

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Versuche mit *Locusta migratoria*

#### 6.1.1 Versuchstiere und Präparation

Die Versuchstiere stammten aus der institutseigenen Zucht oder wurden in Ausnahmefällen über den gewerblichen Handel bezogen. Wenn im Text nicht anders vermerkt, sind adulte Tiere beiderlei Geschlechts eingesetzt worden. Für pharmakologische und immunozytochemische Experimente wurden junge adulte Tiere verwendet, deren Imaginalhäutung nicht mehr als fünf Tage zurücklag. Gegenüber älteren Individuen war in dieser Gruppe eine leichtere Penetration der eingesetzten Pharmaka und Antikörper festzustellen.

Zur Herstellung rein anatomischer Präparate wurden die Tiere wie folgt seziiert: Mit Knetmasse wurden die anästhetisierten Tiere an Rumpf und Extremitäten fixiert. Die ventrale Seite wurde exponiert. Um die Kutikularmembran am Hals später schneiden zu können, wurde der Kopf nach anterior überstreckt und mittels einer Nadel festgelegt.

Mit einem Skalpell wurde ventral in die Kutikula ein Fenster geschnitten, welches vom zweiten abdominalen Sterniten bis an die lateralen Kallositäten des anterioren Thorax reichte. Um schließlich das pterothorakale Kutikulastück abheben zu können, mussten mit nah unter der Kutikula geführter Schere die pleuralen und sternalen Apophysen sowie das Mesospina durchtrennt werden. In entsprechender Weise wurde mit dem Prosternum verfahren, wobei hier auch der zum Episternum führende Nerv 2 zu durchtrennen war. Ein Schnitt in die Halsmembran ermöglichte Zugang zu den Konnektiven zwischen Pro- und Subösophagealganglion.

Wiederholtes Benetzen des Präparates mit isotonischem Ringer (Clements & May, 1974) verhinderte dessen Austrocknung.

Vorsichtig wurden Luftsäcke, Tracheen sowie nötigenfalls auch Fettkörper von der jetzt offen liegenden Ganglienkette gezupft. Sämtliche nach peripher ziehenden Nerven wurden durchtrennt, dergleichen die Konnektive posterior des Meta- und anterior des Prothorakalganglions. Das Präparat konnte jetzt in eine Sylgardschale überführt und mit Minutien festgesteckt werden.

Für physiologische Experimente wurden isolierte Prosternum-Ganglien-Präparate eingesetzt. Diese bestehen im Wesentlichen aus prosternalen Kutikularbereichen, welche die windrezeptiven Haarfelder tragen, und Ganglienketten aus Pro-, Meso-, Metathorakalganglion sowie dem vierten Abdominalganglion. Vom oben genannten Präparationsverfahren abweichende Punkte werden im Folgenden dargestellt:

Um eine gute Ventilation des ZNS sicherzustellen, blieben Tracheen und Luftsäcke an den thorakalen Ganglien weitgehend intakt und wurden nach Überführung in die mit Ringer gefüllte Sylgardschale an der Oberfläche geöffnet. Das Prosternum inklusive dessen Nerv 2 verblieben am Prothorakalganglion. Die Vorderbeine wurden leicht angehoben und proximal der Coxa abgetrennt. Jeweils dorsal des Proepisternums geführte Schnitte separierten die episternale Kutikula vom Pronotum. Um die Diffusion der applizierten Pharmaka zu erleichtern, wurde das Prothorakalganglion vorsichtig unter dem Prosternum hervorgezogen und nur im ventralen, posterioren Bereich des Prothorakalganglions ein Schnitt gesetzt. Anschließend wurden Teile des Perineuriums vorsichtig abgelöst.

### **6.1.2 Registrierung der Ableitsignale, Badapplikation der Pharmaka und Farbstoffinjektion**

Anfänglich wurden Versuche am ventral geöffneten, überdies aber weitgehend intakten Tier vorgenommen. Gegenüber diesen hat die Arbeit am isolierten Prosternum-Ganglien-Präparat aber einige entscheidende Vorteile:

- stabile intrazelluläre Ableitungen auf Grund der weitgehenden Eliminierung von Bewegungsartefakten, hervorgerufen durch Muskelkontraktionen der Extremitäten oder des respiratorischen Systems
- konstanter Flüssigkeitspegel über der Ableitstelle als unbedingte Voraussetzung für eine länger dauernde intrazelluläre Registrierung des Membranpotentials
- präzise zu definierende Endkonzentration bei längerer Badapplikation der jeweiligen pharmakologischen Substanzen

Für die Vitalität dieses Präparates erwiesen sich zwei Faktoren als entscheidend: erstens der Verbleib intakter und an der Ringeroberfläche geöffneter Tracheen und zweitens die Verwendung eines Zellkulturringers (nach E. Heidel). Isotonischer Ringer wurde bei extrazellulären, hypotonischer bei intrazellulären Ableitungen eingesetzt.

Unter diesen Bedingungen erschien das Präparat auch nach mehr als 5 Stunden vital und ermöglichte den verwendeten intrazellulären Zellmarkern bei Raumtemperatur eine schnelle Ausbreitung. Lediglich für die Identifizierung unbekannter Neurone im windsensitiven System (Teil III), also bei Diffusionsstrecken vom prothorakalen bis zum hin zu den abdominalen Ganglien, erwies sich die weitgehend intakte Präparation als vorteilhafter.

***Perfusion und Badapplikation der Pharmaka:*** Das Ganglion wurde mittels zweier über dem Präparat befindlicher Reservoirs (Spritzenzylinder à 20 ml) perfundiert. Sollten verschiedene Substanzen in das Bad appliziert werden, konnte mit einem Zweikanalventil zwischen beiden Zylindern umgeschaltet werden.

