be that if you see what others see,
then you can be reasonably confident of your interpretation,
but if you see something new, it is an artifact.*

(Michael Whitaker in [42])

Dieses Dokument wurde komplett auf elektronischem Weg erstellt. Folgende Programme kamen dabei zum Einsatz:

Textsatz	T_EX 3.14159
Makropaket	L^AT_EX 2_ε <1995/12/01>
Dokumentstil	KOMA-Script scrartcl 2.3g <1996/01/14>
Zeichenerzeugung	METAFONT 2.718
	BitmapToFont 3.0
Postscript-Konvertierung	DviPS 5.58
Postscript-Ausdruck	Ghostscript 3.12
Datenerfassung	FUCAL 4.14, 5.12b und 5.12c
Datenauswertung	GraphPad Prism 1.03
Plots	GnuPlot 3.50.1.17
Grafiken	CorelDraw 4.0
C-Compiler	Borland Turbo C++ 2.0
Programmdokumentation	CWEB 3.4.12
Literaturdatenbank	BibDB 1.4e

Die endgültige Version wurde mit einer Auflösung von 300 dpi auf einem HP LaserJet III und einem HP DeskJet 550C ausgedruckt.

Besonderer Dank geht an Don E. Knuth für sein Textsatz-System T_EX, Eberhard Mattes für die Implementation von T_EX für MS-DOS, Markus Kohm für seine Dokumentklasse Script, Silvio Levy für die Implementation von CWEB, alle Mitarbeiter des L^AT_EX 2_ε-Projekts und an alle eifrigen Verfechter der Idee „freier Software“, die ihre Programme unter der GNU Public License unentgeltlich zur Verfügung stellen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Grundlagen	8
2.1. Die Gefäßendothelzelle	8
2.2. Die Bedeutung von Ca^{2+} für die Zelle	8
2.2.1. Ca^{2+} -Speicher	9
2.2.2. Ca^{2+} -Kanäle	9
2.2.3. Ca^{2+} -Pumpen	10
2.2.4. Ca^{2+} -Effekte	11
2.3. Meßmethoden für die intrazelluläre Ca^{2+} -Bestimmung	11
2.3.1. Ca^{2+} -sensitive Mikroelektroden	11
2.3.2. ^{45}Ca -Radioisotope	12
2.3.3. Aequorin	12
2.3.4. Fluoreszenz-Indikatoren	12
2.4. Fura-2-Fluoreszenz-Spektrometrie	13
2.4.1. Chemische Struktur	14
2.4.2. Optische Eigenschaften	14
2.4.3. Biochemische Eigenschaften	15
2.4.4. Quantitative Ca^{2+} -Bestimmung	15
2.5. Häufig verwendete Abkürzungen	19
3. Humane Endothelzellen	20
3.1. Präparation von HUVEC	20
3.2. Zellkultur	21
3.3. Vorbehandlung der Deckgläschen	21
3.4. Beladung mit Fura-2/AM	22
4. Experimenteller Aufbau	24
4.1. Messung in Suspension	24
4.2. Messung an Einzelzellen	25
4.2.1. Der Meßstand	25
4.2.2. Die Superfusionsanlage	28
5. Experimente und Ergebnisse	31
5.1. Güte des optischen Systems	31
5.2. Das Superfusionssystem	43
5.3. Optimale Fura-2-Konzentration	47
5.4. Photobleaching	47
5.5. Quantifizierte Ca^{2+} -Messungen	49
5.6. Wirkung von Thrombin	53
5.7. Artefakte	55

6. Hilfsprogramme	57
6.1. Das Programm <code>storage</code>	57
6.1.1. Konzept	57
6.1.2. <code>storage.c</code> — das Rahmenprogramm	58
6.1.3. <code>compress.asm</code> — der Komprimierer	60
6.1.4. <code>expand.asm</code> — der Entkomprimierer	60
6.2. Das Programm <code>chname</code>	61
6.2.1. Ausgangssituation	61
6.2.2. <code>chname.c</code> — das Programm	61
6.3. Das Programm <code>filter</code>	61
6.3.1. Ausgangssituation	61
6.3.2. <code>filter.c</code> — das Programm	62
7. Diskussion der Ergebnisse	63
8. Ausblick	64
A. Materialien	65
B. Methoden	67
B.1. Suspensionsmessungen	67
B.2. Einzelzellmessungen	68
C. Kommentierte Quelltexte	69
C.1. <code>storage.c</code>	69
C.2. <code>compress.asm</code>	74
C.3. <code>expand.asm</code>	81
C.4. <code>chname.c</code>	84
C.5. <code>filter.c</code>	86
D. Langfristige Datenarchivierung	91
E. Patches an FUCAL 5.12b	92
Literaturverzeichnis	93
Danksagung	97

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein vom Institut für Klinische Biochemie im September 1993 angeschafftes Meßsystem für fluorimetrische Messungen an Einzelzellen zu vervollkommen und erste Erfahrungen mit diesem Meßplatz zu sammeln. Die durchgeführten Arbeiten und Versuche sollen eine Grundlage für klinisch und molekularbiologisch wichtige Experimente auf dem Gebiet der Signaltransduktion und Ca^{2+} -Regulation in humanen Endothelzellen sein, die für das Verständnis der interzellulären Kommunikationswege des kardiovaskulären Systems von großer Bedeutung sind. Der Schwerpunkt lag dabei auf einer Evaluierung der Güte und Verlässlichkeit des Gesamtsystems aus physikalisch-technischer Sicht und auf der Beseitigung der in der alltäglichen Versuchspraxis aufgetretenen Hindernisse sowie auf der Entwicklung von Standardprotokollen für die anfallenden Routineaufgaben.

Dazu wurden zunächst einige Versuche durchgeführt, deren Ziel die Bestimmung der wesentlichen *Parameter des optischen Systems* (bestehend aus einer monochromatischen Lichtquelle, einem invertierten Mikroskop und einer CCD-Kamera) war. Im Anschluß daran wurde in intensiver Zusammenarbeit mit der institutseigenen Zellkultur ein Protokoll für die *Präparation von einzelnen humanen Gefäßendothelzellen* ausgearbeitet, welches alle nötigen Schritte von der Gewinnung der Zellen aus Nabelschnüren bis hin zum experimentierfertigen, zellbesiedelten Deckgläschen umfaßt.

Bei den anfänglichen Messungen zeichnete sich außerdem der Bedarf ab, auch während einer laufenden Messung die chemische Umgebung der Zellen auf definierte Weise verändern zu können. Zu diesem Zweck wurde eine *Superfusionsanlage* konstruiert, die den einfachen und störungsfreien Austausch des extrazellulären Mediums im Verlauf einer Meßreihe erlaubt.

Zum Abschluß der Arbeit konnten dann mit dem vollständigen System einige Ergebnisse aus der zahlreichen Literatur zum Thema Ca^{2+} -Regulation in einzelnen Zellen beispielhaft nachvollzogen werden. Großes Interesse galt dabei der Frage, inwieweit die in der Literatur häufig gemachten *quantitativen* Aussagen über intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen mit den dort beschriebenen Methoden auch mit diesem System erzielt werden können.

Außerdem wurden viele kleine und große Unzulänglichkeiten der verwendeten Hard- und Software beseitigt, soweit dies im Rahmen der gegebenen Geräteausstattung möglich war.

Da diese Arbeit insbesondere als Basis für zukünftige Experimente dienen soll, wurde großer Wert auf die Dokumentation der im Lauf der Zeit gesammelten *praktischen Erfahrung* im Umgang mit dem kompletten Meßsystem gelegt.

1. Einleitung

Als trennende Zellschicht zwischen dem Intravasalraum und dem Extravasalraum hat das Gefäßendothel eine äußerst wichtige Bedeutung; denn es muß einerseits für Nähr- und Botenstoffe aus dem Blut permeabel sein, andererseits aber auch das Durchdringen von Blutplasma in den Extravasalraum effizient verhindern. Neben dieser reinen Transportfunktion muß das Endothel auch zwischen den Blutzellen und den glatten Muskelzellen der Blutgefäße vermitteln, da deren Kommunikation Grundlage für die Regelung des Gefäßtonus und des Blutdruckes ist. Gerade für das Verständnis der letztgenannten Funktion des Endothels ist daher eine Aufklärung der Signalwege in den Endothelzellen notwendig und von großer Bedeutung für das Verständnis physiologischer und pathologischer Vorgänge im kardiovaskulären System.

Verschiedene Arbeitstechniken ermöglichen es, gänzlich unterschiedliche Informationen über das molekularbiologische Verhalten von Zellen zu gewinnen. So liefern patch-clamp-Versuche, bei denen die Zellmembran mit Mikropipetten und -elektroden angestochen wird, Aufschluß über Membranströme, das Membranpotential, Ionenkanaldichten und -verteilung sowie über die Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Flüssigkeiten. Die Fluoreszenz-Mikroskopie erlaubt es dagegen, die räumliche Verteilung von Organellen, Proteinen und Ionen zu bestimmen, indem diese mit entsprechend spezifischen Fluoreszenz-Farbstoffen selektiv markiert werden und diese Markierung auf mikroskopischen Aufnahmen ausgewertet wird.

Bei Patch-clamp-Methoden handelt es sich jedoch um sehr invasive Techniken, die eine Verletzung der Zellmembran mit sich bringen; Fluoreszenz-Mikroskopie verlangt in den meisten Fällen das Fixieren der Zelle zu einem gewünschten Zeitpunkt und ist daher für dynamische Messungen ungeeignet. Aus diesen Gründen hat sich ein neuer Zweig der Fluoreszenz-Mikroskopie entwickelt, nämlich die Fluoreszenz-Spektrometrie.

Fluoreszenz-Spektrometrie erlaubt mittels entsprechender Indikatoren unter anderem die Bestimmung intrazellulärer Ionenkonzentrationen in intakten, lebenden Zellen. Den in der Fluoreszenz-Spektrometrie verwendeten Farbstoffe ist gemein, daß sie ihr Absorptions- oder Emissionsspektrum in Abhängigkeit der zu messenden Größe reproduzierbar verändern; damit können lebende Zellen nach Einbringen des (im allgemeinen nicht toxischen) Farbstoffes also in einer spektrometrischen Versuchsanordnung beobachtet werden und so die Reaktion auf externe Stimuli direkt und in Echtzeit verfolgt werden. Die Vielzahl der kommerziell verfügbaren Fluoreszenz-Farbstoffe deckt ein breites Anwendungsfeld ab, so daß unterschiedliche Ionen in nahezu beliebigen Konzentrationen beobachtet werden können; auch ist durch geeignete Wahl der verwendeten Lichtwellenlängen und Filter die Verwendung mehrerer Indikatoren gleichzeitig möglich.

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Aufbau eines für Messungen an einzelnen, humanen Endothelzellen geeigneten Fluoreszenz-Spektrometrie-Meßplatzes aus der Sicht eines Physikers und beschäftigt sich mit dem Komplex der Zellkultur und Zellpräparation sowie dem für Ca^{2+} -Messungen eingesetzten Fluoreszenz-Farbstoff Fura-2. Daneben werden die im Rahmen der Bild(nach-)bearbeitung aufgetretenen, eher softwaretechnischen Probleme erläutert und die Methoden und Verfahren, die sich im Arbeitsalltag bewährt haben, geschildert.

2. Grundlagen

2.1. Die Gefäßendothelzelle

Als eines der großen Organe im menschlichen Körper stellt das Gefäßendothel eine wichtige Grundlage für das Funktionieren des gesamten Organismus dar. Seine Bausteine, die Gefäßendothelzellen, sind daher von besonderem Interesse; und die große Anzahl von Publikationen (s. die Referenzen zu [6]) auf dem Gebiet der Forschung an Endothelzellen spiegelt diese Bedeutung wieder.

Endothelzellen —an der Grenze zwischen Intra- und Extravasalraum— müssen verschiedenen Aufgaben nachkommen. Als die das Blutvolumen einschließende Zellschicht bilden sie einen Zellverband, der den Austausch von Wasser, gelösten Ionen und Makromolekülen zwischen diesen beiden Kompartimenten des Körpers auf fein geregelte Weise sicherstellen muß. Daneben regeln sie über humorale und elektrische Kommunikation mit der abluminal liegenden Schicht der glatten Muskelzellen den Gefäßtonus und damit auch die Durchblutung einzelner Gefäßabschnitte [19]. Auch zur luminalen Seite hin kommunizieren die Endothelzellen mit den Zellen im Blutstrom, hauptsächlich mit den Thrombozyten, deren Aktivierung und nachfolgende Aggregation vom intakten Gefäßendothel unterbunden werden muß.

In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, daß bei allen diesen Aufgaben der intrazelluläre Calciumspiegel eine entscheidende Rolle spielt. So erfolgt z. B. die Regulation der interzellulären Adherens junctions, die für die Permeabilität der Endothelschicht bestimmend sind, über calciumabhängige Cadherine [28], ebenso wie auch die Produktion von Vasodilatoren (hier hauptsächlich NO^1 und PGI_2) und Vasoconstrictoren (ET-1 und evtl. Prostaglandin H_2) letztendlich von calciumabhängigen Synthesystemen beherrscht wird [6]. PGI_2 und NO spielen schließlich eine wichtige Rolle in der Verhinderung der Thrombozytenaktivierung.

Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnurvenen bilden auch in Kultur einen dichten Zellverband aus, dessen Morphologie an die Struktur eines Kopfsteinpflasters erinnert [39], wie Abb. 1 zeigt. Sie eignen sich daher als Modelle für das Studium der physiologischen und pathologischen Eigenschaften von Endothelzellen und können auch zu Transfektionen und anderen gentechnischen Manipulationen herangezogen werden.

2.2. Die Bedeutung von Ca^{2+} für die Zelle

Ca^{2+} fungiert häufig ähnlich wie cAMP als sekundärer Botenstoff (second messenger), die Regulation des intrazellulären Calciumspiegels ist also der Dreh- und Angelpunkt für eine einwandfreie Zellfunktion. Es finden sich daher zahlreiche Arbeiten in der Literatur, die sich ausschließlich diesem Thema widmen [4, 8].

Abb. 2 aus [18] zeigt eine schematisierte Darstellung der an der Calciumregulation beteiligten Signalwege, auf die im folgenden noch näher eingegangen wird.

¹Häufig benutzte Abkürzungen sind in 2.5 erläutert.

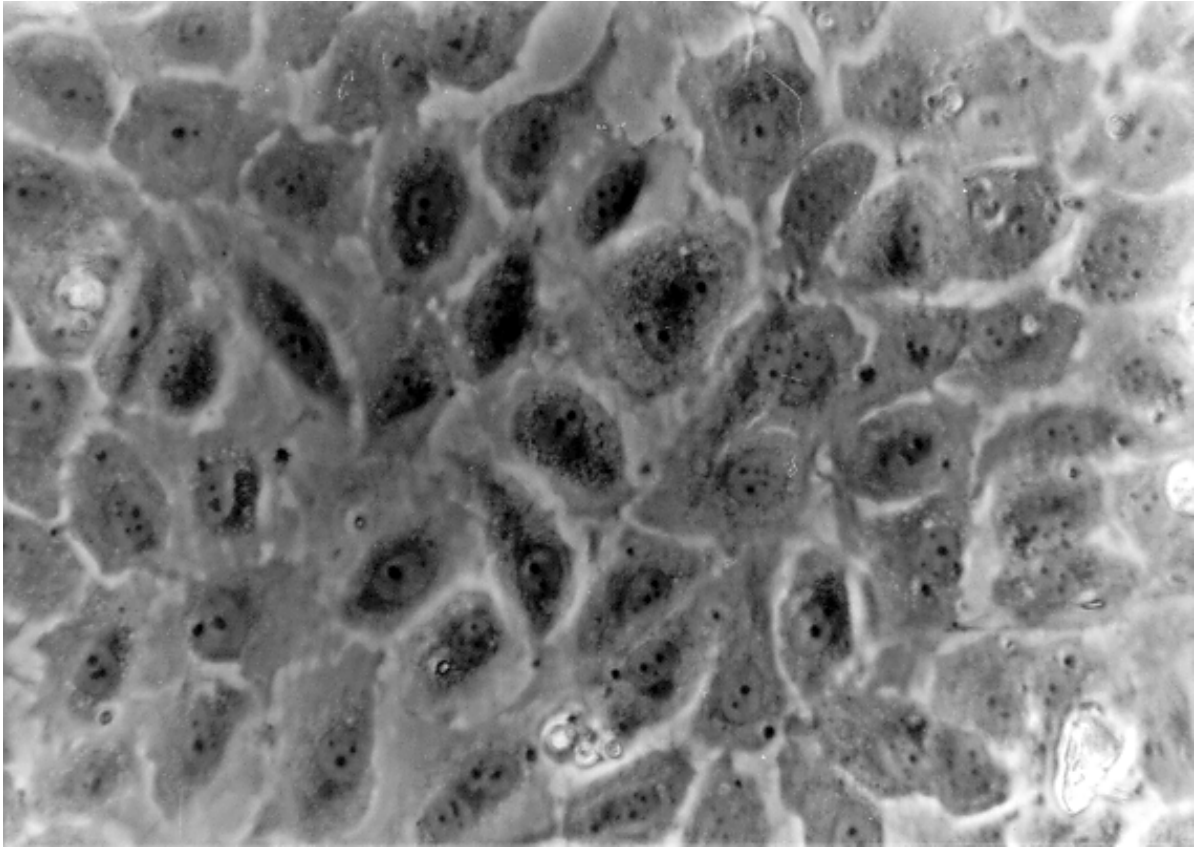


Abbildung 1: Morphologie eines Endothelzellverbands. (Aus [33])

2.2.1. Ca^{2+} -Speicher

Das für die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels notwendige Ca^{2+} kann von der Zelle aus (mindestens) zwei Ca^{2+} -reichen Reservoiren gewonnen werden: dem Extrazellulärraum mit seiner gegenüber dem Zellinneren um einen Faktor 10^5 höheren Ca^{2+} -Konzentration einerseits und aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern andererseits.

Letztere werden oft mit dem endoplasmatischen Reticulum (ER) gleichgesetzt, obwohl es in anderen Zelltypen [41, S. 1177] auch Hinweise auf weitere Ca^{2+} -Speicher (Calciosome) gibt, für die der Nachweis bei Endothelzellen noch aussteht [18, S. 116 f].

Die Entleerung erfolgt sowohl kontinuierlich durch Leaks in der Plasmamembran des ER, wie auch durch IP_3 -abhängige Rezeptorkanäle.

2.2.2. Ca^{2+} -Kanäle

Ein Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum erfolgt in der Regel über Ionenkanäle (I in Abb. 2), deren Aktivierung auf verschiedenen Wegen erfolgen kann.

Neben den Rezeptor-gekoppelten Ca^{2+} -Kanälen, die häufig auf G-Protein-Rezeptoren basieren [35] und die durch Bindung eines entsprechenden Agonisten aktiviert werden, finden sich auch durch mechanische Einflüsse (z. B. durch Shear stress; $I_{\text{NS(str)}}$) aktivierte

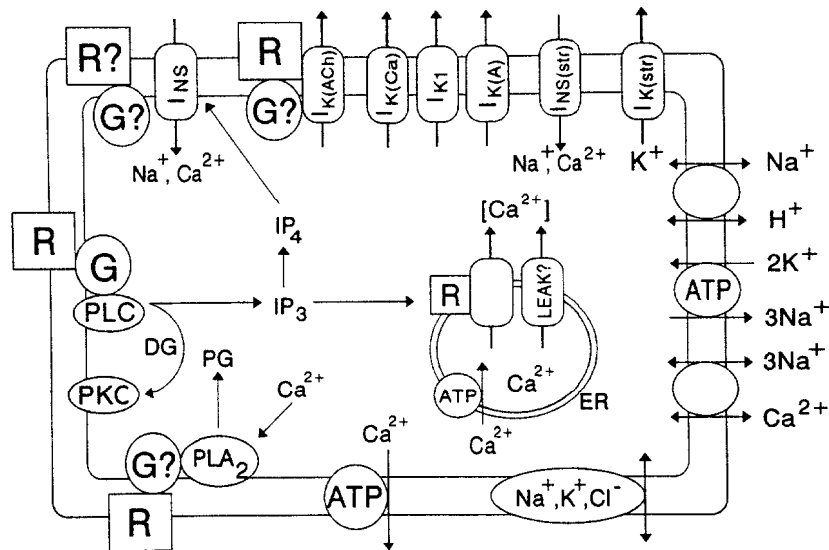


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktionsmechanismen und Ionentransportwege einer Endothelzelle. R, Rezeptor; G, G-Protein; PLC, Phospholipase C; PLA₂, Phospholipase A₂; PG, Prostaglandine; IP₃, Inositol-1,4,5-trisphosphat; IP₄, Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat; DG, Diacylglycerol; PKC, Proteinkinase C; ER, Endoplasmatisches Retikulum. (Aus [18])

Ca²⁺-Kanäle sowie nichtspezifische Kationenkanäle (I_{NS}).

Desweiteren erfolgt Ca²⁺-Einstrom durch Leaks in der Plasmamembran; treibende Kraft ist hier der elektrochemische Gradient aufgrund des Membranpotentials und der Konzentrationsunterschiede zwischen Intra- und Extrazellulärraum. Eine eher untergeordnete Rolle spielen daneben noch Na⁺/Ca²⁺-Austauscher, deren Transportrate durch den elektrochemischen Gradient für Na⁺ bestimmt wird [1].

2.2.3. Ca²⁺-Pumpen

Die intrazellulären Ca²⁺-Speicher müssen nach ihrer Entleerung (die im allgemeinen den rapiden Ca²⁺-Anstieg nach einer Stimulation der Zelle verursacht) wieder gefüllt werden. Hierfür werden in der Literatur zwei Wege diskutiert, nämlich das Zurückpumpen von Ca²⁺ aus dem Cytosol mittels einer Ca²⁺-ATPase [2, S. 516], sowie das Auffüllen der Speicher mit extrazellulärem Ca²⁺ unter Umgehung des Cytosols, ein Vorgang, der durch die räumliche Nähe des ER zur Plasmamembran möglich scheint.

Die (ER-)plasmalemmale Ca²⁺-ATPase kann in Versuchen, bei denen eine Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher gewünscht ist, durch Pharmaka wie Thapsigargin oder t-BHQ (di-*tert*-butylhydroquinon) selektiv gehemmt werden [43]. Leckströme sorgen dann für eine langsame Entleerung der Speicher, das in das Cytosol eingeströmte Ca²⁺ wird von den anderen Transportsystemen in den Extrazellulärraum abgeführt. Allerdings führt eine Entleerung der Speicher zu einem sekundären Ca²⁺-Einstrom von außen als einem Teil der internen Regulationsvorgänge.

2.2.4. Ca^{2+} -Effekte

Die in der Literatur beschriebenen Effekte eines erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels sind so zahlreich, daß hier nur die im Rahmen der kardiovaskulären Signaltransduktion wichtigsten aufgeführt werden sollen. Ein Überblick findet sich bei [6].

Die membrangebundene NO-Synthase (NOS) bindet Calmodulin reversibel und wird dadurch aktiviert; da die Bindungskonstante (von Calmodulin an die NOS) Ca^{2+} -abhängig ist, führt eine steigende Ca^{2+} -Konzentration zu einer vermehrten Aktivierung der NOS. Von Endothelzellen freigesetztes NO stimuliert das cGMP-System der glatten Muskelzellen, was schließlich zu einer Relaxation des Gefäßes führt. Außerdem hemmt NO die Freisetzung von Endothelin-1 (ET-1), welches gefäßverengende Wirkung hätte.

Auf der luminalen Seite führt eine steigende NO-Konzentration ebenfalls zu einer Stimulation des cGMP-Systems der Thrombozyten und unterdrückt damit die Thrombozytenaggregation.

Die Zunahme des intrazellulären Ca^{2+} führt außerdem zu einer vermehrten Freisetzung von PGI_2 (der geschwindigkeitsregulierende Schritt, nämlich die Freisetzung des Substrats Arachidonsäure durch die Phospholipase A_2 , ist Ca^{2+} -abhängig); PGI_2 stimuliert in Thrombozyten das cAMP-System und wirkt so ebenfalls hemmend auf die Thrombozytenaktivierung [13].

PGI_2 reguliert daneben im Wechselspiel mit ET-1 das Zellwachstum der glatten Muskelzellen und wirkt dadurch auch indirekt an der Regulation des Blutdruckes mit.

Eine weitere wichtige Funktion des Endothels, namentlich die Durchlässigkeit der Endothelschicht für Wasser und Makromoleküle, wird ebenfalls von dem intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel reguliert. Diese Stoffe werden hauptsächlich diffusiv durch parazellulären Transport zwischen luminaler und basaler Seite ausgetauscht, und bei [28] wurde gezeigt, daß die Dichtheit der Zell-Zell-Kontakte über die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C (PKC) gesteuert wird.

2.3. Meßmethoden für die intrazelluläre Ca^{2+} -Bestimmung

2.3.1. Ca^{2+} -sensitive Mikroelektroden

Zu den invasiven Techniken zur intrazellulären Ca^{2+} -Messung zählt die Benutzung von ionenselektiven Mikroelektroden. Diese werden (analog zu Mikropipetten) aus zweikanaligen Glasröhrchen gezogen, wonach die beiden Kanäle mit einer Referenzflüssigkeit (NaCl) und mit einer für das jeweilige Ion selektiv permeablen Flüssigmembran (wie z. B. ETH 1001 für Ca^{2+}) befüllt werden. Silberdrähte stellen dann den elektrischen Kontakt zum Meßverstärker her [27].

Dieses Verfahren hat allerdings den gravierenden Nachteil, daß Messungen an einer großen Zellzahl mit sehr hohem Aufwand verbunden sind, da jede einzelne Zelle manuell angestochen werden muß, um eine Messung auszuführen. Außerdem ist der räumliche Meßbereich einer solchen Mikroelektrode sehr klein und auf die nähere Umgebung der Elektrodenspitze beschränkt; und bei niedrigen Ionenkonzentrationen (wie z. B. bei Ca^{2+}) sind reproduzierbare Messungen schwierig.

2.3.2. ^{45}Ca -Radioisotope

Zur Bestimmung von Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum kann man sich einer vergleichsweise einfachen Methode bedienen: Das extrazelluläre Medium wird mit dem β^- -Strahler ^{45}Ca radioaktiv markiert, nachdem die Zellen zunächst längere Zeit in ^{45}Ca -freier Außenlösung inkubiert worden sind. Intrazellulär ist dann zu Beginn eines Experiments keine ^{45}Ca -Aktivität vorhanden und die Registrierung der Aktivität einer Probe nach erfolgter Stimulation und Auswaschen des Außenmediums erlaubt eine quantitative Messung des Ca^{2+} -Influx.

Nachteilig ist an diesem Verfahren allerdings, daß man zur Verhinderung des auswärtigen gerichteten Ca^{2+} -Transportes die Zellen nach der Stimulation stoppen muß, kinetische Vorgänge also nur sehr schwierig zu erfassen sind. Außerdem erhöht sich die Strahlenbelastung am Arbeitsplatz und es fällt radioaktiver Abfall an.

2.3.3. Aequorin

Das Lumineszenzprotein Aequorin, das aus der Qualle *Aequorea forskalea* gewonnen werden kann, wird ebenfalls häufig für die Analyse intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel benutzt. Grundlage des Verfahrens ist die Tatsache, daß Aequorin bei vorhandenem Ca^{2+} (Konzentrationen im Bereich von $0.5\mu\text{M}$ bis $10\mu\text{M}$) spontan Licht emittiert [2, S. 182]. Die Gesamtzahl der emittierten Photonen beträgt hierbei etwa 10^{11}pmol^{-1} [37, S. 991], jedoch hängt die Emissionsrate von der Ca^{2+} -Konzentration in der Umgebung ab; die Intensität des Lumineszenzlichtes läßt sich daher als Maß für die Ca^{2+} -Konzentration benutzen.

Nachteil ist auch hier, daß zum Einbringen des Indikators mit Mikropipetten injiziert werden muß, und außerdem die räumliche Verteilung des Aequorins Auswirkungen auf das Signal hat.

2.3.4. Fluoreszenz-Indikatoren

Zunehmend an Bedeutung gewonnen haben in den letzten Jahren die in großer Zahl kommerziell verfügbaren Fluoreszenz-Indikatoren für den Nachweis von intrazellulärem Ca^{2+} . Tab. 1 zeigt einen Überblick über die am häufigsten verwendeten organischen Farbstoffe.

Allen Farbstoffen ist gemeinsam, daß sich ihre optischen Eigenschaften durch die Bindung eines Ca^{2+} -Ions meßbar verändern; durch den Einsatz solcher Indikatoren ist das Problem der intrazellulären Ca^{2+} -Messung also auf ein spektrometrisches Problem zurückgeführt.

Man unterscheidet drei Klassen von Farbstoffen:

- *Dual excitation-Farbstoffe* verändern ihr Absorptionsverhalten,
- *Dual emission-Farbstoffe* verändern ihr Emissionsverhalten und
- *Single wavelength-Farbstoffe* verändern ihre Quantenausbeute

Indikator	Anregung		Emission	
	λ_1 (nm)	λ_2 (nm)	λ_1 (nm)	λ_2 (nm)
<i>Dual excitation-Farbstoffe:</i>				
Fura-2	340	380	510	
Fura-5	340	380	510	
Fura-Red	480-500	425-450	660	
<i>Dual emission-Farbstoffe:</i>				
Indo-1	350		405	480
<i>Single wavelength Farbstoffe:</i>				
Fluo-3	505		530	
Calcium Green	505		530	
Calcium Orange	550		575	
Calcium Crimson	590		610	

Tabelle 1: Calcium-Indikatoren (nach [29], S. 163)

bei der Komplexbildung mit Ca^{2+} .

Die meisten Farbstoffe können nichtinvasiv in Zellen eingebracht werden (s. 3.4), sind in den nötigen Konzentration nicht toxisch und sprechen in geeignet kurzen Zeiten auf sich ändernde Ca^{2+} -Spiegel an. Sie eignen sich daher ideal zur Messung dynamischer Vorgänge in lebenden Zellen.

2.4. Fura-2-Fluoreszenz-Spektrometrie

Seit ihrer ersten Synthese im Jahre 1984 [15] hat sich in den letzten Jahren die organische Verbindung Fura-2 in zahlreichen Versuchen als geeigneter Fluoreszenz-Farbstoff für die Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen bewährt und wird von fast allen Arbeitsgruppen, die sich mit Ca^{2+} -Messungen beschäftigen, zu diesem Zweck eingesetzt.

Im Gegensatz zu dem vorher häufig eingesetzten Quin-2 zeichnet sich Fura-2 durch eine etwa 30-fach höhere Quantenausbeute, eine wesentlich bessere Selektivität für Ca^{2+} und eine geringere Pufferwirkung für Ca^{2+} aus. Seine große Bedeutung erlangt Fura-2 jedoch aufgrund der nach Bildung des Ca^{2+} -Komplexes auftretenden Verschiebung des Absorptionsmaximums um fast 30 nm, da diese Tatsache die Grundlage für das weiter unten beschriebene Ratio-Verfahren darstellt.

Es finden sich in der Literatur auch vereinzelt Hinweise auf den Fluoreszenz-Farbstoff Fluo-3, der sich durch noch höhere Quantenausbeute und eine größere Anregungswellenlänge auszeichnet [30]. Dieser Farbstoff verbleibt jedoch nur bei zusätzlicher Beladung mit Probenicid (einem Blocker für Anionentransporter) über längere Zeit im Cytosol, und hat damit eine nicht mehr physiologische Zellfunktion zur Folge.

Ein zusammenfassender Überblick über die Problematik der intrazellulären Ca^{2+} -

Bestimmung mittels Fura-2-Fluoreszenz-Spektrometrie findet sich in [7];² weiterführende Literatur zur digitalen Fluoreszenz-Bildgebung in lebenden Zellen findet sich in [42] und [24].

2.4.1. Chemische Struktur

Bei Fura-2 handelt es sich um einen Ca^{2+} -Chelator, der sich aus einem fluoreszierenden Stilben und einem den Ca^{2+} -Komplexbildnern EGTA und BAPTA verwandten Tetracarboxylat-Anteil zusammensetzt. Seine Struktur zeigt Abb. 3; man erkennt am oberen Bildrand die 4 Ca^{2+} -bindenden Carboxylat-Gruppen und den eigentlich chromophoren Anteil in der linken unteren Hälfte.

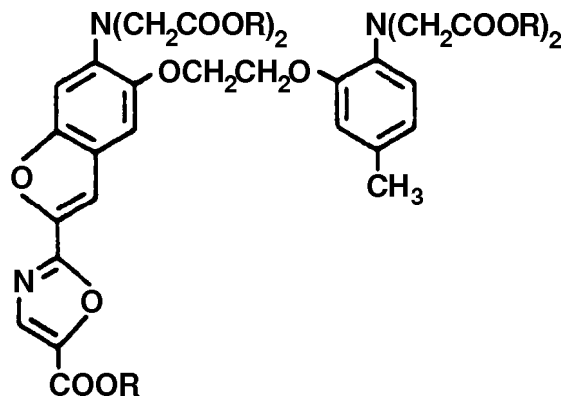


Abbildung 3: Strukturformel von Fura-2 ($\text{R}=\text{H}$) bzw. Fura-2/AM ($\text{R}=\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$). (Nach [15, S. 3443])

Fura-2/AM ist als gelbe, kristalline Substanz kommerziell (Sigma, F-0888) erhältlich, und löst sich in DMSO (Dimethylsulfoxid) in Konzentrationen, die das Anfertigen von 100fachen Stocklösungen problemlos ermöglichen.

