

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Alle Experimente zur Untersuchung der Aktivität von DUM-Zellen während des Laufens wurden an der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* durchgeführt. Für die Experimente wurden adulte Tiere beiderlei Geschlechter aus der institutseigenen Zucht entnommen.

Die Experimente zur Untersuchung der Wirkung von Oktopamin auf den Muskelstoffwechsel wurden an der afrikanischen Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria Forskål* durchgeführt. Auch hier wurden adulte Tiere beiderlei Geschlechts aus der institutseigenen Zucht entnommen.

Die Aufzeichnungen der neuronaler Aktivität identifizierter Motoneuronen während der postembryonalen Entwicklung von *Manduca sexta* mit Hilfe chronisch implantierter Elektroden wurden an Larven unterschiedlichen Alters durchgeführt. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Dr. Carsten Duch. Die Tiere wurden aus der Zucht der Arbeitsgruppe Duch entnommen.

2.2. Elektrophysiologie

2.2.1. Chronische extrazelluläre Ableitungen

Um die Aktivität von DUM Neuronen während eines Verhaltenskontextes wie z.B. des Laufens aufzeichnen bzw. ableiten zu können, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit Elektroden entwickelt, die es ermöglichen, extrazellulär neuronale Signale abzuleiten, während sich das Versuchstier frei bewegen kann. Dabei galt es folgende Probleme zu lösen.

1. Die Elektroden dürfen nur so groß bzw. klein sein, dass sie, wenn sie in das Tier implantiert werden, dieses nicht in ihrem Verhalten beeinflussen. Das heißt, dass die

Elektroden keinen Druck auf die umliegenden Muskeln ausüben oder ein zusätzliches Gewicht für das Tier darstellen dürfen.

2. Die Elektroden müssen über die nötige Flexibilität verfügen, um den anatomischen Gegebenheiten im Tier angepasst werden zu können. Sie müssen aber auch über die nötige Steifheit bzw. Festigkeit verfügen, die den etwaigen Belastungen, die während des Verhaltens auftreten können, Stand zu halten.

3. Das verwendete Material darf für das Tier nicht toxisch sein.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelten Implantationselektroden erfüllen diese Kriterien. Bei diesen Implantationselektroden handelte es sich um bipolare Hakenelektroden. Zur Herstellung der Elektroden wurde Stahldraht (\varnothing 25 μ m, Rheinische Feindraht Industrie, Eckhagen) verwendet, der mit einer Lackschicht isoliert war. Die Enden zweier Drähte von ca. 1 Meter Länge wurden in paralleler Ausrichtung mit Klebeband an dem einen Ende eines Objektträgers fixiert. Die Drähte wurden dann über den Objektträger gezogen, unter Spannung gehalten und mit einem weiteren Streifen Klebeband am anderen Ende ebenfalls fixiert, so dass die Drähte nebeneinander auf dem Objektträger zu Liegen kamen. Die langen Enden der beiden Drähte, die auf einer Seite überstanden, wurden mit Klebeband zusammengeklebt (Abb.1A). An den kurzen Enden der Drähte wurde die Lackschicht mit einer Rasierklinge auf einer Länge von ca. 1 cm vorsichtig abgetragen (Abb.1B). Hierbei galt es zu beachten, dass die Lackisolation der Drähte nicht vollständig abgetragen wurde, sondern nur auf einer Seite. Die blanken Seiten der Drähte bildeten im weiteren Verlauf die Innenschenkel der zum Haken gebogenen Drähte, auf die der Nerv gelegt wurde. Die Außenseiten der Haken behielten somit ihre Isolation durch die Lackschicht. Nachdem die Lackschicht abgetragen war, wurde auf die Drähte auf einer Länge von 5-6 cm Silikon aufgetragen (Abb.1C). Bei dem verwendeten Silikon handelte es sich um ein Zwei-Komponenten-Silikon (Kwik-Cast/Kwik-Sil, World Precision Instruments, Sarasota, FL), das als zusätzliche Isolation der Elektrode gegen das Tier diente. Das Silikon besteht aus einer Basiskomponente und einer Katalysatorkomponente, die den Prozess der Durchhärtung initiiert. Das Aushärten des Silikons hing hierbei sowohl von der Raumtemperatur als auch von dem Mischungsverhältnis der Basiskomponente zur Katalysatorkomponente ab. Zur Herstellung der Elektroden wurden 3 Teile Basiskomponente mit 1 Teil Katalysatorkomponente gemischt. In diesem Mischungsverhältnis betrug die Aushärtungszeit bei Zimmertemperatur ca. 3 Minuten, was zum Verarbeiten bzw.

Auftragen des Silikons auf die Drähte ausreichend war. Bei Mischungsverhältnissen von 2:1 halbiert sich die Zeit, die das Silikon zum Aushärten benötigt. Bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 halbiert sich diese Zeit erneut. Nachdem das Silikon ausgehärtet war, wurden die abisolierten Drahtenden durch oberflächliche Längsschnitte in das Silikon aus diesem herauspräpariert. Die Drahtenden wurden dann so zu Haken gebogen, dass die abisolierte Seite der Drähte die Innenschenkel der Haken bildete. Mit einer Feinschere wurden die Haken auf eine Länge von ca. 200-100 μ m gekürzt. Überschüssiges Silikon wurde mit einem Skalpell entfernt (Abb.:1E und F).

Die oben beschriebenen extrazellulären Hakenelektroden wurden chronisch in *Locusta migratoria* implantiert, um die Aktivität von DUM Neuronen während des Laufens zu ermitteln. Der Vorgang der Implantation wird im folgenden Absatz ausführlich beschrieben. In den durchgeführten Experimenten wurden die extrazellulären Signale 100fach verstärkt und auf einem Oszilloskop (Tektronix 5111A) dargestellt. Über einen Analog-Digitalwandler (CED Cambridge Electronic Design Limited, 1401plus) wurden die Aufnahmen in einen Computer eingelesen und mit dem Programm Spike2 (Version4, Cambridge Electronic Design Limited) weiter ausgewertet.

Die chronischen extrazellulären Ableitungen an *Manduca sexta* wurden mit einem Verstärker (Model 1700, A-M Systems, Stadt; Land) 1000fach verstärkt und mit einem Analog-Digitalwandler (Digidata 1320A, Axon Instruments, Foster City, CA.) in einen Computer (Dell) eingelesen und über mehrere Tage mit der Software pClamp8 (Axon) aufgenommen. Um die Aufnahmen weiter bearbeiten zu können, wurden die Daten in Spike 2 (Version 4, Cambridge Electronic Design) importiert.