Besondere Sorgfalt wurde darauf verwendet, durch Badapplikation bedingte Störeffekte möglichst auszuschließen. So wurden die Temperaturen aller applizierten, in Zellkulturringer angesetzten Lösungen, vor der Applikation auf dieselbe Temperatur eingestellt, um diesbezügliche Auswirkungen auf Membranpotential und AP-Antwort auszuschließen. Eine Peristaltikpumpe saugte den zugeführten Ringers mit einer angefeilten Kanüle ab, und sicherte so einen konstanten Flüssigkeitspegel.

Der NO-Donor Diethylammonium (Z)-1-(N,N-diethylamino)diazon-1-ium-1,2-diolat (DEA/NONOat; Alexis) wurde in Konzentrationen von 10-300  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Da DEA unter physiologischen pH-Bedingungen sehr schnell NO freisetzt, wurde es als Stocklösung in 0,1 N NaOH angesetzt und immer genau 30 s vor Einwaschen mit Ringer gemischt. (Kontrollversuche mit inaktiviertem 300  $\mu\text{M}$  DEA-NO verursachten keine Antwortänderung des A4I1. Die Inaktivierung – Ausgasen - erfolgte in Ringer bei Lagerung über Nacht unter Raumtemperatur). Der sGC-Inhibitor 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on (ODQ; Alexis, San Diego, CA) war in Dimethyl-Sulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) gelöst. Die Endkonzentrationen in Ringer betragen: für ODQ – 100  $\mu\text{M}$  und für DMSO - 0,5 %.

***Extrazelluläre Ableitungen (ausschließlich für Experimente zur Wirkung von NO):*** Eine schematische Darstellung der Ableitapparatur zeigt Abbildung 6.1.

Extrazelluläre Signale des Projektionsinterneurons A4I1 wurden mit Saugelektroden (eigene Herstellung) am Konnektiv zwischen metathorakalem und viertem abdominalen Ganglion erfasst. Kontinuierliches Stimulieren mit Windreizen erlaubte die Identifizierung des sehr windempfindlichen, phasisch-tonisch antwortenden A4I1 (Pflüger & Tautz 1982; Pflüger, 1984). Die Amplitude der A4I1-Aktionspotentiale musste erkennbar größer sein als die anderer Einheiten (mindestens 1,5-fach). Auf solche Hintergrundaktivität war schon vor

Versuchsbeginn besonderes Augenmerk zu richten, da unter Ringer nur sporadisch aktive Neurone bei Applikation von NO-Donoren oftmals mit rhythmischen Salven großer Amplitude antworteten. Solche Experimente wurden wegen der schwierigen Identifikation des A4I1-Signals deshalb abgebrochen.

Die extrazellulären Signale des A4I1 wurden 100-fach differentiell verstärkt (Grass, P15), über einen Oszillographen dargestellt, von analog nach digital gewandelt (CED Cambridge Electronic Design Ltd., 1401 Plus; Abtaste: 5 kHz) und mit der Software Spike 2 (Cambridge Electronic Design Ltd) aufgezeichnet.

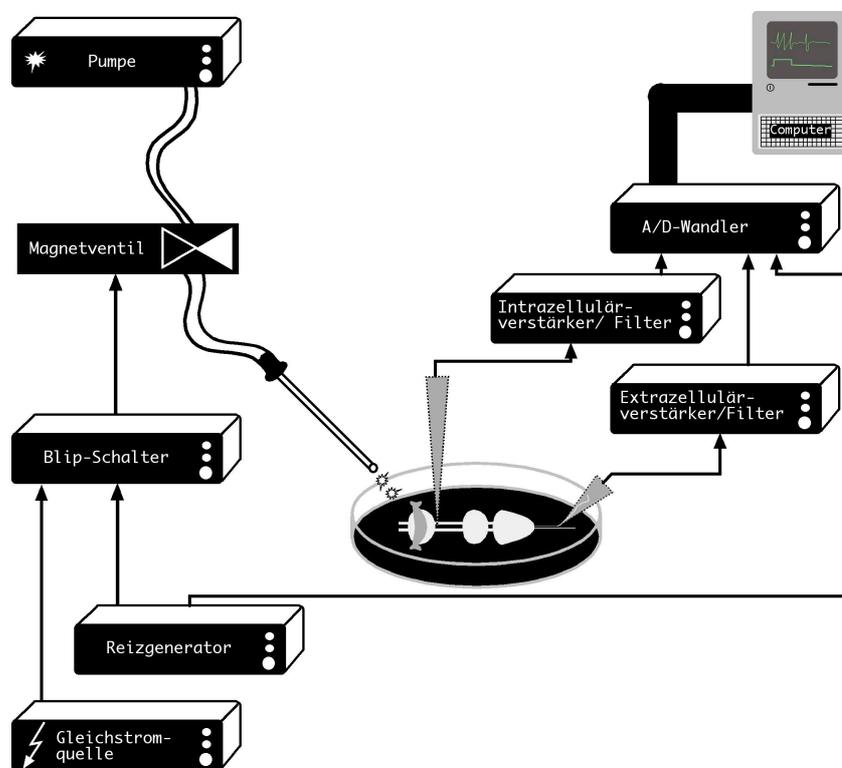


Abb. 6.1 Schema der Reiz- und Ableitapparatur

**Intrazelluläre Ableitungen:** Um das Signal-Rausch-Verhältnis bei der Ableitung schwacher Potentialänderungen zu optimieren, wurden sämtliche Versuche in einem Faraday-Käfig durchgeführt. Erschütterungen wurden minimiert, indem alle Geräte innerhalb des Käfigs auf eine durch Luftschläuche schwingungsgedämpfte Stahlplatte aufmontiert wurden.