2.4.2. Optische Eigenschaften

Tab. 2 gibt eine Übersicht über die wichtigsten optischen Eigenschaften von Fura-2, wie sie in 100 mM KCl-Lösung bei 20 °C bestimmt wurden.

Deutlich ist die hohe Verschiebung des Absorptionsmaximums bei fast gleichbleibender Emissionswellenlänge zu erkennen. Das Anregungsspektrum einer Fura-2-Lösung in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Sättigung zeigt Abb. 4.

Obwohl Fura-2 gegenüber Quin-2 eine deutlich höhere Selektivität für Ca^{2+} auszeichnet, läßt es sich nicht verhindern, daß auch andere bivalente Kationen komplexiert werden. Insbesondere Mg^{2+} stellt hierbei ein großes Problem dar, da es in fast allen Zellen vorhanden ist, oft aber keine physiologisch wichtige Funktion trägt. Mg^{2+} löscht damit

²Dieses Sonderheft wäre zu Beginn der Arbeiten von großer Bedeutung gewesen, leider benötigte die Fernleihstelle der Universitätsbibliothek fast 6 Monate (!) für die Beschaffung einer Kopie.

	Freies Anion	Ca ²⁺ -Komplex
Absorptionsmaximum	362 nm	335 nm
Extinktionskoeffizient	27 kM ⁻¹ cm ⁻¹	33 kM ⁻¹ cm ⁻¹
Emissionsmaximum	512 nm	505 nm
Quantenausbeute	0.23	0.49

Tabelle 2: Optische Eigenschaften von Fura-2. (aus [15, S. 3444])

einen Teil des Fluoreszenz-Signals aus, dies läßt sich jedoch durch eine geeignete Korrektur der aufgenommenen Daten ausgleichen oder zur Messung von Mg²⁺-Konzentrationen ausnutzen.

2.4.3. Biochemische Eigenschaften

Soll Fura-2 als intrazellulärer Ca²⁺-Indikator eingesetzt werden, so muß der Farbstoff in das Cytosol eingebracht werden. Einer direkten Diffusion durch die Plasmamembran steht jedoch die Tatsache entgegen, daß das Fura-2-Molekül wegen seiner Ca²⁺-Bindungsregion stark polarisiert ist. Dieses Problem kann jedoch elegant umgangen werden. (s. 3.4)

Wie jeder Indikator, so puffert auch Fura-2 einen Teil des intrazellulären Ca²⁺; verglichen mit Quin-2 besitzt es jedoch eine deutlich geringere Affinität zu Ca²⁺. Die Dissoziationskonstante beträgt bei 20 °C 135 nM und bei 37 °C 224 nM, ist also stark temperaturabhängig.

Eine Bindung des Farbstoffs an Lipidmembranen konnte in Versuchen mit Erythrozyten nicht festgestellt werden [15, S. 3446], und stellt demnach für die Untersuchung des Ca²⁺-Spiegels im ganzen Cytosol kein Hindernis dar.

Noch nicht bekannt ist, ob hydrolisiertes Fura-2 von Endothelzellen aktiv in den Extrazellulärraum transportiert werden kann. Bei einem vergleichbaren Experiment an Makrophagen konnte ein organischer Anionentransporter identifiziert werden, dessen Vorhandensein zu einem signifikanten Auswärtstransport des Farbstoffes führte [40]. Bisher ist allerdings bei Endothelzellen kein solcher Auswärtstransport, der von störendem Einfluß wäre und z. B. durch Inkubation mit Probenicid blockiert werden könnte, beobachtet worden.

2.4.4. Quantitative Ca²⁺-Bestimmung

Im Gegensatz zu den schon länger bekannten Farbstoffen wie Quin-2 zeichnet sich Fura-2 dadurch besonders aus, daß sich das Absorptionsmaximum durch Bindung eines Ca²⁺-Ions an das Molekül deutlich zu niedrigeren Wellenlängen hin verschiebt. War man bei Quin-2 darauf angewiesen, das Emissionssignal bei einer einzigen Anregungswellenlänge zu verfolgen (dadurch werden die Fluoreszenz-Intensitäten z. B. abhängig von der absoluten Farbstoffkonzentration), erlauben die neueren Farbstoffe, Signale beider Farbstoff-Modifikationen auszuwerten.

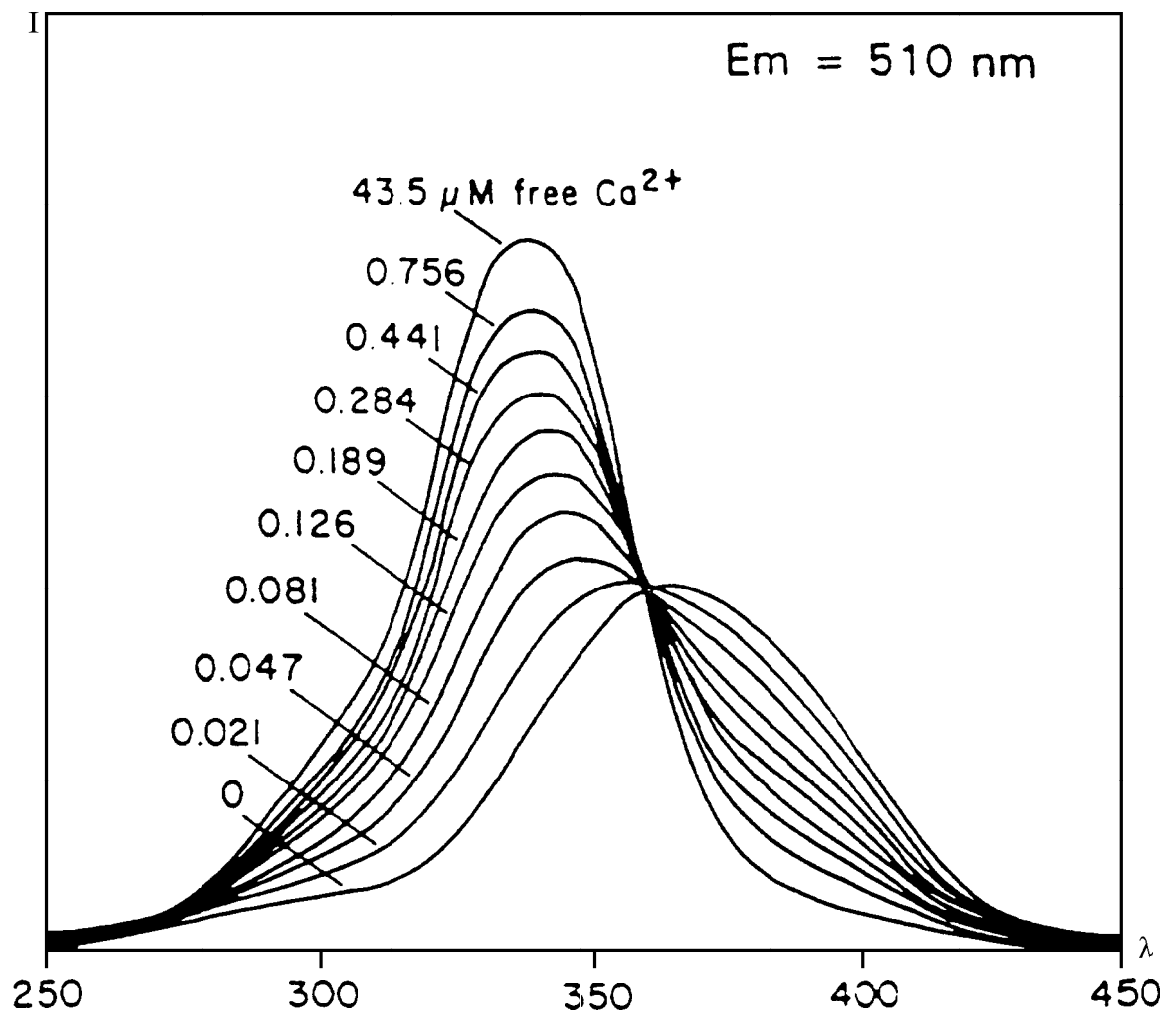


Abbildung 4: Anregungsspektrum von Fura-2. Aufgetragen ist die Emissionsintensität über der Anregungswellenlänge in nm. (Aus [16])

Diese Tatsache ermöglicht anstelle der reinen Intensitätsmessung eine wesentlich zuverlässigere Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration, nämlich durch Anwendung des sogenannten *Ratio*-Verfahrens [15, S. 3447].

Dabei beobachtet man die Intensität des Fluoreszenz-Lichts bei zwei (oder drei) verschiedenen Anregungswellenlängen; im Falle von Fura-2 stammt die Emission nach einer Anregung mit 380 nm hauptsächlich von Ca^{2+} -freien Anionen, Emission nach einer Anregung mit 340 nm dagegen von Fura-2- Ca^{2+} -Komplexen.

Die anschließende Bildung des Verhältnisses der beiden Signalintensitäten eliminiert dann alle Einflüsse auf das Meßsignal, die beide Modifikationen in gleicher Weise betreffen, wie beispielsweise von Zelle zu Zelle schwankende Farbstoff-Konzentrationen, unterschiedliche optische Weglängen oder Instrumentenempfindlichkeiten in verschiedenen Aufbauten. Störeinflüsse, die die Form des Anregungsspektrums verändern (bei Systemen mit deutlich dispersivem Verhalten), führen natürlich zu systematisch fehlerhaften Meßergebnissen; bei der Konstruktion der optischen Komponenten eines Fluoreszenz-Spektrometrie-Meßsystems muß also auf eine möglichst konstante Übertragungsfunktion im Bereich von 340 nm bis 380 nm geachtet werden.

Verfolgt man zusätzlich noch das Signal am isosbestischen Punkt (der Anregungswellenlänge, bei der das Gesamtsignal von der Ca^{2+} -Konzentration unabhängig ist; 360 nm), so erhält man Informationen über die absolut vorhandene aktive Farbstoffmenge, die sich z. B. durch Mg^{2+} -Influx ändert.

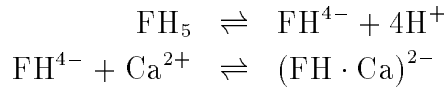
Herleitung der Fura-2-Kalibrationsgleichung Unter der Annahme, daß das Signal der beiden Modifikationen (freies Fura-2 und der Fura-2- Ca^{2+} -Komplex) proportional zur jeweiligen Konzentration dieser beiden Modifikationen ist, ergibt sich folgender Zusammenhang für die Intensität der Fluoreszenz-Signale:

$$I_1 = S_{1f}c_f + S_{1k}c_k \quad (1)$$

$$I_2 = S_{2f}c_f + S_{2k}c_k \quad (2)$$

Hierin ist I_i die Gesamtintensität bei der jeweiligen Anregungswellenlänge ($i = 1, 2$) und c_j die Konzentration der Modifikation ($j = f, k$); die S_{ij} sind die vier Proportionalitätskoeffizienten.

In Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen befindet sich das freie Fura-2 im Gleichgewicht mit dem Fura-2- Ca^{2+} -Komplex:



Zwischen c_f , c_k und der Ca^{2+} -Konzentration besteht nun (unter der Annahme, daß ausschließlich 1:1-Komplexe gebildet werden) gemäß dem Massenwirkungsgesetz folgender einfacher Zusammenhang:

$$K_d = c_f \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{c_k} \quad (3)$$

mit K_d als Bindungskonstante für den Fura-2- Ca^{2+} -Komplex. Die im Experiment letztendlich³ zugängliche Größe R ist das Verhältnis der beiden Signalintensitäten I_1/I_2 , und durch Kombination der Gleichungen (1)-(3) ergibt sich sofort:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \left(\frac{R - (S_{f1}/S_{f2})}{(S_{k1}/S_{k2}) - R} \right) \left(\frac{S_{f2}}{S_{k2}} \right) \quad (4)$$

Der Ausdruck $S_{f1}/S_{f2} = R_{min}$ läßt sich als Signal bei $[\text{Ca}^{2+}] = 0$ identifizieren; entsprechend ist $S_{k1}/S_{k2} = R_{max}$ das Signal bei vollständiger Ca^{2+} -Sättigung. $S_{f2}/S_{k2} = \beta$ kann ebenfalls aus den Signalintensitäten bestimmt werden und hängt im wesentlichen nur vom experimentellen Aufbau ab.

Damit ergibt sich also als Gleichung für die Auswertung einer kalibrierten Ca^{2+} -Messung:

$$\boxed{[\text{Ca}^{2+}] = K_d \beta \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right)} \quad (5)$$

Auswertung Zur quantitativen Auswertung eines Experiments sind daher folgende Schritte nötig:

1. Ausführen des eigentlichen Versuchs: Akquisition von Intensitätsbildern bei einer Anregung mit abwechselnd 340 nm und 380 nm. R erhält man durch Division der Signalintensitäten nach Abzug des Dunkelbildes und des Autofluoreszenzhintergrundes.
2. Einstellen eines Ca^{2+} -freien Zustandes; die Aufnahme zweier Intensitätsbilder liefert S_{f1} und S_{f2} ; daraus erhält man durch Division R_{min} .
3. Einstellen eines Ca^{2+} -gesättigten Zustandes; die Aufnahme zweier Intensitätsbilder liefert S_{k1} und S_{k2} ; daraus erhält man durch Division R_{max} .
4. β ergibt sich als Quotient S_{f2}/S_{k2} ; K_d ist bekannt und beträgt bei 37 °C 224 nM.
5. Umrechnung der in 1. erhaltenen Ratio-Werte in Ca^{2+} -Konzentrationen gemäß Gleichung (5).

Fehlerrechnung Für die Bestimmung der Fehlergrenzen wurden folgende Gesetzmäßigkeiten aus [34] benutzt:

$$\rho_{[\text{Ca}^{2+}]} = \sqrt{\rho_\beta^2 + \rho_{R-R_{min}}^2 + \rho_{R_{max}-R}^2} \quad (6)$$

(Fehlerfortpflanzung in Potenzprodukten, ρ_i sind die relativen Fehler);

$$\sigma_{A-B} = \sqrt{\sigma_A^2 + \sigma_B^2} \quad (7)$$

(Fehlerfortpflanzung in Summen, σ_i sind die Standardfehler).

³Die beiden Intensitäten I_1 und I_2 werden zwar getrennt gemessen, durch Bilden des Verhältnisses erfolgt aber die bereits erwähnte Korrektur der Störeinflüsse.

2.5. Häufig verwendete Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethylester
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	bis-(<i>o</i> -aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetate
BSA	bovine serum albumin (Rinder-Serumalbumin)
cAMP	adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (zyklisches Adenosinmonophosphat)
cGMP	guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (zyklisches Guanosinmonophosphat)
DG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	ethylene diamine-tetraacetate
EGTA	ethylene glycol bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetate
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ET-1	Endothelin-1
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
Fura-2	(1-[2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzo-furan-5-oxy]- 2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetate)
HBS	HEPES buffered saline (HEPES-gepufferte Salzlösung)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₄	Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat
NO	nitric oxide (Stickstoffmonooxid)
NOS	nitric oxide synthase
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C;
RDGF	retina derived growth factor (aus Netzhaut gewonnener Wachstumsfaktor)
ROI	region of interest
t-BHQ	di- <i>tert</i> -Butylhydroquinon

3. Humane Endothelzellen

Bei den in allen Experimenten verwendeten Zellen handelt es sich um humane Gefäßendothelzellen. Diese Zellen gewinnt man einfach und zuverlässig aus dem Endothel der Venen menschlicher Nabelschnüre; die Zelllinie wird daher üblicherweise als HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) bezeichnet.

HUVEC werden wegen ihrer einfachen Verfügbarkeit und leichten Vorratshaltung von fast allen Arbeitsgruppen, die sich mit der Funktion von Endothelzellen befassen, als Modellzelle benutzt. An dieser Stelle soll jedoch nicht verschwiegen werden, daß Endothelzellen aus anderen Gefäßen als der Nabelschnurvene durchaus unterschiedliche Eigenschaften haben [39], die Verhältnisse bei HUVEC also nicht ohne weiteres auf andere Kreislaufabschnitte übertragen werden sollten.

Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die Präparation dieser Zellen, die Kultivierung genügend großer Zellzahlen und die Behandlung der Zellen mit Fura-2 gegeben werden.

3.1. Präparation von HUVEC (nach [33])

HUVEC werden aus frischen Nabelschnüren gewonnen, die nicht älter als 1–2 Tage sein sollten. Es wurden daher zweimal wöchentlich die in der Theresienklinik⁴ angefallenen Nabelschnüre gesunder Neugeborener abgeholt und zur Universitätsklinik gebracht.

Der Transport erfolgte bei Raumtemperatur in physiologischer Lösung (PBS) und ohne weitere Vorbehandlung.

Noch in den Blutgefäßen vorhandenes Restblut und kleinere Blutgerinnsel entfernt man durch Ausstreifen der Nabelschnüre, und es erfolgt eine grobe äußere Reinigung durch Abwischen mit sterilen Kompressen. Nach dem sauberen Abtrennen der Enden mit einem sterilen Skalpell wird zunächst an einem Ende der Nabelschnur ein kurzes Schlauchstück mit Gewindeanschluß in die Vene (die sich durch ihren größeren Durchmesser von den beiden Arterien unterscheiden läßt) eingeführt und mittels Faden fixiert.

Es werden nun dreimal je 50 ml steriler Phosphatpuffer (PBS) in eine Perfusorspritze, die an das Schlauchstück angekoppelt werden kann, aufgezogen und zur weiteren Reinigung der Vene durch diese hindurchgespült. Dabei achtet man auf Druckstellen oder andere Verletzungen der Nabelschnur.

Anschließend bringt man auch am zweiten Ende ein Schlauchstück an, verschließt dort den Schlauch mit einer Schlauchklemme, zieht 20 ml Collagenaselösung (0.1 % in PBS) in eine Spritze auf und drückt die Lösung durch ein 0.45 µm-Sterilfilter in die Nabelschnur, bis diese prall gefüllt ist. Die auch am anderen Ende mit einer Schlauchklemme verschlossene Nabelschnur wird nun für 12 min in einem Begasungsbrutschrank (5 % CO₂, 37 °C) inkubiert.

Nach der Inkubation wird durch Kneten der Nabelschnur versucht, möglichst viele Zellen aus dem Endothelverband herauszulösen, bevor man das Collagenase-Zellgemisch mit weiteren 30 ml steriler PBS aus der Vene ausspült. Aus der so entstandenen Zellsus-

⁴Domerschulstraße 1–3, 97070 Würzburg

pension kann nun durch Zentrifugieren (10 min, 150 g, 20 °C) und anschließender Resuspension in 5 ml Zellkulturmedium (MSA/R) die Primärkultur gewonnen werden. Diese wird dann in eine gelatinebeschichtete (Gelatinelösung A) Gewebekulturflasche (Wachstumsfläche 25 mm²) eingesät und im Begasungsbrutschrank kultiviert.

3.2. Zellkultur

Die so gewonnenen Zellen müssen nun noch mehrmals vermehrt werden, um genügend hohe Zellzahlen zu erreichen. Außerdem können durch das mit dem Splitten verbundene Absaugen des Kulturmediums solche Zellen, die sich nicht an den Kulturschalen anheften (z. B. glatte Muskelzellen aus den Blutgefäßwänden), entfernt und so die Kontamination der Kultur verringert werden.

Während der Wachstumsphase muß das verbrauchte Kulturmedium etwa alle 2 Tage durch neues ersetzt werden. Dazu wird die Kulturflasche nach dem Absaugen des alten Mediums zunächst mit 5 ml steriler PBS gespült, auch, um abgestorbene oder nicht anhaftende Zellen zu entfernen. Nachdem die Spüllösung abgesaugt wurde, werden 5 ml frische MSA/R hinzugegeben.

Haben sich die Zellen nach etwa 4 Tagen soweit vermehrt, daß sie den Boden einer Kulturflasche vollständig konfluent bedecken, so befinden sich in einer solchen Flasche etwa $1.5 - 2.2 \cdot 10^6$ Zellen, die allesamt auf der Gelatineschicht anhaften. Die Kultur kann dann gesplittet werden.

Dazu wird zunächst das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt; Reste davon werden vorsichtig mit 5 ml steriler PBS abgewaschen, die ebenfalls abgesaugt wird. Man gibt 2 ml Trypsin/EDTA in die Kulturflasche und verteilt die Lösung gleichmäßig über den Flaschenboden.

Um den Ablöseprozeß zu beschleunigen, inkubiert man die Zellen nun 150 s bei 37 °C, bevor man die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 3 ml MSA abstoppt. Leichtes Klopfen der Kulturflasche löst auch noch die letzten anhaftenden Zellen.

Die Zellsuspension wird nun zentrifugiert (10 min, 150 g, 20 °C) und das Pellet anschließend in 5 ml MSA/R resuspendiert. Die so entstandene nächste Passage kann dann auf zwei neue Kulturflaschen verteilt werden.

Die Identifikation der so kultivierten Zellen erfolgt in Anlehnung an [23] durch Betrachtung unter dem Lichtmikroskop; HUVEC weisen hierbei eine typische Morphologie in Form einer ausgeprägten Kopfsteinpflaster-Struktur auf (s. Abb. 1).

Für die Experimente wurden Zellen aus den Passagen 2–4 verwendet, wobei bisher keine Unterschiede in der Qualität der Passagen erkennbar waren.

3.3. Vorbehandlung der Deckgläschen

Da sich die üblichen Zellkulturflaschen aus Plastik für die Verwendung als Objektträger auf einem invertierten Mikroskop wegen der zu großen Materialstärke nicht eignen, muß die für die Experimente vorgesehene Passage auf Deckgläschen, die nur 0.17 mm stark sind, kultiviert werden. Diese Deckgläschen müssen zudem noch über einen erhöhten

Rand verfügen, um eine Superfusion mit Puffer zu ermöglichen, ohne das Mikroskop zu verunreinigen.

Mangels geeigneter, kommerziell verfügbarer Deckgläschen dieser Art wurde deshalb eine eigene Lösung entwickelt. Handelsübliche Quarzglas-Objektträger (rund, \varnothing 30 mm) wurden mit einem Rand versehen, indem ein Plexiglasring von etwa 5 mm Höhe aufgeklebt wurde. Bei diesen Ringen handelte es sich um Abschnitte eines Plexiglasrohres (Außen- \varnothing 30 mm, Innen- \varnothing 25 mm), die von der Firma BHM Glas und Kunststoffe, Eibelsstadt unkompliziert zur Verfügung gestellt wurden. Anfängliche Schwierigkeiten in der Zellkultur ließen sich auf den ursprünglich verwendeten (offensichtlich leicht toxischen) Silikonkleber⁵ zurückführen, mittlerweile hat sich jedoch ein anderer Silikonklebstoff⁶ im langfristigen Gebrauch bewährt.

Nach dem Aushärten des Klebers (ca. 2 Tage unter Tageslicht) wurden die Deckgläschen zunächst mit destilliertem Wasser gereinigt, über Nacht mit 75 % Ethanol entfettet und schließlich nochmals mit destilliertem Wasser abgespült. Die Sterilisation erfolgte durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C, 1 bar.

Je nach Bedarf wurde ein Teil der sterilen Deckgläschen dann mit Gelatine beschichtet. Im Gegensatz zur Kultur auf Plastik, wo Gelatinelösung A verwendet wurde, ergaben sich hier zunächst bessere Resultate (gleichmäßigere Konfluenz, stärkeres Anhaften) mit Gelatinelösung B.

Da sich auch bei Verwendung von Gelatinelösung B immer wieder größere Bereiche des Zellverbandes vom Deckgläschen ablösten, wurde für die späteren Experimente auf vernetzte Gelatine zurückgegriffen. Gemäß [39] wurden dazu mit 70 % Ethanol entfettete und mit 90 % Ethanol sterilisierte Deckgläschen zunächst mit PBS gewaschen und danach für 45 min bei 20 °C mit Gelatinelösung C inkubiert. Anschließend wurde die Gelatine durch Inkubation (15 min, 20 °C) mit 0.5 % Glutaraldehyd (in PBS) vernetzt; Reste wurden durch zweimaliges Waschen mit Medium 199 entfernt, bevor eine abschließende Inkubation (15 min, 20 °C) mit Medium 199 erfolgte.

Die durch Splitten einer Kulturflasche gewonnene Zellsuspension wurde dann auf zwei vorbereitete Deckgläschen ausgesät; und etwa 24 h später konnte die Kultur zum Experiment herangezogen werden.

3.4. Beladung mit Fura-2/AM

Hauptproblem bei der intrazellulären Fluoreszenz-Spektrometrie ist die Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff. Das Farbstoffmolekül ist zu groß, um durch Ionenkanäle in der Zellmembran diffundieren zu können; und als polares Molekül ist ihm eine Diffusion durch die in ihrem Inneren lipophile Phospholipiddoppelschicht ebenfalls nicht möglich.

In älteren Arbeiten auf dem Gebiet der Fluoreszenz-Spektrometrie wurde zur Beladung einzelner Zellen auf die etablierte Patch-Pipetten-Technik zurückgegriffen [32], und der Farbstoff mittels einer Mikropipette in das Cytosol eingebracht. Hierbei handelt

⁵BOSTIK Montage Silicon transparent, Bostik, Oberursel

⁶Elastosil E 43 transparent, Wacker Chemie, Burghausen

es sich, wie weiter oben (2.3.1) bereits erwähnt, um eine invasive Technik, die zumal für größere Zellzahlen nicht praktikabel ist.

Zwar besteht prinzipiell die Möglichkeit, durch Anlegen eines hohen elektrischen Feldes und der damit verbundenen Polarisierung der Membran kleine, räumlich begrenzte Membranbereiche zu zerstören (die sogenannte Elektropermeabilisierung), um dadurch Öffnungen in der Zellmembran zu schaffen, die einen Stoffaustausch ermöglichen; aber auch diese Methode stellt eine nicht unerhebliche Belastung für die Zellen dar. In [10] wird zwar demonstriert, daß Endothelzellen sich nach einer solchen Permeabilisierung vollständig erholen können, doch läßt sich das Problem der Beladung auch deutlich einfacher lösen.

Im Falle von Fura-2 und verwandten Farbstoffen greift man zu einer einfachen, aber wirkungsvollen Methode, um den Farbstoff membrangängig zu machen: Nach der Synthese des eigentlichen Farbstoffes werden die polaren Bindungsstellen mit Acetoxymethyl-Resten verestert, so daß das Molekül deutlich weniger polarisiert ist. Nach der dann möglichen Diffusion durch die Zellmembran bewirken zelleigene Esterasen den Abbau der Ester, woraufhin der Farbstoff wieder in seiner aktiven Form vorliegt. Zusätzlich wird dadurch das Ausdiffundieren des Farbstoffes aus der Zelle verhindert.

Um also Zellen mit einem Fluoreszenz-Farbstoff zu beladen, müssen diese zunächst für etwa 45 min mit einer geeignet konzentrierten Lösung des Farbstoff-AM-Esters inkubiert werden; und nach dem Austausch des Außenmediums durch farbstofffreies Medium ermöglicht erneute Inkubation der Zellen den vollständigen Abbau der Ester. Nach ca. 30 min können dann die ersten Fluoreszenz-Messungen durchgeführt werden.

4. Experimenteller Aufbau

Zur Messung von Ca^{2+} -Transienten (durch einen externen Stimulus hervorgerufene, temporäre Änderung der Ca^{2+} -Konzentration) mittels Fluoreszenz-Spektrometrie wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet, die nachfolgend detailliert beschrieben werden sollen.

Die *Messung an Einzelzellen* erlaubt es, die Reaktion einzelner, unter dem Mikroskop ausgewählter Zellen direkt zu messen. Wegen der vergleichsweise geringen Signalintensität müssen allerdings lange Belichtungszeiten verwendet werden, so daß eine nur niedrige zeitliche Auflösung erreicht werden kann (vgl. dazu Tab. 4). Vorteil dieser Meßmethode ist jedoch, daß die beobachteten Zellen aufgrund ihrer Morphologie oder ihrer Lage zueinander nach bestimmten Kriterien selektiert werden können.

Eine höhere Zeitauflösung erlaubt die *Messung an Zellen in Suspension*. Die ungleich höhere Zelldichte führt zu starken Fluoreszenz-Signalen; man mißt dafür jedoch das mittlere Antwortverhalten von etwa $10^4 - 10^5$ Zellen. Information darüber, ob beispielsweise 50 % aller Zellen eine vollständige Reaktion zeigen, oder ob alle Zellen nur zu 50 % auf eine Stimulation reagieren, kann hiermit also nicht gewonnen werden.

Eine dritte Methode, das *Stopped-Flow-Verfahren*, bietet sich für noch schneller ablaufende Vorgänge an; sie wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht eingesetzt. Hierbei werden Zellsuspension und Stimulans getrennt in eine Mischungskammer eingespült, von wo aus beide Komponenten mit hoher Geschwindigkeit in die Meßkammer getrieben werden. Man arbeitet dabei anstelle von Fura-2/AM beispielsweise mit Indo-1/AM, also mit Farbstoffen, die ihre Emission Ca^{2+} -abhängig verändern; durch den Einsatz zweier Photomultiplier können dann beide Emissionslinien gleichzeitig mit hoher Zeitauflösung registriert werden.

4.1. Messung in Suspension

Für spektroskopische Untersuchungen an Zellen in Suspension wurde bisher ein betriebsbereit geliefertes Fluoreszenz-Spektrometer der Firma Perkin-Elmer benutzt. Aufgrund seiner einfachen und zuverlässigen Handhabung konnten mit diesem Gerät anfängliche Erfahrungen in der Fluoreszenz-Spektrometrie gesammelt und Vergleichsmessungen, mit denen die am Einzelzellmeßplatz aufgenommenen Ca^{2+} -Transienten überprüft werden konnten, durchgeführt werden.

Das komplette System besteht aus der eigentlichen Spektrometereinheit,⁷ einer Thermostatiereinheit,⁸ einem PC/AT 286⁹ als Steuerrechner und einem Nadeldrucker¹⁰ zur Ausgabe von Meßergebnissen. In die Spektrometereinheit integriert ist eine mit Netzfrequenz getriggerte Xenon-Lampe, zwei Gitter-Monochromatoren für die spektrale Analyse des Anregungs- und des Emissionslichtes, eine Küvettenhalterung sowie die beiden Photomultiplier für Referenz- und Probensignal.

⁷Perkin-Elmer LS50

⁸Haake D1, Haake L

⁹Perkin-Elmer

¹⁰NEC P7+

Damit sind im Bereich von 230 nm bis etwa 650 nm Messungen von Anregungs- oder Emissionspektren und Fluoreszenz-Messungen möglich. Die Breite der jeweiligen Spaltblenden, die aufgenommenen Spektralbereiche sowie die Integrationszeiten der Einzelmessungen sind in weiten Bereichen mittels Steuersoftware einstellbar; und das System korrigiert durch einen Referenzlichtstrahl automatisch Schwankungen in der Intensität der Lichtquelle.

Es ist allerdings noch ungeklärt, ob und wie sehr HUVEC, die ja Adhäsionszellen sind, ihr Verhalten ändern, wenn sie in Suspension gehalten werden. Die Messungen an diesem Gerät wurden daher lediglich zur Einarbeitung in das Thema durchgeführt und dienten als grobe Anhaltspunkte.

4.2. Messung an Einzelzellen

4.2.1. Der Meßstand

Das Meßsystem für die Messung an einzelnen Zellen wurde im Lauf der vergangenen zwei Jahre aus mehreren, voneinander unabhängigen Komponenten zusammengestellt und besitzt daher eine gewisse Komplexität. Abb. 5 zeigt den schematischen Aufbau der Anordnung.

Das zur Anregung des Fluoreszenz-Farbstoffes notwendige ultraviolette Licht wird von einer Xenon-Lampe¹¹ erzeugt, die von einem externen, stromgeregelten Lampennetzteil¹² versorgt wird. Anfangs hin und wieder auftretende Zündschwierigkeiten lassen sich durch wiederholtes Ein- und Ausschalten des Netzteils umgehen; da die Lampe jedoch sehr empfindlich auf Spannungsspitzen reagiert, sollten die anderen Stromverbraucher (insbesondere der Kühlthermostat) als erstes eingeschaltet werden. Sobald sich (nach etwa 5 min) der Lampenstrom auf 5.4 A eingeregelt hat, brennt die Lampe gleichmäßig und über lange Zeit sehr stabil.

In das Lampengehäuse integriert ist ein Gitter-Monochromator, dessen Bandpaßwellenlänge durch den Steuerrechner¹³ eingestellt werden kann. Herausragendes Merkmal des Monochromators ist die geringe Wechselzeit von etwa 1.25 ms für eine Änderung der Wellenlänge um die für Fura-2-Messungen erforderlichen 40 nm. Leider liegen über die Halbwertsbreite des Bandpasses keine Werte vor; diese hätten auch nicht ohne aufwendiges Zerlegen der herstellerseitig einjustierten Optik ermittelt werden können.

