

3. Ergebnisse

3.1. Die Aktivität von DUM Neuronen während des Laufens

Um die Aktivität von DUM Neuronen im intakten Tier messen zu können, wurden Hakenelektroden entwickelt, die extrazellulär an einem Nerv im Tier implantiert wurden, so dass das Tier sich ohne Beeinträchtigung frei bewegen konnte. Aufgrund ihres extrem kleinen Axon-Durchmessers (0,5 – 1 μm) ist es technisch extrem schwierig, DUM Neurone extrazellulär von peripheren Nerven abzuleiten. Die Amplitude extrazellulär abgeleiteter Spikes bzw. Aktionspotentiale (AP) nimmt mit dem Durchmesser der Axone zu. Daher sind die Spikes der DUM Neurone in extrazellulären Ableitungen kaum detektierbar und sehr schwierig von den sehr viel größeren Spikes der Motoneurone zu trennen. Um die Identifikation der kleinen DUM Neuron Spikes zu ermöglichen, müssen die extrazellulären Elektroden an sehr distalen Abzweigen peripherer Nerven implantiert werden, da die Anzahl von Axonen dort gering ist. Die gewählte Implantationsstelle war der letzte Abzweig von Nerv 3 auf den Muskel M126 (N3A3b; siehe Abb.9A). In N3A3b verlaufen nur 6 Axone (3 Motoneurone, 1 Common Inhibitor (CI) und 2 DUM 3,4,5 Neurone (Bräunig, 1997). M126 ist ein Abduktormuskel, der das Abspreizen der anterioren Coxa während der Schwingphase unterstützt. Dieser Muskel ist beim Laufen exklusiv in der Schwingphase aktiv (Duch und Pflüger, 1995). Das bedeutet, dass die wenigen Axone in Nerv N3A3b, deren Spikes eine große Amplitude aufweisen nur während einer bestimmten Phase des Schrittzzyklus aktiv sind. Das sollte die Identifikation der kleineren Signale der DUM Zellen weiter erleichtern.

Es war technisch extrem schwierig, die Hakenelektroden derart distal an dem Nerv N3A3b chronisch zu implantieren. Die größten Probleme, die überwunden werden mussten, bevor erfolgreiche Elektrodenimplantate an N3A3b durchgeführt werden konnten, werden hier für zukünftige Arbeiten aufgelistet: Elektrisches Übersprechen einer Elektrode auf die kontralaterale Elektrode trat häufig auf. Der Nerv riss bei dem Verschließen der Implantationsstelle leicht ab. Teilweise wurde bei diesem Arbeitsschritt der Nerv derart überdehnt, dass keine extrazellulären Signale mehr zu sehen waren.

Es war aber möglich mit Hilfe von Elektroden-Implantaten, an N3A3b erfolgreiche Ableitungen zu erhalten. Abbildung 7 stellt eine repräsentative Ableitung von N3A3b in einem vollkommen frei beweglichen Tier dar. In Abbildung 7A erkennt man deutlich die einzelnen Schrittzyklen. Abbildung 7B zeigt einen dieser Schrittzyklen in einer größeren zeitlichen Auflösung dargestellt. Innerhalb des Bursts lassen sich die drei Motoneurone aufgrund ihrer unterschiedlichen Amplitude unterscheiden. Um dies zu verdeutlichen wurden die Spikes einzeln nebeneinander gestellt. Die gepunkteten Linien zeigen die Differenz der Amplituden der kleineren Spikes. Bei der vierten klar identifizierbaren Einheit handelt es sich um den CI. Die unteren Pfeile markieren vermeintliche neuronale Signale, bei denen es sich um DUM Zellsignale handeln könnte. Die Qualität dieser extrazellulären Ableitungen blieb für 24 bis 48 Stunden konstant. Daher eignen sich die hier entwickelten Elektroden hervorragend, um über längere Zeiträume Motoneurone extrazellulär abzuleiten. Allerdings konnten die extrazellulär abgeleiteten Spikes der DUM Neurone in diesen Ableitungen von N3A3b nicht eindeutig identifiziert werden.

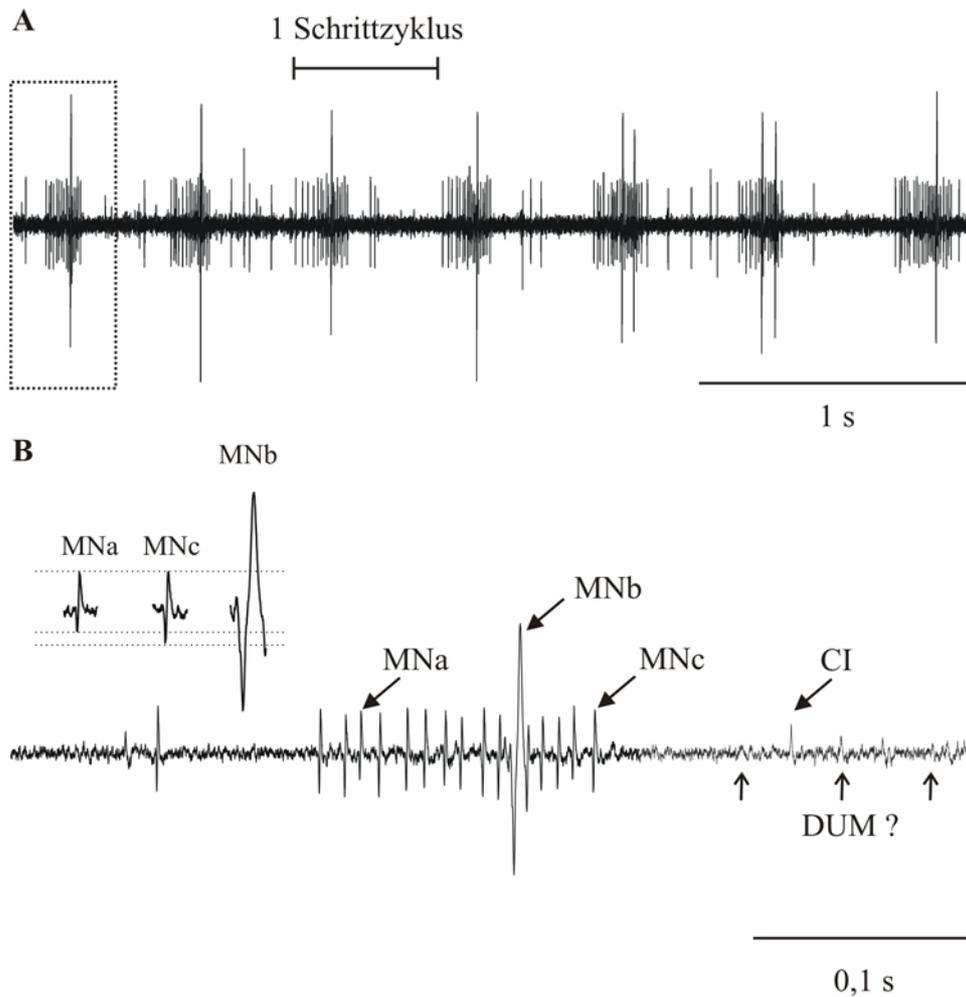
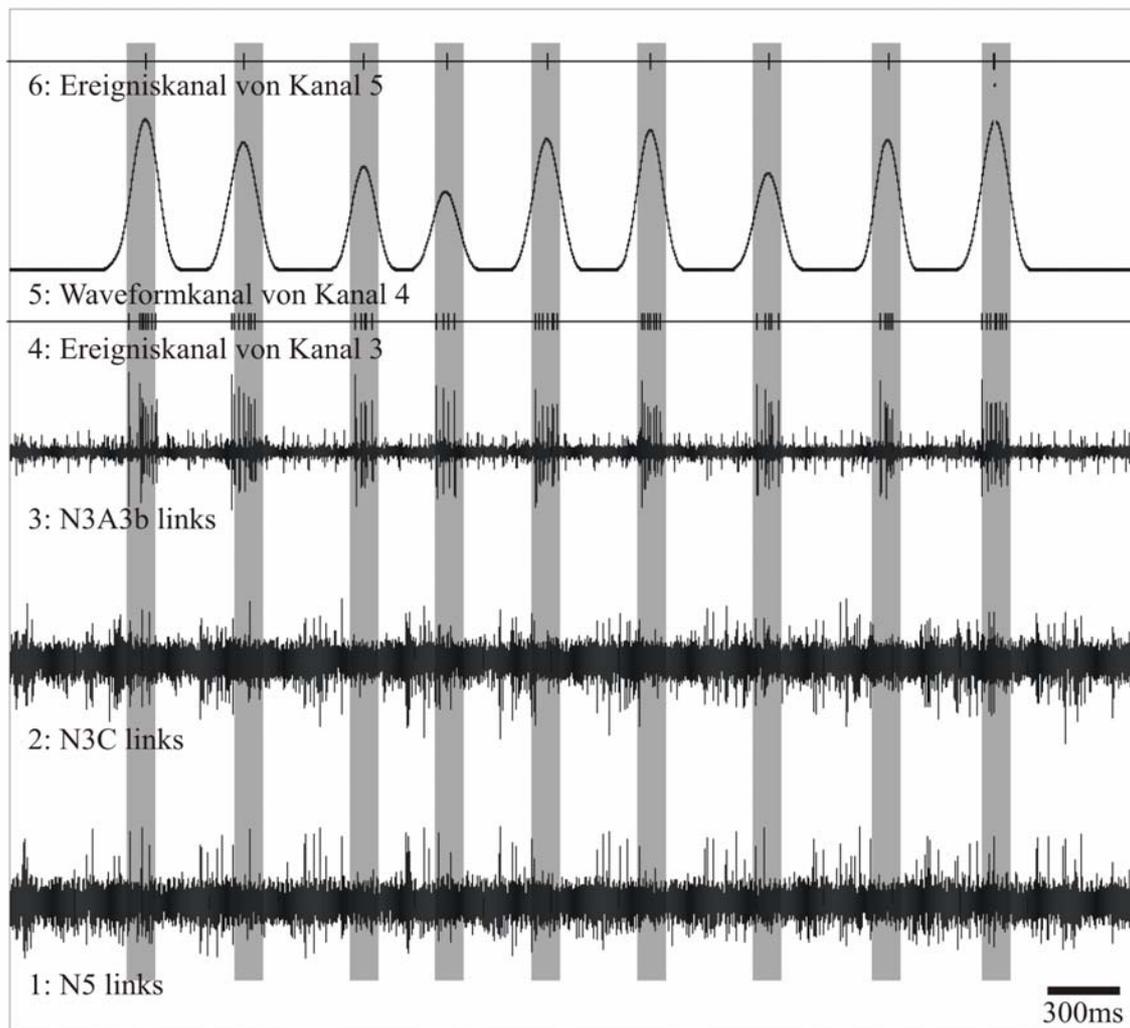


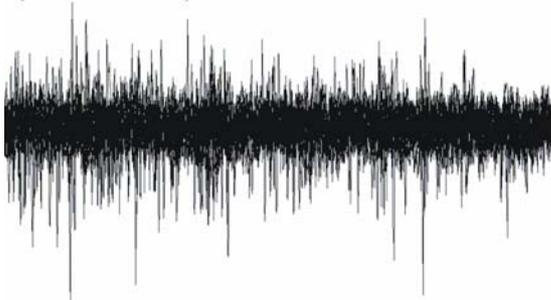
Abb.7: In **A** ist eine repräsentative extrazelluläre Ableitung von Nerv N3A3b dargestellt. Man erkennt deutlich sieben Schrittzyklen. In **B** ist ein Schrittzyklus der in **A** durch den Kasten markiert ist, als Ausschnittsvergrößerung dargestellt. Man kann klar drei unterschiedliche Motoneinheiten unterscheiden. Die drei Motoneuronspikes sind einzeln dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen die jeweils obere und untere Grenze der Amplitude der beiden kleineren Einheiten an. Die unteren Pfeile in **B** markieren neuronale Signale, bei denen es sich um DUM Zellen handeln könnte.

Da M126 von zwei DUM 3,4,5 Zellen innerviert wird (Bräunig, 1997), sollten die Spikes dieser DUM Neurone in allen 3 Hauptseitennerven zu detektieren sein. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu der Ableitung an N3A3b 2 weitere Elektroden-Implantate an Nervenästen durchgeführt, in denen die Axone der DUM 3,4,5 Zellen verlaufen. Anhand der Synchronizität, mit der die Spikes in immer gleichem Abstand zueinander an den einzelnen Elektroden zu messen sein sollten, ergibt sich eine weitere Möglichkeit der Identifikation der DUM 3,4,5 Neurone. Diese Strategie wurde in 7 Präparationen durchgeführt. Abbildung 9 zeigt ein repräsentatives Experiment, in dem 3

extrazelluläre Hakenelektroden chronisch implantiert wurden. Abgeleitet wurden Nerv N5, Nerv N3C und Nerv N3A3b. Das vollkommen intakte Tier konnte ungehindert laufen. In Abbildung 8A sind 9 repräsentative Schrittzyklen dargestellt. In Nerv N3A3b wurden die Spikes der Abduktor-Motoneurone abgeleitet, die M126 innervieren. Diese sind wie bei Duch und Pflüger (1995) beschrieben während der Levatorphase aktiv (siehe graue Balken in Abb. 8A). In Nerv N5 und Nerv N3C des Metathorakalganglions laufen die Axone der Depressor-Motoneurone (Bräunig, 1982), die vornehmlich während der Stemmphase aktiv sind (Duch und Pflüger, 1995). Es konnte also mit mehreren Elektroden-Implantaten gleichzeitig extrazellulär während des Verhaltens abgeleitet werden. Allerdings konnten die Spikes der DUM Neurone auch mit dieser Strategie nicht eindeutig in den kontinuierlichen Ableitungen identifiziert werden. Um zu überprüfen, ob die Spikes der DUM Zellen in mehreren übereinander geschriebenen Überläufen sichtbar werden, und ob die DUM Zellen in der Levatorphase aktiv sind, wurden die motorischen Signale der Levatoren aus Nerv 3A3b als einzelne Ereignisse markiert (Abb.8A, Kanal 4). Mit Hilfe eines Skripts wurden diese durch eine Sinusfunktionstransformation in eine Wellenform übersetzt, die die Frequenz der Bursts wiedergab (Abb.8A, Kanal 5). Der Scheitelpunkt jedes Bursts wurde manuell als Ereignis markiert (Abb.8A, Kanal 6). Diese Ereignisse wurden als Triggersignale für einen Überschreibmodus benutzt. Beginnend mit dem Triggersignal, wurden Abschnitte definierter Länge aus der kontinuierlichen Aufnahme übereinander geschrieben. Sollten die DUM Zellen während der Levator-Phase aktiv sein, sollten sich ihre Signale als Anhäufung in den anderen Ableitungen in einem bestimmten Zeitfenster um das Triggersignal abzeichnen. Die extrazellulären Spikes der DUM Neurone sollten bei diesem Verfahren nicht von Motoneuron-Spikes größerer Amplitude überdeckt werden, da von den Nerven N3 und N5 Depressor-Motoneurone abgeleitet werden und diese alternierend zu den Levator-Motoneuronen aktiv sind (Ryckebusch und Laurent, 1993,1994; Baudoux et al., 1998; Burns und Usherwood, 1978). Damit sollte die Aktivität, die während der Levatorphase in den Nerven N3 und N5 abgeleitet wurde, verhältnismäßig gering sein. Abbildung 8B zeigt je 20 Überläufe desselben Tieres aus A für die Nerven N3C und N5. In beiden multiplen Überläufen zeichneten sich jedoch keine offensichtlichen Akkumulationen von Signalen ab. Es muss also festgehalten werden, dass auch multiple Elektroden-Implantate die Identifikation der extrazellulären DUM Zell Spikes nicht ermöglichen.

A**B**

Überschreibmodus von N3C links
(20 Überläufe)



Überschreibmodus von N5 links
(20 Überläufe)

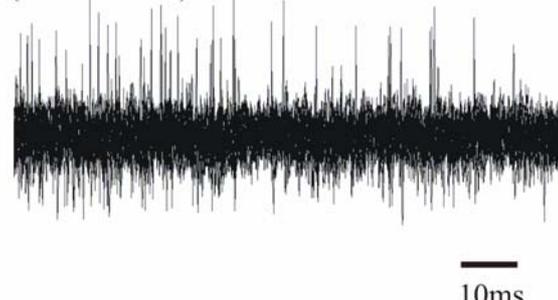


Abb.8: In **A** ist eine Laufsequenz von 9 Schritten dargestellt. Kanal 1 zeigt die extrazelluläre Ableitung von Nerv N5, Kanal 2 von Nerv N3C und Kanal 3 von Nerv N3A3b. Kanal 4 ist ein Ereigniskanal, in dem jede große Einheit aus Kanal 3 als Ereignis markiert ist. Kanal 5 zeigt eine Sinusfunktionstransformation des Kanals 4 und beschreibt die Levatorbursts aus Kanal 3 als Kurve. Kanal 6 markiert die

Scheitelpunkte der Kurven aus Kanal 5 als Ereignisse. In **B** ist ein Überschreibmodus von Kanal 1 und Kanal 2 von je 20 Überläufen.