Eine mit Stearin überzogene, abgeflachte Kanülenspitze wurde nah am Prothorakalganglion unter das zum Metathorakalganglion ziehende Konnektiv geschoben. Diese Plattform wurde mit einem Mikromanipulator (Prior) geführt und das posteriore Ende des

---

Prothorakalganglions derart angehoben, dass es unter leichter Spannung stand. Der vorgesehene Ableitort wurde jetzt kurz trocken gelegt, für 5 Sekunden mit etwas kristalliner Protease (Sigma, Typ XIV) bedeckt und anschließend gründlich gespült. Ebenso wie die Verwendung hypotonischen Ringers erleichterte dieses Vorgehen die Penetration des Gewebes mit der Glasmikroelektrode.

Alle Handhabungen am Präparat, einschließlich der Positionierung der Elektroden, waren durch ein Binokular (Wild-Heerburg) zu beobachten und zu kontrollieren. Den im Bad befindlichen Teil der indifferenten Elektrode bildete eine mit Silberdraht umwickelte Glaskapillare.

Für Färbungen dünnwandige ( $\varnothing$  1,0/0,74 mm), für physiologische Versuche meist dickwandige Borosilikat-Glaskapillaren ( $\varnothing$  1,0/0,58 mm; GC 100F-10; Clark Electromedical Instruments) wurden an verschiedenen Elektroden-Pullern gezogen (Sutter; P-2000; P-97). Für rein physiologische Versuche waren sie befüllt mit 1 M KAc, für Zellmarkierungen dagegen mit in 1 M KCl gelöstem Dextran-TRITC bzw. 5%-igem Neurobiotin oder mit in 0,5M LiCl gelöstem Lucifer Yellow (LY; Widerstände für alle: 20-50 M $\Omega$ ). Die Kapillaren wurden dann an einen Elektrodenhalter montiert und über einen Mikromanipulator (Leitz) bewegt und positioniert.

Das intrazelluläre Signal des A4I1 wurde posterior des Prothorakalganglions, am Austrittsort des Konnektivs abgeleitet. Das Interneuron war wiederum auf Grund seines spezifischen und hochempfindlichen Antwortverhaltens auf Windstimulation zu identifizieren. Sollten, wie in Teil III, andere gegenüber dem Reizmodus Wind sensitive Interneurone aufgefunden werden, wurden kontinuierlich Windpulse generiert (für die Wahl des Ableitortes vgl. Teil III; 5.2.1).

Das Ableitsignal wurde 10-fach verstärkt und in der bereits für extrazelluläre Ableitungen beschriebenen Weise AD-gewandelt und gespeichert. Ein Lautsprecher diente als akustischer Monitor auch schwacher Signale.

Durch konstante leichte Depolarisation ( $< 2$  nA) für Dextran-TRITC und Neurobiotin bzw. Hyperpolarisation ( $< 5$  nA) für LY wurden die Neurone mit den Zellkernen iontophoretisch befüllt. Die Iontophoresedauer sollte in der Regel nicht weniger als 10 Minuten betragen. Das war insbesondere kritisch bei Ableitungen neu beschriebener Interneurone, da stabile Ableitungen schwieriger zu erlangen waren als im breiten Axon des A4I. Sollten nur Verzweigungen im Prothorakalganglion angefärbt werden, genügten bei Raumtemperatur 1-2 Stunden als Diffusionsdauer. Sollten dagegen weiter entfernte Bereiche im Meso- und Metathorakalganglion angefärbt werden, betrug die minimal zugelassene Diffusionsdauer 4-5 Stunden. Sollte darüber hinaus eine Färbung auch im Ganglion A4 detektiert werden, wurde

zum einen näher am Mesothorakalganglion abgeleitet und zum andern an eine initiale 3-4-stündige Inkubation bei Raumtemperatur eine weitere zehnstündige Inkubation im Kühlschrank angeschlossen.

**Markieren sensorischer Neurone:** Rezeptorneurone filiformer Haare wurden entweder mit Neurobiotin (Vector) oder Dextran-Tetramethylrhodamin (Dextran-TRITC, Molecular Probes) markiert. Um identifizierte filiforme Haare herum wurde ein Vaselinering aufgebaut; das so entstehende Reservoir mit Aqua dest. befüllt, und das betreffende Haar an dessen Basis mit einem Rasierklingsplitter abgetrennt. (Es ist anzumerken, dass sich die Erfolgsquote der Färbung deutlich steigern ließ durch ständiges Kühlen, sowohl von Vaseline und Aqua dest. als auch der Epidermis des Tieres.) In das Aqua dest. wurden entweder einige Kristalle TRITC appliziert, andernfalls wurde Aqua dest. gegen eine 5%-ige Neurobiotin/Aqua dest. Lösung ausgetauscht. Die Diffusionszeiten für die über die verletzten Außensegmente in die Zellen eindringenden Farbstoffe betragen in der Regel 1-2 Tage, wobei die Präparate unter feuchter Atmosphäre bei 4 °C gelagert wurden.

**Reizgabe:** Zur Reizung des Rezeptor-A4I1-Systems wurden die filiformen Haare des Prosternums durch Luftpulse definierter Dauer und Stärke bewegt. Die Reizausgabe-Apparatur zeigt Abb. 6.1 schematisch.