Über einen Lichtleiter gelangt das monochromatische Anregungslicht in das invertierte Mikroskop,¹⁴ wo es von einem dichroischen Spiegel¹⁵ in den Strahlengang des Objektives eingekoppelt wird. Ist das Objektiv (im normalen Phasenkontrastbild) auf die gewünschte Beobachtungsebene fokussiert, so ist damit auch das Anregungslicht auf den gleichen Ort fokussiert. Zwar ist es für die im Rahmen der Fluoreszenz-Spektrometrie gemachten Auflichtaufnahmen nicht unbedingt erforderlich, den Durchlicht- und

¹¹Osram XENOPHOT HLX

¹²Heinzinger electronic, Power Supply LN150-1, 5.4 A, 12 V, 75 W

¹³PC/AT 486

¹⁴Nikon Diaphot-TMD

¹⁵Nikon DM-400

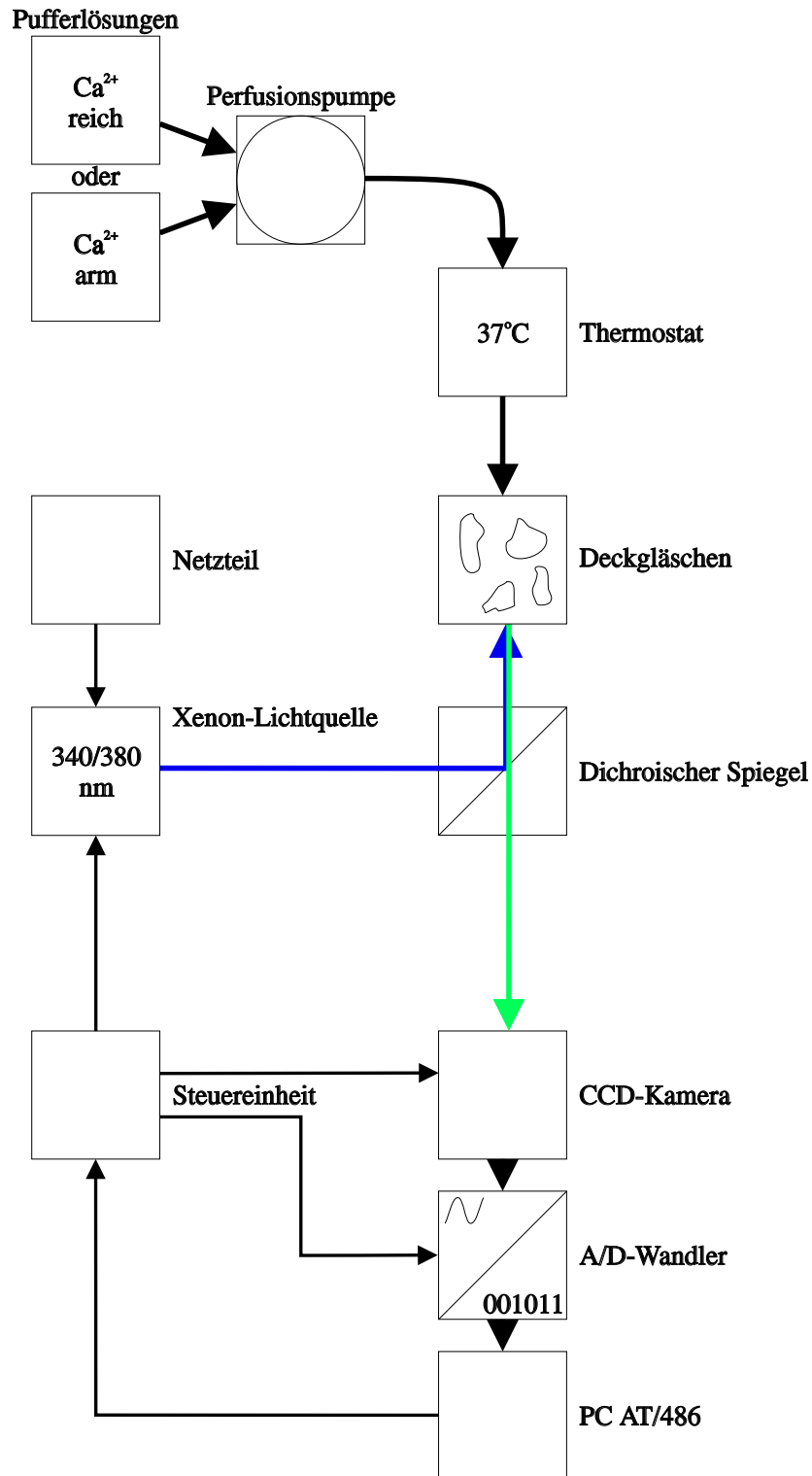


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Einzelzell-Meßplatzes.

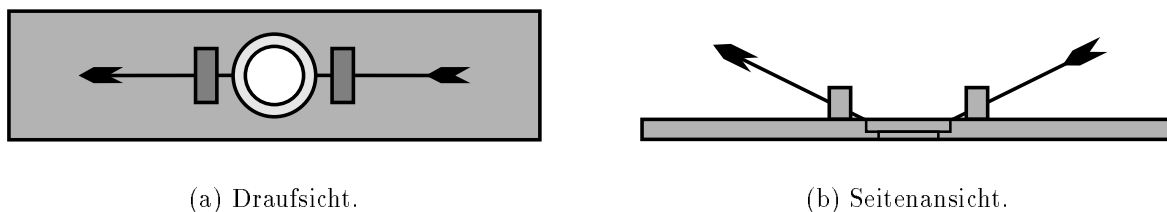


Abbildung 6: Halterung für die Deckgläschen und für die beiden Kanülen der Superfusionsanlage. Die kreisrunde Öffnung hat einen Durchmesser von etwas mehr als 30 mm und dient zur Aufnahme eines Deckgläschen.

Phasenkontrastteil des Mikroskops einzujustieren; eine gelegentliche Überprüfung der einzelnen Linsen und Kondensatoren ist jedoch im Hinblick auf hin und wieder nötige Phasenkontrastbilder zu empfehlen.¹⁶

Auf der Arbeitsbühne des Mikroskops befindet sich der Objektträger (vgl. Abb. 6) mit der darin eingesetzten Probe und den Zu- und Ableitungen der Superfusionsanlage. Der gesamte Objektträger kann mittels eines Manipulators relativ zum Objektiv verschoben werden, ohne daß dabei die Fokussierung verloren geht. Die Deckgläschen mit der daran haftenden Zellschicht werden in den Objektträger eingelegt und sowohl zur mechanischen Fixierung wie auch zur Abdichtung (Überlaufendes Superfusat bildet sonst möglicherweise einen Wasserfilm zwischen Objektiv und Objekt, was unter allen Umständen vermieden werden muß!) mit Schliffett¹⁷ adhesiv fixiert.

Von den Fura-2-Molekülen emittiertes Fluoreszenz-Licht tritt zum Teil wieder durch das Objektiv, durchdringt den dichroischen Spiegel aufgrund seiner größeren Wellenlänge und trifft auf das 384x286 Pixel umfassende CCD-Element. Dieses wird zur Erhöhung seiner Lebensdauer mittels eines Peltierelements auf 10 °C gekühlt. Die Abwärme des Peltierelements wird über einen Wasserkühlkreislauf¹⁸ abgeführt. Wie Aufnahmen des Dunkelsignals zeigen (Abb. 7), ist das Element jedoch trotz Wasserkühlung nicht gleichmäßig temperiert; in der Mitte des unteren Bildrandes zeigt sich ein deutlich erhöhte Zählrate, die wohl auf eine wärmende Lötstelle in der Umgebung hinweist.

Das Bild der CCD-Kamera wird, ebenfalls rechnergesteuert, ausgelesen und von einem 12 bit-A/D-Wandler¹⁹ digitalisiert und im RAM des Steuerrechners zwischengespeichert. Die komplette Steuereinheit für Monochromator, Shutter, CCD-Kamera und Peltierkühlung befindet sich außerhalb des PCs in einem 19 Zoll-Einschub, der den hohen Anforderungen an Einstrahlfestigkeit und Spannungsversorgung durch seinen soliden und fachmännischen Aufbau genügt. Leider wurde bei der Konstruktion vergessen, in diesen Einschub eine Betriebsanzeige einzubauen; ein Umstand, der dazu führte, daß die Steuereinheit hin und wieder über Nacht unbemerkt eingeschaltet blieb. Um diesem Mißstand abzuhelpen, wurde kurzerhand eine Glühlampe in das Gehäuse integriert, die

¹⁶ Hierzu wird auf die Bedienungsanweisungen des Nikon Diaphot-TMD verwiesen.

¹⁷ baysilion mittelviskos, Bayer

¹⁸ Haake K, Haake F3

¹⁹ DATEL ADS-111, 500 kHz



Abbildung 7: Dunkelsignal der CCD-Kamera. Die unterschiedlichen Signalintensitäten weisen auf eine ungleichmäßige Temperaturverteilung auf dem CCD-Chip hin.

nun den Betriebszustand erkennen läßt.

Je nach erforderlicher Zeitauflösung besteht die Möglichkeit, aufgenommene Intensitätsbilder direkt weiterzuverarbeiten oder auf einem Massenspeicher abzuspeichern. Um bei Bedarf auch längere Bildsequenzen noch im Speicher des PCs ablegen zu können, wurde der vorhandene Speicher auf die maximal möglichen 32 MB RAM aufgerüstet; leider zeigte sich später, daß die Meßplatzsoftware FUCAL mit diesem Angebot nicht immer so effizient umgeht, wie es wünschenswert wäre. Sukzessive wurde auch die Festplattenkapazität auf mittlerweile 1.2 GB ausgeweitet und neben dem bereits vorhandenen Wechselplattenlaufwerk noch ein CD-ROM-Laufwerk eingebaut.

4.2.2. Die Superfusionsanlage

Neu entwickelt wurde auch eine Superfusionsanlage, die die Zellen während einer Messung mit Pufferlösung wählbarer Temperatur und Zusammensetzung versorgen kann. Dazu wird das Superfusat mittels einer Perfusionspumpe²⁰ aus bis zu vier Vorratsflaschen gefördert (hierbei erlauben Dreiwegehähne das Zu- und Abschalten einzelner Komponenten, wie beispielsweise Ca^{2+} -reicher oder Ca^{2+} -armer Pufferlösung) und durch ein thermostatisiertes Wasserbad²¹ geleitet. Eine am Objektträger angebrachte Kanüle erlaubt das Einspülen der Pufferlösung in den Probenraum; mittels einer zweiten Kanüle und einer Wasserstrahlpumpe kann die verbrauchte Pufferlösung wieder abgepumpt werden.

Abb. 8 zeigt das Schema der Superfusionsanlage. Die Dreiwegehähne (a) ermöglichen das Zumischen der einzelnen Kanäle, wobei die Kanäle A-D temperaturstabilisiertes Superfusat aus den Vorratsflaschen A-D enthalten. Kanal E ist für das Einspülen geringer Mengen von Substanzen mittels einer 2 ml-Einwegspritze vorgesehen.

Als Bauteile für die Superfusionsanlage wurden pyrogenfreie Leitungen aus dem Be-

²⁰ Gilson Minipuls-2

²¹ Haake E12

reich der Transfusionsmedizin verwendet, die wegen ihrer genormten Schraubgewinde leicht zu kombinieren waren und sich durch geringes Eigenvolumen auszeichnen. Im Einzelnen waren dies:

- Discofix Mehrweghähne, Fa. B. Braun, Melsungen. Bestell-Nr. 04095111
- Verbindungsleitungen ($\varnothing 1.2$ mm, Länge 16 cm), Fa. B. Braun, Melsungen. Bestell-Nr. 04256166
- Perfusorleitungen ($\varnothing 1.2$ mm, Länge 150 cm), Fa. B. Braun, Melsungen. Bestell-Nr. 872296/0
- Pumpenschlauch (Kennung weiß/schwarz), Fa. Abimed, Mannheim. Bestell-Nr. 13018
- Dünnwandkanüle (18 G, Länge 44 mm), Fa. Critikon, Norderstedt. Bestell-Nr. 4024

Um zu vermeiden, daß das Superfusat in gerade nicht benutzten Kanälen stillsteht (dies bringt einerseits Abkühlung mit sich, andererseits belastet es die Pumpe, die dann gegen ein geschlossenes Schlauchende pumpen müßte), wurde ein Rezirkulationsweg geschaffen, der nach Schließen der Hähne (a) geöffnet werden kann. Dazu sind die Dreiweghähne (b) und (c) in die jeweils andere Stellung zu bringen. Dieser Aufbau vermeidet damit sicher das Rückspülen von Puffer in die Vorratsflaschen, die so vor Verunreinigungen geschützt sind.

Zur leichteren Be- und Entleerung der Rezirkulationsleitungen dienen die Hähne (d); noch in den Schläuchen vorhandenes Superfusat kann an diesen Stellen aus dem ansonsten geschlossenen System entfernt werden.

Zum Einspülen des Superfusats in das Deckgläschen wie auch zum Absaugen wird jeweils eine Teflonkanüle eines Dauerkatheters benutzt. Diese lassen sich —falls der Objektträger gewechselt werden muß— dank ihres Gewindeanschlusses leicht an das Schlauchsystem an- und abkoppeln und bieten durch ihre Flexibilität ausreichend Schutz vor Beschädigung des Deckgläschens. Nach dem Austausch des Deckgläschens muß insbesondere die Absaugkanüle wieder richtig positioniert werden, damit es nicht zum Überlaufen der Pufferlösung kommt. Dabei ist auch darauf zu achten, beide Kanülen möglichst fettfrei zu halten, damit diese vom Superfusat optimal benetzt werden können.

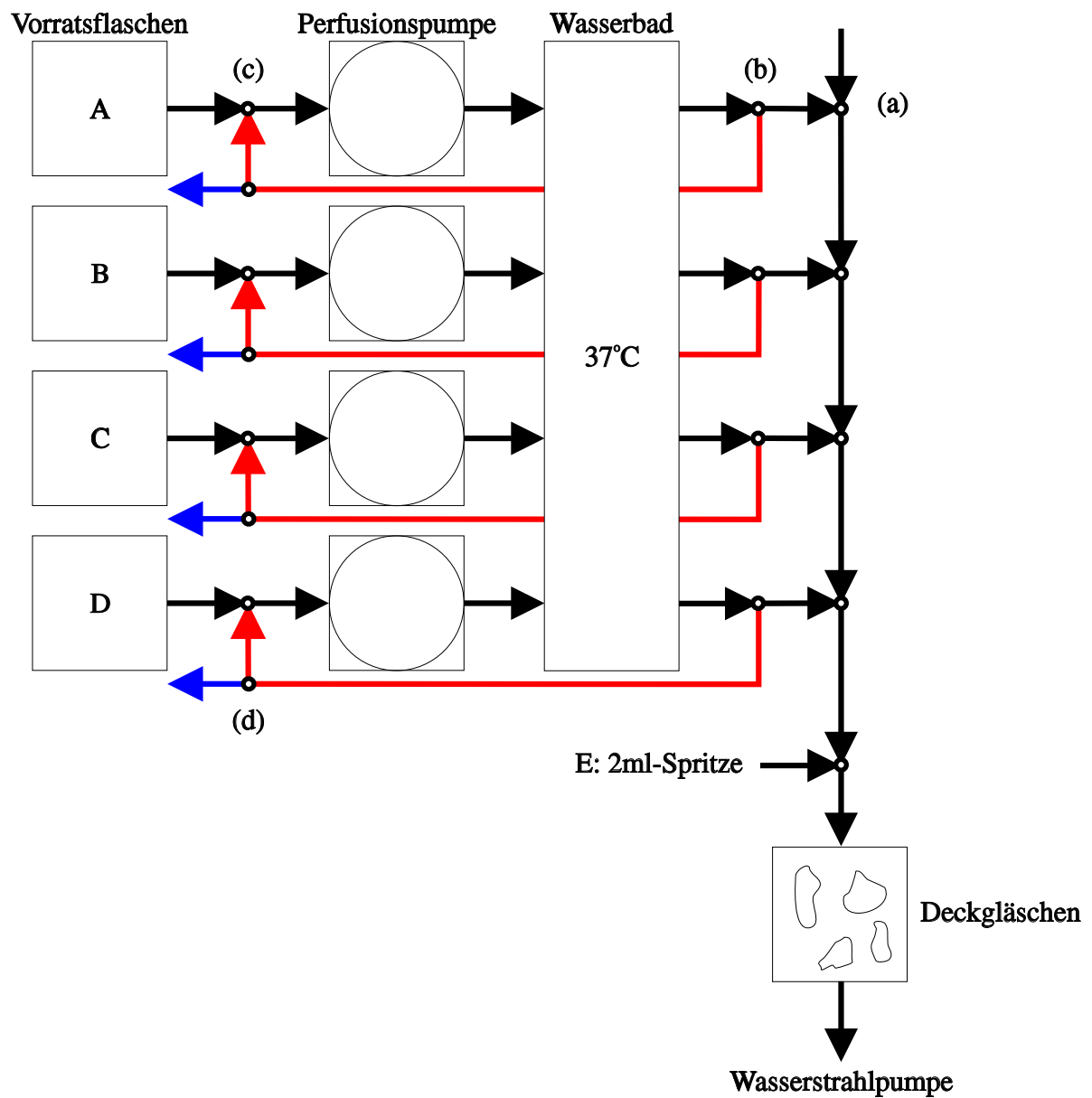


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Superfusionsanlage. Rot: Rezirkulationswege; Blau: Entleerungsschläuche.

5. Experimente und Ergebnisse

5.1. Güte des optischen Systems

Zur Beurteilung der Abbildungsgüte des gesamten optischen Systems (Lichtquelle, Mikroskop, CCD-Kamera) wurden vor Beginn der eigentlichen Messungen mehrere Experimente durchgeführt. Dabei sollten wesentliche Parameter der Meßanordnung, namentlich

- das Transmissionsverhalten des dichroischen Spiegels,
- der Einfluß externer Lichtquellen,
- die Ortsauflösung,
- die Größe des abgebildeten Bereiches,
- die Längen- und Flächentreue sowie
- die Zeitauflösung,

bestimmt werden.

Soweit nichts anderes angegeben, handelt es sich bei den aufgetragenen Intensitätswerten um die Zählraten, die die Meßplatz-Software aus der CCD-Kamera ausgelesen hat. Inwieweit diese Zählraten der tatsächlich integrierten Photonenzahl entspricht, ist nicht bekannt; es kann allerdings davon ausgegangen werden, daß hinreichend gute Proportionalität vorliegt.

Transmissionsverhalten des dichroischen Spiegels Zentrales optisches Element der gesamten Meßanordnung ist der dichroische Spiegel NIKON DM-400, welcher für das Anregungslicht möglichst hohe Reflexion, für das Fluoreszenzlicht jedoch möglichst hohe Transmission aufweisen muß. Laut Dokumentation des Herstellers liegt die theoretische Grenzwellenlänge bei 400 nm; Licht kleinerer Wellenlänge wird reflektiert, Licht größerer Wellenlänge passiert den Spiegel.

Abb. 9 zeigt das Transmissionsspektrum, wie es in einem Zweikanal-Spektrometer²² bestimmt wurde. Dazu wurde der Spiegel in den Strahlengang eingebracht; der Referenzstrahl passierte Luft. Das Spektrum zeigt deutlich das Einsetzen der Transmission bei etwa 400 nm; es geht jedoch auch daraus hervor, daß ein Teil des am Objekt rückgestreuten Anregungslichtes (die beiden zusätzlichen Marken auf der Abszisse entsprechen 340 nm und 380 nm) nicht vom Spiegel aus dem Lichtweg des Fluoreszenzlichtes ausgekoppelt wird, sondern ebenfalls zur CCD-Kamera gelangt.

²²Pye-Unicam SP 8-100

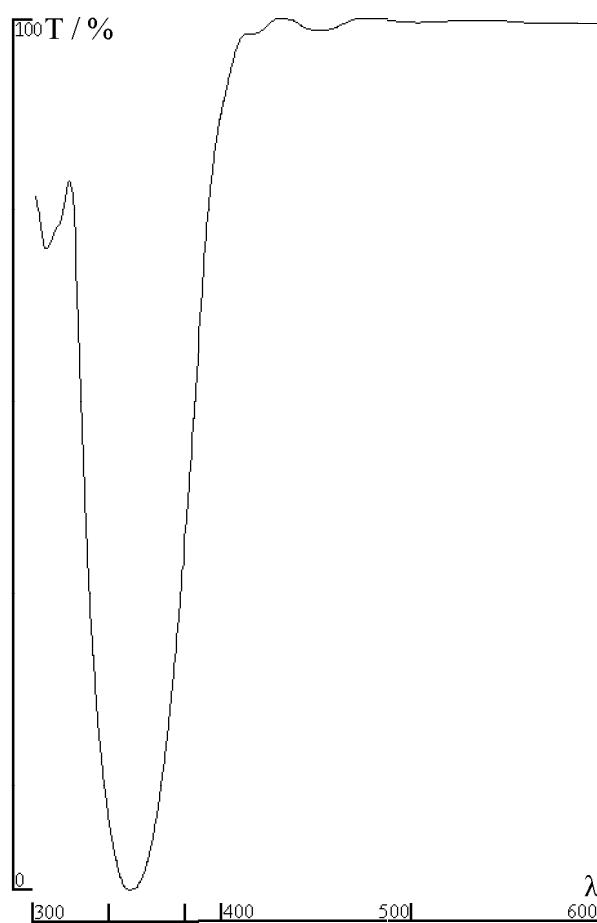


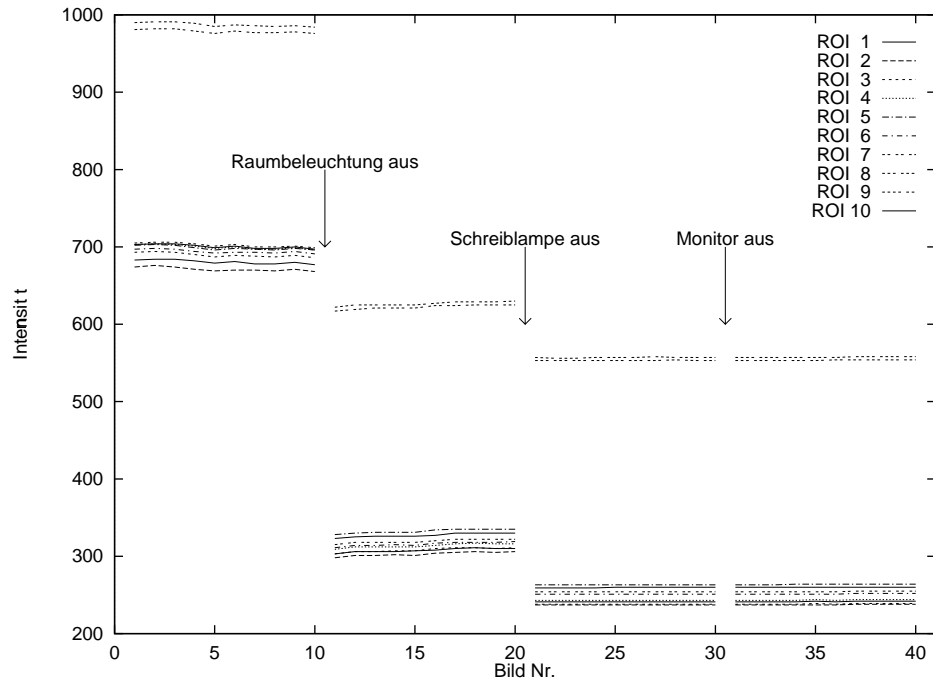
Abbildung 9: Transmissionsspektrum des dichroischen Spiegels Nikon DM-400. Aufgetragen ist die Transmission in % über der Wellenlänge in nm.

Einfluß externer Lichtquellen Obwohl das Meßsystem in einem abgedunkelten, fensterlosen Raum aufgestellt wurde, sind dort doch noch Lichtquellen, insbesondere ein unverzichtbares Arbeitslicht (25 W Schreibtischlampe) und der Computermonitor, vorhanden. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß direktes oder auch gestreutes Licht die Meßanordnung trifft.

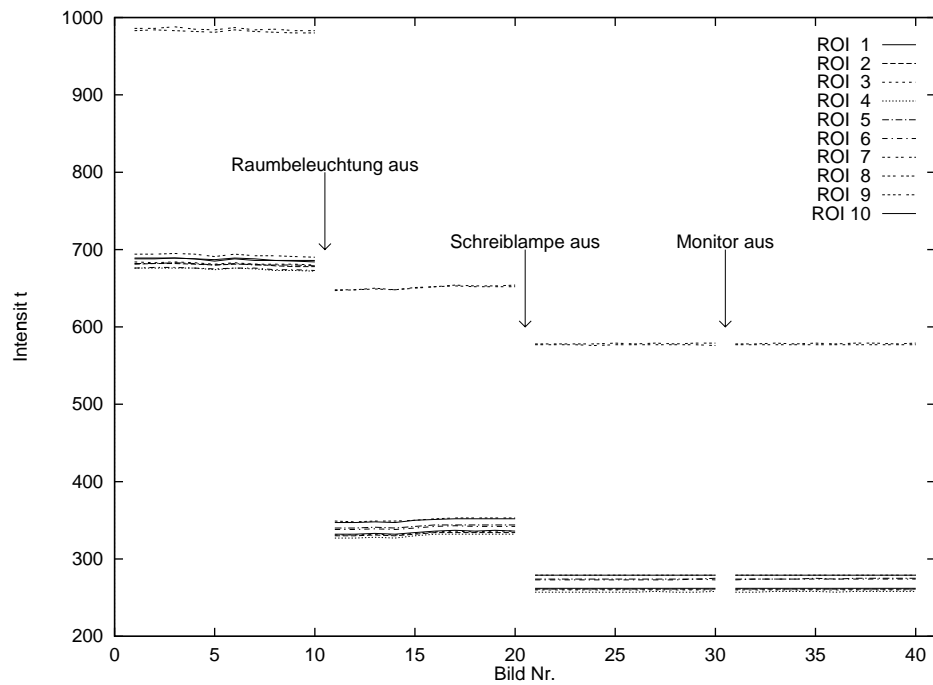
Den Einfluß der einzelnen Lichtquellen zeigt Abb. 10(a). Zu Beginn der Messung waren die normale Raumbeleuchtung, das Arbeitslicht und der Monitor eingeschaltet und das 40fach-Objektiv auf einen leeren Objektträger fokussiert. Nach jeweils 10 aufgenommenen Bildern wurden die einzelnen Lichtquellen nacheinander wie angegeben abgeschaltet. Deutlich erkennbar ist, daß die normale Raumbeleuchtung während einer Messung keinesfalls eingeschaltet sein darf, das Arbeitslicht jedoch benutzt werden kann. Für Messungen mit sehr geringen Signalintensitäten ist jedoch ein Arbeiten im Schein des Monitors angebracht. Da bei diesen Aufnahmen keine Dunkelbildkorrektur erfolgen konnte, erkennt man auch, daß das unkorrigierte CCD-Signal auch bei gleichmäßiger Beleuchtung deutlich ortsabhängig ist. Dies läßt auf eine unterschiedliche Temperaturverteilung auf dem Chip schließen.

Es wurde versucht, durch Anbringen von schwarzem Fotokarton längs des Lichtweges (wo dies möglich war) den Einfluß des Arbeitslichtes zu minimieren. Aus Abb. 10(b) ist jedoch ersichtlich, daß sich dadurch kein wesentlicher Unterschied ergeben hat. Der Großteil des Streulichtes gelangt also durch das Objektiv in das Meßsystem, wo keine Abschirmung gegen Fremdlicht möglich ist.

Neben der Verringerung des Signalkontrastes durch Streulicht bestand auch die Gefahr einer zeitabhängigen Beeinflussung des Signals durch Änderung der Streulichtintensität während einer Meßreihe. Insbesondere der Schatten, den der Experimentator wirft, wenn er sich z. B. zum Pipettieren einer Substanz über das Mikroskop beugt, stellt eine mögliche Störgröße dar. Wie aus Abb. 11 hervorgeht, ist dieser Effekt jedoch vernachlässigbar.



(a) Vor Anbringung von Fotokarton.



(b) Nach Anbringung von Fotokarton.

Abbildung 10: Einfluß von Streulicht auf das Meßsignal. Dargestellt ist die von der CCD-Kamera registrierte Intensität (Integrationszeit 1000 ms) bei Fokussierung auf einen leeren Objektträger.

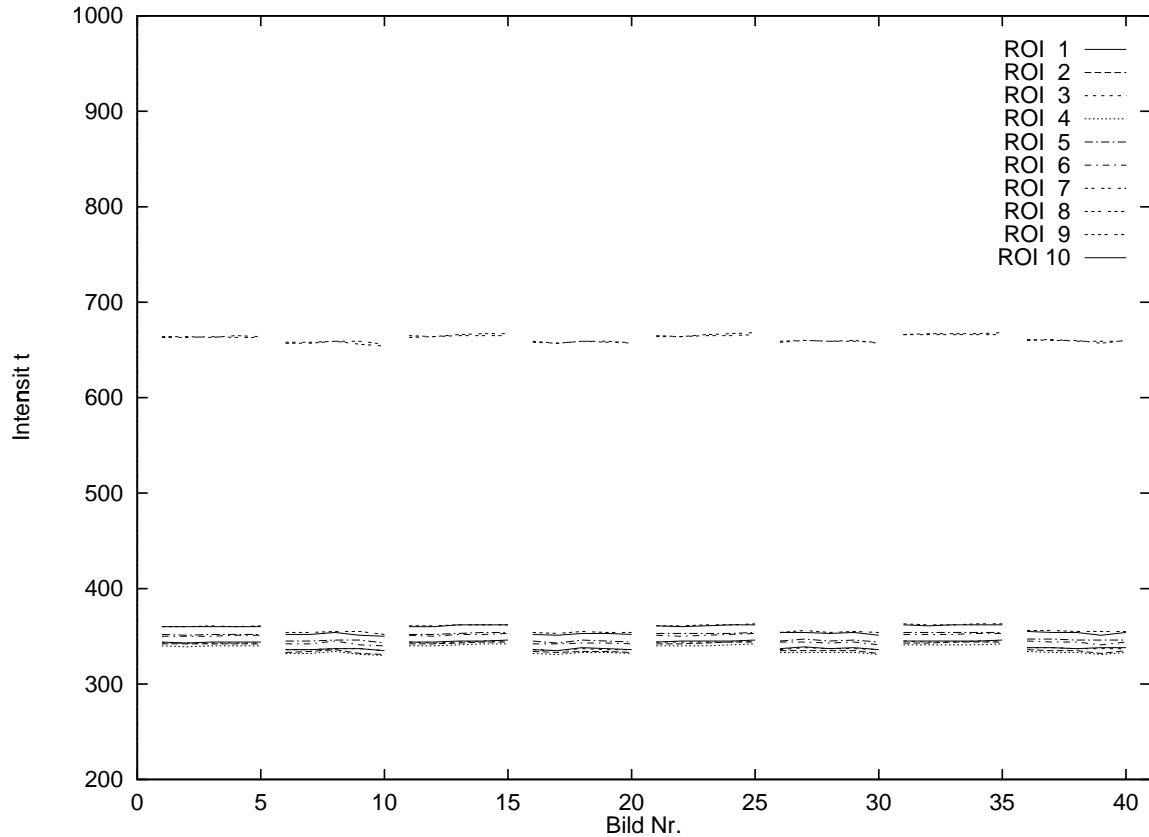


Abbildung 11: Einfluß von Schatten auf das Meßsignal. Nach jeweils fünf Bildern begab sich der Experimentator in die bzw. aus der Linie Arbeitslicht-Meßanordnung. Dargestellt ist die von der CCD-Kamera registrierte Intensität (Integrationszeit 1000 ms) bei Fokussierung auf einen leeren Objektträger.

Zur Bestimmung der geometrischen Parameter wurde eine sogenannte NEUBAUER-Kammer, wie sie zur Zählung von Zellen in Suspension eingesetzt wird, benutzt. Diese Kammer besteht im wesentlichen aus einem Objektträger, in den eine orthogonale Gitterstruktur eingätzt wurde. Die einzelnen Gitterlinien haben Abstände von $250\mu\text{m}$, $50\mu\text{m}$ und $25\mu\text{m}$ und sind daher gut für Entfernungsmessungen geeignet. Abb. 12 zeigt schematisch die Anordnung der Gitterlinien; der dargestellte Bereich hat eine tatsächliche Seitenlänge von 3 mm.

Es wurden nun bei den drei möglichen Vergrößerungsstufen Aufnahmen dieser Gitterstruktur angefertigt. Dazu wurde der in der Mitte der NEUBAUER-Kammer liegende Gitterpunkt auf das Zentrierkreuz in der Photomaske (Abb. 17) ausgerichtet, und bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm je ein Emissionsbild (Abb. 13(a)–13(c)) aufgenommen.