Eine andere Möglichkeit, die Aktivität der DUM Zellen in den Verhaltensspuren zu detektieren, ist das Spikesorting mit anschließendem Template-matching. Hierbei handelt es sich um eine automatisierte Sortierfunktion, bei der unterschiedliche Signale nach vorgegebenen Parametern aus der aufgenommenen Verhaltensspur identifiziert und anschließend markiert werden. Da die Signale in extrazellulären Ableitungen von Tier zu Tier stark variierten, mussten die Parameter, die bei diesem Vorgang vorgegeben wurden, für jede Ableitung einzeln ermittelt werden. Hierzu wurde die DUM Zelle über eine Elektrode durch elektrische Pulse stimuliert. Der gegebene Stimulus wurde aufgezeichnet. Er diente im weiteren Verlauf als Triggersignal. Löst man bei der antidromen Stimulation ein Aktionspotential in der DUM Zelle aus, so sollte dieses mit den Messelektroden immer im gleichen Abstand zum Stimulus abgeleitet werden. Bei dieser Methode macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass DUM Neurone im Gegensatz zu Motoneuronen und sensorischen Neuronen die einzigen Zellen sind, die Axone in mehreren Hauptseitennerven führen. Stimuliert man diese antidrom über einen Nerv, sollte man ausschließlich Spikes der DUM Neurone in den anderen Nerven auslösen.

Über eine Umschaltbox wurde die chronisch implantierte Hakenelektrode von Nerv N3C als Reizelektrode eingesetzt. Die experimentelle Situation ist zum besseren Verständnis schematisch in Abb.9A dargestellt. Die Reizartefakte wurden als Ereignisse in einen neuen Kanal importiert und als Triggersignal für die Überschreibfunktion benutzt. In Abb.9B sind 140 Überläufe der Aufnahme von Nerv N5 dargestellt. In einem zeitlichen Abstand von 14ms zum Stimulusartefakt zeichnen sich die Spikes der DUM Zelle ab. In Bi ist der gleiche Ausschnitt noch einmal als *Average* aus allen 140 Überläufen dargestellt. Im Average kommt es nach 14 ms eindeutig zu einem Signal. In C und Ci sind multiple Überläufe und der Average für die Ableitung von N3A3b dargestellt. Auch hier zeichnen sich die Spikes DUM Zelle in den multiplen Überläufen leicht ab und werden erst als Average eindeutig sichtbar. In Abbildung 9Bii sind die multiplen Überläufe der Ableitungen von Nerv 3A3b und Nerv N5 in einer höheren zeitlichen Auflösung dargestellt. Die mittlere weiße Linie zeigt den Mittelwert, die obere und untere weiße Linie die Standardabweichung. Das verdeutlicht, dass sich die extrazellulär abgeleiteten Spikes der DUM Neurone kaum vom Grundrauschen

abheben, und dass ihre Form sehr variable ist. Die große Variabilität in der Form der extrazellulären DUM Zell Spikes wird besonders bei dem Vergleich einzelner Überläufe zueinander deutlich (Abb.9D).

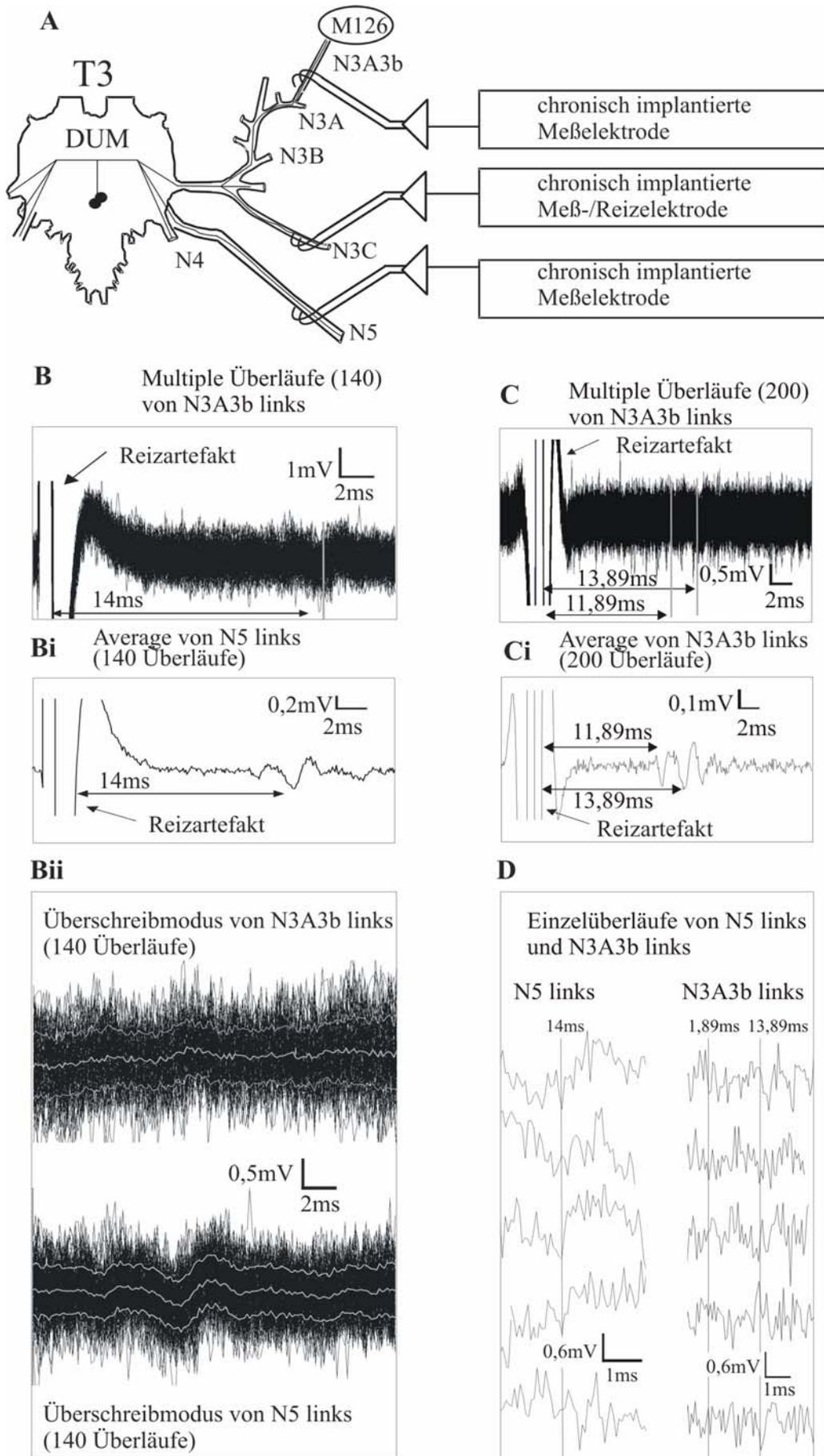


Abb.9: In **A** ist schematisch der Versuchsaufbau dargestellt. An Nerv N3A3b, Nerv N3C und Nerv N5 wurden Hakenektroden auf einer Körperseite chronisch implantiert. Die implantierte Elektrode an Nerv N3C konnte über eine Umschaltbox sowohl als Mess- wie auch als Reizelektrode benutzt werden. In **B** sind multiple Überläufe (140 Überläufen) von Nerv N5 dargestellt. Jeder einzelne Überlauf wurde auf das Reizartefakt getriggert. Der graue Balken markiert die Antwort der DUM Zelle. Das Signal lag 14ms vom Triggersignal entfernt. **Bi** zeigt den entsprechenden Ausschnitt aus B als Average (140 Überläufe). In **C** sind multiple Überläufe (200 Überläufe) von Nerv N3A3b dargestellt. Jeder einzelne Überlauf wurde auf das Reizartefakt getriggert. Die grauen Balken markieren die Antworten der DUM Zellen. Die Signale lagen 11,89ms und 13,89ms vom Triggersignal entfernt. **Ci** zeigt den entsprechenden Ausschnitt aus C als Average (200 Überläufe). Die untere Spur in **Bii** zeigt den Ausschnitt in einer anderen Zeitauflösung. Die obere Spur zeigt die entsprechende Stelle in Nerv N3A3b. In **D** sind je 5 Einzelüberläufe von N5 links und N3A3b links gezeigt. Die Balken markieren den Zeitpunkt 14ms und 11,89ms bzw. 13,89ms, zu dem die DUM Zellen aktiv sind.

Dieses Experiment zeigt, dass die Spikes der DUM Zellen grundsätzlich mit den implantierten Elektroden extrazellulär abgeleitet werden können. Aufgrund der sehr dünnen Axondurchmesser der DUM Neurone sind die Signale allerdings von sehr geringer Amplitude. Im Schnitt wiesen die extrazellulär abgeleiteten Spikes von DUM Zellen eine etwa 150-fach geringere Amplitude im Vergleich zu denen von Motoneuronen auf. Daher wurden die extrazellulären Signale der DUM Neurone nur als Average oder in multiplen getriggerten Überläufen sichtbar (Abb.9B, Bi). Die Einzelsignale aus kontinuierlichen Ableitungen hoben sich hingegen kaum vom Grundrauschen ab (Abb.9Bii). Darüber hinaus unterschieden sich die Formen der Einzelsignale, je nachdem auf welchem Hintergrundrauschen sie aufsaßen, deutlich voneinander. Daher konnten die Einzelsignale in den kontinuierlichen Spuren nicht durch so genanntes „Templatematching“ detektiert werden. Die Variabilität der Spikeform der DUM Zellen war zu groß, um sie durch harte Spikeformkriterien konsistent von anderen Signalen zu trennen. Das erklärt auch weshalb es nicht möglich war, die DUM Zell-Spikes nach Augenmaß in den kontinuierlichen Ableitungen während des Verhaltens zu identifizieren (siehe oben).

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde versucht, die extrazellulär abgeleiteten DUM Zell-Spikes durch intrazelluläre Ableitungen nachträglich zu identifizieren. Hierzu wurde je eine Hakenektrode an die Nerven N4A implantiert. Zuerst wurden Aufnahmen von Ableitungen in frei beweglichen Tieren gemacht. Es wurde gewartet bis das intakte Tier mehrmals Laufverhalten gezeigt hatte. Als Laufverhalten wurden Sequenzen definiert, in denen das Tier mindestens sechs Schrittzyklen auf ebenem

Untergrund in eindeutiger Vorwärtsbewegung durchgeführt hat. Im Durchschnitt betrug ein Schrittzklus 400ms (siehe auch Abb.8). Im Anschluss wurde das Tier dorsal geöffnet, ohne die Elektrodenimplantate zu beeinträchtigen. Daraufhin wurde die DUM Zelle durch eine simultane intrazelluläre Ableitung identifiziert. Das experimentelle Design ist in Abbildung 10A schematisch dargestellt. Durch antidrome Stimulation über die extrazelluläre Reizelektrode ließ sich ein antidromes Aktionspotential (AP) auslösen, das intrazellulär abgeleitet wurde (Abb.10B). Auch in der zur Reizelektrode kontralateralen Messelektrode konnte dieser antidrom evozierte Spike gemessen werden, allerdings war die Amplitude des extrazellulären APs wiederum sehr klein. Der zeitliche Abstand von intrazellulär gemessenen AP zum Reizartefakt betrug 13ms und vom extrazellulär gemessenen Signal auf der kontralateralen Seite zur Reizelektrode 44ms (Abb.11A, Bi). Der zeitliche Abstand zwischen dem intrazellulär gemessenen Signal und der kontralateralen Messelektrode betrug 31ms (Abb.11Bi). In Abb.10Bi sind 5 Einzelüberläufe der kontralateralen Messelektrode in einer größeren zeitlichen Auflösung dargestellt. Der grau unterlegte Bereich markiert den Zeitpunkt 44ms nach dem Reizartefakt. Der rote Kasten zeigt die DUM Zellsignale. Man erkennt deutlich, dass die sehr kleinen DUM Zellsignale in der extrazellulären Ableitung von anderen Signalen überlagert wurden und somit nicht als klare homogene Signalform identifiziert werden konnten. Um genauere Parameter für das Spikesorting formulieren zu können, wurden multiple Überläufe angefertigt, die auf das Reizartefakt getriggert wurden. In Abb.:11Ai ist dies für 39 Überläufe dargestellt. Die schwarze Linie gibt den Mittelwert von 39 Überläufen wieder, die dunkelgrauen Linien die Standardabweichung der Signale in den oberen und unteren Grenzen. Mit Hilfe dieser Eckdaten wurde versucht, die Parameter für die automatisierte Sortierfunktion unterschiedlicher Signale (Spikesorting) in Spike2 festzulegen. Es wurden unterschiedliche Spikeformen als Templates markiert, von denen eine in Abb.11B exemplarisch dargestellt ist. Sie diente im weiteren Verlauf als Schablone. Im anschließenden Templatematching, ein Vorgang in dem in der Aufnahme nach Signalen gesucht wird, die mit der Templateform übereinstimmen, wurde eine Vielzahl von Signalen markiert (Abb.11Bi). Das bestätigt weiter, dass die extrazellulär abgeleiteten DUM Zell Spikes eine zu geringe Amplitude und eine zu große Variabilität in ihrer Form aufwiesen, um mit Hilfe von Templates in der Verhaltensspur eindeutig identifiziert und von anderen Signalen getrennt zu werden.

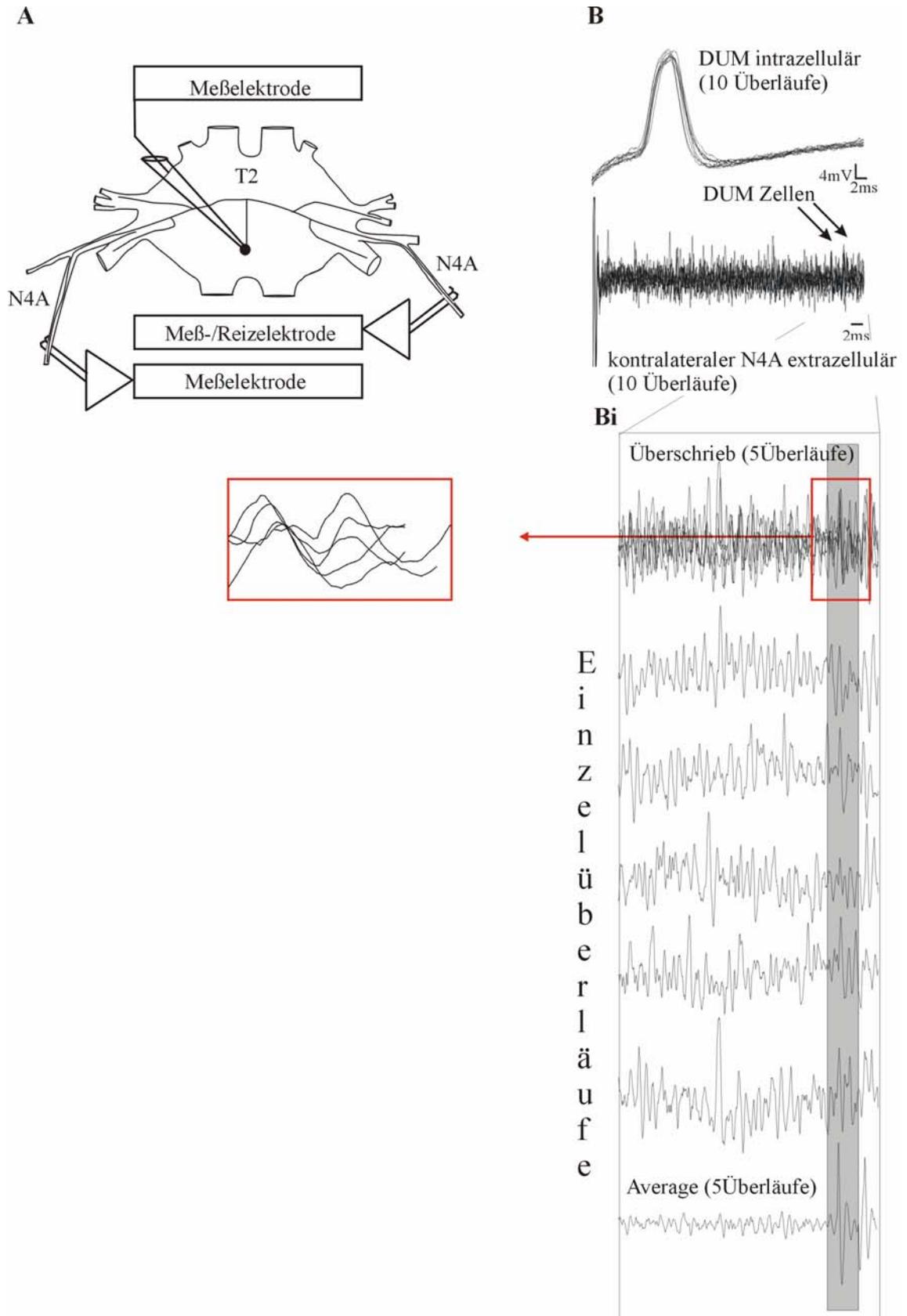


Abb.10: In **A** ist schematisch die experimentelle Situation dargestellt. An beiden Nerven N4A wurden Hakenelektroden chronisch implantiert. Nachdem Aufnahmen vom frei laufenden Tier gemacht wurden, wurde das Tier geöffnet und eine DUM Zelle, deren Axone durch beide Nerven laufen, intrazellulär identifiziert. In **B** sind multiple Überläufe von je 10 Überläufen der intrazellulären Aufnahme der DUM Zelle und eines N4A gezeigt. Die DUM Zelle wurde antidrom über den kontralateralen Nerv N4A stimuliert. Als Triggersignal dienten die Reizartefakte der Aufnahme. In **Bi** sind 5 Überläufe sowohl als multipler Überlauf, wie auch als Einzelüberläufe des Nerv N4A in größerer zeitlicher Auflösung dargestellt. Der grau unterlegte Bereich zeigt den Zeitraum, in dem die DUM Zelle aktiv ist. Der rote Kasten zeigt diesen Abschnitt vergrößert.