Dauer und Rate der Windpulse (s.u.) wurden über einen Reizgenerator kontrolliert (Grass S 48 Stimulator/ Grass SIU 5B Stimulation Isolation Unit). Dessen Signal steuerte ein 3-Weg-Magnetventil (The LEE Co., LFAA 120 8H mit Voltkraft DC Power Supply als 12 V Gleichstromquelle). Der Ausgang des Reizgenerators wurde als Stimulusmonitor parallel zur Ableitspur ebenfalls mit Spike 2 aufgezeichnet.

Eine handelsübliche Aquarienpumpe (Schego optimal) generierte einen konstanten Luftstrom, der je nach Öffnungszustand des Magnetventils entweder auf das Präparat gerichtet war, oder neben das Präparat abgeleitet wurde. Die Reizstärke war an der Pumpe regulierbar. Da kein Anemometer zur absoluten Eichung der Stimulusintensität zur Verfügung stand, wurde der Regelbereich für die Pumpenleistung in gleiche Intervalle eingeteilt und, wenn erforderlich, als relative Messgröße protokolliert.

Die Düsenöffnung des Luftschlauches wurde in den meisten Versuchen derart positioniert, dass der Wind schräg von vorn auf das Präparat gerichtet war - aus einem gegenüber der Längsachse des Tiers um 45° verschobenen Winkel. Derart wurden filiforme Haare des Probasi- als auch des Proepisternums etwa gleichermaßen gereizt. Das erwies sich

insbesondere beim Auffinden neuer, gegenüber der Windrichtung sehr empfindlicher Interneurone als unbedingt notwendig. War die unterschiedliche Verrechnung proepi- und probasisternalen Eingangs zu untersuchen, wurde der Luftschlauch um eine enge Borosilikat-Glaskapillare ( $\varnothing$  1,0 mm; Länge 10 cm) erweitert. Hierdurch war der Luftstrom genauer zu fokussieren, durch Reizung nahe am Präparat und direkt von vorn wurden Probasisternum und beide Proepisterna separat stimuliert (Abb. 5.13).

Standardmäßig waren die Windpulse 300 ms lang und wurden mit einer Frequenz von 0,7 Hz ausgegeben.

*Versuche zur Wirkung von NO:* Je nachdem ob der NO-Donor DEA oder der sGC-Inhibitor ODQ getestet wurde, kamen verschiedene Reizregime zur Anwendung.

Im Falle von *DEA* sollten adaptierende oder habituierende Einflüsse möglichst ausgeschlossen werden, weshalb in Vorversuchen der Stimulus auf so lange Pulsperioden (etwa 1,5s) eingestellt wurde, dass über den Kontrollzeitraum keine Verringerung der AP-Antwort festzustellen war.

Zweck der *ODQ*-Versuche dagegen war es, mittelbar den Einfluss von NO auf die Habituation zu testen. In Vorversuchen wurde deshalb eine Pulsfolge (mit hohem Duty cycle) ermittelt, die innerhalb von 100 s eine etwa 50%-ige Verringerung der AP-Antwort je Windpuls herbeiführte. Die für eine entsprechende Habituation des Präparates notwendigen Pulsperioden betragen zwischen 0,5 und etwa 1s. Insbesondere bei Experimenten zu Wirkungen Stickstoffmonoxids kann der unterschiedliche physiologische Status von Präparaten zu verschiedenen Ergebnissen führen. Vor Beginn des eigentlichen ODQ-Tests wurden die Präparate deshalb 20 min lang mit der vorab ermittelten Pulsfolge konstant stimuliert. Neben der Angleichung des physiologischen Zustands lag ein entscheidender Grund für die Prä-Stimulation darin, das Rezeptor-A4I1-System in den Zustand hoher Belastung zu versetzen. Während der Badapplikation der Pharmaka (ODQ, DMSO) schließlich, wurde das Präparat mit jeweils 100 s dauernden Pulsreihen stimuliert, die mit jeweils 100s dauernden Pausendauern alternierten (vgl. Abb. 3.18). Jeweils die erste, an die 20 min dauernde konstante Prä-Stimulation anschließende Habituationsreihe blieb unberücksichtigt. Dieses Vorgehen sollte Initialeffekte nach Beendigung der nicht durch Pausen unterbrochenen Prä-Stimulation ausschließen.

***Datenanalyse für Teil I:*** Antworten des A4I1 als AP-Zahl/Puls wurden in Spike2 mit darin implementierten, neu geschriebenen oder abgewandelten Scripts analysiert. Weiterführende

---

Auswertungen erfolgten in EXCEL (Microsoft Inc.) und Clampfit (Axon Instruments/Molecular Devices Corp.; für Abb. 3.20 und 3.21). Um für die Untersuchung des Zeitverlaufs während DEA-Applikation sehr kurzfristige Antwortvariabilitäten (<5s) zu minimieren, wurden die Zeitverläufe der AP-Antworten jedes Präparates in EXCEL *Tiefpassgefiltert* (gleitender Mittelwert über n=5 Antworten, d.h. über Zeitfenster von etwa 7,5 s). Statistische Analysen erfolgten in EXCEL, R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) oder STATISTICA (StatSoft). Die jeweiligen statistischen Tests sind unter Ergebnisse jeweils angegeben.

**Datenanalyse für Teil III:** AP-Zeitpunkte und -Antworten je Puls wurden wiederum in Spike2 bestimmt, in EXCEL importiert und hier weiter analysiert.