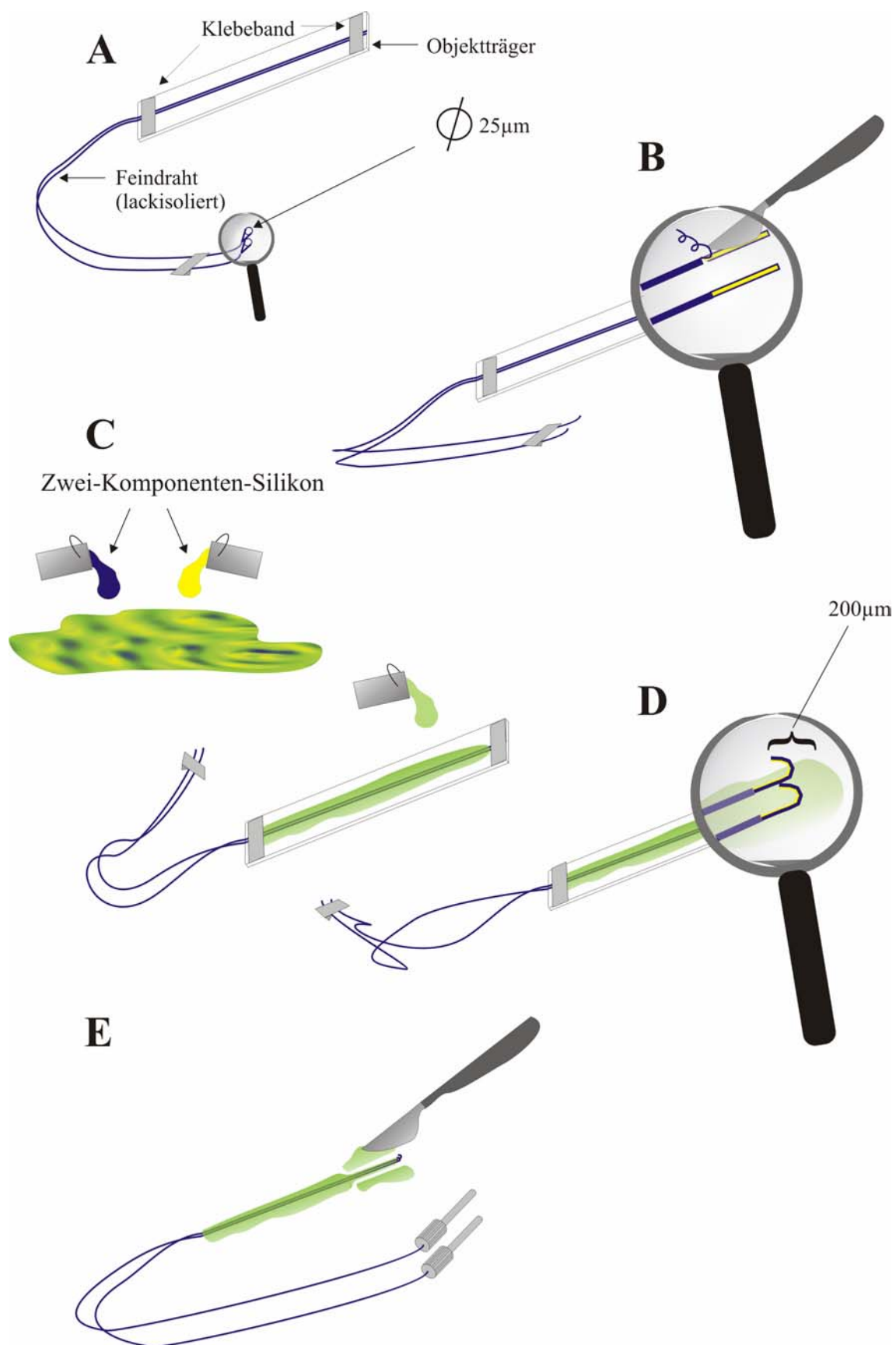


Abb.1: Die Abbildung dokumentiert den Herstellungsprozess chronischer Implantationselektroden. Zur Herstellung der Elektroden werden 2 lackisolierte Drähte von 25 µm Durchmesser in paralleler Ausrichtung auf einem Objektträger befestigt. Mit einem Skalpell wird die Lackschicht auf der Oberseite der Drähte auf einer Länge von 0,5 -1 cm entfernt. Das Zwei-Komponenten-Silikon wird angerührt und mit einem Glashaken auf die Drähte aufgetragen. Mit einem Skalpell wird oberflächlich ein Schnitt von 0,5 cm parallel zu den Drähten gemacht. Der Schnitt erfolgt in dem abisolierten Bereich. Die Drähte werden mit einer Pinzette aus dem Silikon gehoben und zu Haken zurechtgebogen. Bei diesem Schritt ist darauf zu achten, dass die abisolierte Seite der Drähte die Innenschenkel der Haken bildet. Die Haken werden mit einer Feinschere auf eine Länge von 100 – 200 µm gekürzt und überschüssiges Silikon mit dem Skalpell entfernt.

2.2.2. Implantation der Elektroden

2.2.2.1. Implantation der Elektroden an Hauptnerven von *Locusta migratoria*

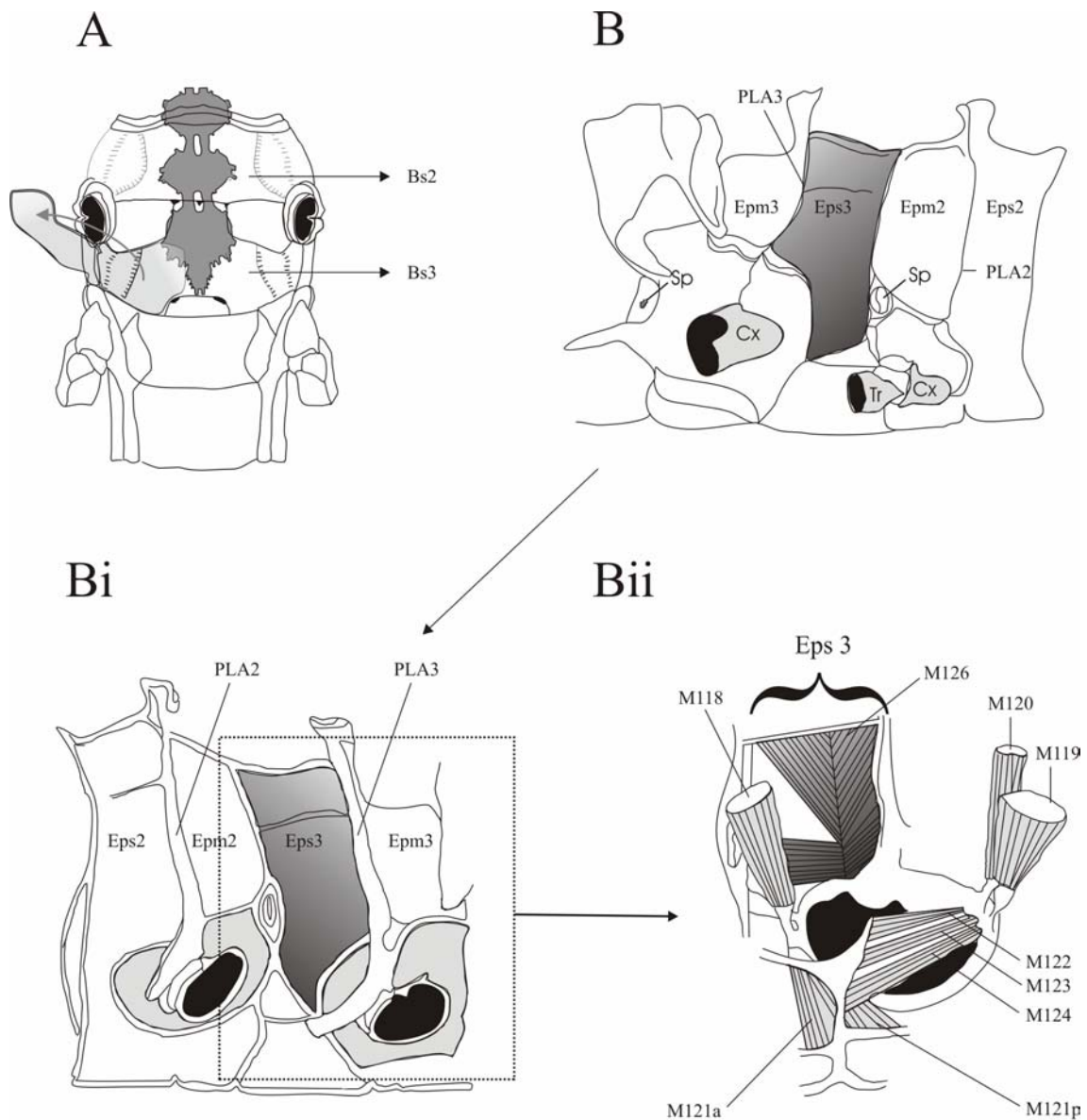
Vor jedem Experiment wurde das Versuchstier im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4°C gekühlt und damit betäubt. Anschließend wurde das Tier mit der ventralen Seite nach oben in einem Knetebett fixiert. Die Positionen von Meso- und Metathorakalganglion waren von außen durch die Ansatzstellen der drei Kutikulaspannen, die sich zwischen Meso- und Metathorakalganglion befinden, gut zu lokalisieren (Abb2A). Mit einem Skalpell wurde im Bereich des Thorax ein Fenster in die Kutikula geschnitten. Der erste Schnitt erfolgte parallel zur mittleren Längsachse des Tieres auf einer Strecke von 4-5mm. Von den Enden des Schnittes folgten von proximal nach distal zwei weitere Schnitte. Hierbei galt es zu beachten, die Flugmuskeln 113 und 127, deren Ansatzstellen ebenfalls von außen gut erkennbar waren, nicht zu verletzen. Das Kutikulastück wurde mit der Pinzette angehoben, nach außen gebogen und mit einer Insektennadel fixiert (Abb.2A). Die an einem Mikroelektrodenhalter befestigte Silikonelektrode wurde so ausgerichtet, dass sie sich annähernd in ihrer Endposition befand und unter optischer Kontrolle an das Kutikulafenster herangefahren. Mit einem Glashaken wurde einer der Hauptnerven N3, N4 oder N5 auf die Implantationselektrode gehoben. Hierbei bildete sich ein Hämolympfilm auf der Elektrode, der unmittelbar vor dem Auftragen des Silikons auf die zur Hakenelektrode gebogenen Drähte mit einem Papiertuch abgesogen wurde. Das Absaugen der Hämolymphe war unbedingt notwendig, da sonst ein optimales Abbinden