Um zu überprüfen, ob es zumindest zu einer teilweise erfolgreichen Markierung der DUM Zell Spikes in der Verhaltensspur kam, wurde das Template-matching trotzdem auf die zuvor aufgenommene Verhaltensspur angewandt (Abb.11C). In der Regel konnte eine Templateform erstellt werden, mit der zumindest Signale im richtigen zeitlichen Abstand zum Reizartefakt und zu spontan auftretenden Aktionspotentialen markiert wurden (Abb:11Bi). Es wurde jedoch nur in 5% der Fälle ein Signal im korrekten Abstand zum Reizartefakt markiert. In Ci ist eine Ausschnittvergrößerung aus C dargestellt. Während der Motoaktivität in der Levatorphase wurden nur wenige Signale markiert, wesentlich mehr Markierungen finden sich zwischen zwei Phasen, wo es nur geringfügige Aktivität der Motoneurone gibt. In Cii ist der grau unterlegte Bereich aus Ci in einer größeren zeitlichen Auflösung dargestellt. Auch hier ließ sich nicht eindeutig eine homogene Signalform bei den markierten Wellenformen erkennen. Scheinbar wurden auch abfallende Flanken zwischen den Motoneuronspikes markiert. Ob es sich bei den markierten Wellenformen überhaupt um neuronale Signale handelte, ließ sich nicht eindeutig bestimmen.

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass die hier entwickelte Technik, chronische extrazelluläre Elektroden an distalen peripheren Nerven zu implantieren, sehr gut geeignet ist, um die Spikes von Motoneuronen aus deren Axonen extrazellulär abzuleiten. Die Spikes von DUM Neuronen haben allerdings aufgrund der geringen Axondurchmesser eine zu geringe Amplitude, um zuverlässig im Verhalten identifiziert werden zu können.

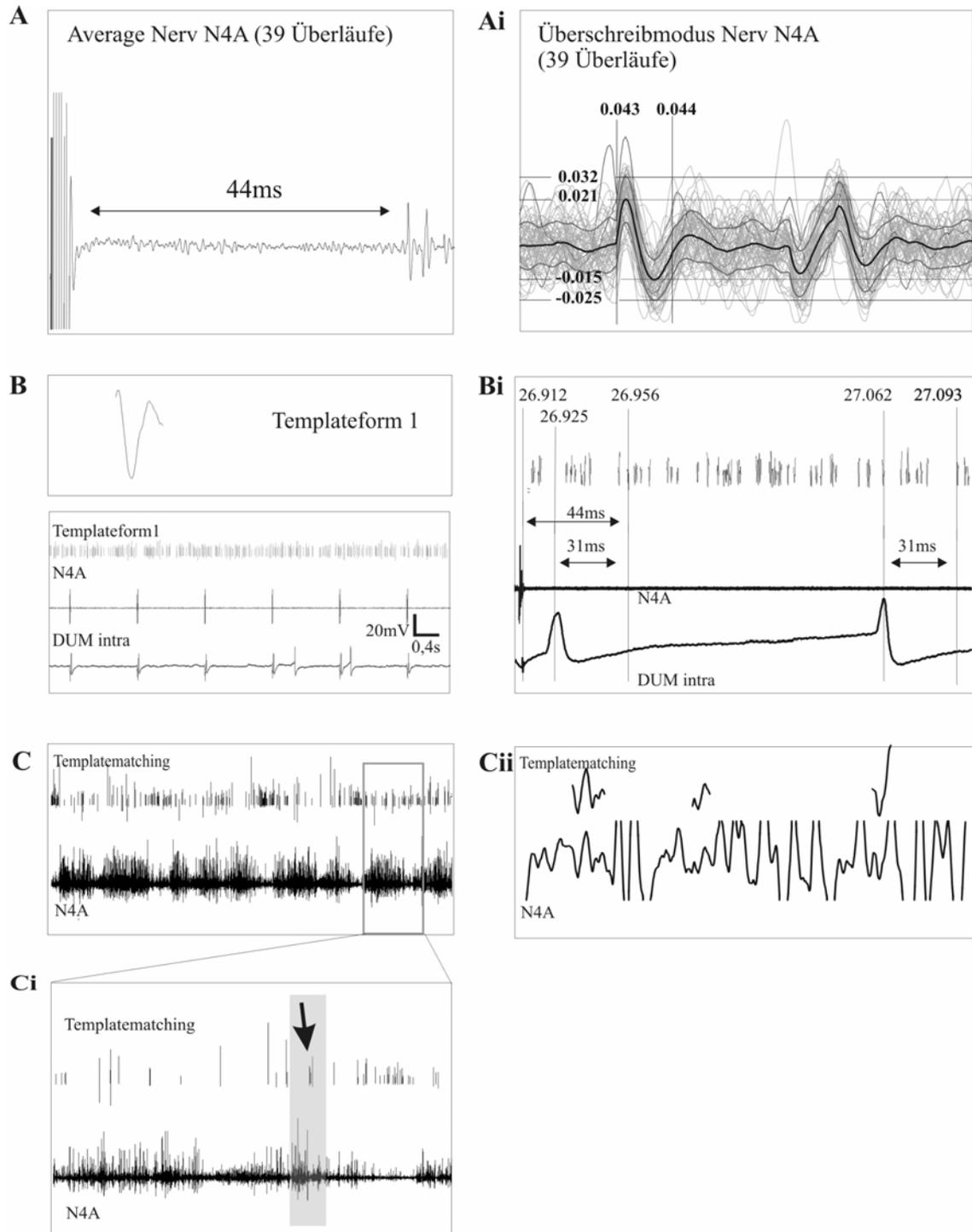


Abb.11: Dargestellt ist das Experiment zur Ermittlung der DUM Zellaktivität mit Hilfe von chronisch implantierten Hakenelektroden und anschließender intrazellulärer Identifikation der DUM Zelle in chronologischer Reihenfolge. **A** zeigt einen Average multipler Überläufe in Nerv N4A kontralateral zur Reizelektrode. Der Abstand zwischen Reizartefakt und DUM Zellsignal beträgt 44ms. In **Ai** sind die DUM Zellsignale als multiple Überläufe im Überschreibmodus in einer größeren zeitlichen Auflösung gezeigt. Der mittlere schwarze Balken gibt den Mittelwert für die Einzelüberläufe an, die dunkelgrauen Linien zeigen die Standardabweichung. Diese Grenzwerte dienen als Parameter für die Sortierfunktion und die Ermittlung unterschiedlicher Signalformen im Rahmen dieser Parameter. **B** zeigt exemplarisch eine der Signalformen (Templateformen) die beim so genannten Spikesorting ermittelt wurden. In **Bi** ist

ein Ausschnitt von B gezeigt. Im Abstand von 44ms zum Reizartefakt wird ein Signal in N4A markiert. Der Abstand dieses Signals zum intrazellulär gemessenen DUM Zellspike beträgt 31ms. Im gleichen Abstand wird im darauf folgenden spontan auftretenden DUM Zellspike ein weiteres Signal in N4A markiert. Aufgrund dieser Übereinstimmung wurde die Templateform 1 für das Templatematching ausgewählt. Die anderen Templateformen zeigten nur selten bzw. keine Markierung in N4A im Abstand von 44ms zum Reizartefakt.

Somit wurde ein Ziel der Arbeit, die Aktivität von DUM Neuronen während des Laufens aus intakten, frei-beweglichen Tieren extrazellulär abzuleiten, nicht erreicht. Dagegen war die Entwicklung der chronischen, extrazellulären Elektroden-Implantate sehr erfolgreich. Motoneurone ließen sich in vollkommen intakten Tieren über längere Zeiträume während des normalen Verhaltens ableiten. Es war sogar möglich, mehrere Elektroden an verschiedenen Nerven zu implantieren. Das ist in Abbildung 12A für eine repräsentative Ableitung mit 5 Elektroden-Implantaten während des Laufens dargestellt. Hier sieht man die Aktivität der Motoneurone in fünf synchronen extrazellulären Ableitungen an unterschiedlichen Nerven für sieben Schrittzyklen (Abb.12A). Für beide Hemiganglien war deutlich die alternierende Aktivität der Motoneurone zu finden. In N4 sieht man die Aktivität der Motoneurone, die während der Levatorphase aktiv waren und in N5 die der Motoneuronen, die in der Depressorphase aktiv waren. Man sieht auch, dass die Levatorphasen zueinander alternierend auftraten. Das Frequenzdiagramm in B zeigt zu dem, dass die Levatorphasen weitgehend von konstanter Dauer waren, die Depressorphasen hingegen eine größere Variabilität in Dauer und Intensität der Bursts zeigten. Da die Tiere in ihrem Verhalten vollkommen unbeeinträchtigt waren und das Implantieren der Elektroden nicht zu dauerhaften Verletzungen führte, kann diese Technik zum Ableiten und zum selektiven Stimulieren von Motoneuronen über längere Zeiträume verwendet werden. Die hier entwickelte Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. C. Duch angewendet, um die Aktivität von identifizierten Motoneuronen während der postembryonalen Entwicklung des Tabakswärmers *Manduca sexta* zu bestimmen und zu manipulieren. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in Kapitel 3.4. dargestellt.

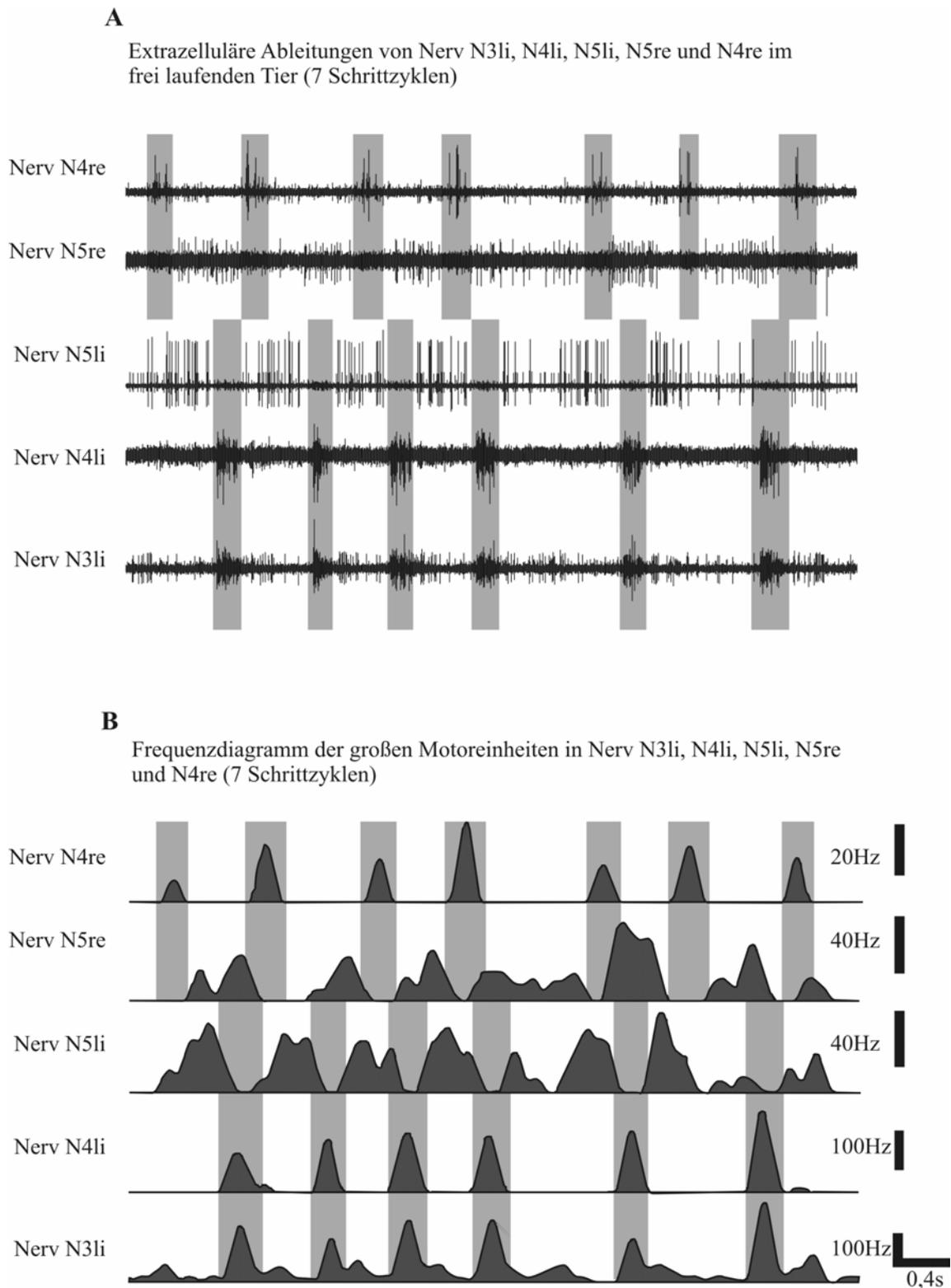


Abb.12: **A** Dargestellt sind die Ableitspuren von fünf extrazellulären Ableitungen chronisch implantierter Elektroden während des freien Laufens. Man erkennt deutlich die alternierenden Aktivitätsmuster zwischen Schwing- und Stemmphase innerhalb einer Körperhälfte und zwischen den beiden Körperhälften. Die grau unterlegten Bereiche markieren die Levator- bzw. Schwingphase. In **B** ist der gleiche Abschnitt als Frequenzdiagramm dargestellt. Die Aktionspotentiale der großen motorischen

Einheiten wurden als Ereignisse markiert. Diese wurden anschließend in einer Sinusfunktionstransformation in eine Kurvenform umgewandelt. Die Amplitude der Welle gibt die Frequenz wieder.

3.2. Aktivität von DUM Neuronen während eines nicht pharmakologisch induzierten motorischen Musters im isolierten Mesothorakalganglion

Um dennoch einen Aufschluss über die Einbindung von DUM Zellen in zentral generierte rhythmische Muster zu erhalten, wurde ein weiterer Versuchsansatz gewählt. Knop et al. (2002) haben ein Präparat vorgestellt, in dem es nach Durchtrennen der Konnektive zwischen Pro- und Mesothorakalganglion sowie Meso- und Metathorakalganglion zur Etablierung eines zentral generierten Musters im Mesothorakalganglion kommt. In diesem Präparat etabliert sich rhythmische Aktivität innerhalb der Motoneuronenpools der Flexor- und Extensor-Motoneurone der Tibiae sowie der Levator- und Depressor-Motoneurone des Trochanter (Knop, Diplomarbeit, 2000). Ob es in allen Motoneurongruppen, die am Laufen beteiligt sind, zu rhythmischer Aktivität kam, wurde nicht überprüft. Der Vorteil dieses Präparats liegt zum einen darin, dass die sensorische Rückkopplung innerhalb des Segments erhalten bleibt, zum anderen handelt es sich bei diesem Rhythmus nicht um einen pharmakologisch induzierten Rhythmus; unspezifische Wechselwirkungen des Pharmakons mit einzelnen Komponenten des Netzwerkes treten also nicht auf. Die Eigenschaften des Rhythmus wurden in den Diplomarbeiten von Knop (2000) und Denzer (1997) ausführlich beschrieben. In dieser Arbeit wurde das Präparat dazu genutzt, die Aktivität der verschiedenen Subpopulationen von DUM Neuronen während eines zentral generierten Aktivitätsmusters zu untersuchen, an dem die Komponenten des Laufnetzwerkes beteiligt sind. Im Folgenden sollen kurz einige Eigenschaften des zentral generierten Rhythmus vorgestellt werden.

Nach dem Durchtrennen der posterioren und anterioren Konnektive des mesothorakalen Ganglions kam es in 40% (n=90) der Experimente zu anhaltender rhythmischer Aktivität. In allen Experimenten wurde der Nerv N4A beider Seiten extrazellulär als Monitor für die Aktivität der Levator-Motoneurone des Trochanter abgeleitet, wobei in einigen Fällen die extrazelluläre Ableitung einer der beiden Seiten fehlschlug. Nerv N4A innerviert den Levatormuskel M102 des Trochanter, der von 6 Motoneuronen

versorgt wird (Bräunig, 1982). Als Salve wurden Folgen von Aktionspotentialen definiert, in denen mindestens 10 Aktionspotentiale in einem maximalen Abstand von 100ms zueinander auftraten. Eine Periode ist der Abstand vom Beginn eines Levatorbursts bis zum Beginn des folgenden. Die Periodendauer variierte sowohl zwischen den Experimenten als auch innerhalb eines Experiments. Die durchschnittliche Periodendauer betrug $30,72s \pm 19,2s$ ($n = 24$) (Abb.13A). Im Gegensatz dazu variierte die Burstdauer innerhalb eines Experiments, wie auch zwischen den Experimenten mit $1,89s \pm 0,8s$ ($n=24$) weitaus geringer (Abb.13B). Die Tatsache, dass die Dauer der Levatorbursts trotz der starken Variabilität der Periodendauer relativ konstant blieb, stimmt mit der Situation im frei laufenden Tier überein. Die Laufgeschwindigkeit wird in der Regel über Änderungen der Dauer der Stemmphase (Depressoren-Aktivität) bei konstanter Dauer der Schwingphase (Levatoren-Aktivität) geändert (Burns und Usherwood 1979; Duch und Pflüger, 1995). In Abbildung 14A, B ist die Beziehung zwischen der Dauer der Levatorbursts und der Periodendauer für ein repräsentatives frei laufendes Tier dargestellt. Die entsprechenden Ableitungen wurden mit Hilfe von chronisch implantierten extrazellulären Elektroden durchgeführt. Auch hier variiert die Dauer einer Periode stark ($0,84s \pm 0,32s$), die Dauer der Levatorbursts hingegen bleibt relativ konstant ($0,23s \pm 0,07s$) (Abb.14A, B). Innerhalb eines Experiments traten die Levatorbursts beider Hemiganglien sowohl alternierend zueinander als auch synchron auf. Eine Kopplung beider Hemiganglien in Bezug auf zeitlichen Abstand der Bursts zueinander bzw. koordinierte alternierende Aktivität ließ sich nicht feststellen.