### 6.1.3 Immunozytochemie

Mit Ausnahme des direkt färbenden Dextran-TRITC wurden Zellmarker und Antikörper an Carbocyanfarbstoffe gekoppelt. Auch im Falle des Direktfarbstoffes Lucifer-Yellow (LY) war dies unumgänglich, da er besonders in schmalen Dendriten nur ungenügende Signalintensitäten emittiert. Darüber hinaus ist das Emissionsspektrum von LY (Anregung bei 488 nm) vergleichsweise breit, weshalb sich dessen Signal nur schlecht separieren lässt gegenüber Farbstoffen, die durch die 567 nm Linie des Ar-Kry Lasers angeregt werden. Das sind beispielsweise Dextran-TRITC und Cy3.

Für die Untersuchung der NOS-Verteilung in der Nähe von Neuronen (Teil I) wurde das intrazelluläre Färbeprotokoll für Neurobiotin mit einem Protokoll zur Entwicklung von Antikörpern kombiniert. Um eine gute Signaltrennung sicherzustellen, wurde Neurobiotin über Streptavidin an CY2 (max. Anregung bei ca. 490 nm; max. Emission bei ca. 510 nm, vgl auch 6.5) und der u-NOS Antikörper über einen sekundären Antikörper an Cy5 gekoppelt (max. Anregung bei ca. 655 nm; max. Emission bei ca. 680 nm). Besonders für NOS-Markierungen ist eine gute Signaltrennung bedeutsam, da im Gegensatz zu Zellfärbungen, Proteinmarkierungen meist eine breitere Verteilung von Signalintensitäten aufweisen. So kann je nach lokaler Häufung der detektierten Proteine ein sehr schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis eintreten. Die CY5-Markierung erwies sich darüber hinaus als vorteilhaft, weil das Gangliengewebe von *Locusta* mit dem hier verwendeten Fixierungsprotokoll unter der 647 nm-Laserlinie die geringste Autofluoreszenz emittiert.

Waren mehrere Zellfärbungen zu kombinieren, wurde ein von D. Bucher (Dissertation, FU-Berlin, 2000) entwickeltes Rezept für Dreifach-Zell-Markierungen angewendet. Kamen nur zwei Farbstoffe zum Einsatz, wurde ebenfalls die Kombination von CY2 und Cy5 bevorzugt (vgl. Tabelle 6.1).

Das Gangliengewebe von *Locusta* stellt gegenüber Antikörpern eine kritische Diffusionsbarriere dar, weshalb der Inkubation verschiedene, die Permeabilität des Gewebes heraufsetzende, Schritte vorangestellt werden müssen (vgl. Tabelle 6.1).

Die auf Sylgard aufgesteckte Ganglienketten wurden fixiert und gewaschen; eine Alkoholreihe diente der Entfettung, eine Enzymlösung (Collagenase/ Dispase, Hyaluronidase (beide Sigma, je 1mg/ml)) perforierte das Gewebe.

Im Falle der gegen die NO-Synthase (NOS) gerichteten Markierungen mit dem polyklonalen universal-NOS-Antikörper (Dianova) musste überdies vor Beginn der Fixierung das Perineurium des Prothorakalganglions entfernt werden (*desheathing*). Ventral, posterior wurde dafür ein Schnitt gesetzt, die Ganglienhülle wurde vorsichtig angehoben und möglichst weit anterior abgetrennt. Tabelle 6.1 gibt eine genaue Aufstellung der Verfahrensweise zur Entwicklung der Färbungen.

Um die dreidimensionale Struktur möglichst wenig zu beeinträchtigen wurden alle Präparate als *wholemounds* auf Objektträger von 0,3 mm Höhe aufgezogen (Eigenbau durch die institutseigene Werkstatt). Ein Loch (Durchmesser: 1cm) zum beiderseitigen Betrachten des Präparates wurde abgedeckt von Deckgläsern, die mit Nagellack bzw. Sekundenkleber aufmontiert wurden. Dies war essentiell, weil der Arbeitsabstand des zumeist verwendeten 50x-Objektives mit 150 µm exakt der Hälfte der Objektträgerhöhe entsprach.

	Zeit in	Dextran-TRITC	Nerobiotin	α LY	u-NOS
<b>Fixierung</b> 4% PFA	h	1-2	2	2	2
<b>Waschen in</b> 0,1 M PBS	min	10	10	10	10
0,1 M PBS	min	10	10	10	10
0,1 M PBS	min	10	10	10	10
<b>Dehydrierung</b> 30% ETOH	min	10	10	10	10
50% ETOH	min	10	10	10	10
70% ETOH	min	10	10	10	10
90% ETOH	min	10	10	10	10
100% ETOH	min	10	10	10	10
100% ETOH	min	10	10	10	10
<b>Rehydrierung</b> 90% ETOH	min	10	10	10	10
70% ETOH	min	10	10	10	10
50% ETOH	min	10	10	10	10
30% ETOH	min	10	10	10	10