des noch flüssigen Silikons mit dem trockenen Silikon der Elektrode ausblieb und keine Isolation der Elektrode gegen das Innenmedium des Tieres erreicht werden konnte. Nach dem Aushärten des Silikons am Elektrodenkopf wurde die Elektrode in das Tier abgesenkt, das nach außen gebogene Kutikulastück wieder in seine ursprüngliche Position gebracht und die Schnittstellen mit Gewebekleber (Histoacryl, Braun, Tuttlingen, Deutschland) oder heißem Bienenwachs versiegelt. Der 4-5cm lange, mit Silikon isolierte Elektrodenschaft wurde zwischen Mittel- und Hinterbein am Tier zum dorsal gelegenen Pronotum geführt und dort mit Bienenwachs fixiert. Das Bienenwachs wurde mit einem Elektronik-Lötkolben aufgetragen, um dessen Spitze ein feiner Silberdraht gewickelt war.

2.2.2.2. Implantation der Hakenelektrode an N3A3b

Um möglichst wenig Aktivität von sensorischen oder motorischen Neuronen während des Laufens abzuleiten, wurden die Elektroden an den Nerven N3A3 platziert. Nerv N3A3 ist der Abzweig vom Nerv 3, der den Muskel 126 innerviert, welcher als Abduktormuskel die Coxa während der Schwingphase vom Körper weg nach vorne zieht (Abb.2Bii; Burrows, 1996). Der Muskel M126 wird von 3 exzitatorischen Motoneuronen und dem inhibitorischen common inhibitor innerviert; des Weiteren wird der Muskel M126 von zwei DUM 3,4,5 Zellen innerviert (Bräunig, 1997). Die Versuchstiere wurden, wie oben beschrieben, im Kühlschrank bei 4°C anästhesiert und mit einer der Körperflanken nach unten im Knetebett fixiert. Die Flügel wurden aufgefaltet, über das Tier gebogen und in dieser Haltung mit Knetmasse zusätzlich fixiert, wodurch man einen freien Zugang zum lateralen Teil des Thorax erhielt. Mit dem Skalpell wurde ein Schnitt parallel zur Pleuralapophyse zwischen Meso- und Metathorakalsegment und zwischen Episternum3 und Epimeron2 durchgeführt (Abb.2B). Beide Schnitte wurden mit einem dritten parallel zur dorsalen Kante des Episternum 3 miteinander verbunden. Mit einer Pinzette wurde das Kutikularstück angehoben und nach außen gebogen. Der Muskel M126 hat seine Ansatzstelle an einer kutikulären Querstruktur, die das Episternum 3 von dorsal nach ventral in einem Verhältnis von ca. 1:2 unterteilt (Abb.2B, Bi). Bei dem dorsal gelegenen Teil handelte es sich nur um Kutikula, die mit einer feinen Insektennadel durchstoßen wurde, um so

das herausgebogene Stück zu fixieren. Dem herausgebogenen Episternum liegt der Muskel M126 auf (Abb.2Bi, Bii). Auch hier wurde die Hakenelektrode erst grob ausgerichtet und anschließend unter optischer Kontrolle unter dem Binokular mittels des Mikromanipulators an die Implantationsstelle herangefahren. Der Nerv wurde mit dem Glashaken auf die Haken gehoben und, wie im vorherigen Absatz beschrieben, mit Silikon abgedichtet und isoliert. Im Anschluss wurde das Tier wieder geschlossen und die Schnitte mit Gewebekleber oder Bienenwachs verschlossen. Die in Silikon eingefassten Elektrodenschäfte wurden am Tier entlang zum Pronotum geführt und dort mit Bienenwachs fixiert.



| | | | |
|-----|-------------|-----|-----------------|
| Bs | Basisternum | Cx | Coxa |
| Epm | Epimeron | Eps | Episternum |
| Sp | Spirakulum | Tr | Trochanter |
| M | Muskel | PLA | Pleuralapophyse |

Abb.2: Schematische Darstellung der Implantationsgebiete der chronisch implantierten Hakenelektroden. In **A** ist die ventrale Aufsicht auf die thorakalen Segmente 2 und 3 dargestellt. Die thorakalen Ganglien sind in dunkelgrau abgesetzt und zeigen die ungefähre Position der Ganglien im Tier. Die Kutikulaplatte, die für die Implantation der Hakenelektroden herausgeschnitten wurde, ist in hellgrau abgesetzt. In **B** ist die laterale Aufsicht auf die Thorakalsegmente 2 und 3 schematisch dargestellt. Die Implantationsstelle ist dunkelgrau markiert. **Bi** zeigt den gleichen lateralen Ausschnitt, doch handelt es sich hierbei um die Innenansicht. Aus Gründen der Anschaulichkeit wurde auf die Darstellung der Muskeln dieser Segmente verzichtet. Die Muskeln, die während des Laufens die Coxa des Hinterbeins bewegen sind in **Bii** schematisch dargestellt. Der Muskel 126, an dessen innervierenden Nerven die Hakenelektrode implantiert wurde, ist dunkelgrau abgesetzt. Er liegt dem Episternum 3, das in **Bi** dunkelgrau markiert ist, von innen auf und hat seine Ansatzstellen an der das Episternum in zwei Hälften unterteilenden Querstruktur. (nach F.O. Albrecht; The Anatomy of the Migratory Locust, 1953)

2.2.2.3. Implantation der Hakenelektroden in der Larve von *Manduca sexta*

Für verschiedene Versuchsansätze wurden Larven unterschiedlichen Alters ausgewählt. Vor jedem Experiment wurden die Tiere auf Eis gelegt, welches sich in einer Styroporbox befand und in einem Kühlraum für 3-4 Stunden auf 4°C heruntergekühlt. Die weitere Präparation der Tiere fand ebenfalls im Kühlraum bei 4°C statt, um Bewegungen der Tiere und zu starkes Bluten derselbigen zu verhindern. Die Tiere wurden anschließend in eine große, mit Sylgard ausgegossene Präparationsschale mit der ventralen Seite nach oben gelegt. Zur Fixierung der Tiere wurden an den vier vorderen Beinen Drahtschlingen befestigt, die ihrerseits an einer Insektennadel befestigt waren (Abb.3A). Durch leichtes ziehen an den Nadel wurde die Kutikula zwischen den beiden Vorder- und Mittelbeinen gedehnt, so dass der Nerv 1 des Mesothorakalganglions durch die Kutikula von außen sichtbar wurde (Abb.4). Die Nadeln wurden in dieser Position im Sylgard fixiert. Mit einem Skalpell erfolgte ein Schnitt von 200 bis 300µm Länge über dem Nerven in die larvale Kutikula. Die Hakenelektrode wurde mit dem Mikromanipulator an den Schnitt herangefahren und der Nerv mit einem Glashaken auf die Elektrode gehoben (Abb.3B, C). Das Silikon zum Isolieren der Elektrode war bereits vor der Fixierung des Tieres in einem Verhältnis 1:1 angerührt worden, da es bei 4°C mehrere Minuten zum Aushärten benötigte. Mit einer feinen Vaselinespritze wurde der Schnitt am Tier abgedichtet und der Bereich unter der Elektrode unterfüttert. Dies vermied ein Nachlaufen der Hämolymphe und erleichterte