A Periodendauer und Burstdauer der Levatormotoneurone im isolierten Mesothorakalganglion während eines zentral generierten Rhythmus

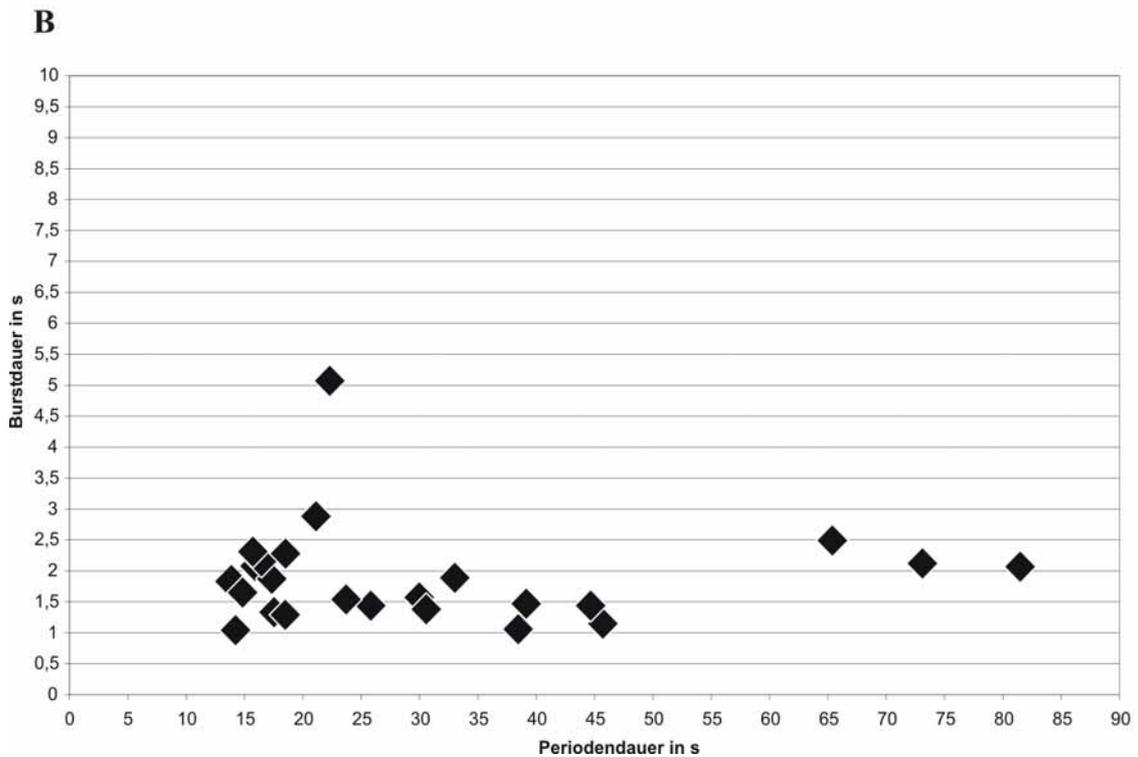
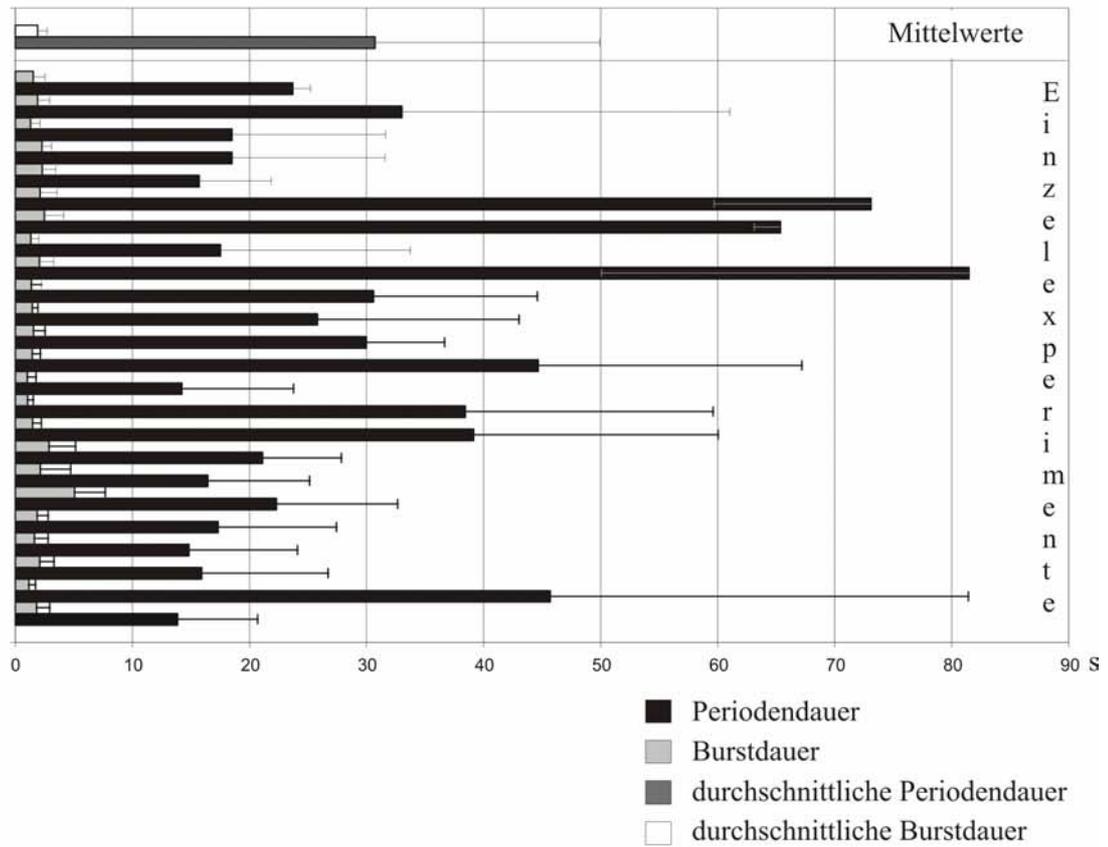
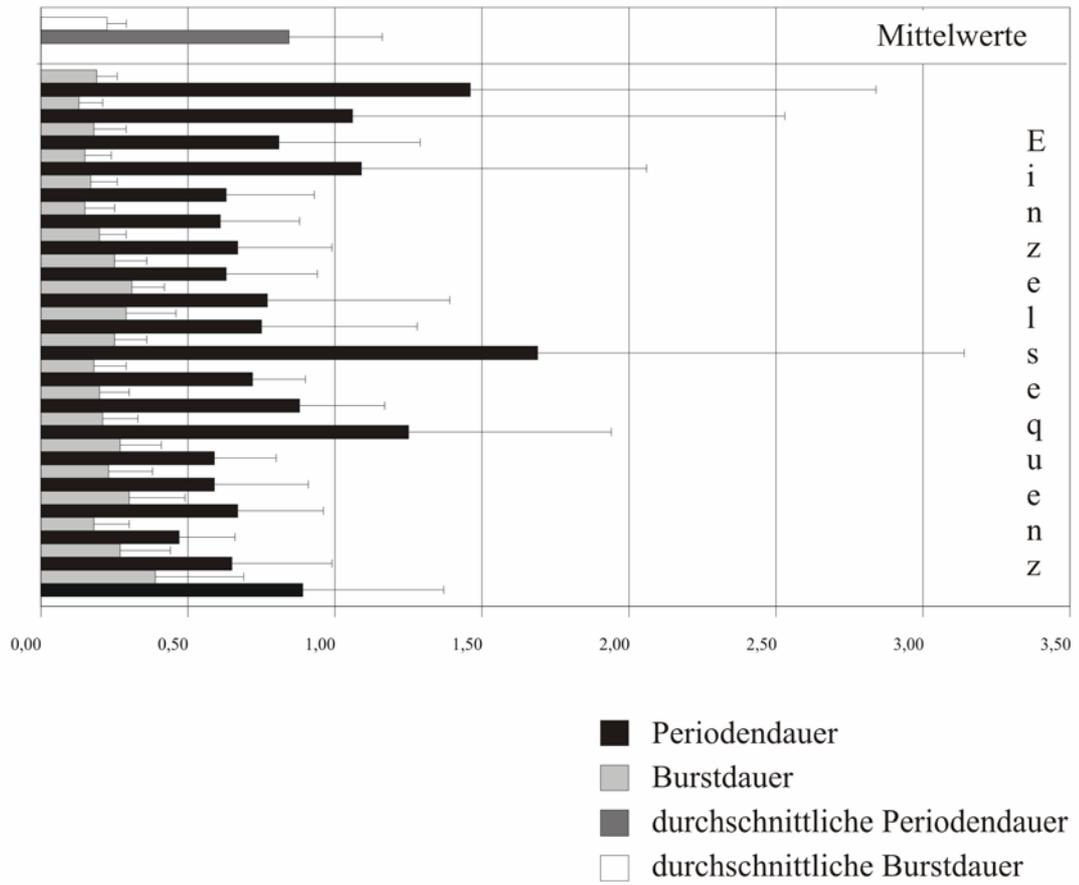


Abb.13: In **A** sind die durchschnittlichen Perioden- und Burstdauern von 24 Experimenten dargestellt, in denen sich nach Durchtrennen der anterioren und posterioren Konnektive ein motorischer Rhythmus etablierte. Die kürzeste Periodendauer betrug $14,22s \pm 9,54s$ und die längste $81,47s \pm 31,39s$. Im Durchschnitt betrug die Burstdauer $1,89s \pm 0,8s$ und die Periodendauer $30,72s \pm 19,2s$. In **B** sind die durchschnittlichen Burstdauern der einzelnen Tiere gegen die Periodendauern aufgetragen.

Periodendauer und Burstdauer von je 10 Laufsequenzen
der rechten und linken Levator motoneurone im intakten Tier

A



B

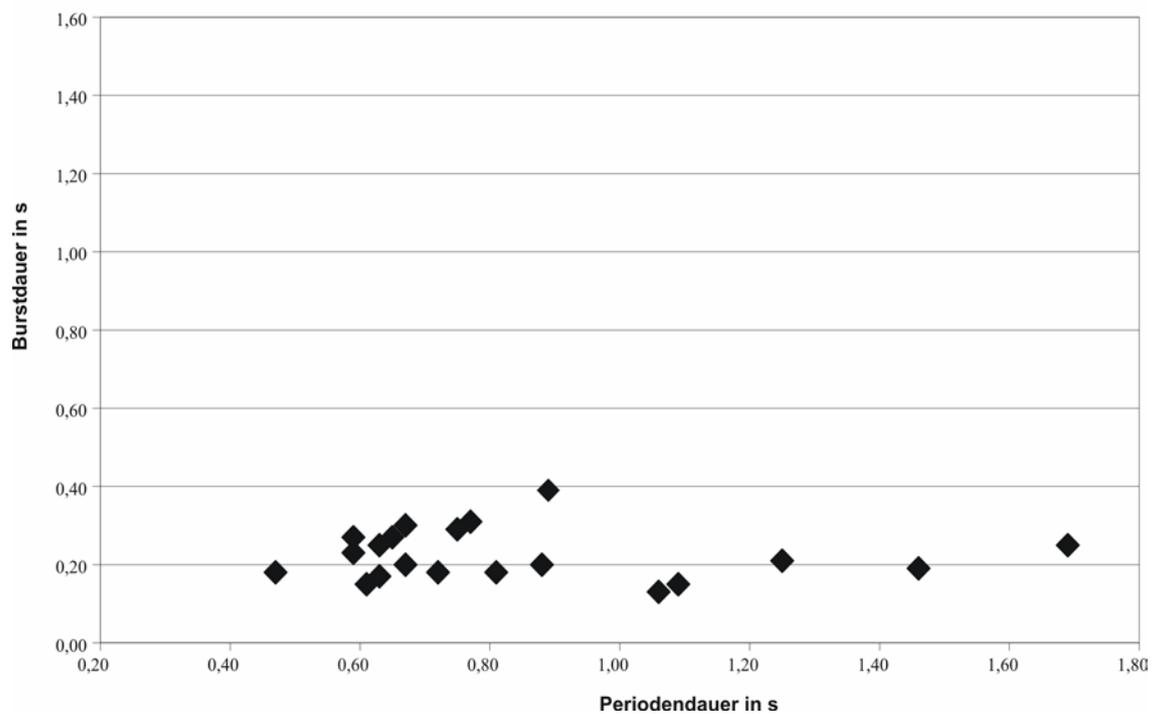


Abb.14: A Dargestellt sind die Periodendauern und Burstdauern von je 10 Schrittzyklen der rechten und linken Levator-Motoneurone eines frei laufenden Tieres. Die schwarzen Balken zeigen die Periodendauer; die hellgrauen Balken zeigen die Burstdauer. Der dunkelgraue Balken gibt die durchschnittliche Periodendauer an. Sie betrug $(0,84s \pm 0,32s)$. Der weiße Balken gibt die durchschnittliche Burstdauer an. Sie betrug $(0,23s \pm 0,07s)$. In **B** sind die einzelnen Burstdauern über der Periodendauer aufgetragen.

3.2.1. Aktivität von DUM Zellen, die keine Beinmuskulatur innervieren, während des nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus.

Während des durch Isolation des Mesothorakalganglion ausgelösten motorischen Musters wurden simultane intrazelluläre Ableitungen von DUM Neuronen durchgeführt. Nach der Aufzeichnung wurden die DUM Neurone durch intrazelluläre Färbungen mit Rhodamin Dextran identifiziert. In Abbildung 15 ist exemplarisch eine intrazelluläre Färbung von einer DUM3A/C,4 Zelle als so genanntes „extended focus“ Bild dargestellt.

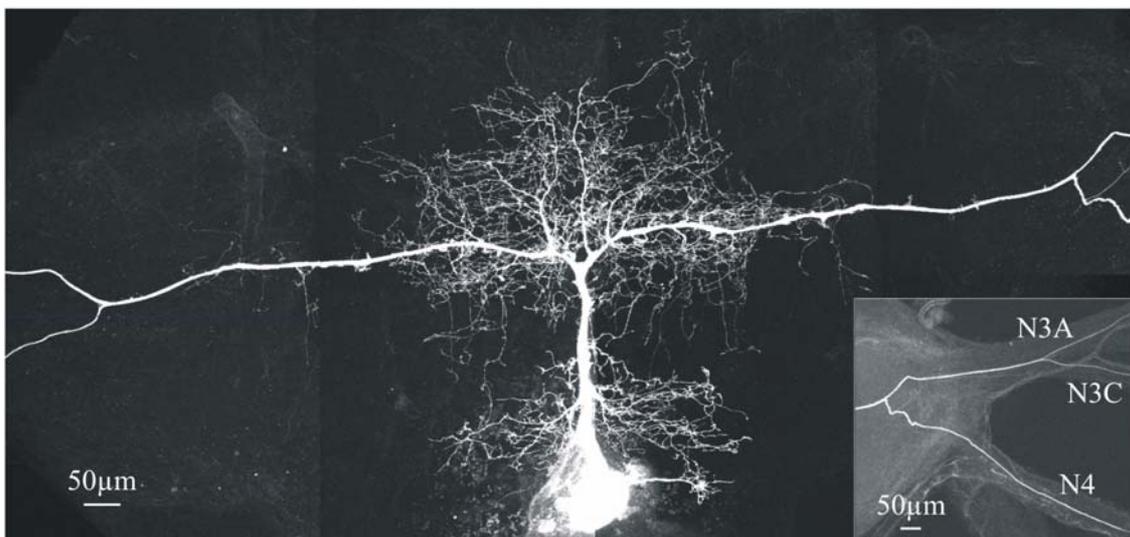
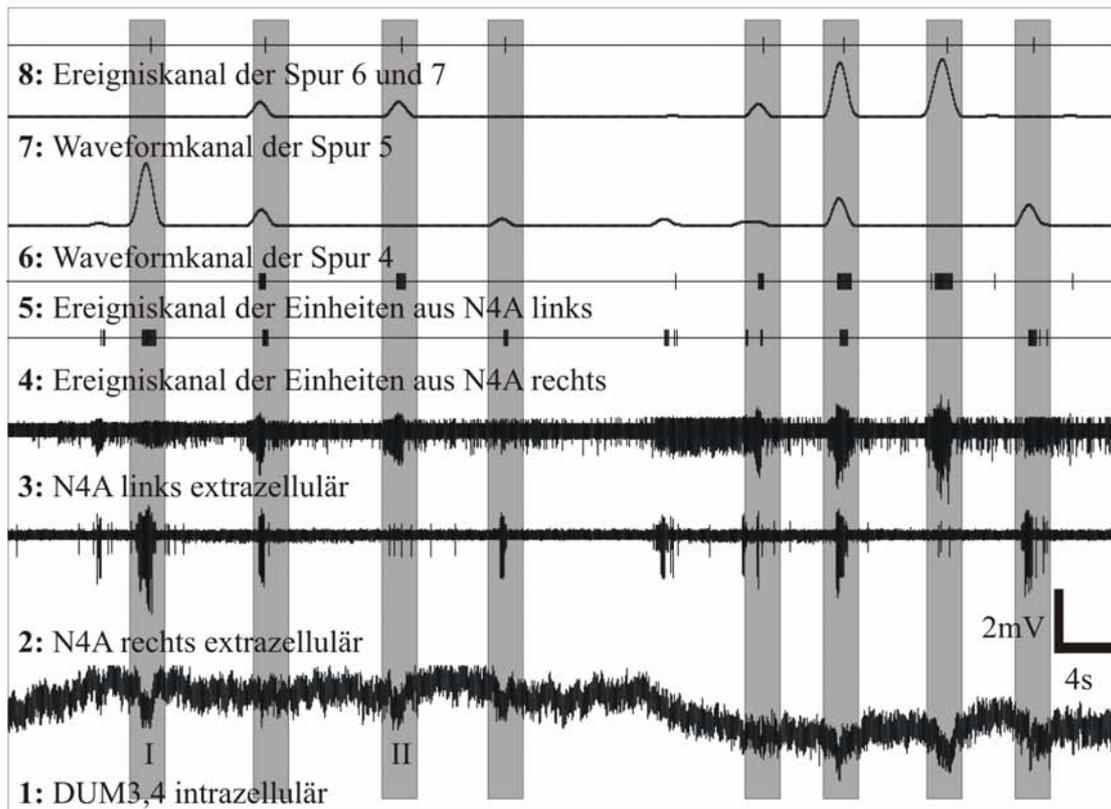