<b>Waschen in</b> 0,1 M PBS	min	10	10	10	10
0,1 M PBS (37 °C)	min	10	10	10	10
0,1 M PBS (37 °C)	min	10	10	10	10
<b>Enzymatische Behandlung</b> Protease/ Hyaluronidase (37 °C)	min	20	20	20	20
<b>Waschen in</b> 0,1 M PBS (ca. 4 °C)	min	10	10	10	10
0,1 M PBS (ca. 4 °C)	min	10	10	10	10
0,1 M PBS	min	10	10	10	10
<b>Inkubation in prim. AK</b> (4 °C)	d	-	1/2 – 1 in CY2/CY3/Cy5- Streptavidin (1:750)	1/2 – 1 in Kaninchen- $\alpha$ -LY (1:1000)	2 Kaninchen- $\alpha$ - u-NOS (1:100)
<b>Waschen in</b> 0,1 M PBS	min	-	10	10	10
0,1 M PBS	min	-	10	10	10
0,1 M PBS	min	-	10	10	10
<b>Inkubation in sek. AK</b> (4 °C)	h	-	-	CY2/ CY5- $\alpha$ - Kaninchen	CY5- $\alpha$ -Kaninchen
<b>Waschen in</b> 0,1 M PBS	min	-	-	10	10
0,1 M PBS	min	-	-	10	10
0,1 M PBS	min	-	-	10	10
<b>Dehydrierung</b> 30% ETOH	min	10	10	10	10
50% ETOH	min	10	10	10	10
70% ETOH	min	10	10	10	10
90% ETOH	min	10	10	10	10
100% ETOH	min	10	10	10	10
100% ETOH	min	10	10	10	10
<b>Klärung</b> Methylsalizylat		bis Klärung	bis Klärung	bis Klärung	bis Klärung
33% Methylsalizylat/ 66% ETOH		bis Klärung (mdst. 4 h)	bis Klärung (mdst. 4 h)	bis Klärung (mdst. 4 h)	bis Klärung (mdst. 4 h)
<b>Präparat aufziehen</b>					

Tabelle 6.1: Rezepte für die Farbstoff- und Antikörperentwicklung in *Locusta migratoria* (zu Varianten der Färbeprozeduren für Antikörper gegen Synapsenproteine s.u.).

**Methodische Versuche zur Markierung von Synapsenproteinen:** Ein ursprünglich geplantes Projekt sollte putative Synapsen zwischen einzelnen windsensitiven Rezeptorzellen und dem A4I1-Interneuron qualitativ und quantitativ erfassen. Gerade für die quantitative Bestimmung von synaptischen Kontakten zwischen A4I1 und Rezeptorzellen erschien die optische Überlappung in Doppelmarkierungen als alleiniges Kriterium für synaptischen Kontakt unzulänglich: Einerseits nutzen die Hauptneuriten des A4I1, mit vermutlich axonalem Charakter, über weite Strecken die gleichen Trakte wie die Rezeptorzellaxone (vgl. Teil III). Andererseits konvergieren viele verschiedene Rezeptorzellaxone in den selben Neuropilgebieten in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Um putative synaptische Kontakte besser abzusichern, sollten deshalb zusammen mit Zellfärbungen synaptische Proteine markiert werden. Deshalb wurden Versuche unternommen, auch ein Protokoll für die Markierung mit präsynaptischen Markern zu entwickeln [ $\alpha$ -Synapsin (SYNORF 1/Maus-Antiserum), bereitgestellt von Prof. E. Buchner, Universität Würzburg, Deutschland und  $\alpha$ -Synaptotagmin (DSYTZ/Kaninchen-Antiserum), Dr. H. Bellen, Baylor College of Medicine, Houston, USA]. Die zahlreichen Tests zur Markierung von Synapsenproteinen führten jedoch nicht zu befriedigenden Resultaten. Um aber weiterführende Untersuchungen zu erleichtern, ist es sinnvoll, die durchgeführten Ansätze als Referenz hier kurz zusammenzufassen:

Ausgangsbasis waren jeweils Standard-Färbeprotokolle für primäre/sekundäre Antikörperkopplung (vgl. Tabelle 6.1).

- 1) Ohne Entfernung des Perineuriums war im Ganglion mittels visueller Beurteilung keine Färbung auszumachen. Wurde das Rezept dagegen in der für den u-NOS Antikörper beschriebenen Weise ausgeführt, war lediglich die Neuropiloberfläche angefärbt.
- 2) Deshalb wurden sowohl Paraffin- als auch Gefrierschnitte verschiedener Dicke von den Präparaten hergestellt. Jedoch auch hier war die Eindringtiefe mit 5-10  $\mu$ m zu gering. Entsprechend geringere Schnittdicken würden aber die dreidimensionale Architektur des A4I1-Rezeptorzell-Systems zu stark beeinträchtigen um vernünftige morphometrische Resultate zu erzielen.
- 3) Ebenfalls erfolglos waren jene Versuche, bei denen zwischen der anfänglichen De- und Rehydrierung ein zusätzlicher wirkungsvoller Entfettungsschritt mit Xylol eingeschaltet wurde oder statt PBS eine 0,5 bzw. 1 % ige TritonX-PBS-Lösung eingesetzt wurde.
- 4) Tests für längere Inkubationszeiten von bis zu 5 Tagen für den primären und 3 Tagen für den sekundären Antikörper verliefen ebenso so wenig erfolgreich wie die Veränderung der Konzentrationen der verwendeten Antikörper. Die höchsten eingesetzten Konzentrationen

waren für SYNORF - 1:10, für DSYTZ - 1:100, für die sekundären Antikörper - jeweils 1:200.

5) Lediglich die Methanolfixierung des Gewebes ermöglichte hinreichende Eindringtiefen der Synapsenmarker von mehr als 50  $\mu\text{m}$ . Hierfür wurden die Präparate in einer Lösung 4%-igen Formaldehyds in 60%-igem Methanol bei variierter Dauer, jedoch höchstens 20 Minuten, vorfixiert. Nun erst wurde für weitere zwei Stunden in herkömmlicher Weise 4%-iges Paraformaldehyd in 0,1 M PBS als Fixierungs-Agens eingesetzt. Das Verfahren verbesserte die Eindringtiefe des Antikörpers deutlich. Dennoch führte es zu einem 'Ausbluten' der intrazellulären Markierung. Sowohl Lucifer-Yellow (Sigma) als auch das nach Farbstoffkopplung sichtbar gemachte Neurobiotin bezeichneten keine fest umrissenen Strukturen mehr. Das Verkürzen der Vorfixierung auf nur 5 Minuten verminderte zwar diesen Effekt, die Zellmarkierungen erschienen aber weiterhin deutlich zu dick und konturschwach.