die Trockenlegung der Drähte an der Hakenelektrode. Mit einem Glashaken wurde das Silikongemisch auf den Haken aufgetragen. Nach dem Durchhärten des Silikons wurde die Elektrode mit dem Mikromanipulator in das Tier abgesenkt worden (Abb.3D). Die zuvor aufgetragene Vaseline diente als zusätzliche Isolation. Die Wunde wurde mit Feuchtgewebekleber (Vetbond-Tissue Adhesive, 3M Animal Care Products, St.Paul, USA) verschlossen und der Silikonschaft der Elektrode mit einem Trockengewebekleber (Histoacryl, Braun, Tuttlingen, Deutschland) am Tier fixiert (Abb.3E). Die Drahtenden der Elektrode wurden mit einem Verstärker (Model 1700, A-M Systems) verbunden. Die extrazellulären Signale wurden 1000fach verstärkt und mit einem Analog-Digitalwandler (Digidata 1320A, Axon Instruments, Foster City, CA) in einen Computer eingelesen. Die neuronalen Signale wurden mit dem Programm pClamp8 (Axon) über mehrere Tage kontinuierlich aufgenommen, wobei die Aufnahme in Teilsequenzen von je einer Stunde unterteilt wurde, um die Datenmenge (140MB pro Stunde) für die weitere Bearbeitung nicht zu groß werden zu lassen. Für die weitere Bearbeitung wurden die Daten in das Programm Spike2 (Version 4, Cambridge Electronic Design) importiert.

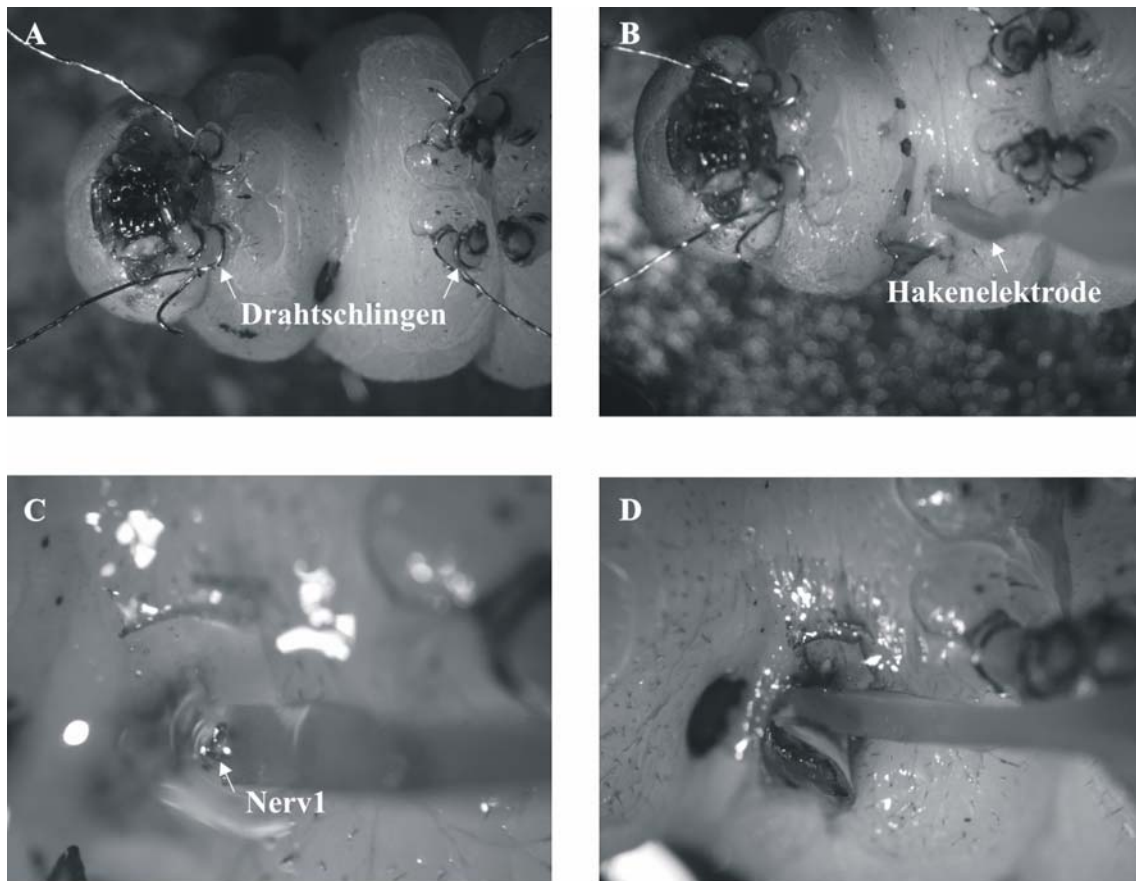


Abb.3: Dargestellt sind die einzelnen Präparationsschritte des Implantierens der chronischen Elektroden bei *Manduca sexta*. In **A** erkennt man die feinen Drahtschlingen, die an den vorderen zwei Beinpaaren befestigt werden, um das Tier in einer Sylgardschale zu fixieren. Im Anschluss wird die Hakenelektrode, die an einem Mikromanipulator befestigt ist, ausgerichtet (**B**). Ein Schnitt von ca. 500 μm Länge wird quer zur Längsachse des Tieres gesetzt. Die Elektrode wird mit dem Mikromanipulator an die Öffnung herangeführt (**C**). Mit einem Glashaken wird Nerv 1 auf die Hakenelektrode gehoben (**C**). Nach dem Abisolieren der Haken mit Silikon wird die Elektrode in die Öffnung abgesenkt (**D**) und die Wunde mit Gewebekleber verschlossen.

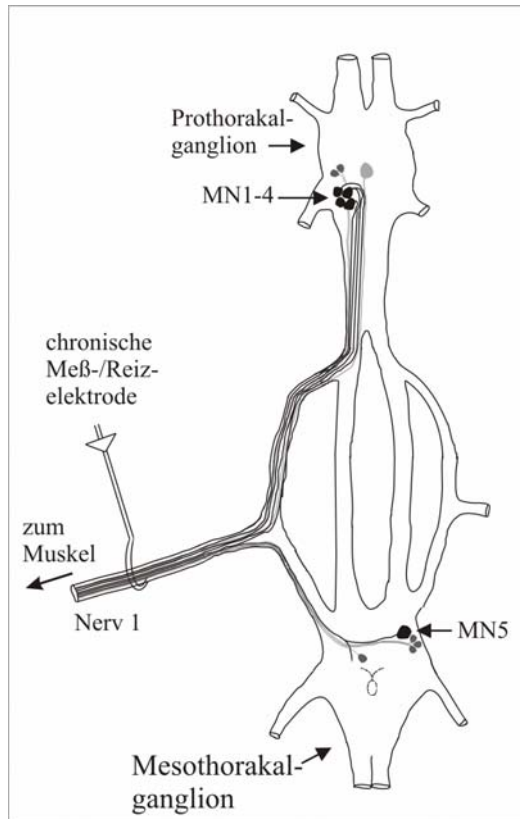


Abb.4: Schematische Darstellung der Ableitsituation der chronisch implantierten Hakenelektroden in *Manduca sexta*. Die Mess-/Reizelektrode wurde an Nerv 1 zwischen Prothorakal- und Mesothorakalganglion implantiert (nach Duch et al., 2000)

2.2.3. Intrazelluläre Ableitungen und Identifizierung von DUM Zellen in einem rhythmischen Präparat

Die Versuchstiere wurden vor jedem Experiment im Kühlschrank bei 4°C betäubt und im Anschluss in einer für dieses Experiment entwickelten Halterung fixiert (Abb.5A). Bei der Halterung handelt es sich um eine Platte von ca.10x10 cm Größe, in deren Mitte ein Spalt von ca.1,5 cm Breite und 6 cm Länge vorhanden ist. Rechts und links der Öffnung befinden sich je zwei Krokodilklemmen, die parallel zur Öffnung angebracht sind. In Verlängerung zum Spalt ist an einem Ende der Platte ein Metallstift angebracht, der in eine dafür vorgesehene Halterung geschraubt werden kann. Die Platte ist um diese Achse 360° drehbar.