Abb. 13(a) zeigt deutlich, daß das Anregungslicht nicht optimal symmetrisch eingestrahlt wird; eine Nachjustierung konnte jedoch bisher nicht erfolgen und soll dann durchgeführt werden, wenn das Meßsystem an seinen endgültigen Aufstellungsort trans-

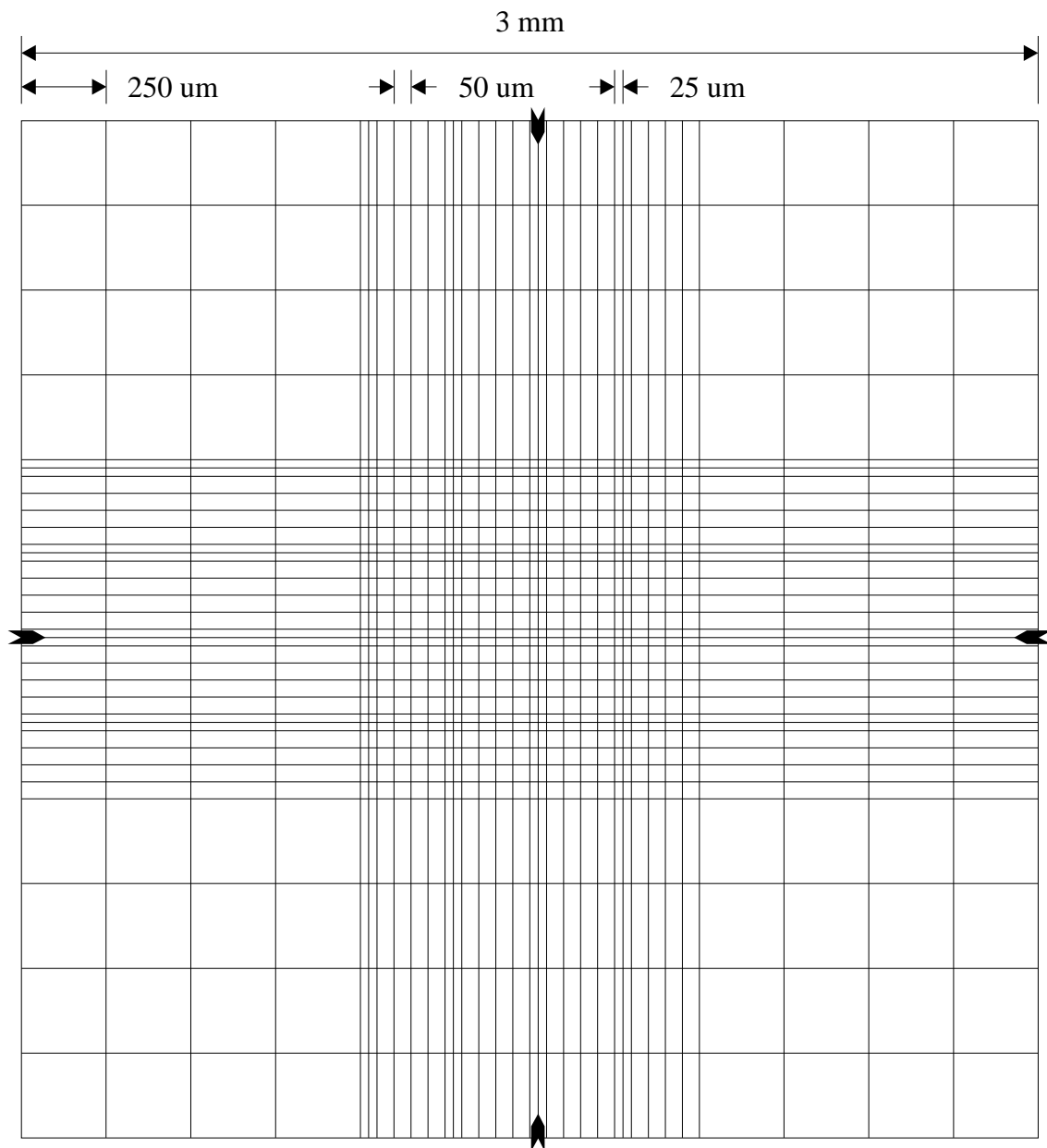


Abbildung 12: Anordnung der Gitterlinien in einer NEUBAUER-Kammer. Die Pfeile markieren die Gitterlinien, auf die bei der Bestimmung der Mittelpunktverschiebung ausgerichtet wurde.

portiert wurde.

Ortsauflösung Die Auswertung dieser Bilder erfolgte mit dem Programm **siscom**, welches zum Lieferumfang der CCD-Kamera gehört. Die Software ermöglicht unter anderem die Darstellung von Längs- und Querprofilen sowie die Aufsummierung der Pixelintensitäten einzelner Spalten oder Zeilen. Die Lage der Intensitätsminima an den Stellen der Gitterlinien konnte so bis auf ± 1 Pixel genau bestimmt werden; und der bekannte Abstand der Gitterlinien ermöglicht das Erstellen von Eichgeraden für die beiden Bilddimensionen.

Die Abbildungen 14, 15 und 16 zeigen die Korrelation zwischen Ortskoordinaten im Original (Abszisse) und im Kamerabild (Ordinate) zusammen mit den jeweiligen Ausgleichsgeraden.

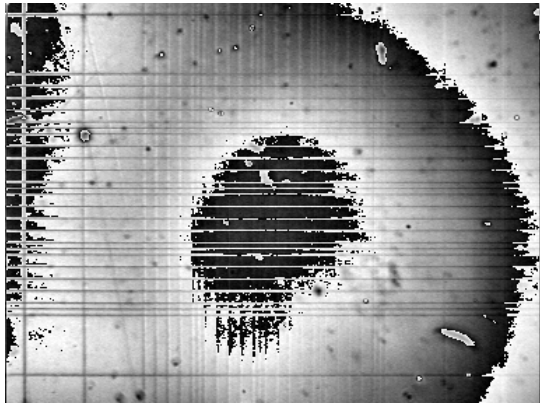
Aus den Kehrwerten der Geradensteigungen ergeben sich direkt die Größen der durch einen Pixel abgebildeten Bereiche des Originalbildes (Tab. 3).

Größe des abgebildeten Bereiches Laut technischer Beschreibung zum Mikroskop zeigt die Photomaske, die in den Strahlengang des Okulars einbringbar ist, mittels eines Rahmens den Bereich an, den eine Kamera am Kameraport auf 24x36-Kleinbild-Film abbilden kann. Wie sich herausgestellt hat, kann die eingesetzte CCD-Kamera jedoch nur einen kleineren Ausschnitt innerhalb des Rahmens abbilden.

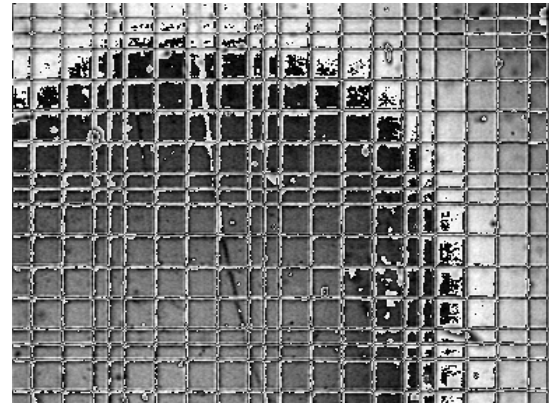
Durch Auszählen der innerhalb des Rahmens liegenden Quadrate konnte so für die drei vorhandenen Objektive der im Okular sichtbare Bereich ausgemessen werden. Aus den Kameraaufnahmen konnte gleichzeitig noch der von der Kamera erfaßte Bereich bestimmt werden, dessen Dimensionen doch deutlich geringer sind, als zunächst angenommen.

Längen- und Flächentreue Als ein Maßstab für die Längentreue kann die Linearität der Beziehung zwischen vertikaler bzw. horizontaler Position und der Pixelkoordinate angesehen werden. Die sich aus den Messungen ergebenden Korrelationskoeffizienten sind ebenfalls in Tab. 3 aufgeführt. Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß die verwendete CCD-Kamera eine hohe Abbildungstreue besitzt, und damit auch genaue Messungen von Geometriegrößen (wie z. B. Umfang oder Querschnittsfläche einer Zelle) mit dem vorliegenden System möglich sind.

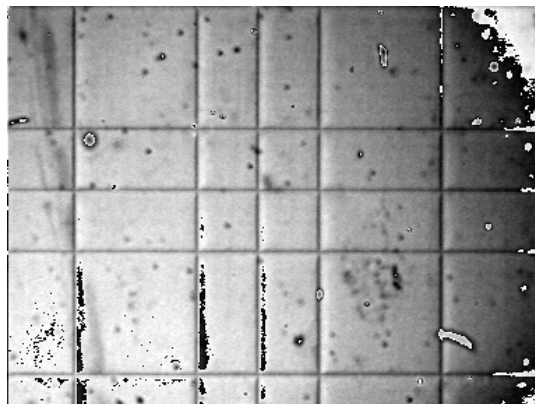
Zeitauflösung Die mit dem Meßsystem maximal erreichbare Zeitauflösung hängt von mehreren, konkurrierenden Faktoren ab. Zum einen muß eine hinreichend große Belichtungszeit (möglich sind Werte zwischen 10 ms und 1000 ms) gewählt werden, um die mitunter schwachen Fluoreszenz-Signale aus dem Untergrund herauszuholen. Sollen lange Sequenzen aufgenommen werden, so reicht (bei mehr als 137 Doppelbildern) die vorhandene RAM-Speicherkapazität nicht mehr aus; und man muß die aufgenommenen Bilder direkt auf einen (deutlich langsameren) Massenspeicher schreiben. Eine untere Grenze für die Bildwiederholzeit setzt der Auslesevorgang der CCD-Kamera, der 119 ms



(a) 4fach-Objektiv. Kantenlänge des Quadrats links unten: $250\mu\text{m}$



(b) 10fach-Objektiv. Kantenlänge des Quadrats links unten: $50\mu\text{m}$



(c) 40fach-Objektiv. Kantenlänge des Quadrats links unten: $50\mu\text{m}$

Abbildung 13: Von der CCD-Kamera erfaßter Ausschnitt bei verschiedenen Vergrößerungen. Dargestellt ist die von der CCD-Kamera registrierte Intensität (Integrationszeit 1000 ms) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm.

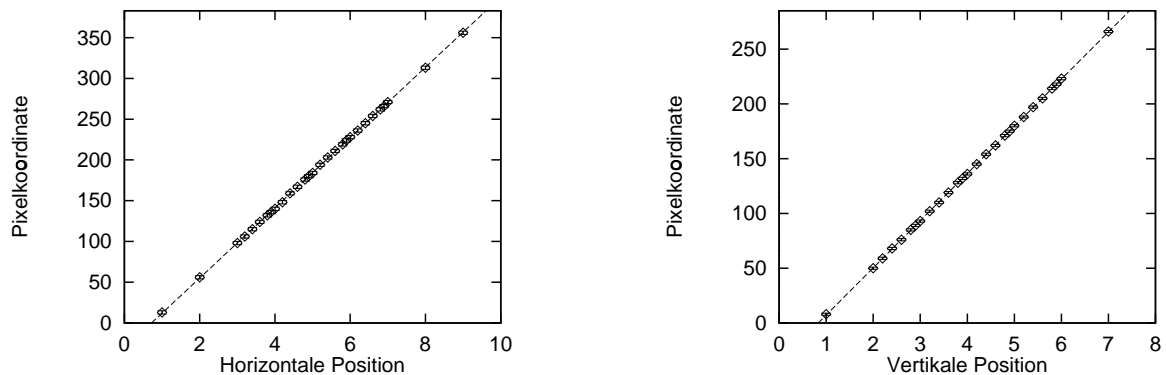


Abbildung 14: Bildgeometrie bei 4facher Vergrößerung.

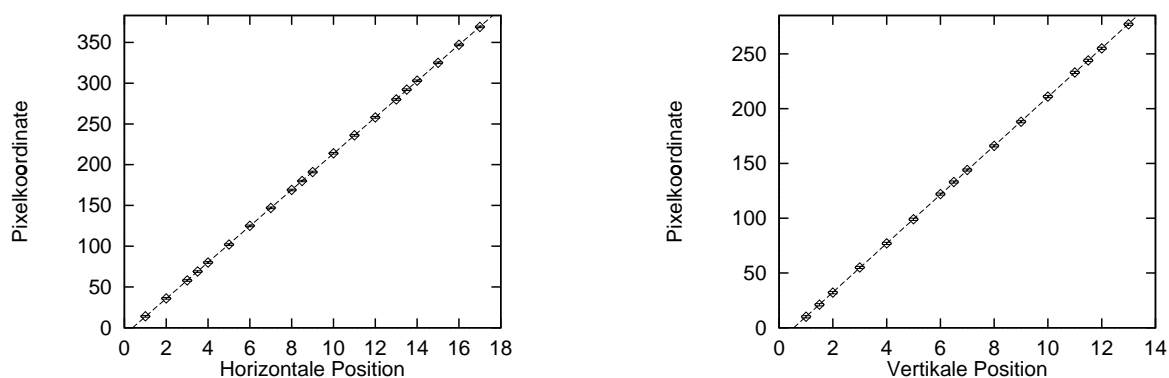


Abbildung 15: Bildgeometrie bei 10facher Vergrößerung.

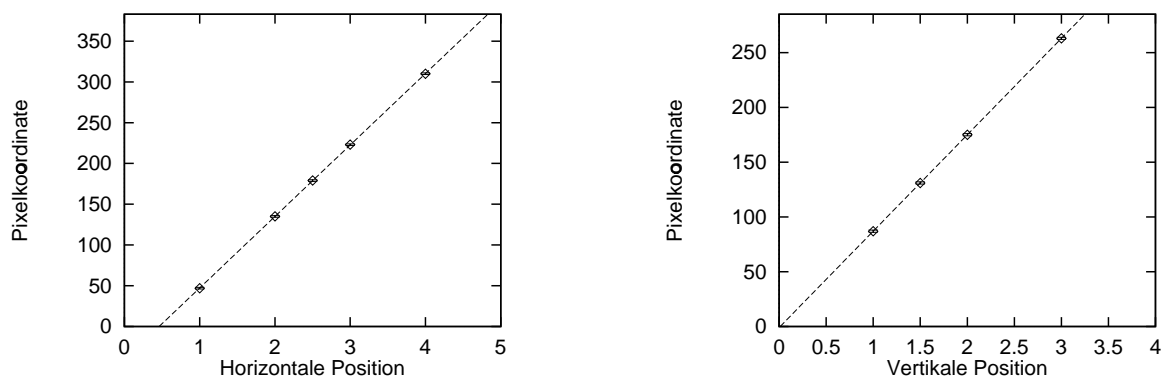


Abbildung 16: Bildgeometrie bei 40facher Vergrößerung. Dargestellt ist die Korrelation zwischen Ortskoordinaten im Original (Abszisse) und im Kamerabild (Ordinate) zusammen mit den jeweiligen Ausgleichsgeraden. Die Meßpunkte bezeichnen die Lagen der Gitterlinien, wie sie aus den Aufnahmen Abb. 13(a)–13(c) bestimmt werden konnten.

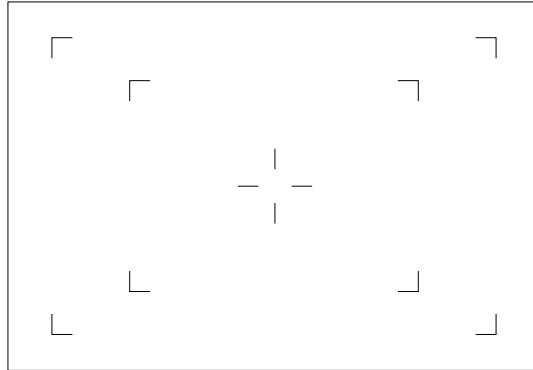


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Photomaske mit dem Zentrierkreuz.

Vergrößerung	4 fach	10 fach	40 fach
Bildgröße Maske (horizontal)	3.25 mm	1.30 mm	325 μm
Bildgröße Maske (vertikal)	2.25 mm	900 μm	225 μm
Bildgröße Kamera (horizontal)	2.00 mm	850 μm	200 μm
Bildgröße Kamera (vertikal)	1.50 mm	600 μm	150 μm
Offset (horizontal)	-12 Pixel	-12 Pixel	-13 Pixel
Offset (vertikal)	-7 Pixel	-6 Pixel	-8 Pixel
Pixelgröße (horizontal)	5.2 μm	2.2 μm	0.52 μm
Pixelgröße (vertikal)	5.2 μm	2.2 μm	0.52 μm
Korrelation (horizontal)	1.0	1.0	1.0
Korrelation (vertikal)	1.0	1.0	1.0

Tabelle 3: Abbildbare Bereiche bei verschiedenen Vergrößerungen. Angegeben sind horizontale und vertikale Ausdehnung des Bildes innerhalb der Photomaske und der Kamera, die Verschiebung des Mittelpunkts, die Größe eines Bildpunktes und die erreichbare Ortsauflösung, zusammen mit den Korrelationsgrößen für die Linearität der Abbildung.

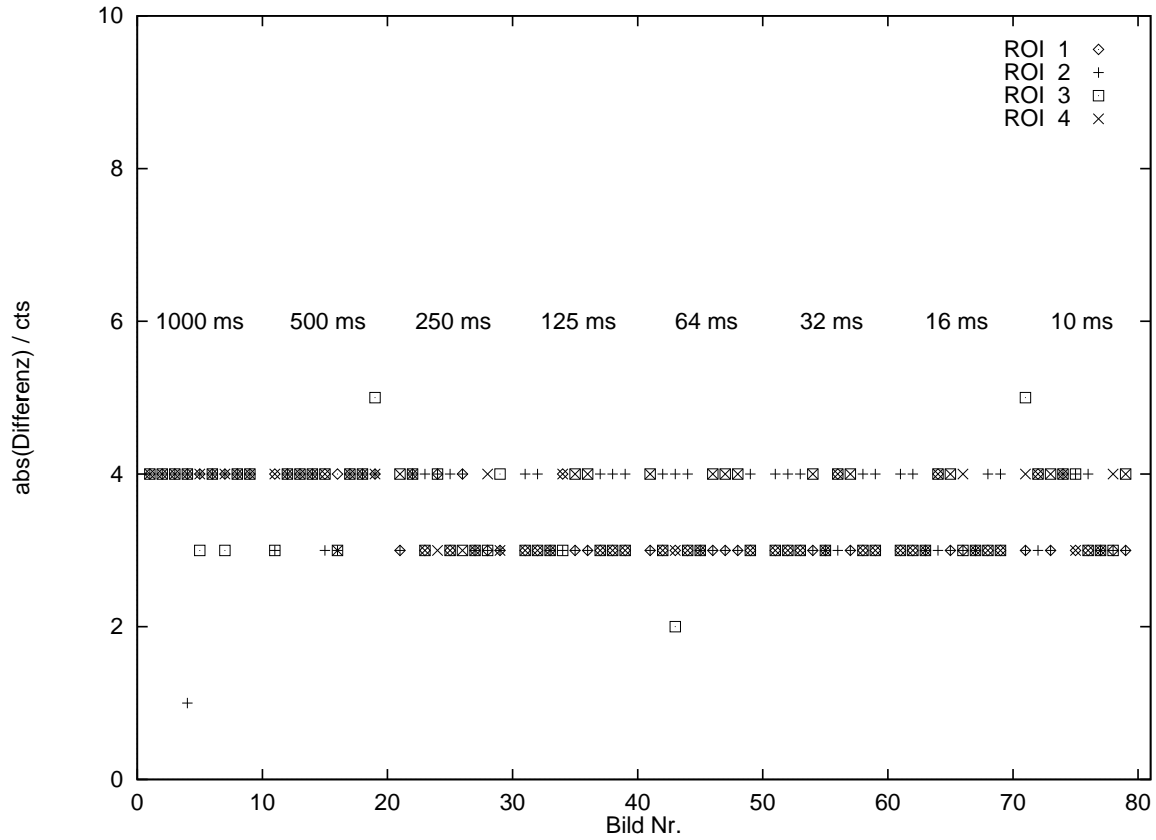


Abbildung 18: Systemeigenes Untergrundrauschen. Dargestellt ist $|R(t + dt) - R(t)|$, gemittelt über jeweils ein Viertel des Gesamtbildes. dt betrug dabei 5000 ms; R ist das 340/380-Verhältnis bei der jeweils angegebenen Anregungszeit.

dauert.²³

Tab. 4 zeigt eine Übersicht über die in den verschiedenen Betriebsarten erreichbaren minimalen Bildwiederholzeiten. Hier zeigt sich übrigens ein weiterer Schwachpunkt von FUCAL, durch parallele Verarbeitung (d. h. Abspeichern und Analysieren eines ausgelesenen Bildes während bereits wieder eine Belichtung läuft) hätte eine minimale Bildwiederholzeit von nur 120 ms garantiert werden können.

Natürlich besteht für die erreichbare Zeitauflösung noch eine andere Randbedingung, nämlich ein ausreichender Signalkontrast. Wegen der Subtraktion des Dunkelbildes und aufgrund des systemeigenen Rauschens zeigen die aufgenommenen Bilder ein von der Integrationszeit unabhängiges Untergrundrauschen von etwa ± 4 cts (Abb. 18); für ein vernünftig auswertbares Signal sind daher Signalintensitäten von mindestens 100 cts anzustreben.

²³Dieser Wert ergibt sich aus der Pixelanzahl ($286 * 384 = 109824$) und einer Ausleserate von 920 kHz. Unerklärlicherweise liegt der Dokumentation zum CCD-Kamerasystem ein Datenblatt für einen 500 kHz-A/D-Wandler bei, mit dem allenfalls die halbe Ausleserate zu realisieren wäre.

Speicher	Belichtungszeit	Bildwiederholzeit	Bildwiederholzeit bei Online-Darstellung
RAM	1000 ms	1006 ms	1256 ms
	500 ms	506 ms	756 ms
	250 ms	256 ms	506 ms
	125 ms	155 ms	405 ms
	64 ms	155 ms	405 ms
	32 ms	155 ms	405 ms
	16 ms	155 ms	405 ms
	10 ms	155 ms	405 ms
RAM	2·1000 ms	2012 ms	2362 ms
	2·500 ms	1012 ms	1362 ms
	2·250 ms	512 ms	862 ms
	2·125 ms	310 ms	660 ms
	2·64 ms	310 ms	660 ms
	2·32 ms	310 ms	660 ms
	2·16 ms	310 ms	660 ms
	2·10 ms	310 ms	660 ms
Harddisk	1000 ms	1425 ms	1675 ms
	500 ms	925 ms	1175 ms
	250 ms	675 ms	925 ms
	125 ms	550 ms	800 ms
	64 ms	489 ms	739 ms
	32 ms	457 ms	707 ms
	16 ms	441 ms	691 ms
	10 ms	435 ms	685 ms
Harddisk	2·1000 ms	2842 ms	3192 ms
	2·500 ms	1842 ms	2192 ms
	2·250 ms	1342 ms	1692 ms
	2·125 ms	1116 ms	1466 ms
	2·64 ms	1055 ms	1405 ms
	2·32 ms	1023 ms	1373 ms
	2·16 ms	1007 ms	1357 ms
	2·10 ms	1001 ms	1351 ms

Tabelle 4: Minimale Bildwiederholzeiten in Abhängigkeit von verwendetem Speicher und Belichtungszeit.

5.2. Das Superfusionssystem

Um Messungen zu ermöglichen, bei denen die Zellprobe längere Zeit auf dem Mikroskop verbleiben muß, wurde eine einfache Superfusionsanlage (s. Abb. 8) entwickelt. Diese ermöglicht es einerseits, eine definierte Umgebung hinsichtlich Temperatur und Zusammensetzung des Puffers gewährleisten zu können, andererseits sollte damit auch die Möglichkeit geschaffen werden, zur Pufferlösung hinzugefügte Pharmaka wieder entfernen zu können und so die Durchführung von Experimenten mit wechselnder Zellumgebung zu gestatten.

Da die Förderleistung der Perfusionspumpe naturgemäß vom hydraulischen Widerstand des Schlauchsystems abhängt, wurde für den an der Pumpe befindlichen Geschwindigkeitssteller zunächst eine Eichkurve aufgenommen. Dazu wurden jeweils alle vier Vorratsflaschen mit H_2O befüllt, durch Pumpen mit maximaler Pumpleistung die eingeschlossene Luft aus allen Schläuchen und Hähnen verdrängt und anschließend die Fördermenge über der Zeit gemessen. Dabei waren alle vier Kanäle gleichzeitig in Betrieb. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen zeigt Abb. 19(a).

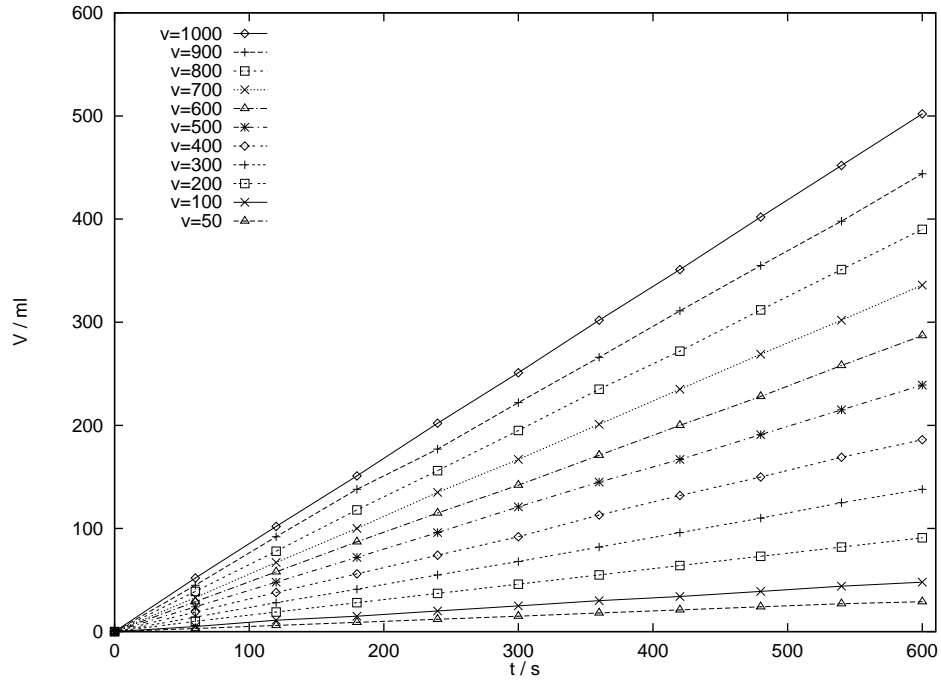
Hieraus läßt sich die Förderleistung für verschiedene Positionen des Geschwindigkeitsstellers einfach bestimmen und eine Eichkurve (Abb. 19(b)) erstellen.

Zusätzlich wurde bestimmt, ob und wie schnell ein vollständiger Austausch der Puffermenge im Deckgläschen erzielt werden kann. Dazu wurden die Kanäle A und B der Superfusionsanlage mit reinem Wasser befüllt, die Kanäle C und D mit einer Lösung von $1\text{ }\mu\text{M}$ Fluorescein in Wasser und an den markierten Zeitpunkten zwischen den beiden Kombinationen A,B und C,D umgeschaltet. Abb. 20 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz-Intensität für verschiedene Pumpgeschwindigkeiten. Die Schwankung des Signals bei Vorhandensein von Fluorescein ist ein Artefakt, der sich durch den oszillierenden Wasserspiegel im Deckgläschen erklären läßt; eine Problematik, die bei echten Fluoreszenz-Messungen wegen der nur geringen Autofluoreszenz der Puffermedien keine Rolle spielt.

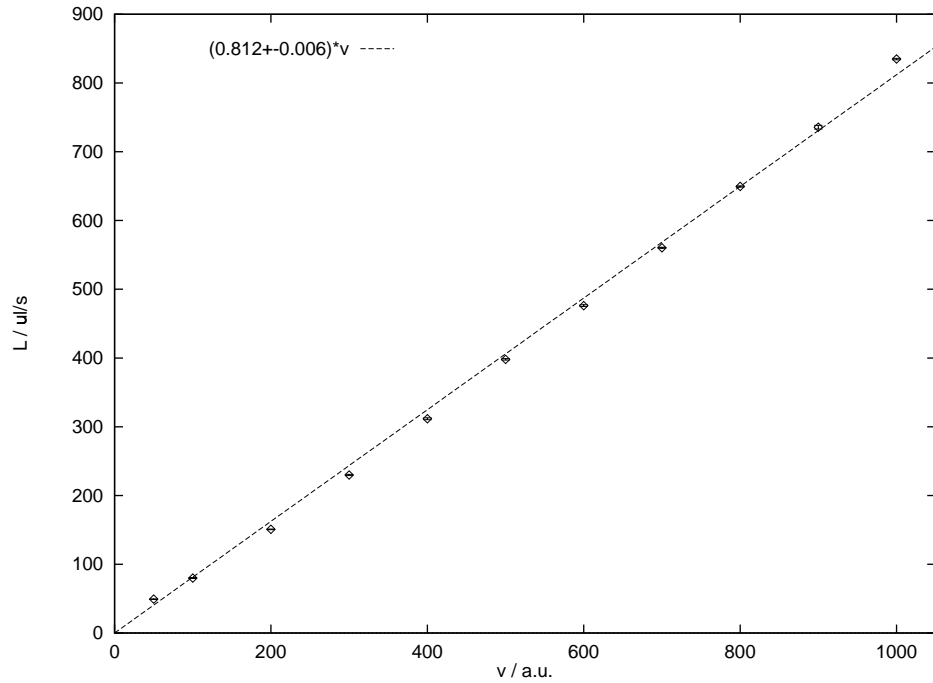
Das gesamte Füllvolumen aller in der Superfusionsanlage verwendeten Schläuche und Hähne beträgt nur 47 ml, so daß auch Pufferlösungen, die teurere Materialien beinhalten, verwendet werden können. Der Totraum, dessen Volumen bei einem Lösungswechsel ausgetauscht werden muß, konnte durch Verwendung dünner Schläuche und einen geeigneten räumlichen Aufbau der Komponenten auf unter 3 ml reduziert werden.

Der beschriebene Aufbau führt wegen der geringen Volumina auch zu einer ausgezeichneten Temperaturstabilität des Superfusats. Abb. 5.2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Superfusattemperatur, wie sie am Ausgang der Superfusionskanüle gemessen wurde. Stellt sich auch eine Gleichgewichtstemperatur ein, die etwa 3°C unter der Temperatur des Wasserbades liegt (37°C), so wird dieser Wert schnell erreicht und bleibt auch bei geringen Durchflußmengen langfristig konstant.

Im Zusammenhang mit dem Thema Superfusion darf jedoch die Problematik des durch die Superfusion erzeugten mechanischen Einflusses auf die Zellschicht nicht unerwähnt bleiben. In [17] findet sich eine Betrachtung der unterschiedlichen Ca^{2+} -Antworten von Endothelzellen, die Flüssigkeitsströmungen ausgesetzt wurden, während sich [38] mit Änderungen der morphologischen Struktur unter Kraftfeldern beschäftigt. Für vergleich-

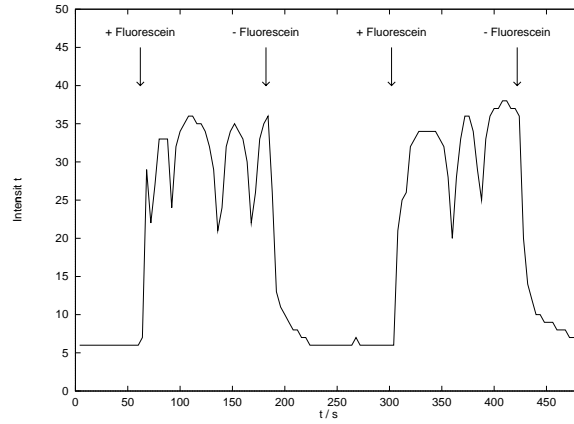


(a) Fördermenge. Dargestellt ist das in der Zeit t mit allen vier Kanälen geförderte Volumen V bei verschiedenen Einstellungen der Pumpgeschwindigkeit v .

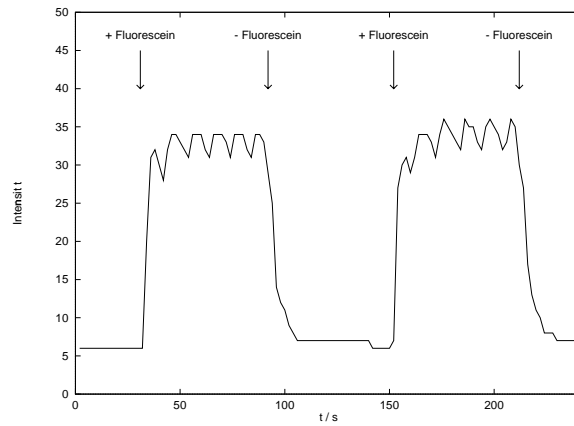


(b) Förderleistung. Dargestellt ist die mittlere Förderleistung (Volumen/Zeit) über der Pumpgeschwindigkeit v und die zugehörige Ausgleichsgerade.