Abb.15: Die Abbildung zeigt exemplarisch eine DUM 3A/C,4 Zelle die im Anschluss eines Experiments zur Identifikation mit Rhodamin Dextran intrazellulär gefüllt wurde. Mit Hilfe dieser Färbungen ließen sich die DUM Zellen eindeutig über die Seitennerven, durch die sie projizierten, identifizieren. Im vorliegenden Beispiel handelt es sich um eine DUM3A/C, 4 Zelle. Man erkennt deutlich die T-Kreuzung des Primärneuriten und die axonale Aufgabelung der bilateralsymmetrischen Axone. In der eingefügten Übersichtsaufnahme kann man deutlich erkennen, dass die Zelle sowohl durch die Nerven 3A und C als auch durch den Nerv 4 projiziert.

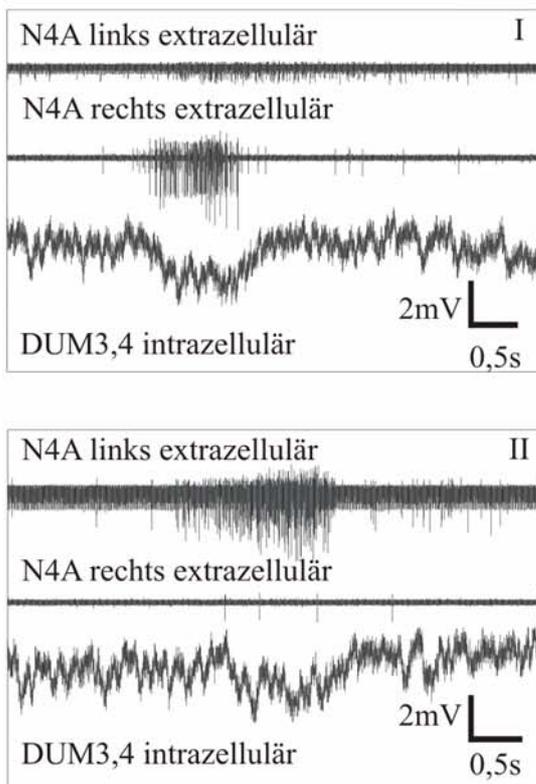
Am Beispiel der DUM3,4 Zellen soll kurz die Methode erläutert werden, die angewendet wurde, um eine mögliche Korrelation zwischen Levatorburst und DUM Zellaktivität darzustellen. In Abbildung 16A sind repräsentative simultane Ableitungen von den Nerven 4A auf beiden Seiten (Levator-Motoneurone) und von einer DUM3,4 Zelle dargestellt (Abb.16A, Spuren 1-3). Die Aktivität der schnellen Levator-Motoneurone, bzw. derjenigen mit großer Amplitude, wurden als Ereignisse markiert (Abb.16A, Spuren 4, 5). Bei diesem Verfahren wurde eine Schwelle gelegt und alle Aktionspotentiale als Ereignis markiert, die diesen Schwellenwert überschritten. Mit einem Skript wurde eine Sinusfunktionstransformation durchgeführt, die die Frequenz der Aktionspotentiale als Wellenfunktion wiedergab (siehe Abb.16A, Spuren 6, 7). Da weder eine detaillierte Frequenzanalyse noch eine Identifikation einzelner Motoneurone, die den Muskel 102 innervieren, durchgeführt wurde, konnte darauf verzichtet werden die Frequenzen im Einzelnen anzugeben. Durch das Setzen einer weiteren Schwelle oder das manuelle Markieren der Scheitelpunkte der Wellenfunktion wurden die als Wellenform dargestellten Bursts als Ereignisse markiert. Diese Markierungen wurden als Triggersignale für die Herstellung multipler Überläufe benutzt, eine Überschreibfunktion, in der zeitlich gewählte Abschnitte um das Triggersignal übereinander geschrieben wurden (Abb.16C). Mit diesem Verfahren sollte getestet werden, ob die Spikes von DUM Neuronen vornehmlich während oder außerhalb der Levatorphase auftraten.

In allen neun Experimenten, in denen von DUM 3,4 Zellen abgeleitet wurde, zeigten diese keine oder sehr geringe Spontanaktivität. Ein Beispiel ist in Abb.16A dargestellt. Auffällig waren die lang anhaltenden Hyperpolarisationen des Membranpotentials der DUM3,4 Zelle. Diese Hyperpolarisationen korrelierten zeitlich mit der Aktivität der Levator-Motoneurone beider Hemiganglien (Abb.16B). Diese zeitliche Korrelation wurde bestätigt, wenn multiple Überläufe des intrazellulär abgeleiteten Membranpotentials der DUM3,4 Zelle auf den Zeitpunkt der höchsten Aktivität während eines Levatorbursts getriggert wurden (Abb.16C). Die prominenten Hyperpolarisationen dauerten für die gesamte Dauer der Bursts in beiden N4A an (Abb.16B, C).

A



B



C

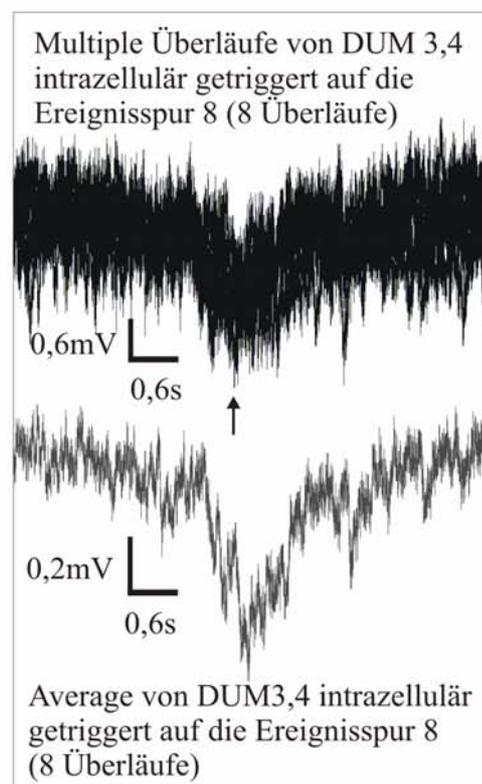
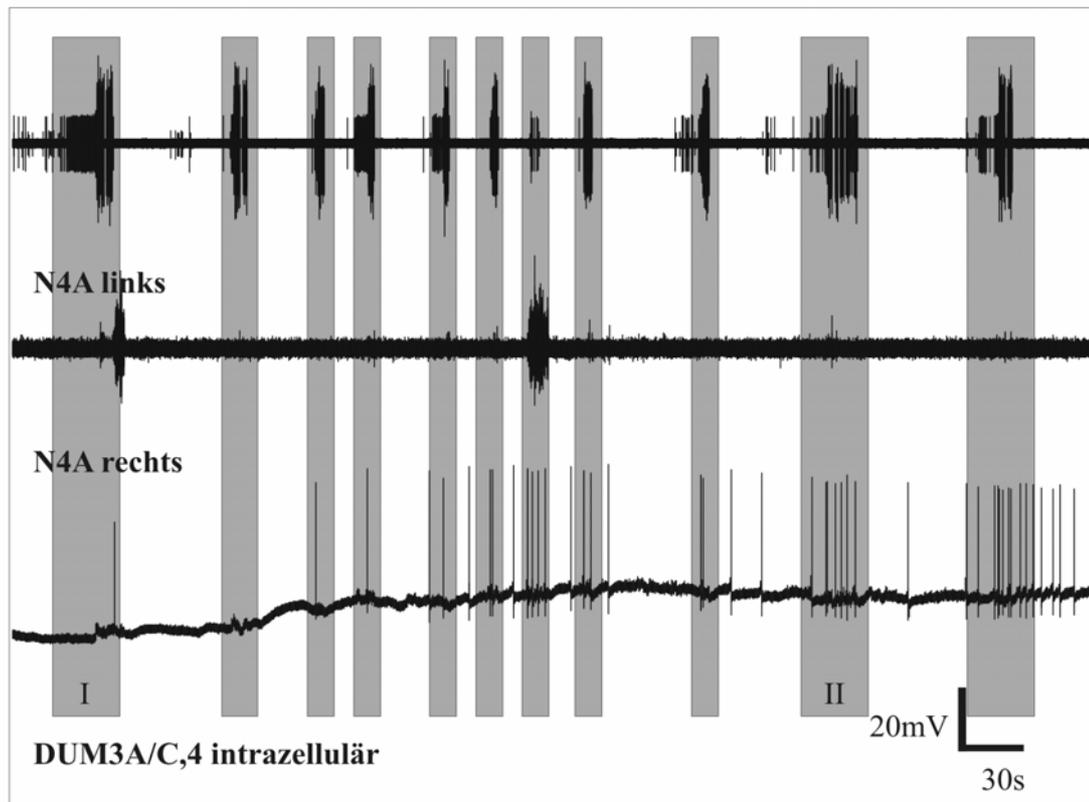


Abb.16: In A ist exemplarisch ein Experiment zur Ermittlung der Aktivität einer DUM 3,4 Zelle während eines nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus dargestellt. Kanal 1 zeigt die intrazelluläre Ableitung einer DUM 3,4 Zelle und Kanal 2 und 3 die synchronen extrazellulären Ableitungen beider N4A. In Kanal 4 sind die Aktionspotentiale aus Kanal 2, in Kanal 5 die Aktionspotentiale aus Kanal 4 als Ereignisse markiert. Kanal 6 zeigt die Ereignisse aus Kanal 4 als Wellenform nach einer Sinusfunktionstransformation; Kanal 7 zeigt das gleiche für Kanal 5. In Kanal 8 sind die Scheitelpunkte der Wellen aus Kanal 6 und 7 manuell als Ereignis markiert. Diese Markierungen dienen als Triggersignal für die multiplen Überläufe in C. Neben den multiplen Überläufen ist in C der Average der Überläufe dargestellt, um die starke Hyperpolarisation deutlicher darzustellen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Triggersignals. Da die Bursts der Levator-Motoneurone zwischen 2 und 4s lang waren, wurde ein Zeitabschnitt von 3 Sekunden vor und nach dem Triggersignal gewählt. In B sind Ausschnitte aus A in einer anderen zeitlichen Auflösung dargestellt, um zu dokumentieren, dass die DUM 3,4 Zelle sowohl bei Bursts der Levator-Motoneurone der rechten als auch der linken Seite hyperpolarisiert wird.

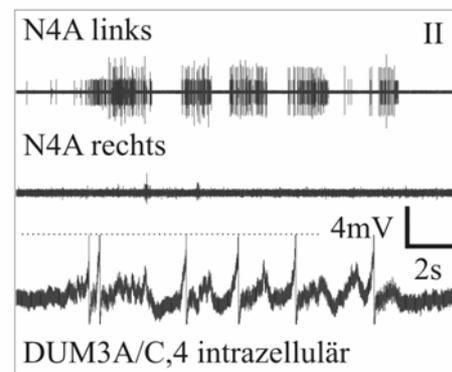
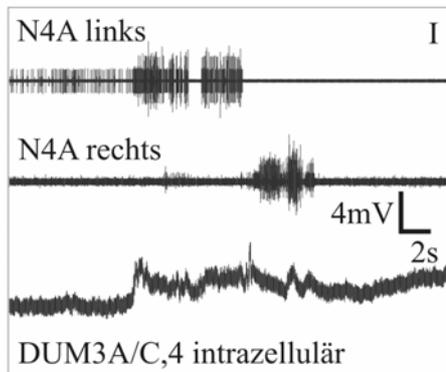
Eine Ausnahme in der Population der DUM3,4 Zellen bildeten die DUM3A/C,4 Zellen. Im Gegensatz zu den DUM3,4 Zellen zeigten die DUM3A/C,4 Zellen in beiden Experimenten, in denen sie abgeleitet werden konnten, sowohl Spontanaktivität, als auch starke Depolarisationen während der Levatorphasen. Eines dieser Experimente ist in Abbildung 17A dargestellt. Die Depolarisationen waren meist überschwellig und lösten in der DUM3A/C,4 Zelle Aktionspotentiale aus. Die Depolarisationen korrelierten mit den Levatorphasen beider Hemiganglien (Abb.17B I, II).

Fast identisch zu den DUM3,4 Zellen verhielten sich die DUM3 Neuronen. In allen Experimenten, in denen eine DUM3 Zelle abgeleitet werden konnte ($n = 4$), zeigte diese ebenfalls keine Spontanaktivität. In Abbildung 18A, B ist eines dieser Experimente exemplarisch dargestellt. DUM3 Zellen zeigten für die gesamte Dauer des Bursts der Levator-Motoneurone deutliche Hyperpolarisationen ihres Membranpotentials (Abb.18Ai). In B wurde die gleiche DUM Zelle hyperpolarisiert. Man sieht in Abb.18B, Bi dass es sich bei der lang anhaltenden Hyperpolarisation nicht um ein Bewegungsartefakt, sondern um einen hyperpolarisierenden synaptischen Eingang handelte. Die Polarität des Eingangs konnte bei Hyperpolarisation des Membranpotentials durch Applikation von negativem Strom umgekehrt werden (Abb.18bii).

A



B



C

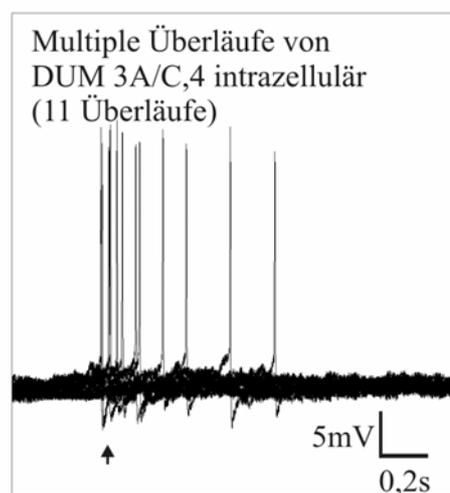


Abb.17: In **A** ist exemplarisch ein Experiment zur Ermittlung der Aktivität einer DUM 3A/C,4 Zelle dargestellt. Die untere Spur zeigt die intrazelluläre Ableitung der DUM 3A/C,4 Zelle, die mittlere und obere Spur die extrazellulären Ableitungen der beiden N4A. Man erkennt deutlich, dass der Rhythmus der rechten Seite weitaus langsamer als der der linken Seite ist. In **BI** und **II** sind zwei Ausschnitte der Ableitung in einer größeren zeitlichen Auflösung dargestellt. Man sieht, dass die Depolarisation der DUM 3A/C,4 Zelle sowohl bei Bursts der Levator-Motoneurone der rechten, als auch bei Bursts der linken Seite auftritt. In **BII** wurden die DUM Zell-Spikes der Anschaulichkeit wegen abgeschnitten (gestrichelte Linie). **C** zeigt multiple Überläufe der DUM 3A/C,4 Zelle (11Überläufe). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Triggersignals. In diesem Experiment wurden der Beginn eines Bursts mit einem Marker als Ereignis gekennzeichnet. Es wurden 0,4s vor und 1,6s nach dem Triggersignal dargestellt, da jeweils zu Beginn eines Bursts der Levator-Motoneurone die Depolarisation in der DUM Zelle am stärksten war.