Nachdem das Versuchstier betäubt war, wurden Vorder- und Hinterbeine entfernt. Das Tier wurde in den Spalt der Halterung gesetzt und die aufgeklappten Flügel mit den Krokodilklemmen fixiert. Auf der Unterseite wurden die Mittelbeine mit Knetmasse derart in Position gebracht, dass sich zwischen Thorax und Femur ein Winkel von 90°

und zwischen Femur und Tibia ein Winkel von 120° ergab. In dieser Position wurde die Coxa mit Zahnrztkleber (Protemp II, ESPE) eingebettet und das Tier zusätzlich an der Halterung fixiert (Abb.5A).

Das Pronotum wurde auf beiden Seiten durch einen lateralen Längsschnitt durchtrennt und der dorsale Teil entfernt. Durch einen medianen Längsschnitt wurde das Tier dorsal geöffnet. Durch Ziehen an den Flügeln ließ sich das Tier öffnen und wurde mit den Krokodilklemmen erneut in dieser Position fixiert. Um das Nervensystem für die intrazellulären Ableitungen zugänglich zu machen, wurden der Darm, das Diaphragma und das Fettgewebe entfernt. Um die Penetration mit Glasmikroelektroden zu erleichtern, wurde die Ganglienhülle trockengelegt und 3-10s mit kristalliner Protease (Sigma) behandelt, die durch mehrmaliges Spülen mit isotonischem Ringer wieder ausgewaschen wurde. Die Elektroden wurden mit Tetramethylrhodamin ((Molecular Probes, Leiden, Niederlande) 4% in 2M Kaliumacetat) gefüllt und hatten einen Widerstand von 60-80M Ω . Zusätzlich zur intrazellulären Elektrode wurde versucht, an beiden N4A eine Hakenelektrode zu setzen, da durch diese Nerven die Axone der Motoneurone des Levator trochanteris laufen, deren Aktivität parallel aufgezeichnet werden sollte. In der verwandten Präparation trat der Rhythmus nach dem Durchtrennen der anterioren und posterioren Konnektive des Mesothorakalganglions spontan in demselbigen auf und wurde nicht durch die Applikation von Pharmaka induziert. Eine schematische Darstellung des Versuchaufbaus ist in Abbildung 5B dargestellt. Der Rhythmus etablierte sich bei ca. 40% (n=90) der Tiere und war durch rhythmische Entladungen der Levator-Motoneurone in Form von Salven von Aktionspotentialen (AP) gekennzeichnet. Sowohl die Häufigkeit der Salven als auch die Dauer zwischen den Salven variierte zwischen den einzelnen Tieren stark. DUM Zellen ließen sich gut anhand der großen Amplitude ihrer Somaspikes (70-80mV) und deren prominenter Nach-Hyperpolarisation erkennen. Die extrazellulären Signale wurden 100fach verstärkt. Alle Aufnahmen wurden auf einem Oszilloskop (Tektronix 5111A) dargestellt und mit einem Analog-Digitalwandler (CED Cambridge Electronic Design Limited, 1401plus) in einen Computer eingelesen und mit dem Programm Spike2 (Version4, Cambridge Electronic Design Limited) ausgewertet. Am Ende eines jeden Experiments wurden die Zellen zur anatomischen Identifizierung iontophoretisch mit Tetramethylrhodamin gefüllt. Dazu wurden mit einer Frequenz von 2,5Hz 20-30min lang jeweils 200ms lange depolarisierende Strompulse (5-10nA) gegeben. Nach ca. einer Stunde Diffusionszeit wurden die Ganglien herauspräpariert und mit

Minutiennadeln unter isotonischem Ringer in einer Sylgardschale aufgespannt. Die Ganglien wurden für eine Stunde in 4% Formalin fixiert. Im Anschluss wurden die Ganglien mit 0,1M PBS für 3x10min gewaschen und in einer aufsteigenden Alkohohlreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) entwässert. Zum Aufklaren wurden die Präparate in Methylsalicylat eingebettet. Die optische Identifikation erfolgte anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

A

Ansicht von oben

Ansicht von unten

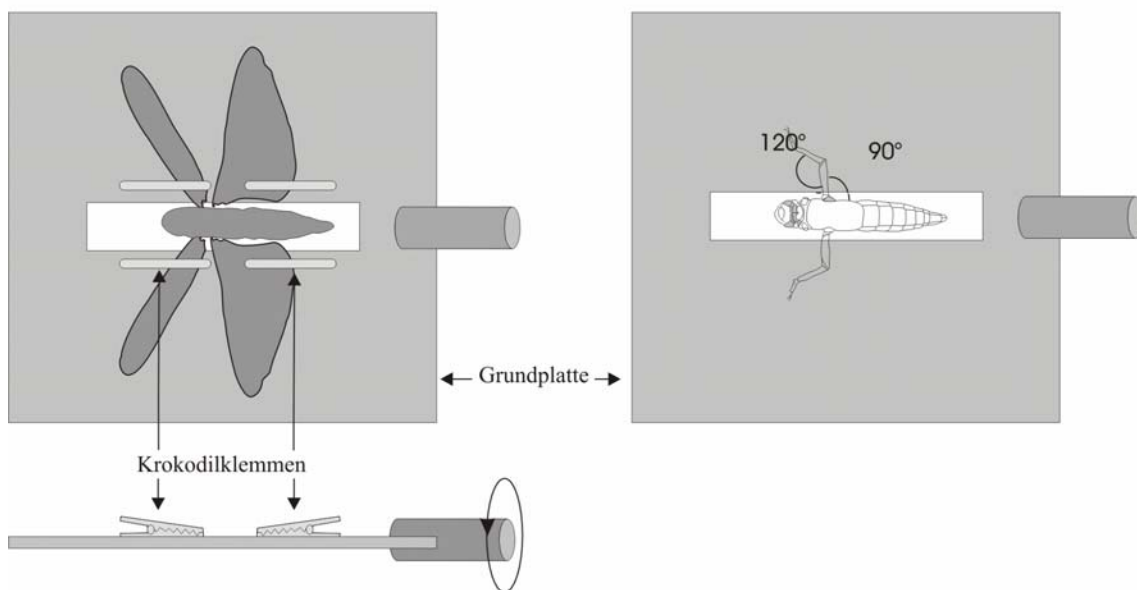
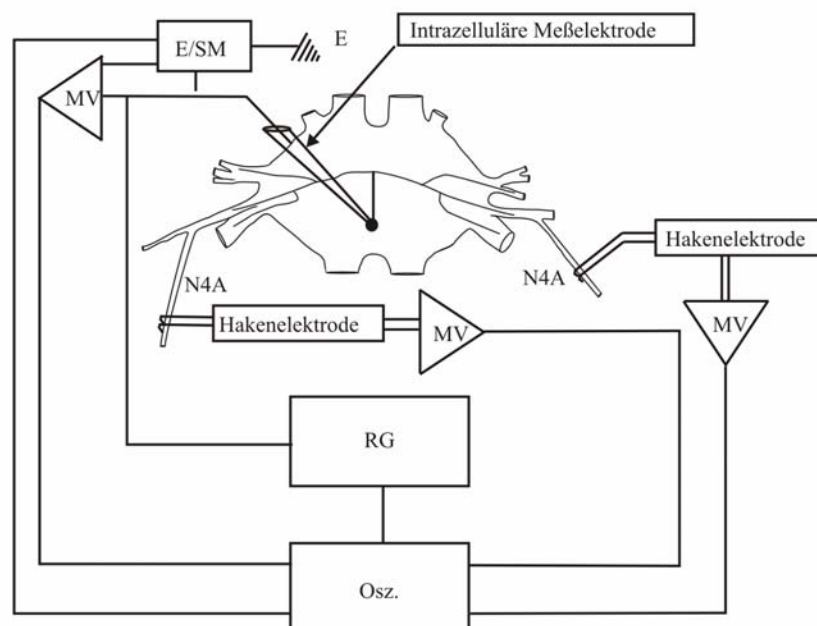
**B**