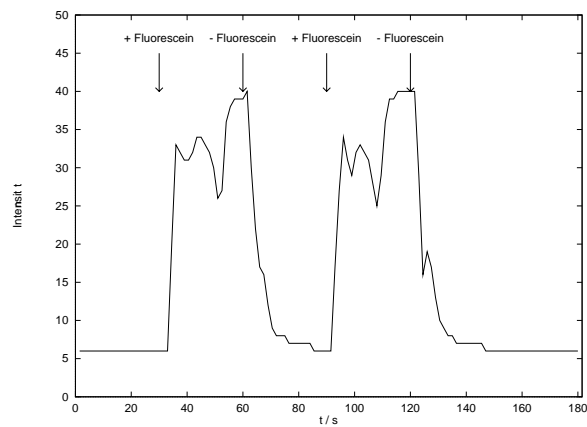
Abbildung 19: Fördermenge und Förderleistung der Perfusionspumpe Gilson Minipuls-2 in Abhängigkeit von der eingestellten Pumpgeschwindigkeit.



(a) $v=250$.



(b) $v=500$.



(c) $v=750$.

Abbildung 20: Lösungswechsel mit der Superfusionsanlage. Dargestellt ist die über 1000 ms integrierte Emissionsintensität bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm. Als Superfusat wurde abwechselnd Wasser und $1\mu\text{M}$ Fluoresceinlösung eingespült.

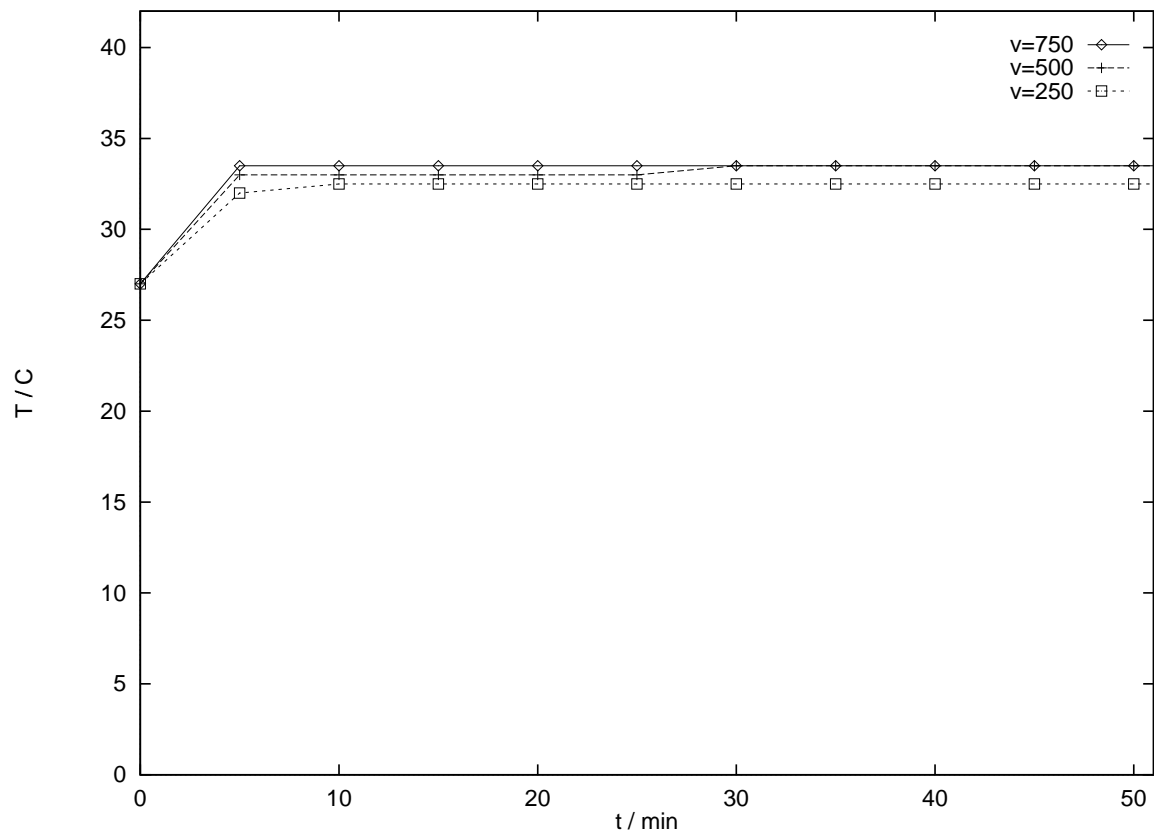


Abbildung 21: Temperatur des Superfusats in Abhängigkeit von der eingestellten Pumpgeschwindigkeit.

bare Messungen ist es daher wichtig, die Strömungsverhältnisse exakt zu reproduzieren, was sich am einfachsten dadurch erreichen läßt, daß während der eigentlichen Messung keine Superfusion erfolgt (soweit möglich), bzw. konstante Superfusionsraten benutzt werden.

5.3. Optimale Fura-2-Konzentration

Die in die Zelle eingebrachte Farbstoffmenge stellt in der Fluoreszenz-Spektrometrie einen wichtigen Parameter dar, dessen geeignete Größe von entscheidender Bedeutung für die Qualität der durchgeführten Messungen ist. Einerseits soll eine möglichst hohe Farbstoff-Konzentration verwendet werden, um damit ein intensives, rauscharmes Signal zu erhalten, andererseits darf der Einfluß des Farbstoffes auf den Ca^{2+} -Haushalt der zu beobachtenden Zellen nicht zu groß sein.

Fura-2 bindet schon in geringen Konzentrationen große Mengen Ca^{2+} und stört damit unter ungünstigen Umständen die normale Ca^{2+} -Regulation.

Die in der Literatur verwendeten Fura-2-Konzentrationen bewegen sich von $2\mu\text{mol/l}$ [9] bis hin zu $10\mu\text{mol/l}$ [26]. Eine Meßreihe sollte daher Aufschluß darüber gehen, welche Konzentrationen in diesem Bereich für die vorliegende Aufgabe am besten geeignet sind.

HUVEC einer Passage 2 wurden dazu auf identische Deckgläschen ausgesät und gemäß dem Standardprotokoll mit Fura-2/AM beladen. Die Endkonzentration an Fura-2 betrug dabei jedoch $1\mu\text{mol/l}$ bis $7\mu\text{mol/l}$. Die Zellen wurden dann jeweils mit $4\mu\text{mol/l}$ Bradykinin zur Ca^{2+} -Freisetzung stimuliert und die Rückkehr in den Ruhezustand beobachtet. Abb. 5.3 zeigt repräsentative Ergebnisse aus der mehrfach wiederholten ($n=3$) Versuchsreihe.

Als ein Kriterium, ob die Beladung mit Farbstoff jeweils erfolgreich war, läßt sich außerdem der optische Eindruck verwenden. Abb. 23(a) zeigt Zellen, die die Vorbehandlung und das Beladen gut überstanden haben; Abb. 23(b) zeigt Zellen, die im Zuge der Vorbereitungen —z. B. durch unbeabsichtigte Unterkühlung oder durch mechanischen Streß— geschädigt worden sind. Von solchen Zellen sind im allgemeinen keine reproduzierbaren Resultate zu erwarten.

Als Ergebnis dieser Meßreihen empfiehlt es sich, künftig eine Fura-2-Konzentration von $4\mu\text{mol/l}$ zu verwenden²⁴.

5.4. Photobleaching

Fura-2 unterliegt —wie alle anderen Fluoreszenz-Farbstoffe auch— dem Photobleaching. Durch Einstrahlung des ultravioletten Anregungslichtes werden nicht nur Fura-2-Moleküle angeregt; ein geringer Teil wird auch irreversibel zerstört, so daß die Menge an aktivem Farbstoff in der Zelle mit zunehmender Bestrahlungsdauer abnimmt.

Damit verbunden sind mehrere Nachteile: Es vermindert sich die absolute Signalstärke mit sinkender Fura-2-Konzentration (was zwar durch das Ratio-Verfahren aufge-

²⁴Diese Experimente wurden mit Zellen, die auf Gelatinelösung B ausgesät worden waren, durchgeführt. Für Zellen auf vernetzter Gelatine hat sich später eine geringere Fura-2-Konzentration ($2\mu\text{mol/l}$) als geeigneter erwiesen.

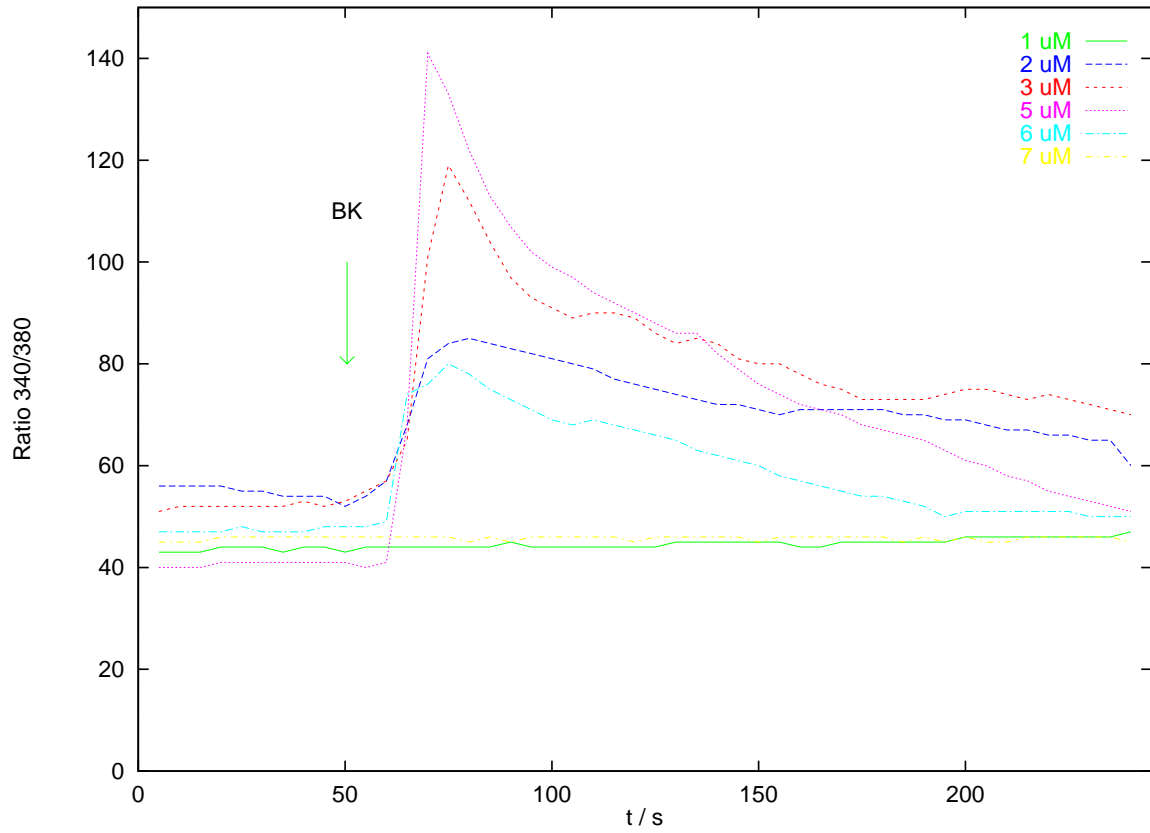
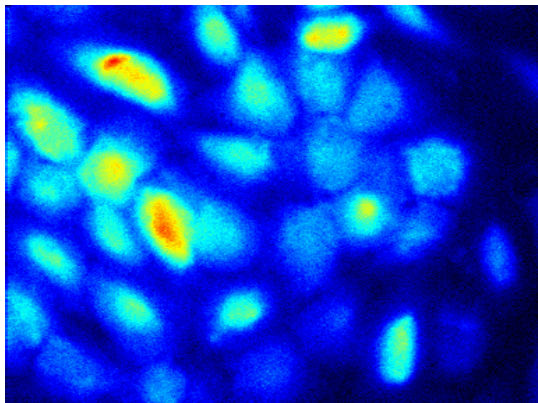
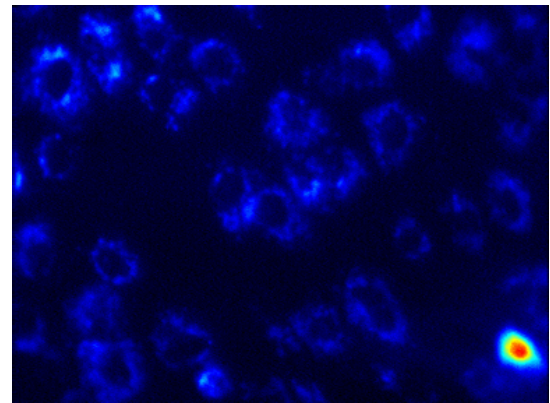


Abbildung 22: Reaktion auf eine Stimulation mit $4 \mu\text{mol/l}$ Bradykinin (BK) in Abhängigkeit von der eingesetzten Fura-2-Konzentration.



(a) Verband vitaler Zellen.



(b) Verband beschädigter Zellen.

Abbildung 23: Optische Unterscheidungsmöglichkeit zwischen vitalen und beschädigten Zellen.

fangen wird, jedoch zu einer Verringerung des Signal-Rausch-Verhältnisses führt); und die entstehenden Zerfallsprodukte sind möglicherweise zellschädigend oder gar toxisch. Hinzu kommt noch, daß unter Umständen eine Farbstoffmodifikation auftritt, die zwar fluoresziert, aber nicht Ca^{2+} -empfindlich ist [3].

Eine Meßreihe sollte daher Aufschluß darüber geben, ob und in welchem Ausmaß Photobleaching in HUVEC eine entscheidendes Problem darstellt.

Zellen einer Passage 2 wurden dazu auf zwei identischen Deckgläschen kultiviert und unabhängig voneinander mit $40\mu\text{M}$ Fura-2/AM beladen. Die eine Probe wurde dann über einen Zeitraum von 60 min intensiv bestrahlt (1000 ms bei 340 nm, 1000 ms bei 380 nm und 6000 ms bei 360 nm pro Minute), während die Kontrollprobe einer eher normalen Lichtmenge ausgesetzt wurde (1000 ms bei 340 nm und 1000 ms bei 380 nm pro Minute).

Abb. 24 zeigt typische ($n=3$) Ergebnisse. Man erkennt deutlich, daß sich durch Photobleaching (selbst nach einer Belichtungsdauer von mehr als 480 s) kaum eine signifikante Änderung des Ratiowertes ergibt, wohl aber ein deutlicher Abfall der einzelnen Signalintensitäten zu bemerken ist.

5.5. Quantifizierte Ca^{2+} -Messungen

Für das Studium der Ca^{2+} -Regulation in Zellen ist es mitunter wünschenswert, neben qualitativen Aussagen zum zeitlichen Verlauf des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels auch quantitative Vergleiche zwischen verschiedenen Experimenten durchführen zu können. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele, bei denen absolute Ca^{2+} -Konzentrationen unter Ruhebedingungen, nach chemischer Stimulation oder mechanischer Reizung von Endothelzellen angegeben werden; oft mit einer Ungenauigkeit von weniger als 10 %.

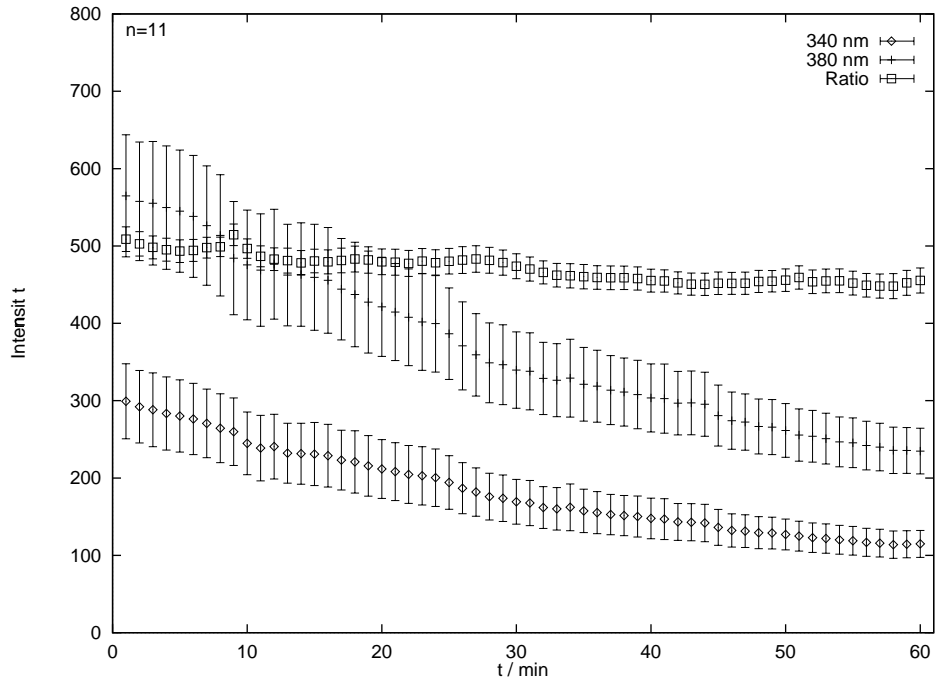
Es wurde daher der Versuch unternommen, mit den zur Verfügung stehenden Mitteln eine quantitative Ca^{2+} -Messung durchzuführen. Auf ein Deckgläschen kultivierte und mit $2\mu\text{M}$ Fura-2/AM beladene Zellen wurden mit $600\mu\text{M}$ ATP stimuliert; nach Rückkehr der Ca^{2+} -Antwort auf den Ruhewert wurde durch Zellyse mit $20\mu\text{l}$ Triton die vollständige Ca^{2+} -Sättigung des vorhandenen Farbstoffes bewirkt. Anschließend wurde durch Zugabe von $20\mu\text{l}$ Na/EGTA (Endkonzentration $8\mu\text{M}$) ein ausreichend niedriger Ca^{2+} -Spiegel erzeugt. Den Signalverlauf zeigt Abb. 25.

Hieraus bestimmt man nun folgende Größen:

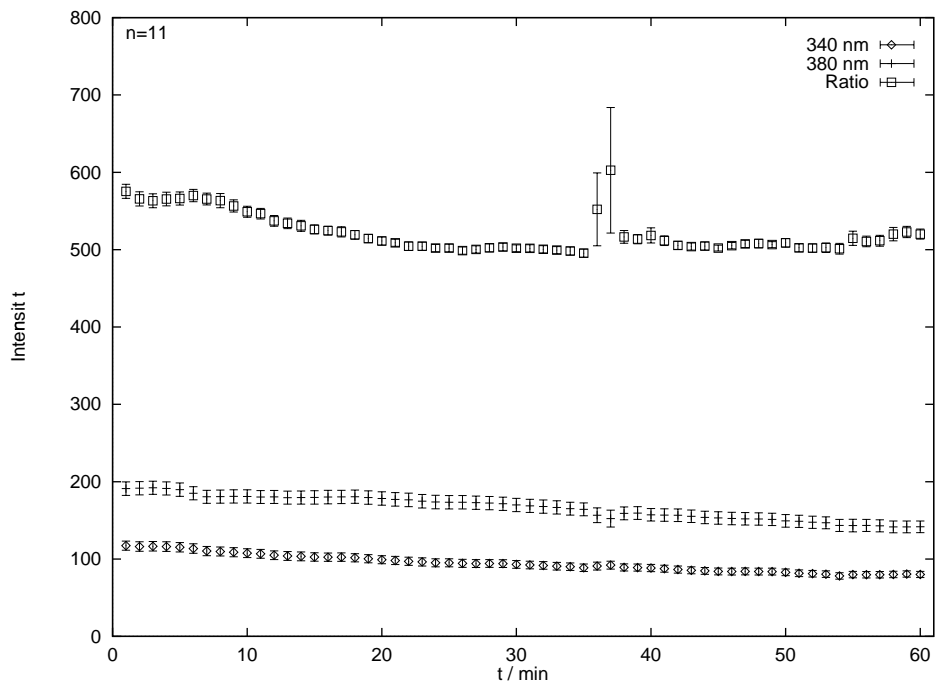
R_{max}	482.0	± 9.2
R_{min}	0.00	± 0.00
R_{Ruhe}	51.32	± 0.56
$R_{Thrombin}$	117.5	± 5.5
S_{f2}	48.2	± 3.6
S_{k2}	56.1	± 3.3

und man erhält mit $K_d = 224\mu\text{M}$ und $\beta = S_{f2}/S_{k2} = 0.859 \pm 0.095$ gemäß der in 2.4.4 angegebenen Formel sofort:

Ca^{2+} -Ruhekonzentration	$229\mu\text{M} \pm 22\mu\text{M}$
Ca^{2+} -Maximalwert	$620\mu\text{M} \pm 68\mu\text{M}$



(a) 8000 ms Anregung pro Minute.



(b) 2000 ms Anregung pro Minute.

Abbildung 24: Photobleaching durch intensive Bestrahlung.

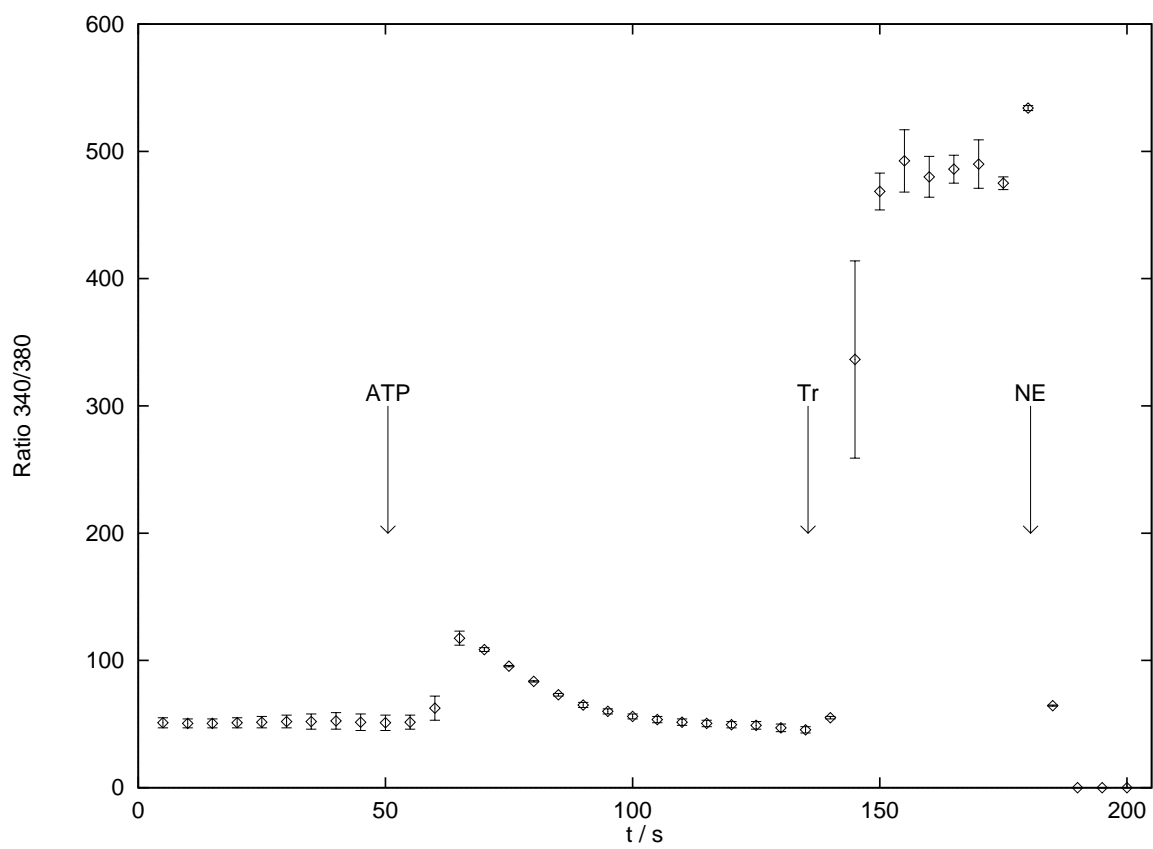


Abbildung 25: Stimulation mit 600 μ M ATP und anschließender Kalibrationsschritt mit Triton (Tr) und Na/EGTA (NE).

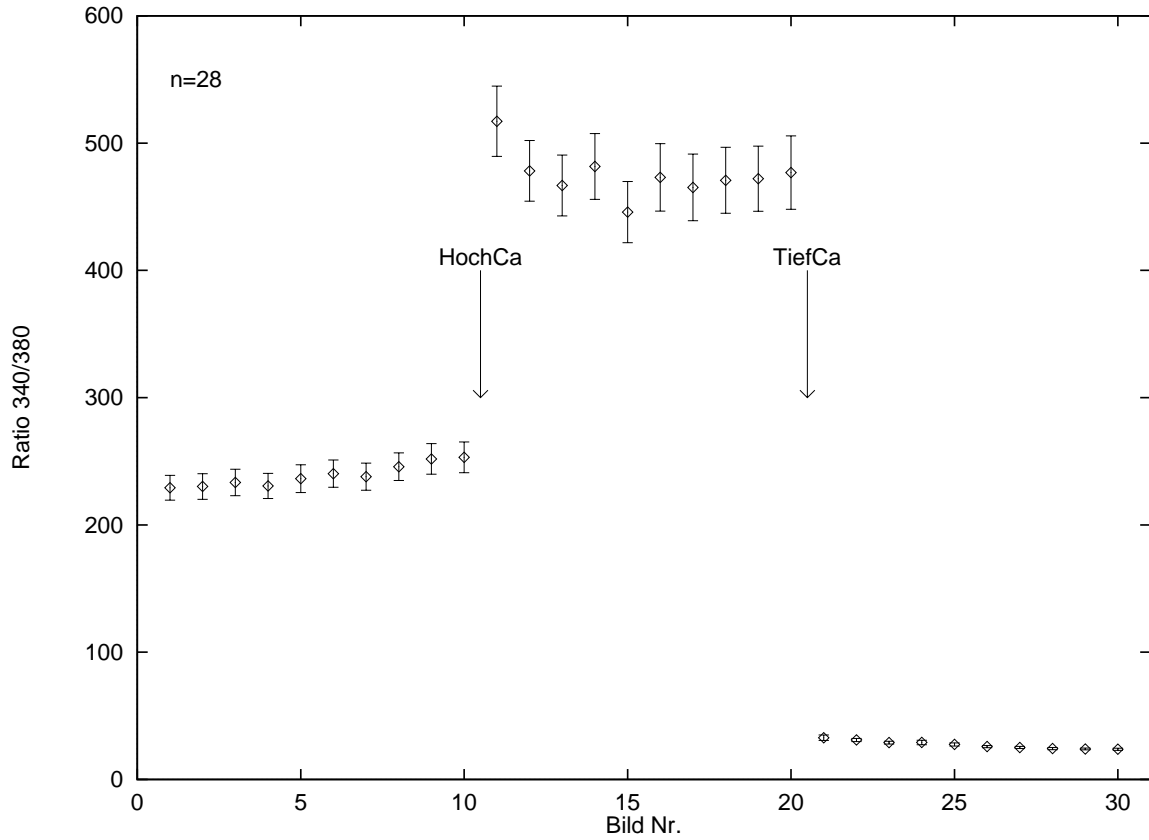


Abbildung 26: Kalibrationsschritt mit Ionomycin.

Problematisch an dieser Methode ist die Tatsache, daß durch die Lyse der Zellen Cytosol und Außenmedium vermischt werden. Hierdurch ändern sich viele für das Fluoreszenz-Signal entscheidende Parameter (u. a. pH-Wert, Ca^{2+} -Konzentration, Fura-2-Konzentration) gleichzeitig, so daß die Signaländerung schwierig zuzuordnen ist. Aus diesem Grund scheinen Kalibrationen, bei denen nur die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration verändert wird, besser geeignet.

Ein solches Experiment, bei dem anstelle der Zellyse mit Triton das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin verwendet wurde, zeigt Abb. 26. Nach der Aufnahme des Ruhezustandes in HBS:Ca wurde die Außenlösung gegen Ca^{2+} -reiche Lösung (HochCa) ausgetauscht, und danach durch Permeabilisierung der Zellmembran mit $4\mu\text{M}$ Ionomycin das Cytosol Ca^{2+} -gesättigt. Es wurden zehn weitere Bilder aufgenommen, die Außenlösung durch nominell Ca^{2+} -freie Lösung (TiefCa) ersetzt, erneut permabilisiert und die abschließenden zehn Bilder aufgenommen.

Die Auswertung ergab die folgenden Ergebnisse:

R_{max}	475	± 18
R_{min}	27.2	± 3.2
R_{Ruhe}	238.8	± 8.8

Damit berechnet sich die Ca^{2+} -Ruhekonzentration zu $172\mu\text{M} \pm 25\mu\text{M}$, ein Wert, der in-

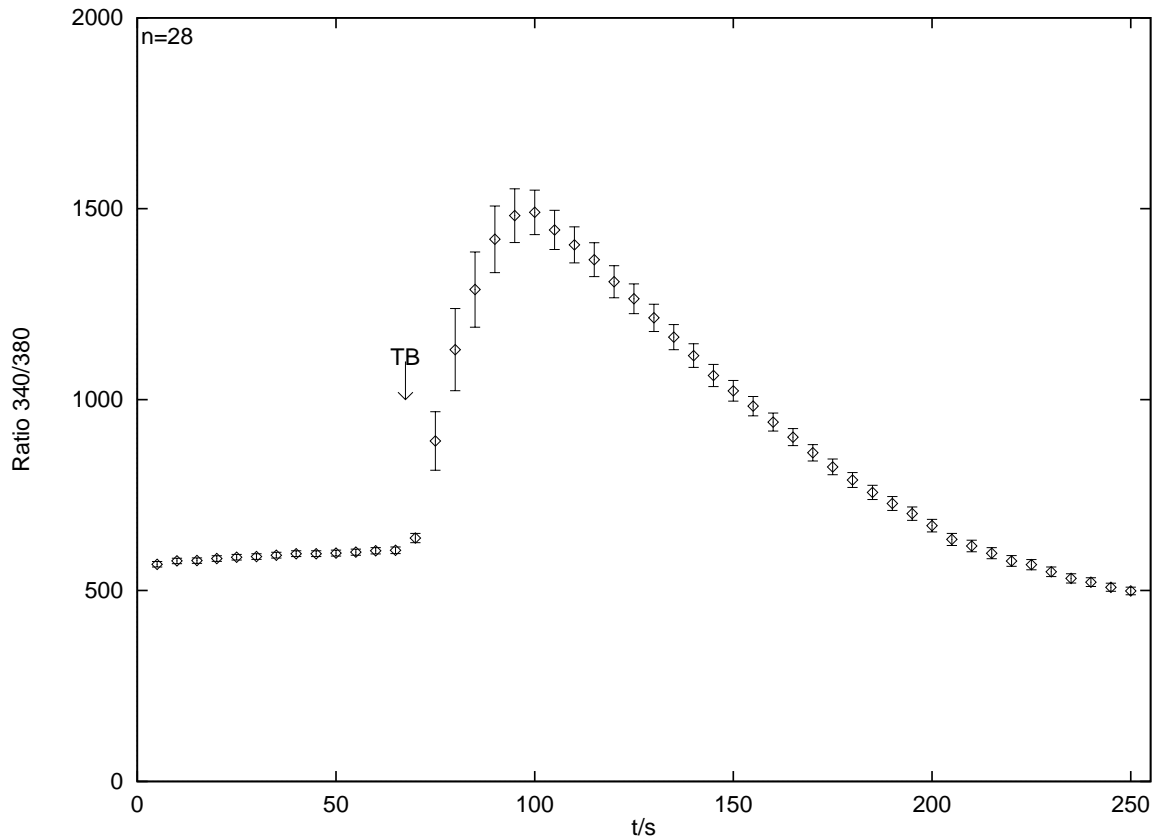


Abbildung 27: Transienter Ca^{2+} -Anstieg nach Stimulation mit 3 U/ml Thrombin

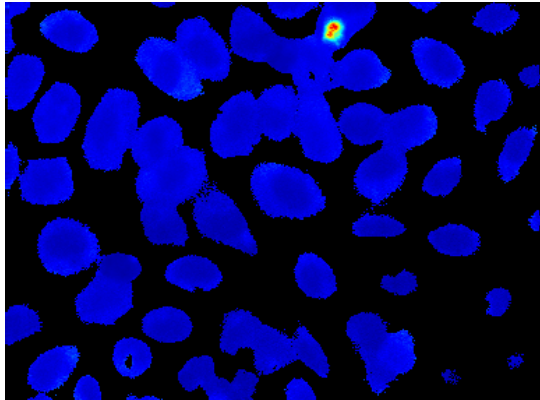
nerhalb der Fehlergrenzen fast mit dem Wert aus der Triton/EGTA-Kalibration übereinstimmt.