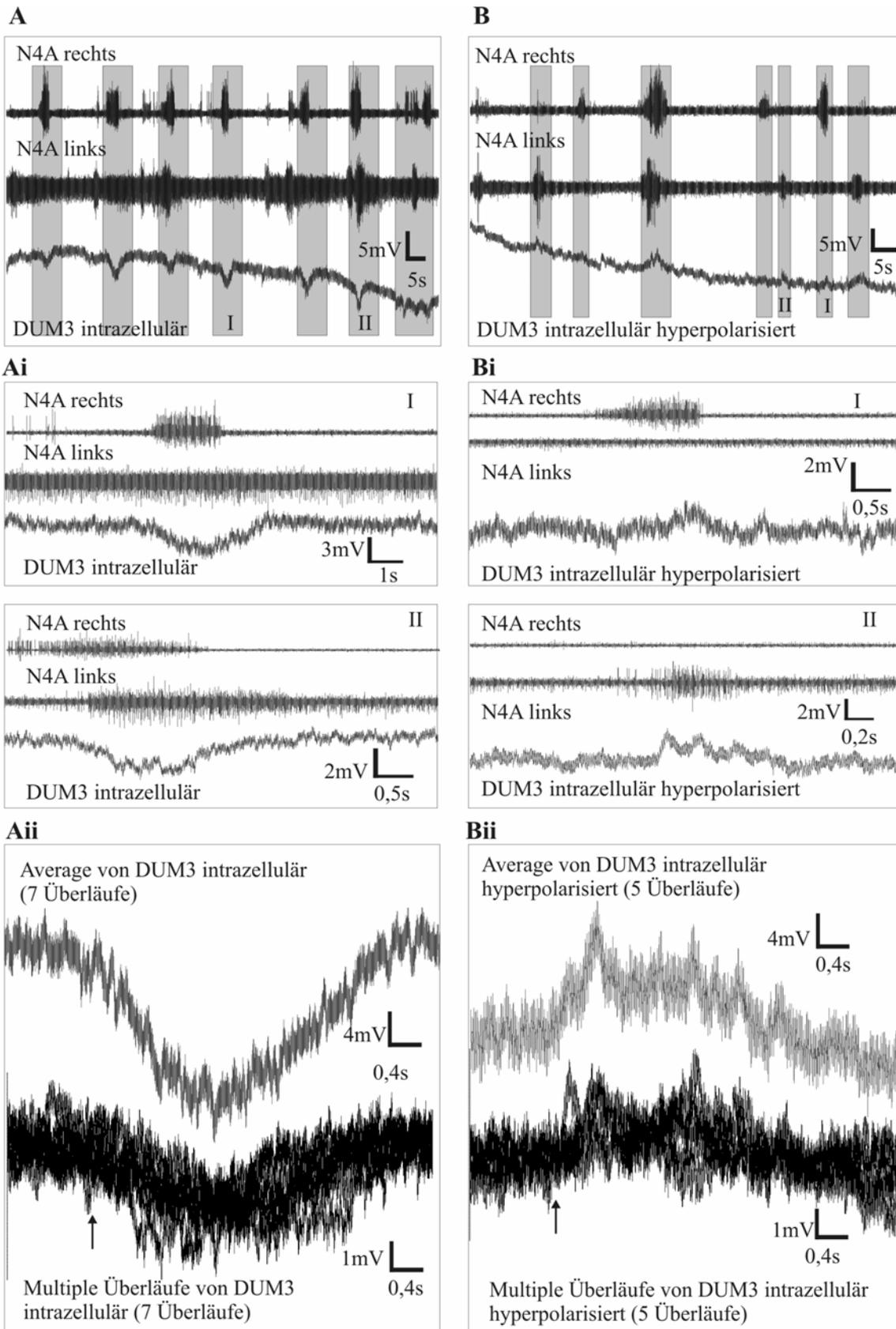
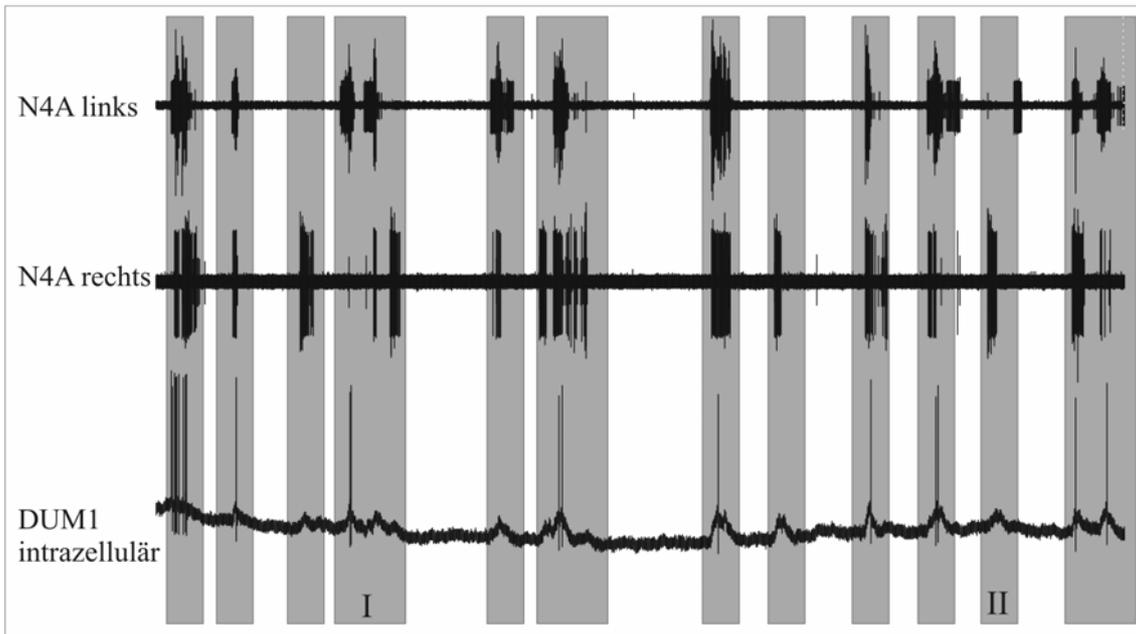


Abb.18: In **A** ist exemplarisch ein Experiment zur Ermittlung der Aktivität einer DUM 3 Zelle während eines nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus dargestellt. Die untere Spur zeigt die intrazelluläre Ableitung der DUM 3 Zelle, die mittlere und obere Spur zeigt die extrazellulären Ableitungen der beiden N4A. **Ai I** und **II** zeigt Ausschnittvergrößerungen aus **A**. Man sieht, dass die Hyperpolarisationen über die gesamte Dauer der Bursts der Levator-Motoneurone beider Hemiganglien anhalten. **Aii** zeigt multiple Überläufe und einen Average dieser multiplen Überläufe. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Triggersignals. Es wurde 1s vor und 3s nach dem Triggersignal dargestellt. **B** zeigt dasselbe Experiment wie **A**, doch wurde die DUM Zelle hier hyperpolarisiert. Wie man sieht, handelt es sich bei den in **A** dargestellten Hyperpolarisationen keinesfalls um Bewegungsartefakte, da sich die Hyperpolarisationen bei ausreichender Applikation von negativem Strom in Depolarisationen umwandeln. In **Bi** sind zwei Abschnitte aus **B** in größerer zeitlicher Auflösung dargestellt, um zu verdeutlichen, dass es sowohl bei Bursts der Levator-Motoneurone des linken als auch des rechten Hemiganglions zu lang anhaltenden Depolarisationen kommt. **Bii** zeigt multiple Überläufe und einen Average derselben. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Triggersignals. Wie in **Aii** ist 1s vor und 3s nach dem Triggersignal dargestellt.

Die größte Variabilität zeigten die DUM1 Zellen. In fünf Experimenten wurde eine der DUM1 Zellen abgeleitet. Leider gelang es nicht, durch die anschließende intrazelluläre Färbung zu entscheiden, ob es sich um DUMDL oder DUM 1b handelte. Die DUM1b Zelle innerviert ventrale Muskeln, Speicheldrüse, Spirakelmuskel und Transversalnerv. DUMDL innerviert den dorsalen longitudinalen Flugmuskel M81 (Burrows und Hoyle, 1973; Hoyle, 1977; Hoyle et al., 1979).

Die DUM1 Zellen zeigten in vier dieser fünf Experimente keine oder sehr geringe Spontanaktivität. In zwei dieser vier Experimenten wurden sie stark depolarisiert. In diesen beiden Experimenten korrelierten die depolarisierenden Eingänge mit den Levatorphasen beider Hemiganglien und depolarisierten die DUM Zelle überschwellig. (Abb.19A, BI,II). In den anderen beiden Experimenten blieben die Depolarisationen aus. Während keines Bursts einer Levatorphase war eine Depolarisation in der DUM1 Zelle zu sehen (Abb.20A, B). In einer fünften Ableitung von einer DUM 1 Zelle zeigte diese rhythmische Aktivität, die jedoch nicht mit den Bursts der Levator-Motoneurone irgendeines Hemiganglien korrelierte. (Abb.21A, B).

A



B

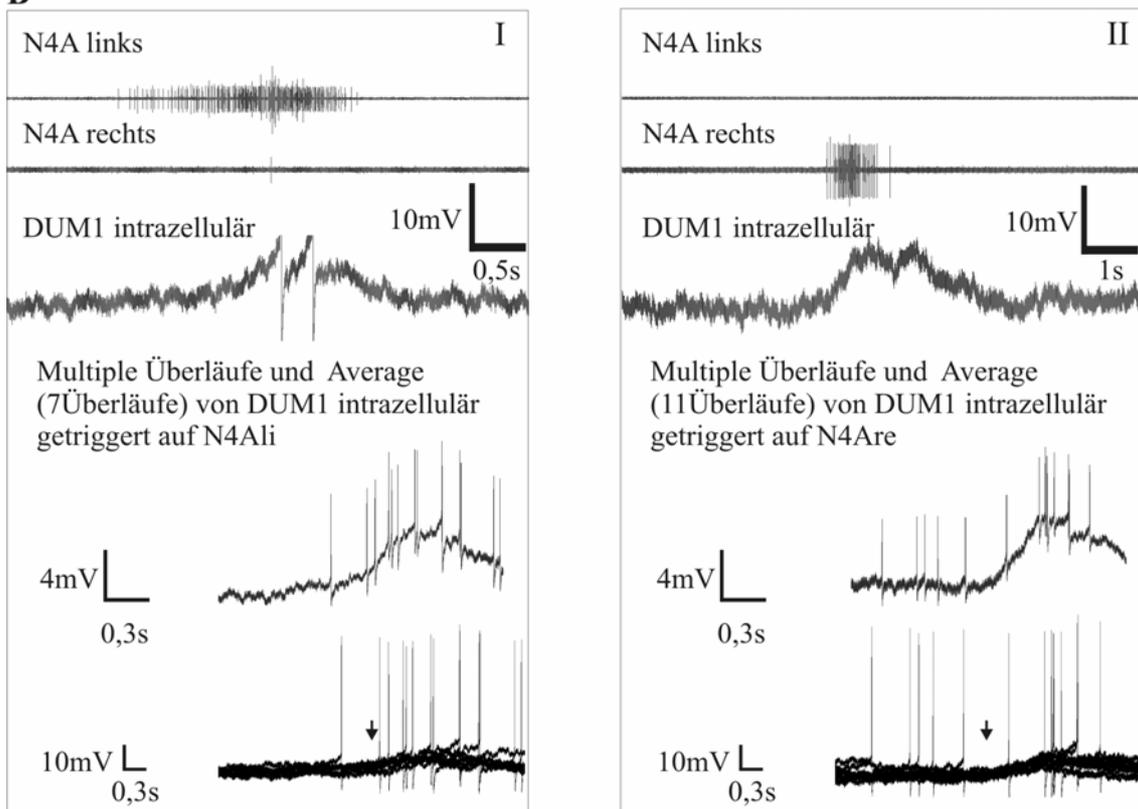


Abb.19: In A ist ein Experiment zur Ermittlung der Aktivität der DUM 1 Zellen während eines nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus dargestellt. Die untere Spur zeigt die intrazelluläre Ableitung der DUM 1 Zelle, die mittlere und obere Spur zeigen synchrone extrazelluläre Ableitungen beider N4A. Man kann sehen, dass die Rhythmen der beiden Hemiganglien nicht zueinander koordiniert sind, es aber während Bursts der Levator-Motoneurone beider Hemiganglien zu Depolarisationen in der DUM 1 Zelle

kommt (**BI, II**). In **BI** und **BII** sind Ausschnittsvergrößerungen des Experiments dargestellt. Die multiplen Überläufe und deren Averages zeigen einen Ausschnitt von 1,5s vor und 1,5s nach dem Triggersignal. In diesem Experiment wurden die Scheitelpunkte der Frequenzdiagramme markiert (nicht abgebildet).

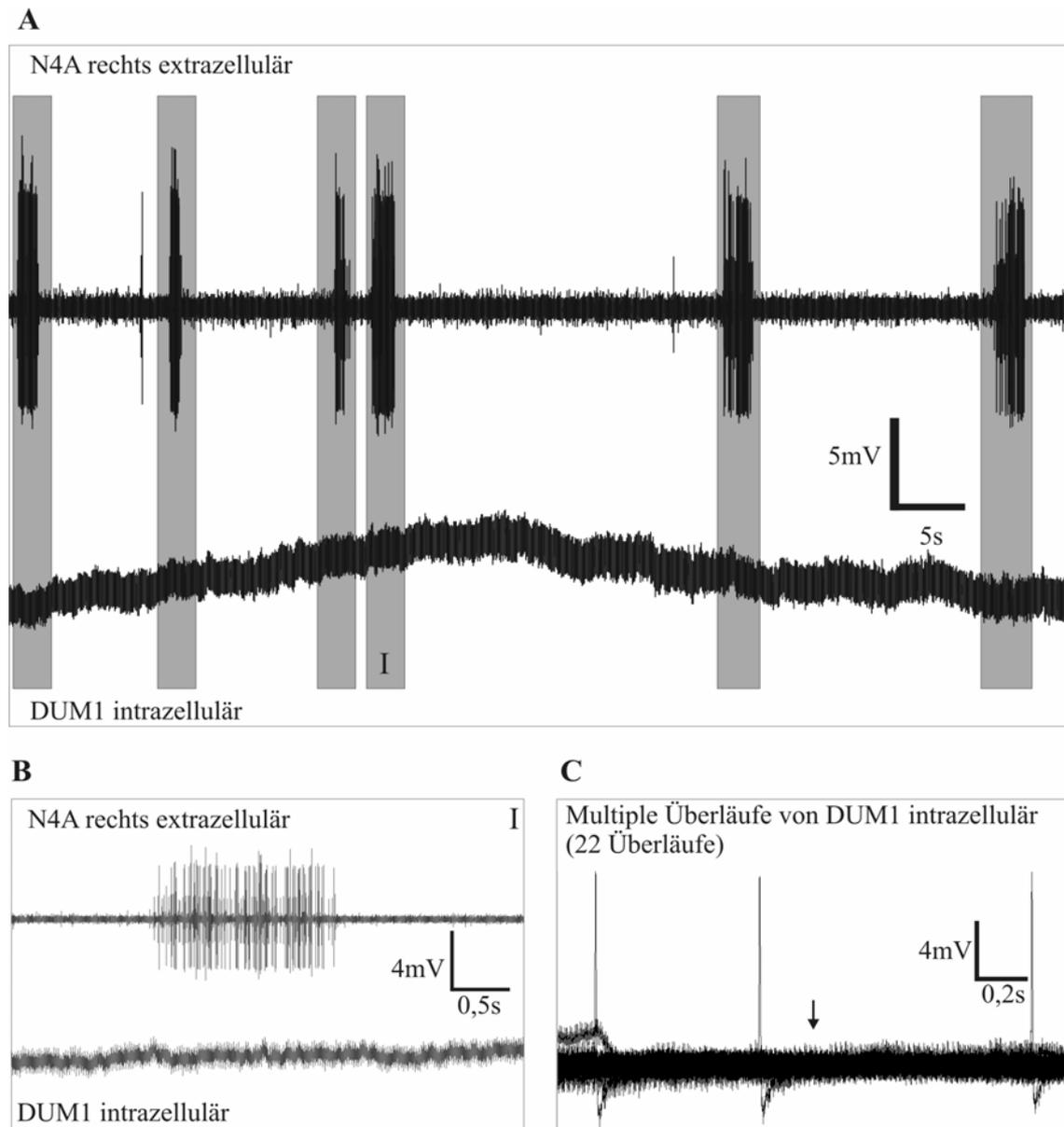


Abb.20: In **A** ist ein weiteres Experiment zur Ermittlung der Aktivität von DUM 1 Zellen während eines nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus dargestellt. In der unteren Spur ist die intrazelluläre Ableitung der DUM 1 Zelle dargestellt, in der oberen Spur die extrazelluläre Ableitung von N4A rechts. Eine Ableitung von N4A links ist in diesem Experiment nicht geglückt. In **B** ist eine Ausschnittsvergrößerung aus **A** dargestellt. Man erkennt sowohl in **A** als auch in **B**, dass zu keinem Zeitpunkt, zu dem ein Burst der Levator-Motoneurone in N4A rechts auftritt, eine Hyper- oder

Depolarisation in der DUM 1 Zelle vorkommt. In C sind multiple Überläufe von je 1s vor und nach dem Triggersignal, das durch einen Pfeil markiert wird, dargestellt.