Abb.5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung der Aktivität von DUM Zellen während eines nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus. In **A** ist die Versuchsanordnung dargestellt. Das Tier wird dorsal von vier Krokodilklemmen an den Flügeln gehalten. Ventral werden die Beine derart mit Zahnarztkleber fixiert, dass sich zwischen Thorax und Femur ein Winkel von 90° und zwischen Femur und Tibia ein Winkel von 120° einstellt. Bei der Fixierung mit Zahnarztkleber wird die Coxa in diesen eingebettet. Der Kleber fungiert zudem als zusätzliche Fixierung des Tieres an der Grundplatte. In **B** ist die Versuchsanordnung schematisch dargestellt. Zwei Hakenelektroden werden jeweils an den Nerven N4A angebracht, um die Aktivität der tibialen Levator-Motoneurone aufzuzeichnen. Eine intrazelluläre Messelektrode misst die Aktivität der DUM Zelle während des Rhythmus. Die Glasmikroelektrode ist mit Tetramethylrhodamin (4% in 2M Kaliumacetat) gefüllt. Über den Reizgenerator kann die Zelle iontophoretisch mit dem Farbstoff gefüllt werden um sie später zu identifizieren. (E: virtuelle Erde; MV: Mikroelektrodenverstärker; Osz.: Oszilloskop; RG: Reizgenerator; SM: Strommessgerät)

2.3. Stimulationsexperimente zur Untersuchung der Wirkung von DUM Neuronen auf den Muskelstoffwechsel

2.3.1. Bestimmungen des Fruktose 2,6-Bisphosphatgehalts im Flugmuskel M119 nach antidromer Stimulation der DUM Neurone

Für jedes Experiment wurden die Tiere im Kühlschrank bei 4° anästhesiert und anschließend mit der dorsalen Seite nach oben im Knetebett fixiert. Um das Nervensystem zugänglich zu machen wurde das Pronotum entfernt und die Tiere durch einen medianen Längsschnitt geöffnet. Anschließend wurden der Darm, das Diaphragma und das Fettgewebe entfernt. Aufgrund ihrer bilateral symmetrischen Projektionsmuster innervieren DUM Neurone die homologen Flugmuskeln beider Körperhälften. Beim Muskel M119 handelt es sich um einen Flügelhebermuskel (Burrows, 1996). Die Denervation eines Muskels auf einer Seite erlaubte es, die Ausschüttung von Oktopamin durch die DUM Neurone auf den Muskel der contralateralen Körperseite zu begrenzen, wodurch der denervierte Muskel in einem Experiment als interne Kontrolle diente. Für die antidrome Stimulation der DUM Neurone wurde das Nervende des denervierten Muskels in eine Saugelektrode eingesogen und elektrisch gereizt. Auf der Seite des Tieres, auf der der Muskel innerviert blieb, wurde an Nerv N4 des Metathorakalganglions eine Hakenelektrode kurz vor dem Muskel M119 angebracht, um die Stimulation der DUM Zelle zu

kontrollieren (Abb.6A). Die Stimulation der DUM Neurone erfolgte für 20 Minuten mit einer Frequenz von 1Hz.

Im ersten Ansatz wurde der Muskel M119 der contralateralen Seite denerviert und das Ende des Nerv N4 in eine Saugelektrode, welche als Reizelektrode fungierte, eingesogen. Nach der Stimulation wurde erst der stimulierte Muskel M119 innerhalb von 30 Sekunden herauspräpariert und im Verhältnis 1:6 (1gr Muskel in 6ml NaOH) in 50mM NaOH überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss daran wurde der unstimulierte Muskel der gleichen Prozedur unterzogen. Mit einem Ultraschallhomogenisator wurden die Muskeln beim Auftauen der NaOH homogenisiert und so direkt in die Lauge aufgenommen. Dies war notwendig, um weiteren chemischen Reaktionen vorzubeugen oder Abbauprozesse zu verhindern. Um zu überprüfen, ob die Aktivität der DUM Neurone einen Einfluss auf den Muskelstoffwechsel hat, wurde der Gehalt an Fructose 2,6-Bisphosphat in den Muskeln bestimmt. Fructose 2,6-Bisphosphat ist ein Regulatorenzym der Glykolyse, welches unter anderem durch Oktopamin, das in der Peripherie der Heuschrecken exklusiv von DUM Neuronen ausgeschüttet wird, stimuliert wird. Nachdem der Muskel homogenisiert wurde, wurden 9 Teile Aqua dest. hinzugefügt und die Lösung für 10 Minuten in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 80° erwärmt.

Die Bestimmung des Gehaltes von Fructose 2,6-Bisphosphat erfolgte im Labor von Professor Wegener in Mainz.

Zur Bestimmung von Fructose 2,6-Bisphosphat wurden die Proben für fünf Minuten bei 80°C vorinkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 10 000g zentrifugiert. Bei der Bestimmung des F2,6-BP-Gehalts im Überstand machte man sich die Eigenschaft desselben zu Nutze, phosphatabhängige Phosphofruktokinase (PP₁-PFK, welches aus Kartoffelknollen isoliert wurde) zu aktivieren (Van Schefting et al., 1982). F2,6-BP ist das einzige aktivierende Enzym; andere tierische Phosphofruktokinasen zeigen keine Wirkung auf dieses Enzym. Anhand einer Eichgraden (PP₁-PFK gegen 0.1-1.0nM F2,6-BP) wurde der Gehalt von F2,6-BP in den Proben bestimmt.

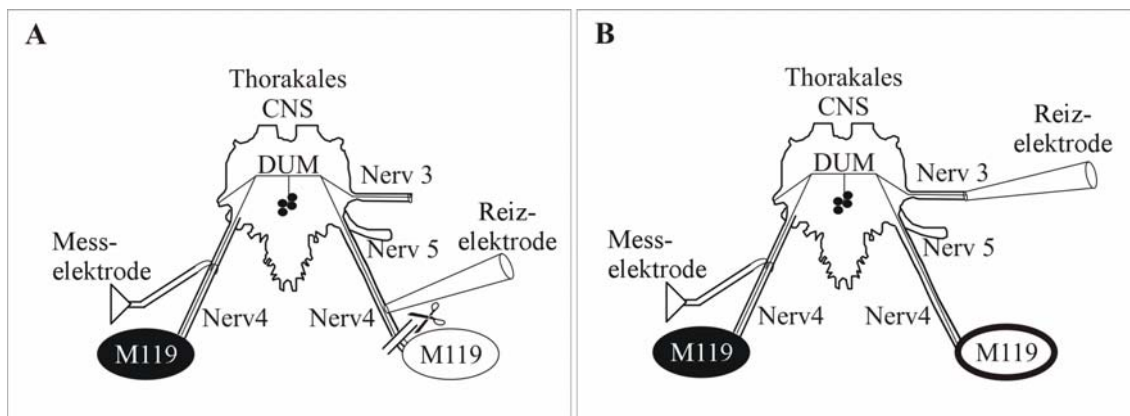


Abb.6: Schematische Darstellung der Ableitsituation in den Experimenten zur Untersuchung des Einflusses der Aktivität von DUM Zellen auf den Muskelstoffwechsel. In **A** ist der Versuchsaufbau zur Bestimmung des Fruktose 2,6-Bisphosphatgehalts im Muskel M119 nach antidromer Stimulation der DUM Zelle dargestellt. Auf einer Seite wurde der Muskel M119 denerviert und der Nerv in eine Saugelektrode zur antidromen Stimulation der DUM Zelle eingesogen. Der denervierte Muskel M119 diente in diesen Experimenten als interne Kontrolle. Der gleiche Versuchsansatz wurde zur Bestimmung der Aktivität der Proteinkinase A nach antidromer Stimulation der DUM Zelle gewählt. In **B** ist ein ähnlicher Ansatz dargestellt. Im Wesentlichen unterscheidet er sich dadurch, dass keiner der beiden Muskeln M119 denerviert ist. Die DUM Zellen werden in diesem Versuchsansatz über Nerv3 antidrom stimuliert, so dass beide Muskeln M119 Ausschüttung von Oktopamin durch die DUM Zellen erfahren. In einer Versuchsreihe wurde in einen Muskel der PKA-Blocker KT5720 injiziert; in den anderen Muskel beim demselben Tier DSMO.