#### **6.1.4 Konfokale Mikroskopie und Analyse der anatomischen Daten**

Um die dreidimensionale Struktur der anatomischen Präparate zu erfassen, wurden sämtliche Färbungen mit einem konfokalen Laserscanmikroskop (KLM) aufgenommen, anfangs ein Leica TCS4D-, später ein Leica SP2-System. Beide Mikroskope verfügten über Mischgas-Laser verschiedener Wellenlänge, von denen die folgenden Linien Verwendung fanden (Aufstellung für das SP2-System):

- He/Ne: 488 nm; Anregung von CY2 und LY
- Ar/Kry: 567 nm; Anregung von CY3 und TRITC
- Ar/Kry: 628 nm; Anregung von CY5

Für Übersichtsfärbungen standen ein 10x/Luft- und ein 20x/Öl- Objektiv zur Verfügung. Als hochauflösendes Objektiv kam ein 50x/Öl-Objektiv zur Anwendung. Das 40x-Objektiv ist aufgrund seiner besseren optischen Eigenschaften (numerische Apertur: 1,25) eigentlich zu bevorzugen, besaß jedoch einen zu geringen Arbeitsabstand für die von ventral bis ca. 150  $\mu\text{m}$  tief ins Ganglion reichenden Dendriten des A4I1. Tabelle 2 zeigt neben den optischen Eigenschaften die für die jeweiligen Objektive verwendeten optischen Schnittdicken.

Mit Standardmodulen der Grafiksoftware Amira 3.1.1 (TCS Europe) wurden konventionelle morphologische Darstellungen, wie Projektionsansicht und optischer Einzelschnitt, erstellt.

Neurone wurden semiautomatisch rekonstruiert mit einem in AMIRA 3.1.1 implementierten Softwaremodul (entwickelt von J.F. Evers/FU-Berlin/AG Duch und S. Schmitt/M. Sibila

/TU-Berlin/AG Obermayer; Schmitt et al., 2004 und Evers et al. 2005, Referenzen in Kapitel 4.4).

Objektiv	10x/Luft HC PLAPO	20x/Öl PLAPO	40x/Öl	50x/Öl
numerische Apertur	0.4	0.7	1,25	0,85
Auflösung x-y/z [nm]	488/2630,4	278,9/1284	156,2/334,4	216,9/743
Arbeitsabstand [ $\mu\text{m}$ ] (mit Deckglas)	2200	250	100	150
verw. opt. Schnittdicke [ $\mu\text{m}$ ]	2	1	0,06-0,3	0,3-0,6

Tabelle 6.2: Kenndaten der eingesetzten Objektiv

Um die Verteilung der NO-Synthase-Immunoreaktivität (NOS-IR) in der Umgebung eines Neurons (Teil I) zu analysieren, wurde die Information der Datenstapel aus zwei Kanälen kombiniert (uNOS-IR vs. rekonstruierte Oberfläche aus Zellfärbung). Dafür wurden mit o.g. Software in festgelegten Distanzen von der rekonstruierten Oberfläche umhüllende Distanzvolumina generiert (vgl. Abb. 3.3 in Kapitel 3.2.1.1). Innerhalb dieser Distanzvolumina wurden die jeweils maximalen Intensitäten aus dem uNOS-IR Kanal ermittelt (Die punktförmigen, etwa  $1\mu\text{m}$  großen uNOS-IR Loki würden bei Betrachtung mittlerer Intensitäten bei größeren Distanzwerten und also in größeren Volumina kaum mehr repräsentiert.). Jedem Punkt auf der originalen Oberfläche (Distanz =  $0\mu\text{m}$ ) wurde in der entsprechenden Distanz die maximale Intensität der uNOS-IR zugeordnet. Für Abbildungen wurde die Intensität falschfarbkodiert dargestellt.

Für weiterführende quantitative und statistische Analysen standen zur Verfügung: EXCEL (Microsoft Corp.), STATISTICA (StatSoft), R (GNU-Projekt, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Anatomische Abbildungen wurden mit Corel-Graphics 11 (Corel Corp.) oder Freehand (Macromedia) erstellt und bearbeitet.

## 6.2 Markierung des Motoneurons 5 (MN5) von *Manduca sexta*<sup>26</sup>

Die Verfahrensweisen zum intrazellulären Markieren des MN5 in *Manduca sexta* waren den in 6.1 beschriebenen Methoden vergleichbar, weshalb hier nur abweichende Punkte besprochen werden sollen.

<sup>26</sup> Experimente für Teil II wurden von Jan Felix-Evers vorgenommen.

### **6.2.1 Versuchstiere und Präparation**

Die Tiere stammten aus der institutseigenen Zucht und wurden in einem künstlichen Tag/Nacht-Zyklus (17h/7h) bei 26 °C gehalten. Kriterien zur Bestimmung der Puppenstadien waren morphologische Veränderungen der Kutikula oder Veränderungen von Strukturen, die durch die Kutikula sichtbar sind (*staging*; u.a. Reinecke JP, Buckner, JS, Grugel SR (1980) Life-cycle of laboratory-reared tobacco hornworms, *Manduca sexta* - study of development and behavior, using timelapse cinematography. Biol Bull 158(1):129-140).