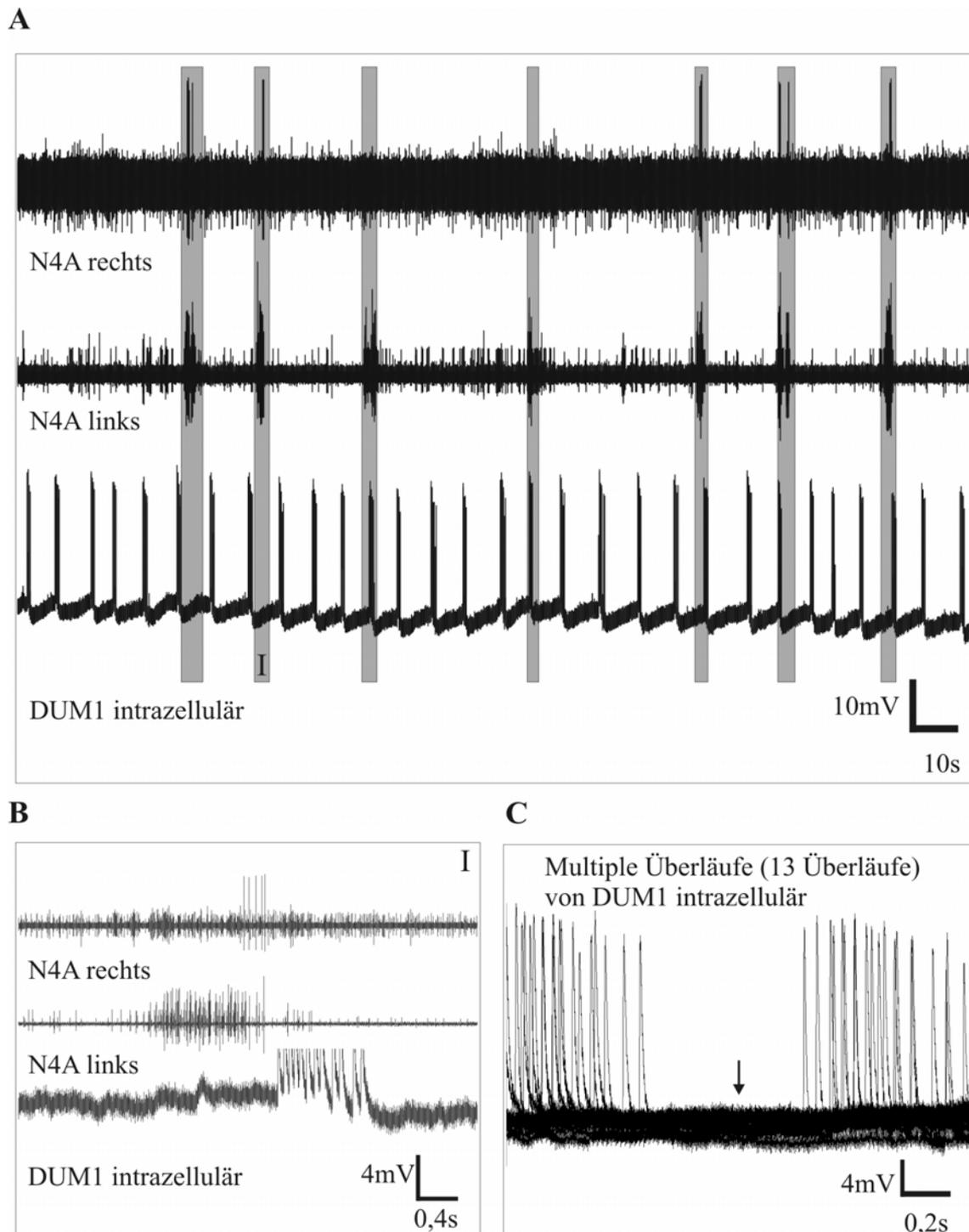


Abb.21: In A ist ein drittes Experiment zur Ermittlung der Aktivität von DUM 1 Zellen während eines nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus dargestellt. Die untere Spur zeigt die intrazelluläre Ableitung der DUM 1 Zelle; die mittlere und obere Spur zeigen die extrazellulären Ableitungen beider

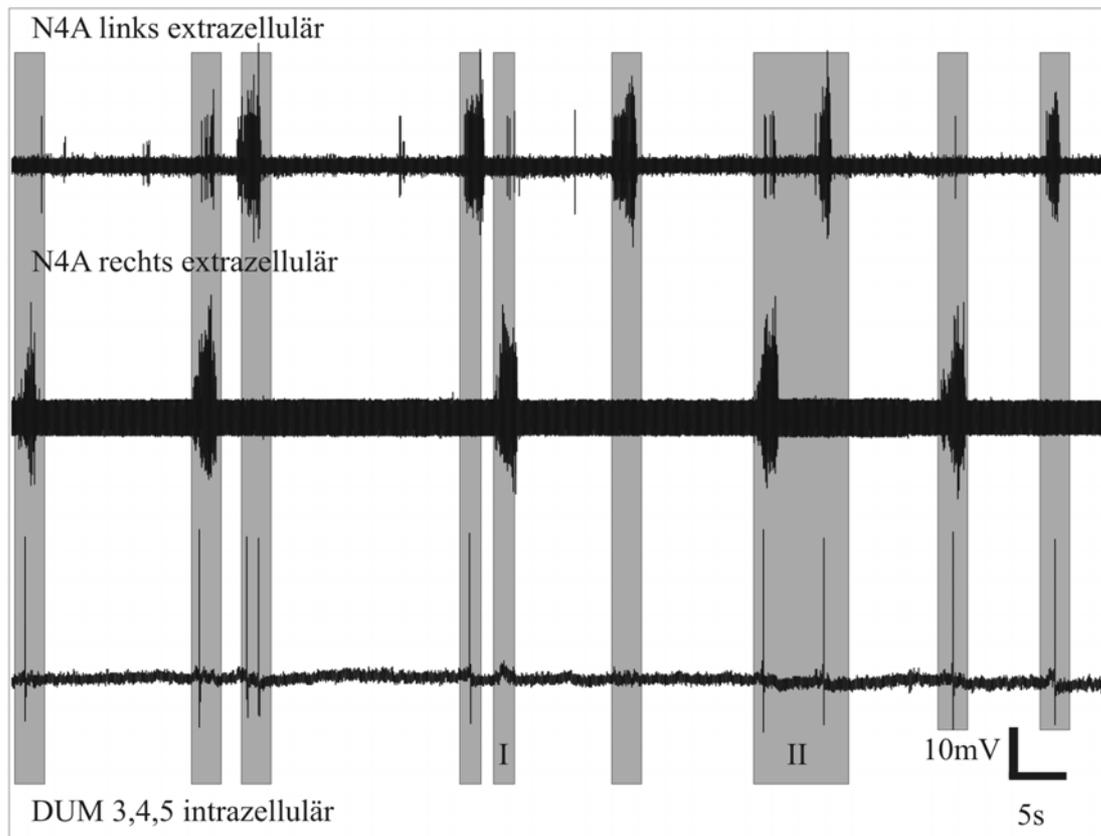
N4A. Man erkennt deutlich das rhythmische Feuern der DUM Zelle. In **B** ist eine Ausschnittsvergrößerung aus A dargestellt um zu verdeutlichen, dass die rhythmische Entladung der DUM Zelle nicht mit den Bursts der Levator-Motoneurone koordiniert ist. In **C** sind multiple Überläufe der intrazellulären Ableitung der DUM Zelle gezeigt. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Triggersignals. Das Triggersignal markiert den Scheitelpunkt der Wellenfunktion (nicht abgebildet). Es sind 1s vor und 1s nach dem Triggersignal dargestellt.

3.2.2. Aktivität von DUM Zellen, die Beinmuskulatur innervieren, während des nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus.

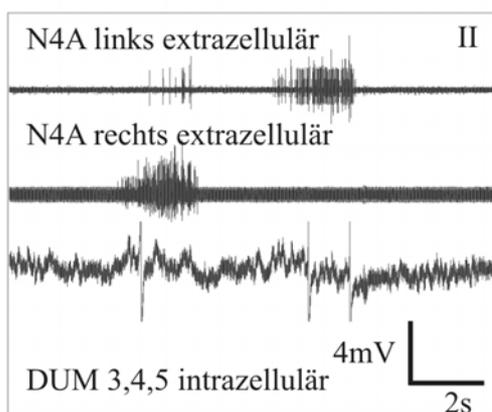
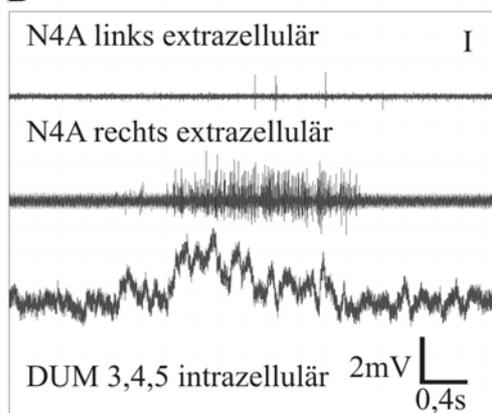
Sowohl DUM3,4,5 Neurone (n=14), als auch DUM5 Neurone (n=4) zeigten rhythmische Aktivität während des nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus. In Abb.22 ist ein Experiment mit einer DUM3,4,5 Zelle exemplarisch dargestellt. Die DUM Zelle wurde mit jedem Burst der Levator-Motoneurone beider Hemiganglien rhythmisch depolarisiert. In den meisten Fällen war diese rhythmische Depolarisation überschwellig und löste Aktionspotentiale aus.

Ähnlich wie die DUM3,4,5 Zellen zeigten auch die DUM5 Zellen rhythmische Depolarisationen, die zeitlich mit den Bursts der Levator-Motoneurone beider Hemiganglien korrelierten (Abb23).

A



B



C

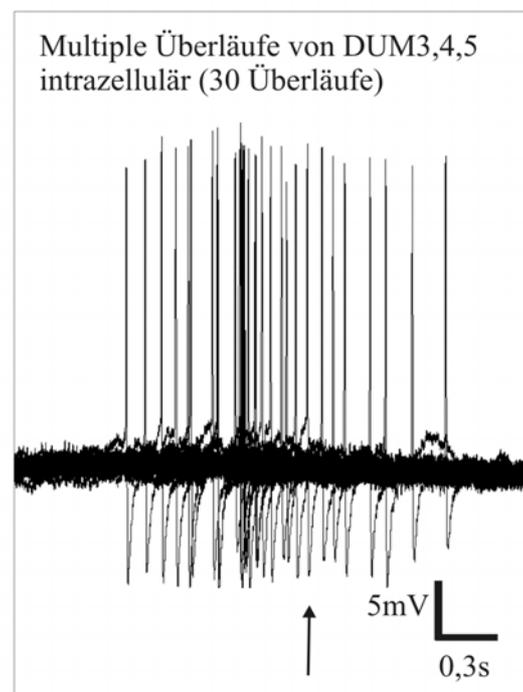
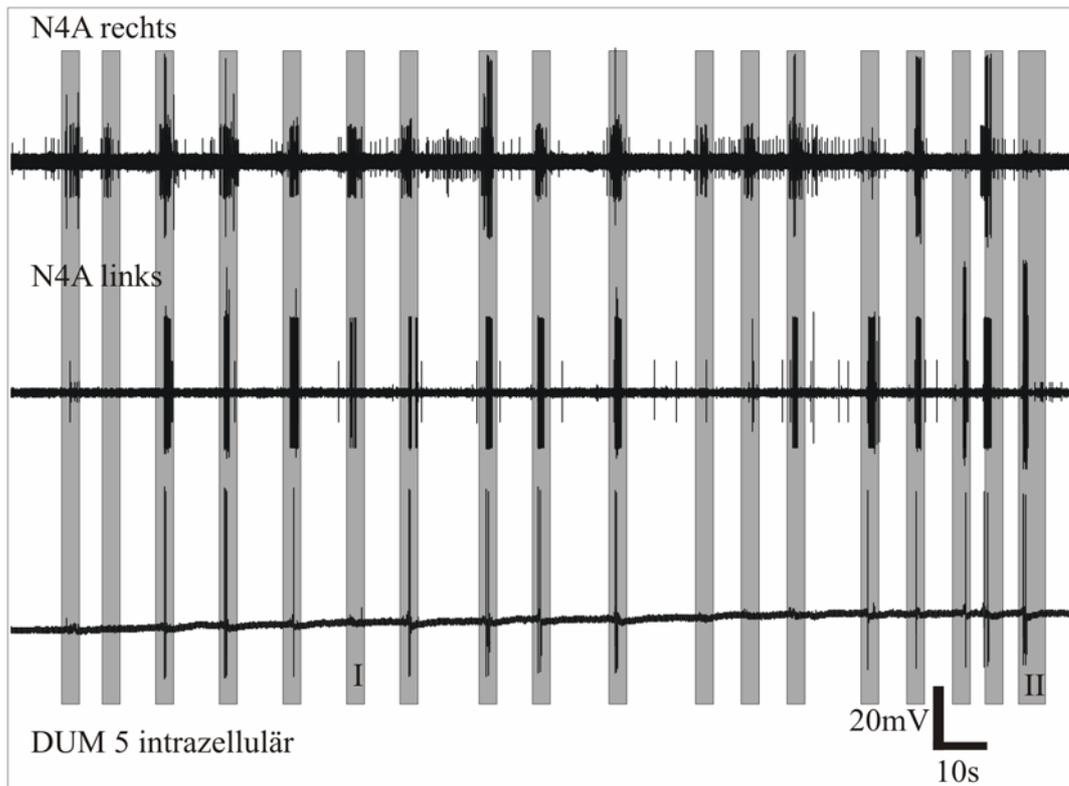
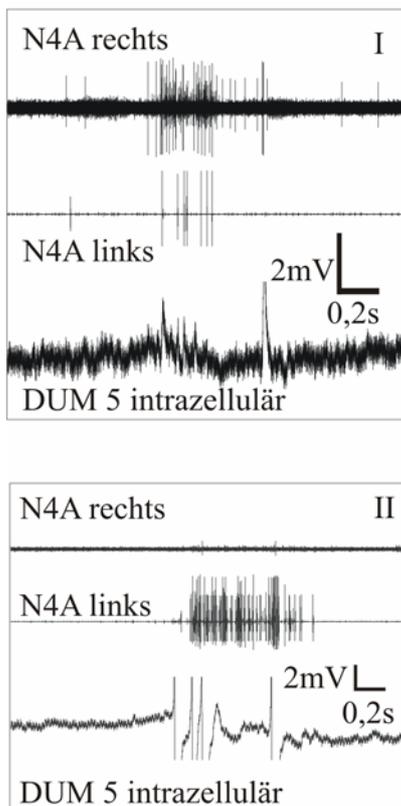
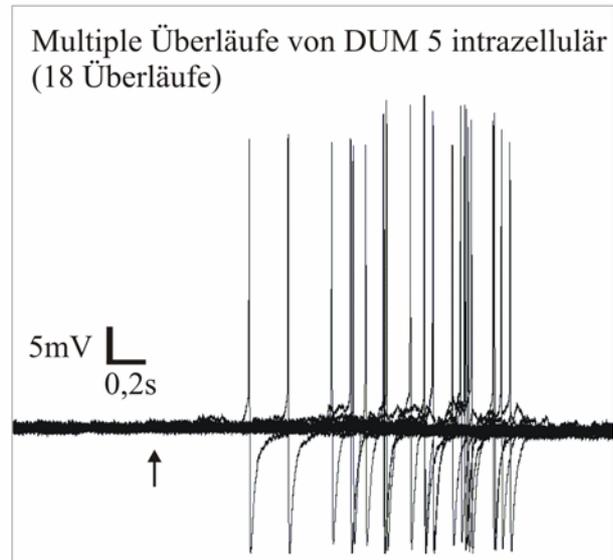


Abb.22: In **A** ist exemplarisch ein Experiment zur Ermittlung der Aktivität von DUM 3,4,5 Zellen während eines nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus dargestellt. Die untere Spur zeigt die intrazelluläre Ableitung der DUM 3,4,5 Zelle; die mittlere und die obere Spur zeigen die extrazellulären Ableitungen beider N4A. In **BI** und **BII** sind Ausschnittsvergrößerungen desselben Experiments dargestellt um zu verdeutlichen, dass die Depolarisationen in der DUM Zelle sowohl während Bursts der Levator-Motoneurone des linken als auch des rechten Hemiganglions auftreten. In **C** sind multiple Überläufe der intrazellulären Ableitung der DUM Zelle gezeigt. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Triggersignals. Markiert wurden die Scheitelpunkte der Wellenfunktion (nicht abgebildet). Es wurde 1,5s vor und 1s nach dem Triggersignal dargestellt.

Abb.23: In **A** ist exemplarisch ein Experiment zur Ermittlung der Aktivität von DUM 5 Zellen während eines nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus dargestellt. Die untere Spur zeigt die intrazelluläre Ableitung der DUM 5 Zelle; die mittlere und die obere Spur zeigen die extrazellulären Ableitungen beider N4A. **BI** und **BII** sind Ausschnittsvergrößerungen von **A** und verdeutlichen, dass die Depolarisationen in der DUM Zelle über den gesamten Zeitraum eines Bursts der Levator-Motoneurone vorkommen. In **C** sind multiple Überläufe der intrazellulären Ableitung der DUM Zelle dargestellt. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des Triggersignals. Als Triggersignal wurde jeweils der Beginn eines Bursts der Levator-Motoneurone beider N4a manuell markiert. Es wurden 0,8s vor und 2,2s nach dem Triggersignal dargestellt.