5.6. Wirkung von Thrombin

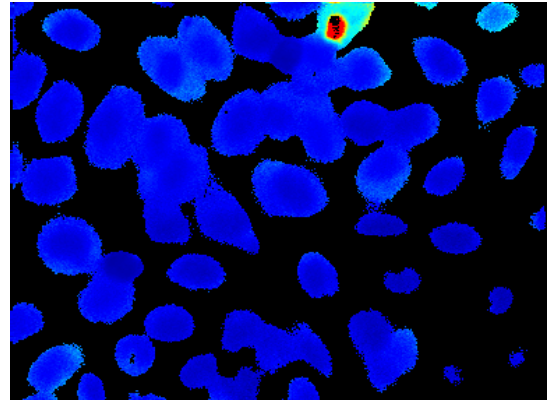
Abschließend wurden einige exemplarische Versuche durchgeführt, die sich an bereits in der Literatur beschriebene Experimente anlehnen, um die Leistungsfähigkeit des Meßsystems in seinem gegenwärtigen Zustand zu demonstrieren.

Auf einem Deckgläschen kultivierte, mit $4\mu\text{M}$ Fura-2/AM beladene HUVEC wurden mit 3 U/ml Thrombin (Sigma T-6884) stimuliert. Abb. 27 zeigt den rapiden Ca^{2+} -Anstieg sowie die Rückkehr in den Ruhezustand nach etwa 180 s. Dies deckt sich gut mit dem entsprechenden Literaturwert ([26, S. 725], 150 s bei 1 U/ml Thrombin.)

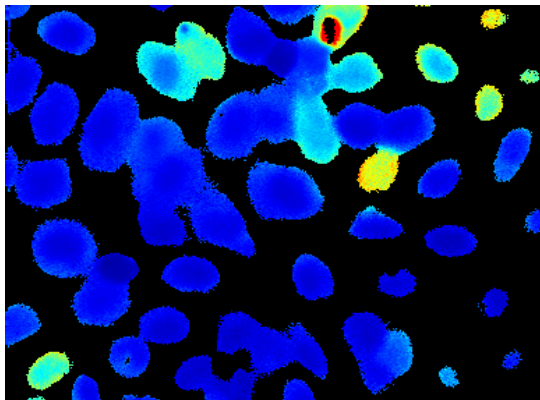
Besonders repräsentativ läßt sich der gleiche Sachverhalt auch als farbige Bildsequenz (Abb. 28) darstellen. Die Ratio-Bilder ausgewählter Zeitpunkte wurden unter Beibehaltung eines einheitlichen Wertebereiches skaliert, so daß sich die Zellantwort direkt erkennen läßt. Blau bedeutet dabei niedrige Ca^{2+} -Konzentration, rot hohe.



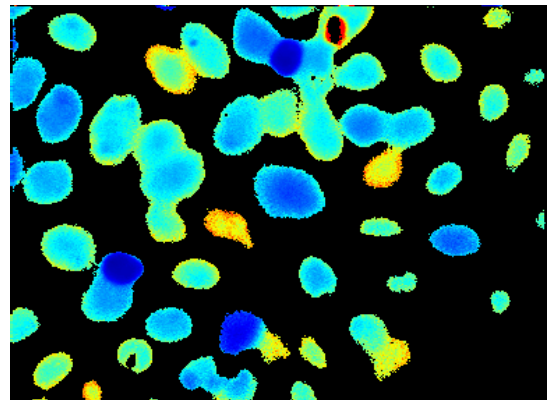
(a) Ruhezustand.



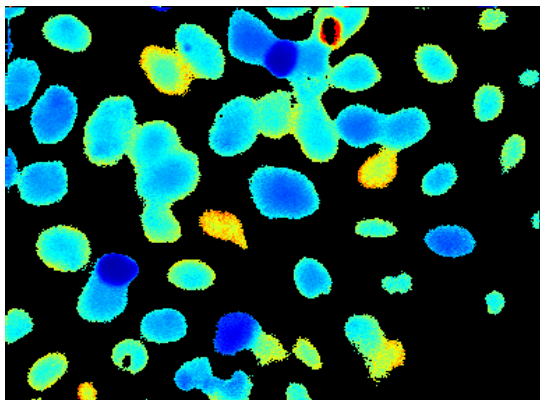
(b) 0 s.



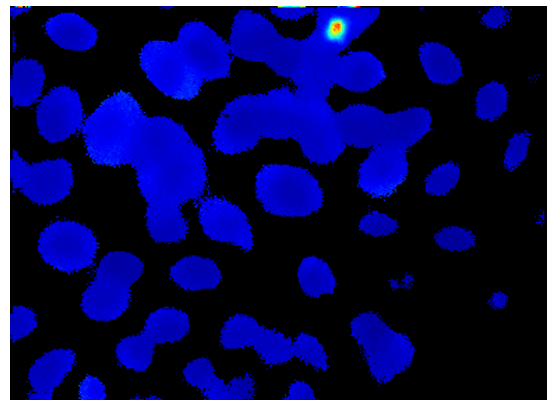
(c) 5 s.



(d) 30 s.



(e) 35 s.



(f) 185 s.

Abbildung 28: Transienter Ca^{2+} -Anstieg nach Stimulation mit 3 U/ml Thrombin ($t = 0 \text{ s}$).

5.7. Artefakte

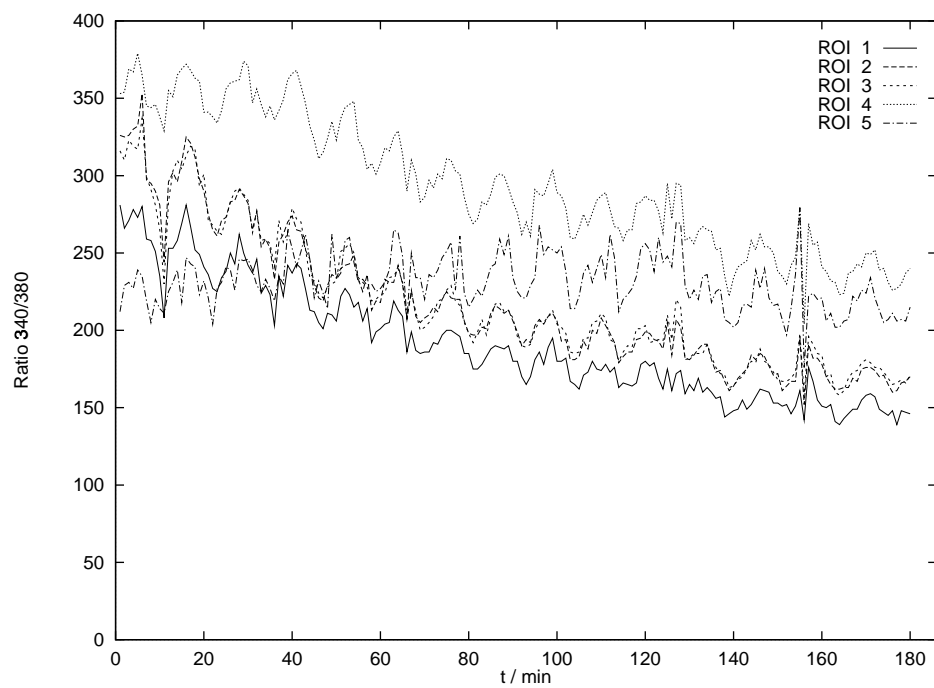
Bei einem komplexen System wie dem hier vorgestellten ist es unvermeidlich, daß die aufgenommenen Meßdaten frei von Artefakten, also durch die Meßmethode hervorgerufenen Verfälschungen, sind. Es konnten allerdings im Zuge der Durchführung der Experimente kaum Effekte beobachtet werden, die eindeutig auf derartigen Fehlern beruhen; ein einziges Experiment lieferte allerdings ein auffälliges Ergebnis, das nicht vorenthalten werden soll.

Abb. 29(a) zeigt das Ergebnis einer Meßreihe, mit der die Zuverlässigkeit der Superfusionsanlage überprüft werden sollte. Mit $2\mu\text{M}$ Fura-2 beladene Zellen wurden über einen Zeitraum von 180 min mit HBS:Ca superfundiert ($v = 100$, Kanäle A–D offen); alle 60 s wurde ein Doppelbild (Belichtungszeit je 1000 ms) aufgenommen.

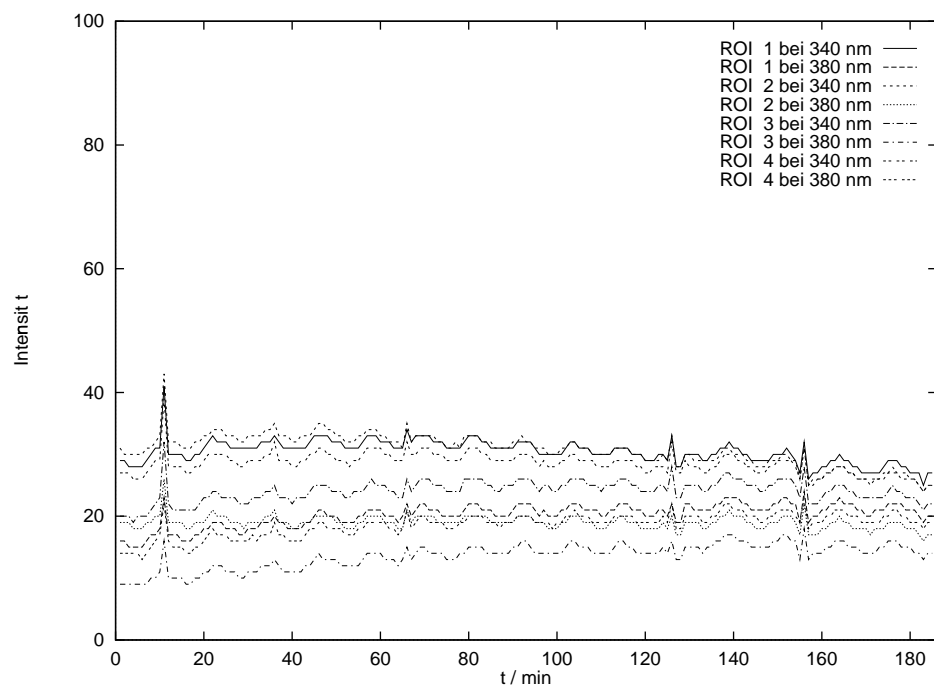
Deutlich ist zu erkennen, wie sich minimale, periodische Schwankungen in den Emissionssignalen (Abb. 29(b)) auf das 340/380-Verhältnis auswirken und das Vorhandensein von niederfrequenten ($T \approx 11.4$ min) Ca^{2+} -Oszillationen vortäuschen. Solche Oszillationen sind zwar bereits beschrieben worden [4], der Effekt ließ sich aber nicht reproduzieren; und außerdem ist nicht zu erwarten, daß (wie hier) alle beobachteten Zellen gleichphasige Oszillationen ausführen. Die Schwankungen sind vielmehr wahrscheinlich auf den oszillierenden Superfusatpegel im Deckgläschen zurückzuführen und fallen wegen der in diesem Experiment aufgetretenen niedrigen Signalintensitäten besonders ins Gewicht.

Die außerdem aufgetretenen Störspitzen wurden durch das Anlaufen des Kühlaggregates verursacht, was regelmäßig zu einem instabilen Brennverhalten der Xenon-Lampe führte. Dieses Problem kann erst mit dem Umzug in das seit langem geplante²⁵ Dunkel-labor gelöst werden, da erst dort mehrere Netzphasen zur Verfügung stehen werden.

²⁵und dank der mehr als nachlässigen Betreuung seitens des Universitätsbauamtes auch nur sehr schleppend umgebaute



(a) „Gleichmäßige Ca^{2+} -Oszillationen, phasensynchron in allen beobachteten Zellen“ — ein Artefakt.



(b) Emissionsintensität.

6. Hilfsprogramme

Beim täglichen Arbeiten mit dem am Einzelzellmeßplatz verwendeten Programm **FUCAL** zeigten sich schnell einige Unzulänglichkeiten der Bilddatenverwaltung. So fallen in kurzer Zeit große Datenmengen an, die die zur Verfügung stehenden Speichermöglichkeiten schnell auslasten, und die etwas ungeschickte Namensgebung führt zu unbequemem Arbeiten mit ganzen Bildsequenzen. Außerdem war es zu Experimentierzwecken vorteilhaft, mit einem kleinen Filterprogramm die Bilddaten auf rudimentäre Weise nachbearbeiten zu können.

Es wurden daher drei Programme — **storage**, **chname** und **filter** — entwickelt, die diese Probleme zum Teil lösen können. Struktur und Implementation dieser Programme werden im folgenden erläutert. Alle Programme wurden mit Borland Turbo C unter dem Speichermodell *large* entwickelt und benutzen für den Zugriff auf **FUCAL**-Bilddaten die entsprechenden Routinen aus der SIS-Library, die zum Lieferumfang des CCD-Kamerasystems gehört.

Die vollständigen, kommentierten Programmlistings sind im Anhang C abgedruckt.

6.1. Das Programm **storage**

6.1.1. Konzept

Ausgangssituation Das verwendete Meßsystem **FUCAL** liefert Bilddaten, die entsprechend des Auflösungsvermögens der benutzten CCD-Kamera (384*286 Pixel) und des eingesetzten A/D-Wandlers mit 12-Bit Auflösungsvermögen eine Größe von 219904 Bytes haben (davon sind 256 Bytes Headerinformation). Für die Aufnahme von Bildsequenzen ist man an die Speicherkapazität des vorhandenen PCs gebunden, so daß zur Zeit etwa 130 Bilder im RAM gespeichert werden können.

Auch bei der Auslagerung der Bilddaten auf Hintergrundspeicher zeigen sich ähnliche Platzprobleme.

Es wurde daher nach einem schnellen Verfahren zur Kompression der anfallenden Daten gesucht.

Kompressionsverfahren Aufgrund der Anforderungen an die Geschwindigkeit der Kompression konnte keiner der bekannten, leistungsfähigen Kompressionsalgorithmen benutzt werden. Die Bilddaten zeigten jedoch bei näherer Betrachtung eine Struktur, die sich hervorragend zur Kompression eignet: Aufeinanderfolgende Pixel ein und desselben Bildes unterscheiden sich nur gering in ihrem Grauwert.

Es wurde daher folgender Weg zur Kompression beschritten:

- Die 256 Byte Headerinformation werden unkomprimiert gespeichert. Hier wäre der Aufwand (Kompressionszeit) in keinem Verhältnis zum Nutzen (Kompressionsverhältnis) gestanden.
- Das erste Pixel jedes zu komprimierenden Bildes wird ebenfalls unkomprimiert, d. h. in einem Word gespeichert.

- Alle weiteren Pixel eines Bildes werden gespeichert, indem zunächst die Differenz der Grauwerte zweier aufeinanderfolgender Pixel berechnet wird. Diese Differenz wird dann durch einen Code mit variabler Codelänge codiert; und zwar so, daß häufig auftretende Differenzen mit kürzeren Codes codiert werden können:

Differenz	Codelänge
0..5	4 Bits
6..29	8 Bits
30..284	12 Bits
285..4096	Escapecodierung

Diese Bitfolgen werden dann direkt aufeinanderfolgend gespeichert.

- Im Falle von Escapecodierung wird (Differenz `div` 285)-mal der 12-Bit-Code für ± 285 codiert, und der verbleibende Rest (Differenz `mod` 285) mit dem entsprechenden Code.

Programmaufbau `storage` besteht im wesentlichen aus drei Teilen, die nachfolgend getrennt beschrieben werden:

`storage.c` C-Modul zur Steuerung des Ablaufes und zur Bereitstellung der Bilddaten

`compress.asm` Assemblermodul zur Kompression

`expand.asm` Assemblermodul zur Dekompression

Die beiden Assemblerteile sind unabhängig vom aufrufenden Programm implementiert und können auch zu anderen Programmen (z. B. einer neuen Version von FUCAL) hinzugelinkt werden.

6.1.2. `storage.c` — das Rahmenprogramm

`storage` kann sowohl für die Kompression von Bilddaten, die sich bereits auf einem Hintergrundspeicher befinden, wie auch für die Dekompression von `storage`-Archiven verwendet werden.

Kompression Für die Kompression lautet der Aufruf

```
storage -c <files to compress> <outputfile>
```

`<files to compress>` bezeichnet dabei die Namen der Bilddateien, die in ein Archiv zusammengefaßt werden sollen. Dabei ist die Benutzung von Wildcards (`?` und `*`) und die Angabe eines Pfadnames möglich.

`<outputfile>` gibt den Namen der zu erzeugenden Archivdatei an.

storage überprüft nun zunächst die Anzahl der Parameter und versucht, das Ausgabefile zu öffnen. Ist bereits ein File gleichen Namens vorhanden, bricht das Programm mit einem entsprechenden Hinweis ab. Ansonsten werden alle passenden Bilddateien in Folge komprimiert.

Dekompression Für die Dekompression lautet der Aufruf
`storage -x <inputfile>`

`<inputfile>` gibt den Namen der zu entpackenden Archivdatei an.

storage überprüft nun zunächst die Anzahl der Parameter und öffnet das Eingabefile. Danach werden alle in der Archivdatei enthaltenen Bilddateien in Folge dekomprimiert und unter dem ursprünglichen Namen im aktuellen Verzeichnis abgespeichert. Bereits vorhandene Files gleichen Namens werden hierbei nicht überschrieben, es erfolgt dann keine Dekompression der jeweiligen Bilddatei.

Archiv auflisten Seit der Version 1.1 ist der Aufruf
`storage -l <inputfile>`
möglich.

`<inputfile>` gibt den Namen der zu betrachtenden Archivdatei an.

storage überprüft nun zunächst die Anzahl der Parameter und öffnet das Eingabefile. Danach werden alle in der Archivdatei enthaltenen Bilddateien in Folge dekomprimiert und die abgespeicherten Dateinamen auf dem Bildschirm ausgegeben. Damit kann ein schneller Überblick über die in einem Archiv zusammengefaßten Dateien gewonnen werden.

Archiv betrachten Zusätzlich ist analog zu `-l` noch der Aufruf
`storage -v <inputfile>`
möglich.

`<inputfile>` gibt den Namen der zu betrachtenden Archivdatei an.

storage überprüft nun zunächst die Anzahl der Parameter und öffnet das Eingabefile. Danach werden alle in der Archivdatei enthaltenen Bilddateien in Folge dekomprimiert und (falls es die Videohardware erlaubt) auf dem Bildschirm dargestellt. Nach der Anzeige eines Bildes kann mit einem beliebigen Tastendruck zum nächsten Bild weitergeschaltet werden.

6.1.3. `compress.asm` — der Komprimierer

Schnittstelle Beim Modul `compress.asm` handelt es sich um eine Assemblerroutine, die in 486er Assembler geschrieben wurde. Sie stellt eine schnelle Implementation der Funktion

```
unsigned int compute_code(unsigned int *pixel,
                          int number,
                          unsigned int *buffer)
```

dar.

Die drei Parameter haben folgende Bedeutung:

unsigned int *pixel Ein FAR-Zeiger auf das erste Pixel des zu komprimierenden Bereiches. Die Funktion skaliert diesen Zeiger zunächst auf einen möglichst kleinen Offset herunter, um einen Segmentüberlauf beim Hochzählen zu vermeiden.

int number Die Anzahl der zu verarbeitenden Pixel. Sie darf höchstens 32768 sein, da auf keinen Fall mehr Werte vom Typ **unsigned int** in einem Segment angesprochen werden können.

unsigned int *buffer Ein FAR-Zeiger auf einen hinreichend großen Speicherbereich für die Erzeugung der Codesequenz. Auch dieser Zeiger wird zunächst auf einen möglichst kleinen Offset herunterskaliert, um einen Segmentüberlauf beim Hochzählen zu vermeiden.

`compute_code()` hat als Rückgabewert (im Register *AX*) die Anzahl der gültigen *Bytes* in `buffer`.

6.1.4. `expand.asm` — der Entkomprimierer

Schnittstelle Beim Modul `expand.asm` handelt es sich ebenfalls um eine Assemblerroutine, die in 486er Assembler geschrieben wurde. Sie stellt eine schnelle Implementation der Funktion

```
void compute_data(unsigned int *pixel,
                  int number,
                  unsigned int *buffer)
```

dar.

Die drei Parameter haben folgende Bedeutung:

unsigned int *pixel Ein FAR-Zeiger auf das erste Pixel des Speicherbereiches für die entkomprimierten Daten. Die Funktion skaliert diesen Zeiger zunächst auf einen möglichst kleinen Offset herunter, um einen Segmentüberlauf beim Hochzählen zu vermeiden.

int number Die Anzahl der zu erzeugenden Pixel. Sie darf höchstens 32768 sein, da auf keinen Fall mehr Werte vom Typ **unsigned int** in einem Segment angesprochen werden können.

unsigned int *buffer Ein FAR-Zeiger auf die Codesequenz. Auch dieser Zeiger wird zunächst auf einen möglichst kleinen Offset herunterskaliert, um einen Segmentüberlauf beim Hochzählen zu vermeiden.

`compute_data()` hat keinen Rückgabewert.

6.2. Das Programm `chname`

6.2.1. Ausgangssituation

Das verwendete Meßsystem **FUCAL** liefert Bilddateien, deren Dateiname sich aus dem Namen der Sequenz sowie verschiedenen Kennungen zusammensetzt.

Ein Umbenennen ganzer Sequenzen mußte bisher wegen des unzulänglichen DOS-Befehls **rename** umständlich von Hand durchgeführt werden. **chname** sorgt hier für Abhilfe, da es die Namenskonvention für **FUCAL**-Bilddaten kennt und komplette Sequenzen einschließlich aller zugehörigen Dateien schnell und einfach umbenennen kann.

6.2.2. `chname.c` — das Programm

`chname` wird folgendermaßen aufgerufen:

```
chname <oldname> <newname>
```

`<oldname>` bezeichnet dabei den Sequenznamen der Bilddateien, die umbenannt werden sollen. Dabei ist die Benutzung von Wildcards (`?` und `*`) nicht möglich.

`<newname>` gibt den neuen Sequenznamen an.

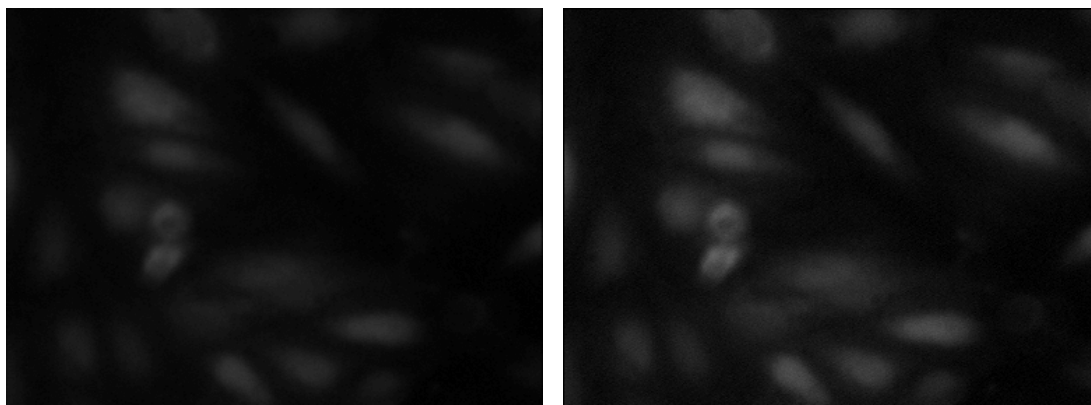
6.3. Das Programm `filter`

6.3.1. Ausgangssituation

Während der ersten Aufnahmen von Fluoreszenz-Bildern zeigte sich, daß der Bildkontrast nicht ausreichte, um feine morphologische Strukturen des Zellverbandes noch ausmachen zu können.

Da noch keine geeignete Bildverarbeitungssoftware gefunden werden konnte, die eine bequeme Weiterverarbeitung der **FUCAL**-Bilddaten ermöglicht hätte, wurde nach [36] ein kleines Filterprogramm zur Kontrastverstärkung entwickelt.

filter kennt die Namenskonvention für **FUCAL**-Bilddaten und kann daher komplette Sequenzen schnell und einfach bearbeiten.



(c) Vor der Filterung.

(d) Nach der Filterung.

Abbildung 29: Kantenverstärkung durch digitale Filterung mit einer 3x3-Matrix.

6.3.2. filter.c — das Programm

`filter` wird folgendermaßen aufgerufen:

```
filter <filter spec> <files to filter> <new extension>
```

`<filter spec>` bezeichnet dabei den Dateinamen der Datei, die die Filtermatrix beschreibt. Diese Datei enthält in der ersten Zeile die Größe N der (quadratischen) Filtermatrix und in den folgenden N Zeilen jeweils N ganzzahlige Matrixelemente.

`<files to filter>` gibt an, welche Bilddateien zu bearbeiten sind. Dabei ist die Benutzung von Wildcards (?) und *) und die Angabe eines Pfadnamens möglich.

`<new extension>` gibt an, welche Dateinamenerweiterung die gefilterten Bilder bekommen sollen.

Als ein Beispiel²⁶ soll hier die Anwendung einer 3x3-Kantenverstärkungsmatrix gezeigt werden. Abb. 29(c) zeigt das ursprüngliche Emissionsbild (340 nm, 1000 ms); Abb. 29(d)

das gefilterte Bild. Als Filtermatrix wurde hierbei $\begin{pmatrix} 0 & -1 & 0 \\ -1 & 5 & -1 \\ 0 & -1 & 0 \end{pmatrix}$ verwendet; diese

Matrix subtrahiert die zweite Ortsableitung der Intensitäten vom Originalbild.

Bedingt durch den Filterprozeß ist das gefilterte Bild an den Rändern jedoch um jeweils ein Pixel kleiner als das Originalbild; diese Tatsache stellt aber in den allermeisten Fällen kein großes Problem dar.

²⁶Leider läßt sich der erzielte Effekt im Druck schlecht wiedergeben, in einem Bildverarbeitungsprogramm sieht man den Erfolg deutlich.

7. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Erfahrungen im Umgang mit dem vollständigen System und die Ergebnisse der beschriebenen Experimente zeigen, daß sich der auf der Basis eines von der Firma T.I.L.L Photonics, Planegg gelieferten Fluoreszenz-Spektrometrie-Meßsystems entwickelte und ausgebaut Meßstand für die Bestimmung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen im täglichen Einsatz gut bewährt hat.

Ohne Probleme können die in der institutseigenen Zellkultur präparierten Endothelzellen für Experimente vorbereitet werden; auch die anfangs auftretenden Schwierigkeiten mit sich ablösenden Zellschichten konnten durch ein leicht verändertes Protokoll aus dem Weg geräumt werden. Die Beladung von HUVEC mit einer geeigneten Menge Fura-2/AM gehört nun zu den Routineaufgaben, und auch der anschließende Abbau zu Fura-2 verläuft problemlos und reproduzierbar.

Die einfache Handhabung der zellbesiedelten Deckgläschen erlaubt eine sichere Positionierung der Zellen auf dem Mikroskop; gleichzeitig sorgt der erhöhte Rand für unter normalen Bedingungen ausreichenden Schutz gegen Auslaufen des Superfusates.

Wie die Ergebnisse zeigen, kann eine Vielzahl von Versuchen an Einzelzellen durchgeführt werden, da die wesentlichen Versuchsparameter (Belichtungszeiten, Anregungswellenlängen, Zeitauflösung) in weiten Bereichen variiert werden können. Aufgrund der hohen Abbildungsstreue bietet sich auch die Auswertung morphologischer Veränderungen an. Das System in seiner derzeitigen Form bietet daher eine verlässliche Grundlage für *qualitative* Aussagen über das zeitliche Verhalten der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

Weniger zufriedenstellend sind hingegen die Möglichkeiten einer *quantitativen* Auswertung. Die absolute intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird schon im Ruhezustand durch viele Parameter beeinflußt (Wahl des Fluoreszenz-Indikators, Indikatorkonzentration und Pufferkapazität, Zusammensetzung des extrazellulären Puffers (s. [12])), so daß sich hier bereits eine große Variabilität der Meßwerte ergeben kann. Hinzu kommt noch, daß man durch die zusätzlichen Kalibrierschritte deutlich längere Versuchszeiten benötigt, wodurch möglicherweise die Zeitauflösung schlechter wird; auch hat sich die quantitative Auswertung der Meßdaten als nicht sehr zuverlässig erwiesen.

Absolute Konzentrationsangaben, wie sie in der aktuellen Literatur häufig gemacht werden, sind mit den dort angegebenen Methoden wohl nicht immer einfach und reproduzierbar zu erzielen und sollten daher mit der nötigen Vorsicht betrachtet werden. Auf keinen Fall sollten Vergleiche zwischen Arbeiten verschiedener Gruppen angestellt werden, da die absoluten Werte oft aufgrund unterschiedlicher Methoden signifikant voneinander abweichen.

Falls möglich, sollte bei der Planung einer Versuchsreihe daher sichergestellt werden, daß später nur Aussagen zu relativen Änderungen gemacht werden müssen. Dazu bietet sich beispielsweise die sukzessive Messung des Verhaltens der gleichen Zellpopulation unter verschiedenen äußeren Bedingungen (wie sie mit der Superfusionsanlage unkompliziert eingestellt werden können) an.

8. Ausblick

Das mit dieser Arbeit vorgestellte Meßsystem für intrazelluläres Ca^{2+} ist sicherlich in einigen Punkten noch verbesserungswürdig. So bietet sich die Konstruktion einer geschlossenen Perfusionskammer an, die den Lösungswechsel und die Temperaturkontrolle noch weiter vereinfachen könnte. Andere Arbeitsgruppen haben hier mit vergleichsweise wenig Aufwand bereits gute Erfahrungen gemacht [11, 20]. In diesem Zusammenhang ist auch an eine Kontrolle der Gaszusammensetzung über dem Superfusat zu denken; insbesondere wegen der Wechselwirkung zwischen atmosphärischem CO_2 -Gehalt und evtl. verwendeten Bicarbonat-Puffern und wegen des zunehmenden Photobleaching bei hohen O_2 -Konzentrationen. Eine einfache Lösung dieses Problems zeigt [21] auf.

Durch das geringe Probenvolumen erschwert, aber doch nicht unmöglich, ist die direkte Messung der Superfusattemperatur im Deckgläschen. Hierfür sollte ein Meßfühler auf der Basis eines Pt100-Widerstandes geeignet sein, der auch in kleinen Abmessungen erhältlich ist und zusammen mit einer Regelelektronik eine konstante Proben temperatur garantieren könnte.

Daneben empfiehlt sich, sobald die hierfür nötigen Hardwarevoraussetzungen gegeben sind (insbesondere die Anbindung an das Campus-Netzwerk), eine Verbesserung der Bildqualität durch nachträgliches Deblurring (Kontrastverstärkung) anzustreben. Eine Methode, die mit der Aufnahme von Bildern aus nur einer Bildebene (eine Randbedingung, da mit dem gegenwärtig vorhandenen Mikroskop keine Mehrschichtaufnahmen gemacht werden können) auskommt, findet sich in [31]; für eine derartige Bildnachbearbeitung wird man aber wegen des damit verbundenen hohen Rechenaufwandes (zweimalige Fouriertransformation!) auf leistungsfähigere Computer als den am Meßplatz vorhandenen PC/AT 486 zurückgreifen müssen.

Als langfristige Perspektive bietet sich die Kombination des Einzelzellmeßplatzes mit einem patch-clamp-Meßplatz an, so daß (wie in der Literatur gelegentlich beschrieben [14, 5]) gleichzeitig Ca^{2+} -Messungen durchgeführt und Membranströme etc. erfaßt werden können.

Insgesamt bietet das derzeit vorhandene Meßsystem jedoch eine solide Grundlage für aussagekräftige, biochemisch motivierte Messungen zur Ca^{2+} -Regulation in Einzelzellen und damit einen Ausgangspunkt für weitreichende Versuche auf diesem Gebiet.

A. Materialien

Soweit im Haupttext nichts anderes vermerkt ist, wurden im Rahmen der beschriebenen Experimente die hier aufgeführten Lösungen und Chemikalien verwendet.

Medium 199, Trypsin/EDTA und PBS wurden von GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein fertig bezogen; RDGF wurde selbst isoliert [33, S. 32]; alle anderen Chemikalien stammten von Sigma.