Eine 15 minütige Lagerung auf Eis anästhetisierte die Tiere. Sie wurden entlang der dorsalen Mittellinie geöffnet und mit Ringer perfundiert. Die thorakalen Ganglien wurden entfernt und überführt in eine mit Sylgard beschichtete Petrischale, die ebenfalls eine Ringerlösung enthielt. Die freien Nervenendigungen wurden festgesteckt, und die Gangleinhülle mit Pinzetten vorsichtig entfernt. Der Nerv 1 des Mesothorakalganglions mit einer peripheren Abzweigung, die nur die Axone der 5 dorsolongitudinalen Flugmuskeln (DLM) enthält, wurde intakt gelassen.

### **6.2.2 Registrierung der Ableitsignale, Farbstoffinjektion und Reizapparatur**

Das MN5 ist das einzige mesothorakale Motoneuron der fünf DLMs, die durch einen spezifischen Abzweig des Nerven 1 in die Peripherie ziehen. Antidromes Stimulieren der Nervenendigung mit einer Saugelektrode (Eigenbau) ermöglicht deshalb das Identifizieren des MN5 im Mesothorax (Stimulationseinheit: AM-Systems inkl. stimulus-isolation unit).

Die Glasmikroelektroden waren befüllt mit 7% Neurobiotin in 2 M KAc, die resultierenden Widerstände betragen 20-25 M $\Omega$ . Ableitverstärker (AxoClamp 2B), AD-Wandler (Digidata 1322A) und Aufzeichnungssoftware (Clampfit 9.0) stammen von Axon Instruments. Leichte Depolarisation (3 nA) ermöglichte das iontophoretische Befüllen der Zelle (in der Regel 45 min).

### **6.2.3 Immunocytochemie**

Die Ganglien wurden in 4% Paraformaldehyd für 2 h fixiert und anschließend gespült in Phosphatpuffer (PBS). Eine aufsteigende Ethanolreihe entwässerte die Ganglien (50/70/90/100%). Aufeinander folgend wurde das Präparat mit wirksam entfettenden Lösungen gespült (1:1 Ethanol/Methylsalizylat, 100 % Methylsalizylat, 1:1 Methylsalizylat Xylol; je 10 min). Alle Schritte wurden anschließend in umgekehrter Reihenfolge ausgeführt um das Präparat zu rehydrieren. Nach einem zweistündigen Bad in 0,5 % igem TritonX-PBS wurden die Ganglien in 10% *normal-goat-serum* präinkubiert (1h). Die anschließenden

Kopplung von Neurobiotin an Streptavidin-CY3 (1:750 in 0,05% igem Triton X PBS) erfolgte während einer mindestens 24-stündigen Inkubationszeit, während der das Präparat auf einem Schüttler gelagert war. Schließlich wurde das Präparat erneut in PBS gespült, dehydriert (s.o.) in 100% Methylsalizylat geklärt und in der für *Locusta* beschriebenen Weise auf Objektträger aufgezogen (Die Objektträger waren hier jedoch lediglich 200 µm hoch).

#### 2.2.4 Konfokale Mikroskopie und Analyse der anatomischen Daten

Konfokalmikroskopische Bilder wurden mit einem hochauflösenden 40x-Öl Objektiv aufgenommen (vgl. Tabelle 6.2). Die optische Schnittdicke betrug 300 nm. Die Daten wurden wiederum mit der Software Amira 3.1.1 und darin implementierten, neuen Modulen prozessiert. Für weiterführende statistische Analysen sind die Daten in R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) importiert worden. Längenmaße wurden getestet mit dem paarweisen Wilcoxon-Test (Korrektur für multiple Vergleiche über *Bonferroni's p-value adjustment*). Der t-Test nach Student wurde für paarweise Vergleiche zwischen Filopodiendichten an Dendritenschaft und –spitze genutzt.

#### 6.3 Lösungen und Chemikalien

Isotonischer Ringer nach Clements und May (1974)		
	140mM	NaCl
	10mM	KCl
	4mM	NaH PO <sub>4</sub>
	6mM	Na HPO <sub>4</sub>
	2mM	CaCl <sub>2</sub>
	9mM	Saccharose (opt. für isotonisch)
		gelöst in Aqua dest.
Zellkulturringer nach E. Heidel		
	150 mM	NaCl
	5 mM	Kcl
	5 mM	CaCl <sub>2</sub>

	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	Hepes
	pH 7,4, 360 mOsmol/ Kg eingestellt mit NaOH und Glukose	
<i>Manduca</i> Ringer		
	140mM	NaCl
	5mM	Kcl
	28mM	D-Glucose
	5mM	Hepes
		gelöst in Aqua dest
PBS-Puffer		
Lösung A	27,6g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O/ 1 Liter Aqua dest.
Lösung B	28,	4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O/ 1 Liter Aqua dest.
		Mischverhältnis Lösung A:B/ 1:4
DEA NONOate	Alexis,	
ODQ	Alexis	
Protease	Sigma, P-5147	
Collagenase-Dispase	Sigma, C-3180	
Hyaluronidase	Sigma, H-3506	
Formalin	Fluka	37% wässrige Lösung
Paraformaldehyd		4% in Aqua dest.
Methylsalizylat	Merck	

---

Dextran-Tetramethylrhodamin-ITC	Molecular Probes, D-3308	
Neurobiotin	Linaris (Fa.Vektor), S-1120	
Cy2/CY3/CY5-Streptavidin,	Dianova, 016-160-084	
Lucifer-Yellow	SIGMA L0259	
Anti-Lucifer Yellow Antikörper (aus Kaninchen)	SIGMA L9163	
Normal Goat Serum	Linaris (Fa.Vektor), S-1000	1g in 25ml Aqua dest
u-NOS Antikörper (aus Kaninchen)	Dianova/ ABR PA1-039	