2.3.2. Bestimmung der PKA-Aktivität im Flugmuskel M119 nach antidromer Stimulation der DUM Neurone

In einem weiteren Ansatz erfolgte die Bestimmung der Proteinkinase A-Aktivität. Der Versuchsansatz wurde, wie in 2.3.1. beschrieben, gewählt. Im Anschluss an die Stimulation wurden erst Muskelfasern vom stimulierten Muskel herausgeschnitten, kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss in Blaubrand[®]-Mikropipetten überführt. Die Mikropipetten waren dreigeteilt und mit jeweils 20µl Homogenisierungspuffer gefüllt. Nach der Bestückung mit dem Homogenisierungspuffer wurden die Mikropipetten in flüssigem Stickstoff gefroren. Zum Überführen der Muskeln in den Homogenisierungspuffer wurde der Puffer an der oberen Grenze durch kurzes Halten zwischen Daumen und Zeigefinger angetaut, wodurch eine flüssige Übergangsphase entstand. Der noch gefrorene untere Teil des Puffers diente als Unterlage zum Stößeln und als unterer Abschluss der Mikropipette.

Der Muskel wurde mit einem Stößel in der flüssigen Phase des Homogenisierungspuffers homogenisiert. Durch anschließendes Eintauchen der Mikropipette in flüssigen Stickstoff wurden die Proben erneut gefroren und bis zur weiteren Bearbeitung in diesem gehalten.

Für die Phosphorylierungsreaktion wurde das Homogenisat in einen Reaktionsmix pipettiert. Der Reaktionsmix bestand aus $1\mu\text{Ci}$ ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$) ATP (5000 Ci/mmol), $20\mu\text{M}$ ATP, 1mM EGTA, 10mM Mercaptoethanol in 50mM Tris-HCl, pH 7,5 und $1\mu\text{g}$ des Phosphataseinhibitors 1 (I-1), welches als Substrat für die PKA diente. Nach einer Reaktionszeit von 80 Sekunden, bei Raumtemperatur (20°C), wurde die Reaktion durch Zugabe von $6\mu\text{l}$ Probenpuffer ($0,25\text{M}$ Tris-HCl, pH 6,8 mit 5% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS), 20% Glycerol, und 0,1% Bromphenolblau) gestoppt. Anschließend wurden die Proben auf ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mit ca. 20mA pro Gel einer Elektrophorese unterzogen. Das Gel wurde dann für ca. 5 Minuten fixiert, in Wasser gewaschen, auf „Gel-Blotting-Paper“ gelegt und im Vakuum getrocknet. Zur Detektion der Signale wurde es über Nacht auf einen Röntgenfilm gelegt, der am folgenden Tag entwickelt wurde. Für die quantitative Analyse wurden die Röntgenfilme eingescannt und mit dem Programm NIH Image weiterbearbeitet. Um die unterschiedlichen Proben miteinander in ein Verhältnis setzen zu können, wurden diese normiert. In jeder Probe wurde die Aufnahme von ^{32}P in das PKA-spezifische Substrat I-1 ins Verhältnis gesetzt mit der Aufnahme von ^{32}P in intrinsische Proteine, was durch andere Kinasen katalysiert wird. Die Bestimmungen der PKA-Aktivität erfolgten in Zusammenarbeit mit der AG Müller, FU-Berlin.

2.3.3. Bestimmung der PKA-Aktivität nach Applikation des cAMP-Donors 8Bromo-cAMP ohne antidrome Stimulation der DUM Neurone

Das Tier wurde wie in 2.3.1. von dorsal präpariert und der Darm, die Diaphragmen sowie das Fettgewebe entfernt. Im Anschluss daran wurde mit einer Hamiltonspritze in einen der beiden Muskeln M119 der cAMP-Donor 8Bromo-cAMP ($20\mu\text{l}$ einer 10^{-3}M Lösung in DMSO) und in den Kontrollmuskel $20\mu\text{l}$ DMSO injiziert. Nach 20 Minuten Einwirkzeit wurden die Muskeln herauspräpariert. Die sich anschließenden Arbeitsschritte und die Bestimmung der PKA-Aktivität sind in 2.3.2. beschrieben.

2.3.4. Bestimmung der PKA-Aktivität nach Applikation des PKA-Inhibitors KT5720 nach antidromer Stimulation der DUM Neurone

Das Tier wurde wie in 2.3.1. von dorsal präpariert und der Darm, die Diaphragmen und das Fettgewebe entfernt. In diesem Versuchsansatz wurde keiner der beiden Muskeln denerviert. In einen Muskel wurde der PKA-Inhibitor KT5720 (20 μ l einer 10⁻³M Lösung in DMSO) und in den Kontrollmuskel 20 μ l DMSO injiziert. Die DUM Zellen wurden über den Nerv 3 für 20 Minuten mit einer Frequenz von 1Hz antidrom stimuliert (Abb.6B). Die sich anschließenden Arbeitsschritte und die Bestimmung der PKA-Aktivität sind in 2.3.2. beschrieben.

2.3.5. Bestimmung der Fruktose 2,6-Bisphosphatgehalts nach Applikation des PKA-Inhibitors KT5720 nach antidromer Stimulation der DUM Neurone

Der Versuchsansatz wurde wie in 2.3.4. gewählt. Auch hier wurde der PKA-Inhibitor in gleicher Konzentration und Menge in den einen der Muskeln M119 und DMSO in den anderen Muskel M119 injiziert. Nach der Stimulation folgten die Arbeitsschritte wie in 2.3.1. beschrieben. Die Bestimmung des Fruktose 2,6-Bisphosphatgehalts erfolgte im Labor von Prof. Wegener in Mainz.

2.4. Stimulationsexperimente zur Ermittlung des Einflusses von neuronaler Aktivität auf das erneute Auswachsen persistierender Motoneurone während der Larvalentwicklung von *Manduca sexta*

2.4.1. Ableiten der motorischen Muster in vivo

Um zu überprüfen, ob neuronale Aktivität einen Einfluss auf das erneute Auswachsen persistierender Motoneurone während der Larvalentwicklung von *Manduca sexta* hat, wurden Hakenelektroden, wie in 2.2.2.3. beschrieben, in Manducalarven implantiert. Grundvoraussetzung für Manipulationsexperimente ist eine genaue Kenntnis der neuronalen Aktivität in einem sich normal entwickelnden Tier. Um diese zu ermitteln, wurde die neuronale Aktivität kontinuierlich von Nerv 1 mit Hilfe