Zellkulturmedien:

Collagenaselösung	PBS 0.1 % (w/v) Collagenase
Gelatinelösung A	H ₂ O 0.1 % (w/v) Gelatine
Gelatinelösung B	H ₂ O 0.5 % (w/v) Gelatine
Gelatinelösung C	H ₂ O 1.0 % (w/v) Gelatine
MSA	Medium 199 20 % FCS (Fetal calf serum) 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin-Mischung)
MSA/R	Medium 199 20 % FCS (Fetal calf serum) 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin-Mischung) 0.5 % RDGF (Retina derived growth factor)
PBS	0.20 g/l KCl 0.20 g/l KH ₂ PO ₄ 8.00 g/l NaCl 1.15 g/l Na ₂ HPO ₄ pH 7.40
Trypsin/EDTA	PUCKSche Salzlösung A 0.5 % Trypsin 0.2 % EDTA
Pharmaka (Stocklösungen):	
ATP	H ₂ O 10 mM ATP
Bradykinin	H ₂ O 200 µM Bradykinin
Thrombin	H ₂ O 10 U/ml Thrombin

Fluoreszenz und Kalibrierung:

DMSO:Fura2	5 ml DMSO 1 mg Fura-2/AM
Fluorescein	H ₂ O 100 µM Fluorescein
Triton X-100 (TX)	H ₂ O 20 % Triton X-100
Na-EGTA	H ₂ O 400 mM Na-EGTA
Ionomycin	H ₂ O 100 µM Ionomycin

Physiologische Puffer:

HBS:Ca (nach [22])	H ₂ O		
	NaCl	140 mM	8.182 g/l
	KCl	5.4 mM	0.403 g/l
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.5 mM	0.102 g/l
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.5 mM	0.221 g/l
	D-Glukose	10 mM	1.983 g/l
	BSA	1 mg/ml	1.000 g/l
	HEPES	15 mM	3.905 g/l
HBS:Mg (nach [22])	H ₂ O		
	NaCl	140 mM	8.182 g/l
	KCl	5.4 mM	0.403 g/l
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.0 mM	0.408 g/l
	D-Glukose	10 mM	1.983 g/l
	BSA	1 mg/ml	1.000 g/l
	HEPES	15 mM	3.905 g/l
TiefCa (nach [25])	H ₂ O		
	NaCl	22.5 mM	1.315 g/l
	KCl	100 mM	7.456 g/l
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.0 mM	0.204 g/l
	EGTA	10 mM	3.8 g/l
	HEPES	10 mM	2.6 g/l
HochCa (nach [25])	H ₂ O		
	NaCl	20.0 mM	1.169 g/l
	KCl	110 mM	8.202 g/l
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.0 mM	0.204 g/l
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.0 mM	0.147 g/l
	HEPES	10 mM	2.6 g/l

Anmerkung: Die beiden HBS-Puffer (HBS:Ca bzw. HBS:Mg) haben sich mit BSA als nicht lagerfähig erwiesen. In großen Mengen im Voraus angesetzte HBS-Puffer wurden daher erst am Versuchstag mit der entsprechenden Menge BSA versetzt und danach der pH-Wert mit NaOH bzw. HCl auf 7.40 eingestellt.

B. Methoden

B.1. Suspensionsmessungen

Benötigte Substanzen:

- HBS:Ca ohne BSA (37 °C)
- BSA
- 2 ml Trypsin/EDTA pro T25-Kulturflasche
- 10 ml MSA pro T25-Kulturflasche
- 200 µl DMSO:Fura2

Durchführung:

- HBS:Ca ansetzen
- Kulturmedium absaugen und werfen
- Waschen mit 10 ml HBS:Ca pro T25-Kulturflasche
- Ablösen mit 2 ml Trypsin/EDTA pro T25-Kulturflasche (2 min inkubieren)
- Stoppen mit 10 ml MSA pro T25-Kulturflasche
- Zellen auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilen und abzentrifugieren: 5 min, 700 g
- 2x Waschen mit 10 ml HBS:Ca pro Zentrifugenröhrchen
- Resuspendieren in 10 ml HBS:Ca pro Zentrifugenröhrchen
- Inkubieren mit 100 µl DMSO:Fura2 pro Zentrifugenröhrchen (45 min, 37 °C)
- Zellen abzentrifugieren: 5 min, 700 g
- 2x Waschen mit 10 ml HBS:Ca pro Zentrifugenröhrchen
- Resuspendieren in HBS:Ca, bis Signal in günstigem Bereich

Standardeinstellungen Perkin-Elmer-Spektrometer:

- Anregungswellenlänge: 340 nm
- Anregungsspalt: 10.0 mm
- Emissionswellenlänge: 510 nm
- Emissionsspalt: 6.0 mm
- Integrationsdauer: 1000 ms

B.2. Einzelzellmessungen

Benötigte Substanzen:

- 13 ml HBS:Ca ohne BSA (37 °C) pro Deckgläschen
- 13 mg BSA pro Deckgläschen
- 20 µl DMSO:Fura2 pro Deckgläschen

Durchführung:

- HBS:Ca ansetzen
- Kulturmedium absaugen und werfen
- 2x Waschen mit 2 ml HBS:Ca pro Deckgläschen
- Inkubieren mit 2 ml HBS:Ca und 20 µl DMSO:Fura2 (45 min, 37 °C)
- 2x Waschen mit 2 ml HBS:Ca
- Inkubieren mit 2 ml HBS:Ca (30 min, 37 °C)
- Messung in 1 ml HBS:Ca

Standardeinstellungen FUCAL:

- Anregungswellenlänge A: 340 nm
- Belichtungszeit A: 1000 ms
- Anregungswellenlänge B: 380 nm
- Belichtungszeit B: 1000 ms
- Bildwiederholzeit: 5000 ms

Auswertung von FUCAL-Bildsequenzen

- Bilder `name0A01` und `name0B01` laden
- Bestimmung des Hintergrundsignals: Mitteln der Intensität aus 3 rechteckigen ROIs, die keine Zellen enthalten: $Background_A$, $Background_B$
- Berechnung des Ratiobildes: $(Intensity_A - Background_A)/(Intensity_B - Background_B)$
- Abgrenzung der Zellen: $Threshold \approx \max(Background_A, Background_B)$
- Definieren von 10–20 ROIs im Ratiobild; pro Zelle eine ROI
- Berechnung der Kinetik (dazu $Threshold = 0$ einstellen!)
- Auswertung der Kinetik mit einem geeigneten Statistik- und Grafikprogramm

C. Kommentierte Quelltexte

C.1. storage.c

Zunächst wird eine Meldung definiert, die das Programm bei jedem Start ausgibt und die (konstante) Größe einer Bilddatei als Symbol definiert:

```
#define BANNER "This is storage 1.2 (" __DATE__ ")\\n"
#define PICFILESIZE 219904L
```

Benutzte Libraries des Compilers:

```
#include <stdlib.h>
#include <stdio.h>
#include <dir.h>
#include <dos.h>
#include <string.h>
```

Benutzte Libraries zur Kamerakarte:

```
#include "progsis.h"
#include "transfer.h"
#include "vga256.h"
```

Makro zur Fehlerbehandlung der SIS-Funktionen Die SIS-Funktionen geben im Fehlerfall einen Wert $\neq 0$ zurück, welcher in der globalen Variablen **result** gespeichert wird. Tritt ein Fehler auf, so erfolgt die Ausgabe der Fehlernummer und Abbruch des Programms:

```
#define FT \
    if (result){ \
        set_textmode(); \
        printf("%s: SIS-error: %X\\n", argv[0], result); \
        exit(EXIT_FAILURE); \
    }
```

Globale Variablen gibt es nur eine:

```
int result;
```

Funktionsprototypen

```
void uninit_SIS(void);
void compress(int argc, char* argv[]);
void decompress(char* whattodo, char* inputfile);
void compress_data(char *infile, FILE* outfile);
void decompress_data(FILE* infile, struct image_header *header,
    char *whattodo);
extern unsigned int compute_code(unsigned int* first_pixel,
    int HowManyPixelsToCompress,
    unsigned int* buffer);
void compute_data(unsigned int* first_pixel,
    int HowManyPixelsToExpand,
    unsigned int* buffer);
```

Ein Workaround, um **leave_SIS()** für **atexit()** verwenden zu können (**atexit()** verlangt einen Zeiger auf eine Funktion **void(void)**; **leave_SIS()** ist aber vom Typ **int(void)**; daher der Aufwand):

```
void uninit_SIS(void){
    leave_SIS();
}
```

main() überprüft den korrekten Aufruf des Programms und gibt evtl. eine entsprechende Fehlermeldung aus:

```
int main(int argc, char* argv[]){
    if ( (strcmp(argv[1], "-c")==0 && argc>=4) ||
        (strcmp(argv[1], "-l")==0 && argc==3) ||
        (strcmp(argv[1], "-v")==0 && argc==3) ||
        (strcmp(argv[1], "-x")==0 && argc==3) ){
        printf(BANNER);
    }
    else{
        printf("usage: storage -c <files to compress into one> <outputfile>\n");
        printf("      storage -l <inputfile>                (list archive)\n");
        printf("      storage -v <inputfile>                (view archive)\n");
        printf("      storage -x <inputfile>                (extract archive)\n");
        return EXIT_FAILURE;
    }
}
```

Die Kamerabibliothek verwendet zur Speicherung der Bilddaten im RAM EMS-Speicher, dessen Verwaltung durch die Funktion **init_SIS()** initialisiert wird. Muß das Programm wegen eines Fehlers abgebrochen werden, so sollte der angeforderte Speicher durch **uninit_SIS()** wieder freigegeben werden:

```
result=init_SIS(); FT;
atexit(uninit_SIS);
```

Danach verzweigt **main()** je nach **argv[1]** nach **compress** bzw. **decompress**:

```
if (strcmp(argv[1], "-c")==0){
    compress(argc, argv);
}
else{
    decompress(argv[1], argv[2]);
}

return EXIT_SUCCESS;
}
```

compress() komprimiert die Bilddaten in den Dateien **argv[2]–argv[argc-2]** unter Beibehaltung der Headerinformation nach **argv[argc-1]**:

```
void compress(int argc, char* argv[]){
    FILE* outfile;
    int i;                      /* Zum Durchlaufen der Kommandozeilenargumente */
    int done;                   /* Ein Argument abgearbeitet? */
    struct ffbld ffbld;

    /* Ausgabedatei oeffnen */
    outfile=fopen(argv[argc-1], "r");
    if (outfile!=NULL){
        printf("%s: %s already exists.", argv[0], argv[argc-1]);
        exit(EXIT_FAILURE);
    }
}
```

```

}

outfile=fopen(argv[argc-1], "wb");
if (outfile==NULL){
    printf("%s: unable to open %s for writing.", argv[0], argv[argc-1]);
    exit(EXIT_FAILURE);
}

/* Zu komprimierende Files finden und abarbeiten */
for (i=2; i<argc-1; i++){
    done=findfirst(argv[i], &ffblk, 0);

    if (done){
        printf("%s: no files matching %s.\n", argv[0], argv[i]);
    }

    while (!done){
        if (ffblk.ff_fsize!=PICFILESIZE)
            printf("Skipping %s - not a picture.\n", ffbldk.ff_name);
        else
            compress_data(ffblk.ff_name, outfile);
        done=findnext(&ffblk);
    }
}

/* Ausgabedatei schliessen */
fclose(outfile);
}

```

decompress() entkomprimiert die Bilddaten in **infilename**. Die Filenamen der erzeugten Bilder sowie die Headerinformationen werden dabei wieder hergestellt; nicht jedoch das ursprüngliche Dateidatum. **whattodo** kann zum Aufrufzeitpunkt (l)ist, (v)iew oder e(x)tract sein. Die Datei **infilename** hat folgenden Aufbau:

```

struct image_header image1;
length_of_next_block;
1st_block_of_compressed_data_for_image1;
length_of_next_block;
2nd_block_of_compressed_data_for_image1;
...
struct image_header image2;
length_of_next_block;
1st_block_of_compressed_data_for_image2;
length_of_next_block;
2nd_block_of_compressed_data_for_image2;
...
struct image_header imageN;
length_of_next_block;
1st_block_of_compressed_data_for_imageN;
length_of_next_block;
2nd_block_of_compressed_data_for_imageN;
...

```

decompress() versucht nun zunächst, das Eingabefile zu öffnen; ist dies erfolgreich, wird Bild um Bild blockweise ausgelesen, entkomprimiert und gegebenenfalls auf dem Bildschirm angezeigt bzw. unter dem alten Namen abgespeichert:

```

void decompress(char* whattodo, char* infilename){
    FILE* infile;
    struct image_header header;

    /* Eingabedatei oeffnen */
    infile=fopen(infilename, "rb");
    if (infile==NULL){
        printf("%s: unable to open %s for reading.", argv[0], infilename);
        exit(EXIT_FAILURE);
    }

    /* Erstes Bild der Sequenz entkomprimieren */
    if (fread(&header, sizeof(struct image_header), 1, infile)==1){
        decompress_data(infile, &header, whattodo);
    }
    else{
        printf("%s: %s doesn't start with a valid image header.",
            argv[0], infilename);
        exit(EXIT_FAILURE);
    }

    /* Restliche Bilder der Sequenz entkomprimieren */
    while (fread(&header, sizeof(struct image_header), 1, infile)==1){
        decompress_data(infile, &header, whattodo);
    }

    /* Eingabedatei schliessen */
    fclose(infile);
}

```

`compress_data()` lädt das Bild `infilename` per `load_image()` ins EMS, komprimiert die Daten und schreibt die komprimierten Daten samt Header ins `outfile`:

```

#define CODEBUFSIZE 16384

void compress_data(char *infilename, FILE* outfile){
    struct image_header header;
    const int the_image=1;                /* Aktuell bearbeitetes Bild */
    unsigned int buffer[CODEBUFSIZE];     /* Buffer fuer Code */
    int row, i, i_max;
    unsigned int *first_pixel;            /* Zeiger auf Anfang der Bilddaten */
    int length;                           /* Laenge des erzeugten Codes im Buffer */

    printf("Compressing %s...\n", infilename);

    result=load_image(&header, the_image,
        0, 0, SIS_ColsNumber, SIS_RowsNumber, infilename); FT;

    *strstr(infilename, ".")='\0';        /* Extension PIC abschneiden */
    strcpy(header.name, infilename);       /* Filename im Header speichern */
    fwrite(&header, sizeof(struct image_header), 1, outfile);
}

```

Die eigentliche Komprimierung geschieht folgendermaßen:

Die Bilddaten von jeweils **EMS_RowsPerPage** Bildzeilen liegen direkt aufeinanderfolgend in einer EMS-Page. Da die Anzahl der hierfür benötigten Bytes (**EMS_RowsPerPage** * **SIS_ColsNumber** * 2) 16128 beträgt, bleibt am Ende der EMS-Page ein unbenutzter (?) Rest von 256 Bytes. Die letzte Page eines Bildes enthält dann nur noch **SIS_RowsNumber mod EMS_RowsPerPage** Zeilen.

Es werden daher jeweils entsprechend viele Zeilen in einem Aufruf von `compute_code()` komprimiert.


```

row=0;
i_max=SIS_RowsNumber/EMS_RowsPerPage;
for (i=0; i<i_max; i++){
    /* Bild-Seite in die EMS-Page 0 mappen */
    result=get_rowadress(the_image, row, 0, &first_pixel); FT;

    /* Seite komprimieren */
    length=compute_code(first_pixel, EMS_RowsPerPage*SIS_ColsNumber, buffer);
    /* length ins outfile schreiben */
    fwrite(&length, sizeof(length), 1, outfile);
    /* buffer ins outfile schreiben */
    fwrite(buffer, sizeof(char), length, outfile);

    row+=EMS_RowsPerPage;
}
/* Uebrigbleibende Zeilen */
{ /* Bild-Seite in die EMS-Page 0 mappen */
    result=get_rowadress(the_image, row, 0, &first_pixel); FT;

    /* Seite komprimieren */
    length=compute_code(first_pixel, (SIS_RowsNumber-row)*SIS_ColsNumber, buffer);
    /* length ins outfile schreiben */
    fwrite(&length, sizeof(length), 1, outfile);
    /* buffer ins outfile schreiben */
    fwrite(buffer, sizeof(char), length, outfile);
}
}

```

decompress_data() entpackt die Bilddaten aus dem **infile** und schreibt sie zunächst ins EMS. Von dort werden die Bilddaten per **save_image()** abgespeichert:

```

void decompress_data(FILE* infile, struct image_header *header, char* whattodo){
    char outfilename[13];
    const int the_image=1; /* Aktuell bearbeitetes Bild */
    unsigned int buffer[CODEBUFSIZE]; /* Buffer fuer Code */
    int length;
    int row, i;
    unsigned int *first_pixel; /* Zeiger auf Anfang der Bilddaten */

    outfilename[0]='\0';
    strcat(outfilename, header->name);
    strcat(outfilename, ".PIC");

    if (strcmp(whattodo, "-l")==0)
        printf("%s\n", outfilename); /* Archivinhalt nur auflisten */
    else
        printf("Expanding %s...\n", outfilename); /* Archiv entpacken */

    row=0;
    for (i=0; i<SIS_RowsNumber/EMS_RowsPerPage; i++){
        /* Laenge des naechsten Codeblocks aus dem infile lesen */
        fread(&length, sizeof(length), 1, infile);
        /* Codeblock aus dem infile in buffer lesen */
        fread(buffer, sizeof(char), length, infile);
        /* Bild-Seite in die EMS-Page 0 mappen */
        result=get_rowadress(the_image, row, 0, &first_pixel); FT;
        /* Seite expandieren */
    }
}

```

```

    compute_data(first_pixel, EMS_RowsPerPage*SIS_ColsNumber, buffer);

    row+=EMS_RowsPerPage;
}
/* Uebrigbleibende Zeilen */
{ /* Laenge des naechsten Codeblocks aus dem infile lesen */
    fread(&length, sizeof(length), 1, infile);
    /* Codeblock aus dem infile in buffer lesen */
    fread(buffer, sizeof(char), length, infile);
    /* Bild-Seite in die EMS-Page 0 mappen */
    result=get_rowadress(the_image, row, 0, &first_pixel); FT;
    /* Seite expandieren */
    compute_data(first_pixel, (SIS_RowsNumber-row)*SIS_ColsNumber, buffer);
}

if (strcmp(whattodo, "-v")==0){ /* Archivinhalt anzeigen */
    set_mode640x480(0x032F, 16); FT;
    result=show_pseudo(the_image, 0, 0,
                      0, 0, SIS_ColsNumber, SIS_RowsNumber,
                      0, 0, VGA_Xresolution, VGA_Yresolution); FT;

    getch();
    set_textmode();
}

if (strcmp(whattodo, "-x")==0){ /* Archiv entpacken */
    if (fopen(outfilename, "r")!=NULL)
        printf("Skipping %s - file exists.\n", outfilename);
    else{
        result=save_image(header, the_image,
                        0, 0, SIS_ColsNumber, SIS_RowsNumber, outfilename); FT;
    }
}
}
}

```

C.2. compress.asm

Das Modul `compress.asm` verwendet folgende Register, die bis auf `DS`, `SI` und `DI` alle zerstört werden:

<code>DS</code>	Segment des FAR-Zeigers auf <code>unsigned int pixel</code>
<code>SI</code>	Offset des FAR-Zeigers auf <code>unsigned int pixel</code>
<code>ES</code>	Segment des FAR-Zeigers auf <code>unsigned int buffer</code>
<code>DI</code>	Offset des FAR-Zeigers auf <code>unsigned int buffer</code>
<code>FS</code>	Ursprüngliches Datensegment
<code>EAX</code>	Erzeugter Ausgabecode
<code>EBX</code>	Differenz der Pixelwerte, Kopie des Ausgabecodes
<code>CL</code>	für <code>SHL</code> , <code>SHR</code>
<code>CH</code>	Anzahl der gültigen Bits in <code>EAX</code>
<code>DX</code>	Kopie des Offsets des Beginns von <code>buffer</code>

Zunächst ist dem Assembler das verwendete Speichermodell sowie die Parameterübergabekonvention der aufrufenden Sprache mitzuteilen und das Codesegment zu beginnen:

```

.MODEL LARGE, C
.CODE
.486

```

Die beiden Konstanten **MAXDIFF** und **MINDIFF** legen den Bereich fest, der direkt, also ohne Escape-Sequenzen, codiert werden kann:

```
MAXDIFF EQU 284
MINDIFF EQU -284
```

Es folgt der Prozedurkopf und das Retten der veränderten Register:

```
PUBLIC compute_code
compute_code PROC FAR
    PixelOffset:WORD, PixelSegment:WORD,
    Number:WORD,
    BufferOffset:WORD, BufferSegment:WORD

    push    DS
    push    SI
    push    DI
```

Das aktuelle Datensegment (in **DS**) wird gebraucht, um auf die Codetabelle zugreifen zu können. Es wird daher nach **FS** kopiert:

```
mov    AX, DS
mov    FS, AX
```

Der übergebene FAR-Zeiger auf den ersten Pixel wird nach **DS:SI** gebracht; dabei wird der Offset in den Bereich 0–16 verschoben und das Segment entsprechend angepaßt:

```
mov    SI, PixelOffset
and    SI, 000fh
mov    AX, PixelOffset
shr    AX, 4
add    AX, PixelSegment
mov    DS, AX
```

Analog wird der übergebene FAR-Zeiger auf den Anfang des Buffers nach **ES:DI** gebracht. Es erfolgt ebenfalls die Verschiebung des Offsets in den Bereich 0–16 und die entsprechende Anpassung des Segments. Zur späteren Berechnung der Länge des erzeugten Codes wird der anfängliche Offset in **DX** gespeichert:

```
mov    DI, BufferOffset
and    DI, 000fh
mov    DX, DI
mov    AX, BufferOffset
shr    AX, 4
add    AX, BufferSegment
mov    ES, AX
```

Die Länge der in **EAX** erzeugten Ausgabebits wird in **CH** gezählt, dieses Register wird daher zunächst mit 0 initialisiert:

```
mov    CH, 00h
```

Der erste Pixel wird unverändert in den Buffer kopiert, danach wird der Zeiger auf den Buffer um die Länge eines **unsigned int** hochgezählt. Ein Pixel wurde verarbeitet, **Number** muß also dekrementiert werden:

```

mov    BX, DS:SI
mov    ES:DI, BX
add    DI, 2
dec    Number

```

Hier beginnt nun die Hauptschleife. Solange noch nicht alle Pixel codiert wurden, springt das Programm nach jedem codierten Pixel an diese Stelle zurück:

nextpixel:

DS:SI zeigt auf den als nächstes zu verarbeitenden Pixel. Der Pixelwert wird für die Subtraktion nach **BX** kopiert, **DS:SI** auf den nächsten Pixel gesetzt und die Differenz mit dem vorherigen Pixelwert in **BX** ausgeführt:

```

mov    BX, DS:SI
add    SI, 2
sub    BX, DS:SI

```

In **BX** steht nun die Differenz aus aktuellem Pixelwert und Wert des Vorgängerpixels, die zwischen **MINDIFF** und **MAXDIFF** sein sollte; durch Addition von **MAXDIFF** liegt **BX** dann im Intervall **0–2*MAXDIFF**:

```

add    BX, MAXDIFF

```

Es wird nun geprüft, ob **BX** innerhalb dieser Grenzen liegt; falls nicht, wird ein entsprechendes Escape codiert und zum Label **Reentry** zurückgesprungen, wo die Überprüfung erneut stattfindet:

```

Reentry:
js     SHORT Underflow
cmp    bx, 2*MAXDIFF
ja     Overflow

```

Hier beginnt nun die eigentliche Codierung: An den bereits in **EAX** vorhandenen Ausgabecode sollen die entsprechenden Codebits **CodeTable[BX]** angehängt werden.

Dazu wird zunächst das Ausgaberegister **EAX** um **LengthTable[BX]** nach links verschoben und rechts Nullen eingefügt:

```

Codiere:
mov    CL, FS:LengthTable[BX]
shl    EAX, CL

```

Danach können die Codebits durch einfache Addition an den Ausgabecode angehängt werden. **BX** muß dazu erst noch mal 4 genommen werden, da es jetzt als Index in eine Double-Word-Tabelle dient:

```

shl    BX, 2
add    EAX, FS:CodeTable[BX]

```

Die Anzahl angehängter Bits wird in **CH** mitgezählt:

```

add    CH, CL

```

Es muß nun überprüft werden, ob im sich Ausgaberegister bereits ein Code von mehr als 16 Bit angesammelt hat. Falls dem so ist, so müssen die entsprechenden Bits als Word in den Buffer geschrieben werden.

CH wird also mit 16 verglichen; und je nach Ergebnis des Vergleichs wird der entsprechende Code-Abschnitt angesprungen:

```

cmp    CH, 16
je     SHORT CHgleich16
jb     SHORT CHkleiner16

```

1. Fall: CH ist größer als 16 Dies ist der aufwendigste Fall! Zunächst wird **EAX** nach **EBX** kopiert, damit die übrigbleibenden, rechten Bits in **EAX** später nicht wieder mühsam hergestellt werden müssen:

```
mov    EBX, EAX
```

Der Ausgabecode ist jetzt um einige Bits zu weit links in **EBX**. Subtraktion von 16 vom Wert in **CH** liefert die Anzahl der Bits, die der Code zuweit links steht, und korrigiert auch gleich **CH** um 16 (denn so viele Bits werden jetzt ausgegeben und sind somit in **EAX** nicht mehr gültig):

```
sub    CH, 16
```

EBX wird jetzt nach rechts geschiftet, bis die auszugebenden 16 Bits in **BX** angelangt sind. Leider muß die Anzahl Bits, um die verschoben werden soll, in **CL** stehen, so daß ein zusätzliches **mov** nötig ist. Danach kann dann **BX** in den Buffer ausgegeben werden und der Zeiger auf den Buffer weitergesetzt werden:

```
mov    CL, CH
shr    EBX, CL
mov    ES:DI, BX
add    DI, 2
```

Falls **Number** noch größer als 0 ist, nächstes Pixel verarbeiten; ansonsten erfolgt Sprung zum Prozedurabschluß:

```
dec    Number
jnz    SHORT nextpixel
jmp     done
```

2. Fall: CH ist kleiner als 16 Es gibt noch nichts zu tun, da im Ausgaberegister noch kein volles Word Code erzeugt wurde. Falls **Number** noch größer als 0 ist, nächstes Pixel verarbeiten; ansonsten erfolgt Sprung zum Prozedurabschluß:

```
CHKleiner16:
dec    Number
jnz    SHORT nextpixel
jmp     done
```

3. Fall: CH ist genau 16 **EAX** enthält 16 gültige Bits, und diese stehen im unteren Word, also in **AX**. Von dort können diese Bits direkt in den Buffer geschrieben werden. Der Zeiger auf den Buffer muß hochgezählt werden; und der Zähler **CH** für die Anzahl der gültigen Bits in **EAX** wieder auf 0 gesetzt werden:

```
CHgleich16:
mov    ES:DI, AX
mov    CH, 0
add    DI, 2
```

Auch hier: Falls **Number** noch größer als 0 ist, nächstes Pixel verarbeiten; ansonsten weiter beim Prozedurabschluß:

```
dec    Number
jnz    SHORT nextpixel
```

Prozedurabschluß Ist **CH** größer als 0, so befinden sich noch gültige Bits in **EAX**, die noch in den Buffer zu kopieren sind. Der Ausgabecode in **EAX** wird dazu um so viele Bits nach links geshiftet, bis er gerade linksbündig in **AX** steht. Danach wird **AX** in den Buffer kopiert und der Zeiger auf den Buffer nochmals hochgesetzt:

```
done:
    mov    CL, 16
    sub    CL, CH
    shl    EAX, CL
    mov    ES:DI, AX
    add    DI, 2
```

Zum guten Schluß wird noch die Länge des erzeugten Codes im Buffer aus **DI** (Ende) und **DX** (Anfang) berechnet und in **AX** an den Aufrufer zurückgegeben:

```
    mov    AX, DI
    sub    AX, DX
```

Ende der Funktion: Register poppen, Stackrahmen löschen und Rücksprung zum Aufrufer:

```
    pop    DI
    pop    SI
    pop    DS
    leave
    retf
```

Escapecodierung Ist eine Differenz außerhalb des direkt codierbaren Bereiches, so wird solange ein entsprechender Escape-Code codiert, bis die Differenz wieder im erlaubten Bereich liegt.

Underflow (also eine Differenz kleiner als **MINDIFF**) wird durch die Bitfolge **0110 0000 0000b** codiert. Diese 12 Bits werden (wie oben in der allgemeinen Codierung) an **EAX** angehängt:

```
Underflow:
    mov    CL, 12
    shl    EAX, CL
    add    EAX, 011000000000b

    add    CH, CL
```

Nun werden, falls nötig, die obersten 16 Bits von **EAX** in den Buffer ausgegeben. Mit Ausnahme der beiden Befehle **push BX** und **pop BX** (**BX** enthält die zu codierende Differenz und darf daher hier nicht verändert werden) handelt es sich um den gleichen Code wie im allgemeinen Fall, er wurde nur aus Geschwindigkeitsgründen (Ersparnis von zeitaufwendigen Sprüngen) hier nochmals kopiert. Nach der Codierung wird **BX** um **MAXDIFF+1** verkleinert, so daß beim Label **Reentry** erneut geprüft werden kann, ob die Differenz jetzt direkt codiert werden kann:

```
    cmp    CH, 16
    je     SHORT UCHgleich16
    jb     SHORT UCHkleiner16
    push    BX
    mov     EBX, EAX
    sub     CH, 16
    mov     CL, CH
    shr     EBX, CL
    mov     ES:DI, BX
    add     DI, 2
```

```

    pop    BX
    add    BX, MAXDIFF+1
    jmp    Reentry

```

```

UCHkleiner16:
    add    BX, MAXDIFF+1
    jmp    Reentry

```

```

UCHgleich16:
    mov    ES:DI, AX
    mov    CH, 0
    add    DI, 2
    add    BX, MAXDIFF+1
    jmp    Reentry

```

Overflow (also eine Differenz größer als **MAXDIFF**) wird durch die Bitfolge **0111 1111 1111b** codiert. Diese 12 Bits werden (wie oben in der allgemeinen Codierung) an **EAX** angehängt:

```

Overflow:
    mov    CL, 12
    shl    EAX, CL
    add    EAX, 011111111111b

    add    CH, CL

```

Nun werden auch hier, falls nötig, die obersten 16 Bits von **EAX** in den Buffer ausgegeben. Nach der Codierung wird **BX** um **MINDIFF+1** verkleinert, so daß beim Label **Reentry** erneut geprüft werden kann, ob die Differenz jetzt direkt codiert werden kann:

```

    cmp    CH, 16
    je     SHORT OCHgleich16
    jb     SHORT OCHkleiner16
    push    BX
    mov     EBX, EAX
    sub     CH, 16
    mov     CL, CH
    shr     EBX, CL
    mov     ES:DI, BX
    add     DI, 2
    pop     BX
    add     bx, MINDIFF-1
    jmp     Reentry

```

```

OCHkleiner16:
    add     bx, MINDIFF-1
    jmp     Reentry

```

```

OCHgleich16:
    mov     ES:DI, AX
    mov     CH, 0
    add     DI, 2
    add     bx, MINDIFF-1
    jmp     Reentry

```

Damit endet die Funktion **compute_code**:

```

compute_code ENDP

```

Es schließen sich nun die beiden Codetabellen an, in denen der verwendete Code abgelegt ist:

`.DATA`

Die erste Tabelle enthält die Bitfolgen, die den Code an sich darstellen:

```
CodeTable DD 011000000000b ; Underflow
          DD 011000000001b ; -284
          DD 011000000010b ; -283
...
          DD 10101111b ; -6
          DD 1011b ; -5
          DD 1100b ; -4
          DD 1101b ; -3
          DD 1110b ; -2
          DD 1111b ; -1
          DD 0000b ; 0
          DD 0001b ; 1
          DD 0010b ; 2
          DD 0011b ; 3
          DD 0100b ; 4
          DD 0101b ; 5
          DD 10000000b ; 6
...
          DD 01111111101b ; 283
          DD 01111111110b ; 284
          DD 01111111111b ; Overflow
```

In der zweiten Tabelle stehen die Längen der jeweiligen Codes:

```
LengthTable DB 12 ; Underflow
            DB 12 ; -284
            DB 12 ; -283
...
            DB 8 ; -6
            DB 4 ; -5
            DB 4 ; -4
            DB 4 ; -3
            DB 4 ; -2
            DB 4 ; -1
            DB 4 ; 0
            DB 4 ; 1
            DB 4 ; 2
            DB 4 ; 3
            DB 4 ; 4
            DB 4 ; 5
            DB 8 ; 6
...
            DB 12 ; 283
            DB 12 ; 284
            DB 12 ; Overflow
```

Das Ende des Moduls `compress.asm`:

`END`

C.3. expand.asm

Das Modul `expand.asm` verwendet folgende Register, die bis auf `DS`, `SI` und `DI` alle zerstört werden:

<code>DS</code>	Segment des FAR-Zeigers auf <code>unsigned int buffer</code>
<code>SI</code>	Offset des FAR-Zeigers auf <code>unsigned int buffer</code>
<code>ES</code>	Segment des FAR-Zeigers auf <code>unsigned int pixel</code>
<code>DI</code>	Offset des FAR-Zeigers auf <code>unsigned int pixel</code>
<code>FS</code>	Ursprüngliches Datensegment
<code>AX</code>	Eingabecode
<code>ECX</code>	Für Berechnungen
<code>EBX</code>	Index für Lesen des Heaps
<code>DL</code>	Anzahl der gültigen Bits in <code>EAX</code>

Zunächst ist dem Assembler das verwendete Speichermodell sowie die Parameterübergabekonvention der aufrufenden Sprache mitzuteilen und das Codesegment zu beginnen:

```
.MODEL LARGE, C
.CODE
.486
```

Die Konstante `Blatt` zeigt durch ein gesetztes Bit 32 an, daß beim Durchlaufen des Heaps ein gültiger Code erkannt wurde:

```
Blatt EQU 80000000h ; Bit 32 gesetzt -> Ende des Codes
```

Es folgt der Prozedurkopf und das Retten der veränderten Register:

```
PUBLIC compute_data
compute_data PROC FAR
    PixelOffset:WORD, PixelSegment:WORD,
    Number:WORD,
    BufferOffset:WORD, BufferSegment:WORD

    push    DS
    push    SI
    push    DI
```

Das aktuelle Datensegment (in `DS`) wird gebraucht, um auf den Heap zugreifen zu können. Es wird daher nach `FS` kopiert:

```
    mov     AX, DS
    mov     FS, AX
```

Der übergebene FAR-Zeiger auf den Buffer wird nach `DS:SI` gebracht; dabei wird der Offset in den Bereich 0–16 verschoben und das Segment entsprechend angepaßt:

```
    mov     SI, BufferOffset
    and     SI, 000fh
    mov     AX, BufferOffset
    shr     AX, 4
    add     AX, BufferSegment
    mov     DS, AX
```

Analog wird der übergebene FAR-Zeiger auf den ersten Pixel nach **ES:DI** gebracht. Es erfolgt ebenfalls die Verschiebung des Offsets in den Bereich 0–16 und die entsprechende Anpassung des Segments:

```
mov    DI, PixelOffset
and    DI, 000fh
mov    AX, PixelOffset
shr    AX, 4
add    AX, PixelSegment
mov    ES, AX
```

Der erste Pixel wird unverändert aus dem Buffer kopiert, danach wird der Zeiger auf den Buffer um die Länge eines **unsigned int** hochgezählt. Ein Pixel wurde verarbeitet, **Number** muß also dekrementiert werden:

```
mov    CX, DS:SI
mov    ES:DI, CX
add    SI, 2
dec    Number
```

Zunächst wird das erste Code-Wort aus dem Buffer nach **AX** gelesen. **DL** zählt die Anzahl der unverarbeiteten Bits in **AX** und wird daher auf 16 gesetzt:

```
mov    AX, DS:SI
add    SI, 2
mov    DL, 16
```

Die eigentliche Decodierung erfolgt in zwei verschachtelten Schleifen. Die äußere Schleife wird so oft durchlaufen, bis alle Pixel erzeugt worden sind. **nextpixel** ist der Schleifenanfang der äußeren Schleife; der Wert des letzten Pixels befindet sich dann in **CX**. Wird ein Pixel mit Escapecodierung decodiert, so erfolgt ein Rücksprung zum Label **nextcode**, so daß ein weiterer Code abgearbeitet werden kann, ohne daß der Zeiger auf Pixel inzwischen weitergezählt wurde; dies bildet die innere Schleife:

```
nextpixel:
nextcode:
```

Zunächst muß aus dem Heap ein gültiger Code decodiert werden. Der Index für den Zugriff auf den Heap wird in **EBX** berechnet; **EBX** wird daher zu Beginn eines neuen Codes mit 1 initialisiert. Da es sich hierbei um einen Zugriff auf eine Double-Word-Tabelle handelt, wird gleich der tatsächliche Offset, nämlich 4 in **EBX** geschrieben:

```
mov    EBX, 4
```

Jetzt wird der Heap durchlaufen, bis ein gültiger Code erkannt wurde. Dazu wird der Eingabecode bitweise aus **AX** ins Carry-Flag geschoben; findet sich dort eine 1, wird **EBX=2*EBX+4**; findet sich dort eine 0, wird **EBX=2*EBX**. Der Rücksprung zu **NochKeinBlatt** erfolgt solange, bis der Eintrag **Heap[EBX]** ein gesetztes Bit 32 hat.