chronisch implantierter Hakenelektroden bis zu vier Tage abgeleitet und aufgezeichnet. Die Versuchstiere stammten aus der Zucht von Dr. C. Duch und wurden mit künstlicher Nahrung (Bell und Joachim, 1976) gefüttert und bei einer Tag-/Nachtperiode von 17 Stunden Licht zu 7 Stunden Dunkelheit gehalten. Um die neuronale Aktivität bestimmten Entwicklungsstadien zuordnen zu können, wurden sowohl chronologische wie auch morphologische Kriterien zur Bestimmung des Entwicklungsstadiums herangezogen (Nijhout und Williams, 1974; Bell und Joachim, 1976; Dominik und Truman, 1984a). Innerhalb der Stadien, die vor der Puppenhäutung liegen, wird der Zeitpunkt, zu dem die Tiere zu wandern beginnen, mit W0 bezeichnet. Alle folgenden Entwicklungsstadien zwischen W0 und der Puppenhäutung bezeichnet man als W1 bis W4. Die Puppenhäutung findet am Tag W4 statt. Auf lichtmikroskopischem Niveau lassen sich die ersten strukturellen Änderungen der Motoneurone MN1-5 am Tag W2 erkennen (Duch et al. 2000). Aus diesem Grund wurden die Experimente an Tieren durchgeführt, die noch die letzten drei Tage der Entwicklung vor der Puppenhäutung zu durchlaufen hatten (W2-W4). Um diese Stadien detaillierter beschreiben zu können, wurden die Stadien W2-W4 in drei Untereinheiten unterteilt. Das Stadium W2 wurde unterteilt in W2 und W2 late (W2l). Die Stadien W2 und W2l sind definiert als die Zeitabschnitte bevor und nachdem die Ocellen ihre Pigmentierung verloren haben. Die Unterteilung entspricht der Unterteilung in W2a und W2b wie sie von Consoulas et al. (1996) veröffentlicht wurde. Das Stadium W3 ist durch ein Einziehen des Kopfes charakterisiert, wodurch ein charakteristisches Dreieck am posterioren Ende des Kopfes sichtbar wird. Das Stadium dauert 24 Stunden und wurde in chronologischer Abfolge in drei Untereinheiten unterteilt, W3 early (W3e), W3 mid (W3) und W3 late (W3l). Jeder dieser Abschnitte war von gleicher Länge und dauerte etwa 8 Stunden. Je nachdem wie lange der Übergang von W3 zu W4 dauerte, variierte die Länge der Untereinheiten von W3e –W3l zwischen 6 und 10 Stunden. W3 dauerte mindestens 18 Stunden. Tiere, die länger als 30 Stunden im Stadium W3 waren, wurden aus den Experimenten entfernt. Das Stadium W4 wurde als das Stadium charakterisiert, in dem sich ein dorsaler brauner Streifen auf dem metathorakalem Segment abzeichnete. Das Stadium W4 wurde ebenfalls in drei Untereinheiten W4 early (W4e), W4 mid (W4) und W4 late (W4l) unterteilt, wobei die Stadien W4e und W4 als Untereinheiten gleicher Dauer definiert wurden. Sie beschreiben die Zeit vom ersten Auftreten des braunen Balkens auf dem metathorakalen Segment bis zum ersten Schrumpfen der Kutikula des ersten Abdominalsegments (anteriores Schrumpfen, Truman et al., 1980; entspricht W4a,

Consoulas et al., 1996) und dauerten jeweils bis zu acht Stunden. W4l umfasste die verbleibende Zeit bis zur Puppenhäutung und dauerte zwischen 4 bis acht Stunden (entspricht W4b, Consoulas et al., 1996).

2.4.2. Stimulation der Motoneurone MN1-5 über antidrome Reizung an Nerv 1

Zu Beginn der Experimente wurde das Alter der Tiere anhand charakteristischer, für jedes Entwicklungsstadium spezifischer Merkmale bestimmt. Es wurden Tiere des Wanderstadiums W3 benutzt. In diesem Stadium befinden sich die Tiere ungefähr 2 Tage vor ihrer Verpuppung. Die Aktivität wurde wie in 2.2.2.3. aufgezeichnet. Mit dem Eintritt in das Wanderstadium W4 wurden die Motoneurone extrazellulär über die Hakenelektrode elektrisch stimuliert. Mit einem Reizgenerator (A-M Systems, Modell 2100) wurden unterschiedliche Reizprotokolle, auf die später noch genauer eingegangen wird, appliziert. Die Einzelpulse hatten eine Dauer von 0,1 ms, die Amplitude betrug 8V. Für die anschließende anatomische Auswertung wurden die Motoneurone in Nerv 1 durch anterograde Färbungen markiert und die Zellkerne der larvalen Muskeln angefärbt.

2.4.3. Anterograde Färbungen von Motoneuronen in Nerv 1 und Anfärbung Muskelzellkernen in *Manduca sexta*

Im Anschluss an die extrazellulären Reizprotokolle wurden die Tiere für drei Stunden auf Eis gelegt und somit betäubt. Ein Tier wurde in einer Sylgardschale fixiert und entlang der dorsalen Mittellinie aufgeschnitten. Nach der Entfernung des Darms wurden die thorakalen Segmente herausgeschnitten und mit Insektennadeln vorsichtig aufgespannt. Zwischen Ganglion und Hakenelektrode wurde um den Nerv 1 eine Vaselinewanne angefertigt, so dass dieser in der Vaselinewanne lag. Eine zweite Vaselinewanne wurde in annähernd gleicher Position auf der kontralateralen Seite angefertigt. Die Wannen wurden mit destilliertem Wasser gefüllt und die Nerven in der Wanne geschnitten. Das destillierte Wasser diente zum Aufquellen eventuell gequetschter Axone an den Schnittstellen und wurde nach zehn Minuten durch Neurobiotin (4% in destilliertem Wasser, Sigma) ersetzt. Danach wurden die Vaselinewannen mit Vaseline geschlossen und die Präparate in Ringer zur Diffusion des

Neurobiotin für 24 Stunden bei 4°C gehalten. Nach 24 Stunden wurden die Vaselinewannen wieder vorsichtig geöffnet und das Neurobiotin mit einem Papiertuch mit Bedacht abgesogen. Im Anschluss wurden die Präparate 3 x 10 Minuten mit Puffer gewaschen und dann für 2 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Präparate erneut 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) entwässert und, um die Permeabilität des Gewebes zu erhöhen, mit Xylol 2 x 5 Minuten behandelt. Nach der Rückführung durch eine absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 70%, 50%, 30%) wurden die Präparate erneut für 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Präparate mit Cy3-gekoppeltem Streptavidin (Jackson Immuno-Research Laboratory Inc., 1/1,000) für 24 Stunden inkubiert. Um die Zellkerne der Muskeln anzufärben, wurde anschließend Propidium Iodid (125µl/ml einer 500µM Stammlösung) für 20 Minuten appliziert. Nach erneutem Waschen mit PBS (3 x 10 Minuten) wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) entwässert und in Methylsalicylat aufgeklärt.

2.5. Konfokale Mikroskopie

Um eine optimale Auflösung der angefärbten Strukturen zu erhalten, wurden die Präparate mit einem konfokalen Mikroskop (Leica TCS 4D) gescannt. Die „Wholemount“ Präparate wurden bei optischen Schnittdicken zwischen 1 und 4µm im Laserscanverfahren aufgenommen und auf einem Unix Rechner (SGI) gespeichert. Die digitalen Bilderstapel wurden mit dem Programm Amira (TGS, San Diego, CA, USA) und Corel Draw 8 (Corel, Ottawa, Kanada) bearbeitet. Alle in dieser Arbeit dargestellten Bilder sind so genannte Projektionsansichten, in denen alle zu einem Bilderstapel gehörenden Einzelbilder zu einem zweidimensionalen Bild zusammengesetzt wurden.

2.6. Lösungen und Chemikalien

| | |
|---------------------|---|
| Isotonischer Ringer | nach Clements und May (1974) |
| | 140mM NaCl |
| | 10mM KCl |
| | 4mM NaH ₂ PO ₄ |
| | 6mM Na ₂ HPO ₄ |
| | 2mM CaCl ₂ |
| | 9mM Saccharose, alles in Aqua dest. |
| Manduca Ringer | 140mM NaCl |
| | 5mM KCl |
| | 28mM D-Glucose |
| | 5mM Hepes |
| Tris-HCl-Puffer | 12,1g Tris(Hydroxymethyl)Ammino- Methan in 1l Aqua dest., Mit HCl auf pH 7,6 einstellen |
| PBS-Puffer | Lösung A: 27,6g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O/ 1 Liter Aqua dest. Lösung B: 28,4g Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O/ 1 Liter Aqua dest. Mischverhältnis Lösung A:B/ 1:4 |
| Protease | Sigma, P-5147 |
| Formalin | Fluka, 37% wässrige Lösung |
| Collagenase-Dispase | Sigma, C-3180 |
| Hyaluronidase | Sigma, H-3506 |
| Neurobiotin | Linaris (Fa.Vektor), S-1120 |
| Normal Goat Serum | Linaris (Fa.Vektor), S-1000 |
| Paraformaldehyd | 4%, 1g in 25ml Aqua dest. |
| Cy3-Streptavidin | Dianova, 016-160-084 |
| Propidium Iodid | 125µl/ml einer 500µM Stammlösung |
| Methylsalicylat | Merck |
| Tetramethylrhodamin | Molecular Probes, D-3308 |
| 8Bromo-cAMP | 20µl einer 10 ⁻³ M Lösung in DMSO |
| KT5720 | 20µl einer 10 ⁻³ M Lösung in DMSO |