Für jedes aufgebrauchte Bit des Codes wird **DL** dekrementiert; sollte **DL** zwischenzeitlich 0 werden, muß ein neues Codewort aus dem Buffer nach **AX** geladen werden, der Zeiger auf den Buffer entsprechend hochgezählt werden und **DL** wieder mit 16 geladen werden; war **DL** ungleich 0, so wird dieses Nachladen durch Sprung zum Label **AllesOK** übersprungen:

```

NochKeinBlatt:
    shl     EBX, 1
    shl     AX, 1
    jnc     SHORT EsWarEineNull
    add     EBX, 4
EsWarEineNull:
    dec     DL
    jnz     SHORT AllesOK
    mov     AX, DS:SI
    add     SI, 2
    mov     DL, 16

AllesOK:
    test    DWORD PTR FS:Heap[BX], Blatt
    jz      NochKeinBlatt

```

BX zeigt jetzt auf den Eintrag im Heap, der die ursprünglich codierte Differenz enthält; dieser Eintrag wird in **EBX** gespeichert:

```

    mov     EBX, DWORD PTR FS:Heap[BX]

```

Das untere Wort von **EBX** (also **BX**) ist die codierte Differenz. Der Wert des neuen Pixels kann also aus **CX** (Wert des vorherigen Pixels) und **BX** berechnet werden:

```

    sub     CX, BX

```

Falls die codierte Differenz eine Escapecodierung darstellte, muß noch ein weiterer Code für das gleiche Pixel abgearbeitet werden; es erfolgt also ein Rücksprung nach **nextcode**:

```

    cmp     EBX, Blatt OR -285
    je      nextcode
    cmp     EBX, Blatt OR 285
    je      nextcode

```

Ansonsten wurde ein Pixel erfolgreich generiert. **ES:DI** wird Zeiger auf den nächsten Pixel, und **Number** muß dekrementiert werden. Sind noch nicht alle Pixel erzeugt worden, erfolgt Rücksprung zur Marke **nextpixel**:

```

    add     DI, 2
    mov     ES:DI, CX
    dec     Number
    jnz     nextpixel

```

Prozedurabschluß Ende der Funktion: Register poppen, Stackrahmen löschen und Rücksprung zum Aufrufer:

```

    pop     DI
    pop     SI
    pop     DS

    leave
    retf

```

Damit endet die Funktion **compute_data**:

```
compute_data ENDP
```

Es schließt sich nun der Heap zur Entschlüsselung der Codes an.

Um den Wert für eine beliebige Bitfolge zu bestimmen, beginne man an der Wurzel (Index=1) und berechne Index=2*Index für jede 0 im Code bzw. Index=2*Index+1 für jede 1 im Code. Ist Bit 32 des entsprechenden Wertes gesetzt, so hat man ein Blatt des Baumes erreicht und die codierte Differenz befindet sich in den unteren 31 Bits des Heapeintrages:

```
.DATA

; Heap[0]: Dummy
Heap DD 1 DUP (0)
; Heap[1]: Wurzel
      DD 1 DUP (0)
; Ebene 1
      DD 2 DUP (0)
; Ebene 2
      DD 4 DUP (0)
; Ebene 3
      DD 8 DUP (0)
; Ebene 4
      DD Blatt OR 0      ;0000
      DD Blatt OR 1      ;0001
      DD Blatt OR 2      ;0010
      DD Blatt OR 3      ;0011
      DD Blatt OR 4      ;0100
      DD Blatt OR 5      ;0101
      DD 0                ;0110
      DD 0                ;0111
      DD 0                ;1000
      DD 0                ;1001
      DD 0                ;1010
      DD Blatt OR -5     ;1011
      DD Blatt OR -4     ;1100
      DD Blatt OR -3     ;1101
      DD Blatt OR -2     ;1110
      DD Blatt OR -1     ;1111
...

```

Das Ende des Moduls `expand.asm`:

```
END
```

C.4. chname.c

Zunächst wird eine Meldung definiert, die das Programm bei jedem Start ausgibt:

```
#define BANNER "This is chname 1.1 (" __DATE__ ")\n"
```

Benutzte Libraries des Compilers:

```
#include <stdlib.h>
#include <stdio.h>
#include <dir.h>
#include <dos.h>
#include <string.h>

```

Globale Variablen gibt es keine, nur eine Typdefinition für die Elemente in der verzeigten Liste:

```
typedef struct fn {char name[13]; struct fn *next;} filename;
```

main() überprüft zunächst den korrekten Aufruf des Programms und gibt evtl. eine entsprechende Fehlermeldung aus:

```
int main(int argc, char* argv[]){
    char oldname[13], newname[13];
    int done;
    struct ffbk ffbk;
    filename start, *end;
    int i;

    argv[0]=strrchr(argv[0], '\\')+1;
    if (argc!=3){
        printf("usage: %s <oldname> <newname>\n", argv[0]);
        printf("example: \"%s hit50 hit51\" renames all files hit50*. * to hit51*. *\n",
            argv[0]);
        return EXIT_FAILURE;
    }

    printf(BANNER);
```

Danach baut es eine verzeigte Liste aller Filenamen im aktuellen Verzeichnis auf, die mit **argv[1]** beginnen. Steht dafür kein Speicher mehr zur Verfügung, bricht das Programm mit einem entsprechenden Hinweis ab:

```
    strcpy(oldname, argv[1]);
    strcat(oldname, ".*");

    done=findfirst(oldname, &ffbk, 0);

    if (done){
        printf("%s: no files matching %s.\n", argv[0], oldname);
        return EXIT_FAILURE;
    }

    end=&start;
    while (!done){
        strcpy(end->name, ffbk.ff_name);

        end->next=malloc(sizeof(*end->next));
        if (end->next==NULL){
            printf("%s: out of memory.\n", argv[0]);
            return EXIT_FAILURE;
        }

        end=end->next;
        done=findnext(&ffbk);
    }
    end->next=NULL;
```

Im Anschluß daran wird die Liste Eintrag für Eintrag abgearbeitet und aus dem alten, vollständigen Dateinamen ein neuer erzeugt, indem der Teil **argv[1]** durch **argv[2]** ersetzt wird. Sodann wird die Datei umbenannt:

```

    end=&start;
    while(end->next!=NULL){
        strcpy(newname, "");
        strcat(newname, argv[2]);
        strcat(newname, &end->name[strlen(argv[1])]);

        if (rename(end->name, newname)==0)
            printf("Renamed %s to %s.\n", end->name, newname);
        else{
            printf("%s: unable to rename %s to %s.\n", argv[0], end->name, newname);
            return EXIT_FAILURE;
        }

        end=end->next;
    }

    return EXIT_SUCCESS;
}

```

C.5. filter.c

Zunächst wird eine Meldung definiert, die das Programm bei jedem erfolgreichen Start ausgibt und die (konstante) Größe einer Bilddatei als Symbol definiert:

```

#define BANNER "This is filter 1.1 (" __DATE__ ")\n"
#define PICFILESIZE 219904L

```

Benutzte Libraries des Compilers:

```

#include <stdlib.h>
#include <stdio.h>
#include <dir.h>
#include <dos.h>
#include <string.h>

```

Benutzte Libraries zur Kamerakarte:

```

#include "progsis.h"
#include "transfer.h"
#include "vga256.h"
#include "compute.h"

```

Makro zur Fehlerbehandlung der SIS-Funktionen Die SIS-Funktionen geben im Fehlerfall einen Wert $\neq 0$ zurück, welcher in der globalen Variablen **result** gespeichert wird. Tritt ein Fehler auf, so erfolgt die Ausgabe der Fehlernummer und Abbruch des Programms:

```

#define FT \
    if (result){ \
        set_textmode(); \
        printf("%s: SIS-error: %X\n", argv[0], result); \
        exit(EXIT_FAILURE); \
    }

```

Hierfür braucht man leider eine globale Variable:

```

int result;

```

Die C-Standard-Funktion `atexit()` verlangt als Funktionsargument einen Zeiger auf eine Funktion vom Typ `void(void)`. Da `leave_SIS()` als `int(void)` deklariert ist, muß sie in eine entsprechende Funktion eingeschachtelt werden:

```
void uninit_SIS(void){
    leave_SIS();
}
```

Wurde das Programm korrekt aufgerufen, so wird die Versionsinformation (definiert in **BANNER**) ausgegeben, ansonsten wird das Programm nach der Ausgabe einer entsprechenden Fehlermeldung abgebrochen:

```
int main(int argc, char* argv[]){
    argv[0]=strrchr(argv[0], '\\')+1;
    if (argc<4){
        printf("usage: %s <filter spec> <files to filter> <new extension>\n",
            argv[0]);
        return EXIT_FAILURE;
    }

    printf(BANNER);
```

Die Kamerabibliothek verwendet zur Speicherung der Bilddaten im RAM EMS-Speicher, dessen Verwaltung durch die Funktion `init_SIS()` initialisiert wird. Muß das Programm wegen eines Fehlers abgebrochen werden, so sollte der angeforderte Speicher durch `uninit_SIS()` wieder freigegeben werden:

```
    result=init_SIS(); FT;
    atexit(uninit_SIS);
```

Nun können die Bilder gefiltert werden:

```
    filter(argc, argv);

    return EXIT_SUCCESS;
}
```

```
void filter(int argc, char* argv[]){
    FILE *matrixfile;
    int dim;
    int i, j;
    int **coeff;
    int k;
    int done;
    struct ffblok ffblok;
```

Die Filtermatrix wird aus einem externen File eingelesen, dessen Name in `argv[1]` steht. Nach der Überprüfung, ob das File tatsächlich existiert, wird zunächst die Dimension der Filtermatrix eingelesen und in `dim` gespeichert:

```
    matrixfile=fopen(argv[1], "r");

    if (matrixfile==NULL){
        printf("%s: can't open %s for reading.\n", argv[0], argv[1]);
        exit(EXIT_FAILURE);
    }

    if (fscanf(matrixfile, "%d", &dim)!=1 || dim % 2==0){ /* dim even? */
        printf("%s: invalid matrix dimension in %s.\n", argv[0], argv[1]);
        exit(EXIT_FAILURE);
    }
```

Danach werden die Matrixelemente `coeff[dim][dim]` ohne weitere Nachbearbeitung in ein Feld eingelesen. Kommt es hierbei zu Inkonsistenzen oder zu Speichermangel, so wird das Programm nach Ausgabe einer entsprechenden Fehlermeldung abgebrochen:

```
coeff=(int**)malloc(sizeof(int*)*dim);
if (coeff==NULL){
    printf("%s: out of memory.\n", argv[0]);
    exit(EXIT_FAILURE);
}

for (i=0; i<dim; i++){
    coeff[i]=(int*)malloc(sizeof(int)*dim);
    if (coeff[i]==NULL){
        printf("%s: out of memory.\n", argv[0], argv[1]);
        exit(EXIT_FAILURE);
    }
    for (j=0; j<dim; j++){
        if (fscanf(matrixfile, "%d", &(coeff[i][j]))!=1){
            printf("%s: invalid filter spec in %s.\n", argv[0], argv[1]);
            exit(EXIT_FAILURE);
        }
    }
}

fclose(matrixfile);
```

Die Argumente `argv[2]–argv[argc-1]` enthalten die Dateinamen der zu bearbeitenden Dateien, eventuell mit Wildcards. Argument um Argument wird ausgewertet, und falls sich Dateien der richtigen Größe (definiert in `PICFILESIZE`) finden, werden diese an die Funktion `filter_it()` zur weiteren Bearbeitung übergeben:

```
for (k=2; k<argc-1; k++){
    done=findfirst(argv[k], &ffblk, 0);

    if (done){
        printf("%s: no files matching %s.\n", argv[0], argv[k]);
    }

    while (!done){
        if (ffblk.ff_fsize!=PICFILESIZE)
            printf("Skipping %s - not a picture.\n", ffbldk.ff_name);
        else
            filter_it(ffblk.ff_name, dim, coeff, argc, argv);
        done=findnext(&ffblk);
    }
}
}
```

Die Funktion `filter_it()` leistet nun die Filterung eines einzelnen Bildes. Dazu erzeugt sie zunächst den Dateinamen des gefilterten Bildes durch Austausch der alten Extension durch die neue:

```
void filter_it(char *oldname, int dim, int **coeff, int argc, char* argv[]){
    char newname[13];
    struct image_header header;
    const int old_image=1;
    const int tmp_image=2;
    const int new_image=3;
```



```

int row, col, i, j, norm=0;
unsigned int intensity, new_intensity;

strcpy(newname, oldname);
*(strstr(newname, ".")+1)='\0';
strcat(newname, argv[argc-1]);

```

Im Anschluß daran wird getestet, ob der neue Dateiname schon existiert und (falls das nicht der Fall ist) das Originalbild eingelesen:

```

if (fopen(newname, "r")!=NULL)
    printf("Skipping %s - file exists.\n", newname);
else{
    printf("Filtering %s...\n", oldname);
    result=load_image(&header, old_image,
        0, 0, SIS_ColsNumber, SIS_RowsNumber, oldname); FT;

```

Die eigentliche Filterung geschieht nun dadurch, daß zum Zielbild (welches zunächst komplett auf 0 gesetzt wird) geeignet verschobene und mit den entsprechenden Koeffizienten aus der Filtermatrix gewichtete Kopien des Originalbildes addiert werden, bevor abschließend durch Multiplikation mit einem Normierungsfaktor der ursprüngliche Wertebereich wieder restauriert wird:

```

result=sis_setvalue(new_image,
    0, 0, SIS_ColsNumber, SIS_RowsNumber, 0); FT;

for (i=0; i<dim; i++)
    for (j=0; j<dim; j++){
        norm+=coeff[i][j];
        result=sis_setvalue(tmp_image,
            0, 0, SIS_ColsNumber, SIS_RowsNumber, 0); FT;
        result=sis_copy(old_image, j, i,
            tmp_image, dim/2, dim/2,
            SIS_ColsNumber-dim+1, SIS_RowsNumber-dim+1); FT;
        if (coeff[i][j]>0){
            result=sis_mul_constant(tmp_image, 0, 0,
                tmp_image, 0, 0,
                SIS_ColsNumber, SIS_RowsNumber,
                coeff[i][j]); FT;
            result=sis_addition(new_image, 0, 0,
                tmp_image, 0, 0,
                new_image, 0, 0,
                SIS_ColsNumber,
                SIS_RowsNumber); FT;
        }
        if (coeff[i][j]<0){
            result=sis_mul_constant(tmp_image, 0, 0,
                tmp_image, 0, 0,
                SIS_ColsNumber, SIS_RowsNumber,
                -coeff[i][j]); FT;
            result=sis_subtraction(new_image, 0, 0,
                tmp_image, 0, 0,
                new_image, 0, 0,
                SIS_ColsNumber,
                SIS_RowsNumber); FT;
        }
    }
}

```

```

if (norm>0){
    result=sis_mul_constant(new_image, 0, 0,
                           new_image, 0, 0,
                           SIS_ColsNumber, SIS_RowsNumber, 1.0/norm); FT;
}

```

Nach erfolgreicher Filterung wird das erzeugte Bild schließlich unter dem neuen Dateinamen abgespeichert:

```

    result=save_image(&header, new_image,
                    0, 0, SIS_ColsNumber, SIS_RowsNumber, newname); FT;
}
}

```

D. Langfristige Datenarchivierung

Wie schon an anderer Stelle (vgl. 6.1) bemerkt, erzeugt **FUCAL** beim Aufnehmen einer Meßreihe große Datenmengen, die selbst nach Kompression durch **storage** noch etwa 75 KB pro Bild betragen. Es sammeln sich daher schnell Bilddaten an, die die Kapazität der zur Verfügung stehenden Festplatte auslasten.

Zur langfristigen Sicherung des Datenbestandes wurde deshalb nach einer unkomplizierten Lösung gesucht. Die Ausstattung des Meßplatzrechners mit einem Wechselplattenlaufwerk (Syquest, 88 MB), einem QIC-Tapestreamer (Colorado, 220 MB) und einem CD-ROM-Laufwerk (Toshiba, 650 MB) ermöglicht eine schrittweise Datenarchivierung:

1. Neue Meßdaten liegen unkomprimiert auf der Festplatte, für gewöhnlich im benutzereigenen Verzeichnis **d:\pic\<benutzer>**. Dies ermöglicht die sofortige Analyse der jeweils neuesten Meßdaten ohne weiteren Aufwand.
2. Reicht dort die Kapazität nicht mehr aus, werden die Bilddaten mittels **storage** komprimiert und auf einer Wechselplatte abgelegt. Dabei hat es sich als günstig erwiesen, Bilddaten eines Versuchstages in einem entsprechend bezeichneten Verzeichnis (z. B. **e:\950630** für die Daten des 30. Juni 1995) gesammelt abzulegen. Eventuell erstellte Kinetiken werden nach **d:\kin\<benutzer>** verschoben.
3. Haben sich genügend Daten auf den Wechselplatten angesammelt (etwa 3–4 volle Wechselplatten), sollten die Daten auf eine CD übertragen werden. Dazu sind die **storage**-Archive auf den Wechselplatten wieder zu dekomprimieren und auf ein bis zwei Streamerbändern zu sichern. Die Streamerbänder können dann dazu benutzt werden, die Daten zum Rechenzentrum der Universität zu transportieren, wo die CD gebrannt werden kann.²⁷
4. Prinzipiell (vgl. Anhang E) ist dann ein Zugriff auf die Daten direkt von der CD aus möglich (**g:\950630**), wegen der in diesem Punkt noch unzulänglichen Meßplatzsoftware **FUCAL** empfiehlt es sich jedoch, für die spätere Auswertung älterer Meßdaten, diese temporär wieder von der CD zurück auf die Festplatte (nach **d:\pic\<benutzer>**) zu kopieren.

²⁷Mit der Anbindung des Instituts für Klinische Biochemie an das Campus-Netz sollte ein physikalischer Datentransport durch einen einfachen Netztransfer ersetzbar sein, falls das RZ die Möglichkeit zur kurzfristigen Speicherung einer kompletten CD im Netz anbietet.

E. Patches an FUCAL 5.12b

An der von der Firma T.I.L.L. Photonics gelieferten Meßplatz-Software **FUCAL** mußten, um die Benutzung des CD-ROM-Laufwerkes für die Archivierung der Bilddaten zu ermöglichen, einige Patches vorgenommen werden. Diese sind hier der Vollständigkeit halber dokumentiert.

Neben zwei fehlerhaften Texten für Fehlermeldungen des Systems, die einfach zu korrigieren waren, mußte die Stelle gefunden werden, die die Eingabe eines neuen Datenpfades durch den Benutzer verifiziert. In der Originalversion von **FUCAL** wird zu diesem Zweck versucht, in dem vom Benutzer angegebenen Verzeichnis eine Datei **TEST.P** anzulegen, die nach erfolgreichem Anlegen sofort wieder gelöscht wird. Dieser Test schlägt auf einer nicht beschreibbaren CD-ROM naturgemäß fehl, auch wenn das angegebene Verzeichnis tatsächlich existieren sollte. Es wurde daher mit Hilfe eines Disassemblers und eines Binäreditors die entsprechende Stelle ausfindig gemacht, und der Test auf erfolgreiches **fcreate()** derart modifiziert, daß das Ergebnis nun unabhängig von der tatsächlichen Beschreibbarkeit des Speichermediums ist.

Nachteil dieser Methode ist allerdings, daß damit auch falsche Benutzereingaben nicht mehr erkannt werden können; eine Situation allerdings, die sich spätestens beim Versuch, Daten aus dem angegebenen, nicht existenten Verzeichnis zu lesen, mit einer entsprechenden Fehlermeldung bemerkbar macht.

Die hier aufgeführten Patches beziehen sich auf die 425.110 Bytes große Version 5.12b vom 20.09.95.

Byte No.	neu	alt
0003DBC2	EB 74 # JMP	anstatt JZ
0003DC01	EB 7D # JMP	anstatt JNL
0005352B	70 6E # "not available path" -> "path not available"	
0005352C	61 6F	
0005352E	68 20	
0005352F	20 61	
00053530	6E 76	
00053531	6F 61	
00053532	74 69	
00053533	20 6C	
00053535	76 62	
00053536	61 6C	
00053537	69 65	
00053538	6C 20	
00053539	61 70	
0005353A	62 61	
0005353B	6C 74	
0005353C	65 68	
0005399C	73 74 # "files exists" -> "files exist"	
0005399D	74 73	

Literatur

- [1] ADAMS, D. J., J. BARAKEH, R. LASKEY, and C. VAN BREEMEN: *Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells*. FASEB J., 3:2389–2400, 1989.
- [2] ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, and J. D. WATSON: *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., 3 ed., 1994.
- [3] BECKER, P. L. and F. S. FAY: *Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations*. Am. J. Physiol., 253:C613–C618, 1987.
- [4] BERRIDGE, M. J. and G. DUPONT: *Spatial and temporal signalling by calcium*. Curr. Op. Cell Biol., 6:267–274, 1994.
- [5] BLATTER, L. A., Z. TAHA, S. MESAROS, P. S. SHACKLOCK, W. G. WIER, and T. MALINSKI: *Simultaneous measurements of Ca^{2+} and nitric oxide in bradykinin-stimulated vascular endothelial cells*. Circ. Res., 76:922–924, 1995.
- [6] BUSSE, R. and I. FLEMING: *The endothelial organ*. Curr. Op. Cardiol., 8:719–727, 1993.
- [7] *Special issue: Fluorescence spectroscopy with fura-2*. Cell Calcium, 11:55–231, 1990.
- [8] CLAPHAM, D. E.: *Calcium signaling*. Cell, 80:259–268, 1995.
- [9] DRAIJER, R., A. B. VAANDRAGER, C. NOLTE, H. R. DE JONGE, U. WALTER, and V. W. M. VAN HINSBERGH: *Expression and possible functional role of cGMP-dependent protein kinase I and its substrate VASP in human endothelial cells of different origin*. Circ. Res., 77:897–905, 1995.
- [10] FENNELL, D. F., R. E. WHATLEY, T. M. MCINTYRE, S. M. PRESCOTT, and G. A. ZIMMERMAN: *Endothelial cells reestablish functional integrity after reversible permeabilization*. Arteriosclerosis and Thrombosis, 11:97–106, 1991.
- [11] FORSYTHE, I. D. and R. T. COATES: *A chamber for electrophysiological recording from cultured neurones allowing perfusion and temperature control*. J. Neurosci. Meth., 25:19–27, 1988.
- [12] GASALLA-HERRAIZ, J., S. RHEE, and C. M. ISALES: *Calcium-sensitive probes for the measurement of intracellular calcium: Effects of buffer system and magnesium concentration*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 214:373–388, 1995.
- [13] GEIGER, J., C. NOLTE, and U. WALTER: *Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors*. Am. J. Physiol., 267:C236–C244, 1994.

- [14] GERICKE, M., M. OIKE, G. DROOGMANS, and B. NILIUS: *Inhibition of capacitive Ca^{2+} -entry by a Cl-channel blocker in human endothelial cells.* E. J. Pharmacol., 269:381–384, 1994.
- [15] GRYNKIEWICZ, G., M. POENIE, and R. Y. TSIEN: *A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties.* J. Biol. Chem., 260:3440–3450, 1985.
- [16] HAUGLAND, R. P.: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* Molecular Probes Inc., 5 ed., 1994.
- [17] HELMLINGER, G., B. C. BERK, and R. M. NEREM: *Calcium responses of endothelial cell monolayers subjected to pulsatile and steady laminar flow differ.* Am. J. Physiol., 269:C367–C375, 1995.
- [18] HIMMEL, H. M., A. R. WHORTON, and H. C. STRAUSS: *Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells.* Hypertension, 21:112–127, 1993.
- [19] INAGAMI, T., M. NARUSE, and R. HOOVER: *Endothelium as an endocrine organ.* Annu. Rev. Physiol., 57:171–189, 1995.
- [20] INCE, C., R. E. BEEKMAN, and G. VERSCHRAGEN: *A micro-perfusion chamber for single-cell fluorescence measurements.* J. Immunol. Meth., 128:227–234, 1990.
- [21] INCE, C., D. L. YPEY, M. M. C. DIESSELHOFF-DEN DULK, J. A. M. VISSER, A. DE VOS, and R. VAN FURTH: *Micro- CO_2 -incubator for use on a microscope.* J. Immunol. Meth., 60:269–275, 1983.
- [22] JAFFE, E. A., J. GRULICH, B. B. WEKSLER, G. HAMPEL, and K. WATANABE: *Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol trisphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured endothelial cells.* J. Biol. Chem., 262:8557–8565, 1987.
- [23] JAFFE, E. A., R. L. NACHMAN, C. G. BECKER, and C. R. MINICK: *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.* J. Clin. Invest., 52:2745–2756, 1973.
- [24] JOVIN, T. M. and D. J. ARNDT-JOVIN: *Luminescence digital imaging microscopy.* Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 18:271–308, 1989.
- [25] KERSTING, U.: *Private Mitteilung.*
- [26] LERNER, R.: *Changes of cytosolic calcium ion concentrations in human endothelial cells in response to thrombin, platelet-activating factor, and leukotriene b_4 .* J. Lab. Clin. Med., 124:723–729, 1994.

- [27] LÜCKE, A., R. KÖHLING, H. STRAUB, D. MOSKOPP, H. WASSMANN, and E.-J. SPECKMANN: *Changes of extracellular calcium concentration induced by application of excitatory amino acids in the human neocortex in vitro*. Brain Res., 671:222–226, 1995.
- [28] LUM, H. and A. B. MALIK: *Regulation of vascular endothelial barrier function*. Am. J. Physiol., 267:L223–L241, 1994.
- [29] MASON, W. T., J. HOYLAND, I. DAVISON, M. A. CAREW, and B. SOMASUNDARAM: *Quantitative real-time imaging of optical probes in living cells*. In MASON, W. T. (ed.): *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, chap. 12, pp. 161–195. Academic Press Ltd., 1993.
- [30] MERRITT, J. E., S. A. MCCARTHY, M. P. A. DAVIES, and K. E. MOORES: *Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca^{2+} in platelets and neutrophils*. Biochem. J., 269:513–519, 1990.
- [31] MONCK, J. R., A. F. OBERHAUSER, T. J. KEATING, and J. M. FERNANDEZ: *Thin-section ratiometric Ca^{2+} images obtained by optical sectioning of fura-2 loaded mast cells*. J. Cell. Biol., 116:745–759, 1992.
- [32] NEHER, E. and W. ALMERS: *Patch pipettes used for loading small cells with fluorescent indicator dyes*. Adv. in exp. medicine and biology, 211:1–5, 1986.
- [33] NOLTE, C.: *Charakterisierung der Wechselwirkung von Endothelzellen und Thrombozyten; Analyse der Vasodilatator- und Endothelzell-regulierten Proteinphosphorylierung in Thrombozyten*. Doktorarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 1991.
- [34] PRZYBYLSKI, A.: *Skriptum zur Vorlesung „Auswertung von Messungen und Fehlerrechnung“*. Universität Würzburg, WS 1990/91.
- [35] RINK, T. J.: *Receptor-mediated calcium entry*. FEBS Lett., 268:381–385, 1990.
- [36] SCHAALE, M.: *Scharf gerechnet. Nachträgliche Kantenverstärkung in digitalisierten Farbbildern*. c't - Zeitschrift für Computertechnik, 1:254–262, 1990.
- [37] STRYER, L.: *Biochemistry*. W. H. Freeman and Co., New York, 3 ed., 1988.
- [38] THOUMINE, O., T. ZIEGLER, P. R. GIRARD, and R. M. NEREM: *Elongation of confluent endothelial cells in culture: The importance of fields of force in the associated alterations of their cytoskeletal structure*. Exp. Cell Res., 219:427–441, 1995.
- [39] VAN HINSBERGH, V. W. M. and R. DRAIJER: *Culture and characterization of human endothelial cells*, chap. 5.

- [40] VIRGILIO, F. D., T. H. STEINBERG, J. A. SWANSON, and S. C. SILVERSTEIN: *Fura-2 secretion and sequestration in macrophages*. J. Immunol., 140:915–920, 1988.
- [41] VOET, D. und J. G. VOET: *Biochemie*. VCH, 1992.
- [42] WHITAKER, M.: *Fluorescence imaging in living cells*. In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, vol. 2, pp. 37–43. Academic Press, Inc., 1994.
- [43] YAMAMOTO, N., H. WATANABE, H. KAKIZAWA, M. HIRANO, A. KOBAYASHI, and R. OHNO: *A study on thapsigargin-induced calcium ion and cation influx pathways in vascular endothelial cells*. Biochim. Biophys. Acta, 1266:157–162, 1995.

Besonderer Dank geht an

- Petra Hönig-Liedl und Susanne Stumpf für ihre aufopferungsvolle (und im Sommer hin und wieder auch schweißtreibende) Arbeit in der Zellkultur,
- Jörg Geiger für sein humorvolles und kameradschaftliches Wesen sowie für seine unermüdliche Bereitschaft, auch auf die einfachsten Fragen hilfreiche Antworten zu geben,
- Ulrich Walter für seinen Mut, diese Diplomarbeit an einen externen Physiker zu vergeben,
- Ulrich Kersting für viele anregende Ideen und seine Mitarbeit in Sachen Superfusionsanlage,
- Silvia und Caroline Schüle in für die Kultur „Caroline“ :-)
- Christiane Bachmann für ihre stete Bereitschaft zum persönlichen Gespräch,
- und natürlich an alle alten und neuen „Klifo’s“, die ihren Teil zu dieser Arbeit durch Tips, Tricks, Gerätschaften und Ideen beigetragen haben.

Danke!

Ich wünsche Albert Smolenski, der die von mir begonnenen Versuche weiterführen wird, viel Erfolg bei seiner Arbeit.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt zu haben, und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet zu haben.

Würzburg, 2. Februar 1996

Marcus Ohlhaut