A**B****C**

Zusammenfassend lässt sich feststellen:

1. Durch das Durchtrennen der Konnektive zum Pro- und Metathorakalganglion ließ sich im Mesothorakalganglion rhythmische Aktivität in den Motoneuronenpools auslösen, die am Laufen beteiligt sind. Dieser Rhythmus war nicht pharmakologisch induziert und die sensorische Rückkopplung im Segment blieb erhalten. Wie beim Laufen im intakten Tier änderte sich die Periodendauer mit Änderungen der Depressor- oder Stemmphase, wohingegen die Dauer der Levator- oder Schwingphase weitgehend konstant blieb.
2. DUM Neurone, welche Muskeln innervieren, die am Laufen beteiligt sind, zeigten rhythmische Aktivität in Form von rhythmischen Depolarisationen, die in den meisten Fällen überschwellig waren. Die rhythmischen Depolarisationen korrelierten mit den Bursts der Levator-Motoneurone beider Hemiganglien (Tabelle 1).
3. DUM Neurone, welche keine Muskeln innervieren, die am Laufen beteiligt sind, zeigten teilweise rhythmische Aktivität in Form von rhythmischen Hyperpolarisationen oder zeigten keinerlei Aktivität, die sich mit den rhythmischen Bursts der Levator-Motoneurone korrelieren ließen. Ausnahmen bildeten zum einen die DUM 3A/C,4 Zelle, die wie die DUM 3,4,5 und die DUM 5 Zelle rhythmisch depolarisiert wurde, und zum anderen eine der beiden DUM 1 Zellen, die im Rahmen der hier vorliegenden Experimente nicht eindeutig als DUM1b oder DUMDL identifiziert werden konnte (Tabelle 1).

DUM1b/DUMDL	DUM3	DUM3,4	DUM3A/C,4	DUM3,4,5	DUM5
+/0 ?	-	-	+	+	+

Tabelle 1: In Tabelle 1 sind alle Typen von DUM Zellen des Mesothorakalganglions und ihre Aktivität während des nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus aufgeführt. Die DUM Zellen, die die Beinmuskulatur innervieren, erhalten während des Rhythmus depolarisierende Eingänge (+); die DUM Zellen, die Flugmuskeln innervieren erhalten hyperpolarisierende Eingänge (-). Eine Ausnahme innerhalb dieser Gruppe bildet die DUM3A/C,4 Zelle, die ebenfalls erregende Eingänge bekommt. Unklar ist auch die Situation bei den DUM1 Zellen, die entweder erregende Eingänge bekommen, oder die während des Rhythmus weder depolarisierende noch hyperpolarisierende Eingänge zeigen (0)

3.3. Stimulationsexperimente zur Untersuchung der Wirkung von DUM Neuronen auf den Energiestoffwechsel des Muskels

3.3.1. Bestimmungen des Fruktose 2,6-Bisphosphat Gehalts im Flugmuskel M119 nach antidromer Stimulation der DUM Neurone

Um die Funktion modulatorischer Neurone im Verhaltenskontext verstehen zu können, sollte man zum einen die Aktivitätsmuster dieser Neurone in dem jeweiligen Verhaltenskontext kennen und zum anderen die Wirkung der Modulatoren auf ihre Zielgebiete untersuchen. Die vorangegangenen Kapitel haben sich mit den Aktivitätsmustern von DUM Neuronen während des Laufens bzw. während zentral generierter Muster, der am Laufen beteiligten Motoneurone, beschäftigt. Im folgenden Kapitel sollen nun Experimente vorgestellt werden, die sich mit der Funktion der Aktivierung oder der Hemmung von verschiedenen Typen von DUM Neuronen während eines Verhaltens auseinandersetzen. Wie in der Einleitung bereits dargestellt, innervieren DUM Neurone Skelett- und Visceralmuskeln, Sinnesorgane oder Neurohämalorgane. Die Wirkung von Oktopamin, freigesetzt durch DUM Neurone, bei der Sensitisierung von Sinnesorganen (Bräunig und Eder, 1998; Matheson, 1997), oder bei der Modulation von Kontraktionseigenschaften von Muskeln (Evans und O'Shea, 1978; Evans und Siegler, 1982), sind seit langem bekannt. Darüber hinaus postulierten Duch und Pflüger (1999) eine mögliche Wirkung auf den Muskelstoffwechsel, hervorgerufen durch die Aktivität bzw. Hemmung von DUM Neuronen. Sie formulierten die Arbeitshypothese, dass die Ruhe-Aktivität der Flugmuskeln innervierenden DUM Neurone (DUM3, DUM3,4 Neurone) in der Zeit vor einem Flug dazu dient, in diesen Muskeln die Glykolyse zu aktivieren (Duch und Pflüger, 1999). Die Aktivität dieser DUM Neurone sollte über die Freisetzung von Oktopamin zu einer Erhöhung des potenten Glykolyse-Aktivators Fruktose 2,6 Bisphosphat (F2,6BP, Wegener, 1996; Blau und Wegener, 1994; Blau, et al., 1994) im Flugmuskel führen. Infolge dessen sollte die beobachtete Hemmung dieser DUM Neurone während des Fluges zu einer Verringerung der F2,6BP-Konzentration führen und somit auch die Glykolyserate herabsetzen, so dass bei längeren Flügen auf Fettverbrennung umgeschaltet werden könnte (Duch und Pflüger, 1999). Träfe diese Arbeitshypothese zu, würde das bedeuten, dass zentrale modulatorische Neurone den Stoffwechsel ihrer

Zielmuskeln auf die unterschiedlichen Anforderungen, während des Verhaltens, einstellen könnten. Um das zu testen, wurde der F2,6BP Gehalt in Flugmuskeln in Abhängigkeit von der DUM Zell Aktivität gemessen. Hierzu wurden alle 4 DUM_{3,4} Neurone, die den Flügelhebermuskel (M119; Burrows, 1996) innervieren, in semi-intakten Präparationen elektrisch stimuliert. Anschließend wurde in Zusammenarbeit mit der AG von Prof. Dr. Wegener (Mainz) der F2,6BP Gehalt der Muskeln gemessen (siehe Methoden). Bei 20 Tieren wurden die DUM Zellen kontralateral zum innervierten Flugmuskel M119 für 20 Minuten mit 1Hz antidrom stimuliert. Die kontralaterale Stimulation ruft in der DUM Zelle ein antidrom ausgelöstes AP hervor, welches dann zu anhaltender Ausschüttung von Oktopamin in den Terminalen führt. Die Stimulationsfrequenz von 1 Hz entspricht der oberen Grenze der Feuerfrequenz, die in semi-intakten Präparationen von *Locusta* in Ruhe gemessen wurden (Duch und Pflüger, 1999). Einer der beiden Muskeln M119 wurde vor der Stimulation denerviert und diente jeweils als interne Kontrolle. Der Versuchsaufbau ist zum besseren Verständnis schematisch in Abb.24A dargestellt.

Die Stimulation und damit die Aktivität der DUM Zellen erhöhte den Gehalt von Fruktose 2,6-Bisphosphat in M119 in allen 20 Tieren (Abb.24B). Auch wenn die Variabilität zwischen den einzelnen Tieren relativ hoch war, so war in allen zwanzig Tieren der F2,6BP Gehalt in den Muskeln, die DUM Zell Stimulation erfahren hatten, beträchtlich höher als im denervierten Kontroll-Muskel des gleichen Tieres. Die Aktivität der DUM Neurone führte zu einer signifikanten Erhöhung des F2,6BP Gehalts (gepaarter T-test, $p < 0.001$), der im Mittel sieben Mal höher war als in den Kontrollmuskeln (Abb.24B). Damit wurde das erste Mal ein direkter und spezifischer Einfluss zentraler modulatorischer Neurone auf die Kontrolle des Stoffwechsels von Muskeln gezeigt.

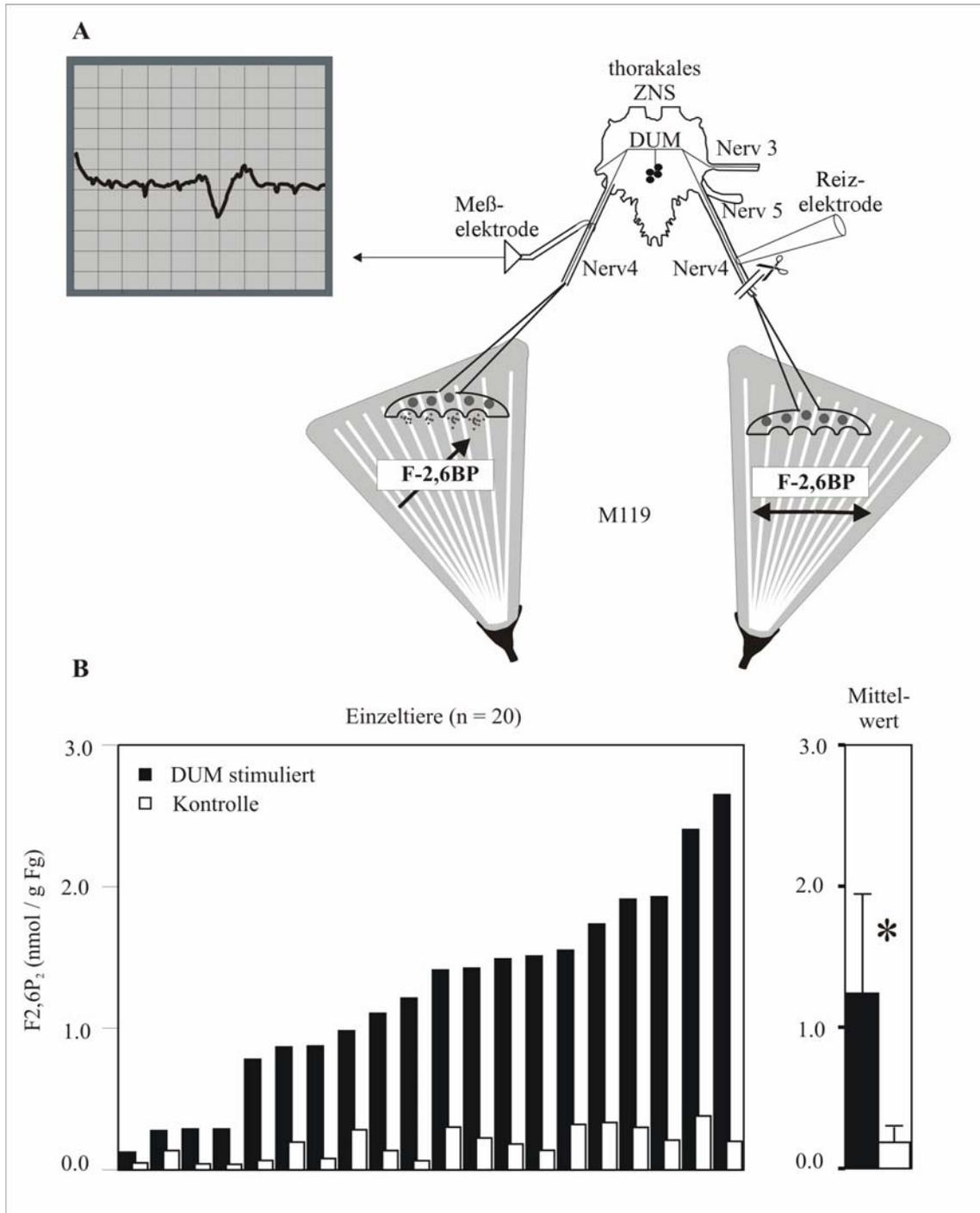


Abb.24: In **A** ist die experimentelle Situation zur Ermittlung des F_{2,6}Bp-Gehalts dargestellt. Das metathorakale Ganglion wurde freipräpariert und an einem Nerv4 eine Hakenelektrode zur Kontrolle der Stimulation der DUM Zelle kurz vor dem Muskel M119 angebracht. Der kontralaterale Muskel M119 wurde denerviert und das abgeschnittene Ende wurde in eine Saugelktrode eingesogen, die im Verlauf des Experiments als Reizelektrode fungierte. In **B** sind die Messwerte der Fruktose 2,6-Bisphosphatbestimmung für jedes einzelne Tier als Balkendiagramm dargestellt. Die schwarzen Balken zeigen die Messwerte für die innervierten Muskeln, die eine DUM Zell-Stimulation erfahren haben; die weißen Balken zeigen die Messwerte der denervierten Muskeln, also der internen Kontrolle für jedes Tier. Die Mittelwerte aller 20 Tiere sind in B dargestellt.

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

Für die Skelettmuskeln von *Locusta* sind zwei unterschiedliche Rezeptortypen für Oktopamin beschrieben worden. Zum einen erhöhen sie die intrazelluläre Kalziumkonzentration über den IP3 Signalweg und zum anderen den cAMP Spiegel durch die Aktivität der Adenylatzyklase, was zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt (Evans und Robb, 1993). Im folgenden sollte überprüft werden, ob der oben beschriebene Effekt, der durch die Aktivität von DUM Neuronen auf den Gehalt von F2,6BP im Flugmuskel wirkt, über den gleichen sekundären Botenstoff vermittelt wird, wie der modulatorische Einfluss von Oktopamin auf die Kontraktionseigenschaften von Muskeln. In Zusammenarbeit mit Dr. U. Müller (Berlin) wurde die PKA Aktivität mit Hilfe einer Substratphosphorylierung in den Muskeln M119 in Abhängigkeit von der Aktivität von DUM Neuronen gemessen. In diesem Versuchsansatz wurde das gleiche experimentelle Design wie in den Versuchen zur Bestimmung des F2,6BP Gehalts gewählt (Abb.25A). In 11 Tieren wurde der Muskel M119 auf einer Seite denerviert und die 4 DUM_{3,4} Zellen zu dem kontralateralen M119 mit 1 Hz über 20 Minuten antidrom stimuliert. Der denervierte Muskel diente jeweils als interne Kontrolle zum innervierten Muskel. Die Proben der Muskeln, die eine Oktopaminausschüttung durch die Stimulation der DUM Zellen erfahren hatten, zeigten eine deutliche Schwärzung der PKA Aktivitätsbande auf dem Film (PKA Bande, siehe Pfeil in Abb.25Di). Im Gegensatz dazu war die PKA Bande in den denervierten kontralateralen Kontrollmuskeln der gleichen Tiere weitaus weniger intensiv. Die quantitative Analyse zeigt eine signifikant höhere PKA Aktivität in den stimulierten Muskeln (ungepaarter T-test, $p < 0.001$, Abb.25Dii).

3.3.3. Pharmakologische Beeinflussung der PKA-Aktivität in M119

In einem weiteren Versuchsansatz wurde getestet, ob sich der Effekt, der durch die Stimulation der DUM Zellen auf die PKA Aktivität hervorgerufen wurde, durch pharmakologisch erhöhte cAMP Konzentrationen imitieren lässt. Dies wäre eine wichtige Voraussetzung um zu testen, ob der PKA Weg hinreichend ist, um eine Erhöhung des F2,6BP Gehalts durch DUM Zell Stimulation hervorzurufen. Darüber

hinaus bedarf es aber auch eines pharmakologischen Werkzeugs, mit dessen Hilfe sich die PKA Aktivität in M119 ausschalten lässt, was eine wichtige Voraussetzung wäre um zu testen, ob der PKA Weg, für eine Erhöhung des F2,6BP Gehalts durch DUM Zell Stimulation in M119 notwendig ist.

Um die PKA Aktivität in M119 pharmakologisch zu erhöhen, wurde ein cAMP Donor in semi-intakten Präparationen in vollständig innervierte, unstimulierte Muskeln injiziert. Auf einer Seite wurde der cAMP Donor 8-bromo-cAMP in M119 und in den kontralateralen Kontrollmuskel DMSO injiziert (Abb.25B). Die Injektion von 8-bromo-cAMP erhöht die Aktivität der PKA signifikant gegenüber dem Kontrollmuskel (Abb.25Dii, ungepaarter T-test $p < 0.001$). Der Effekt des Donors auf die PKA Aktivität unterschied sich nicht signifikant von der durch DUM Zell Stimulation induzierten Erhöhung der PKA Aktivität (Abb.25Dii, ungepaarter T-test $p > 0.2$). Somit steht ein pharmakologisches Werkzeug zur Erhöhung der PKA Aktivität in M119 ohne DUM Zell Stimulation zur Verfügung.

Um zu testen, ob die durch DUM Zell Stimulation vermittelte Erhöhung der PKA Aktivität pharmakologisch blockiert werden kann, wurde folgender Versuch durchgeführt. Es wurde eine Stimulation gewählt, bei der die Muskeln M119 auf beiden Seiten eine Oktopaminausschüttung durch die Aktivität der DUM Zellen erfahren sollten. Hierfür wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die DUM 3,4 Zellen, die M119 innervieren, sowohl durch Nerv 3 als auch durch Nerv 4 projizieren. Die Stimulation der DUM3,4 Zellen erfolgte über Nerv 3. Es wurde keine Denervierung durchgeführt, so dass beide Muskeln M119 von der DUM Zell Aktivität moduliert wurden. In einen der beiden Muskeln M119 wurde vor der Stimulation der PKA Blocker KT 5720 injiziert. Der andere Muskel wurde mit DMSO behandelt und diente als interne Kontrolle (Abb.25C). Im Gegensatz zu den stimulierten Kontroll-Muskeln wurde in den mit PKA-Blocker behandelten Muskeln, die PKA Aktivität signifikant reduziert (Abb.25Dii, gepaarter T-test $p < 0.001$). Damit steht ein pharmakologisches Werkzeug zur Verfügung, um die durch DUM Zell Stimulation induzierte Erhöhung der PKA Aktivität zu blockieren.

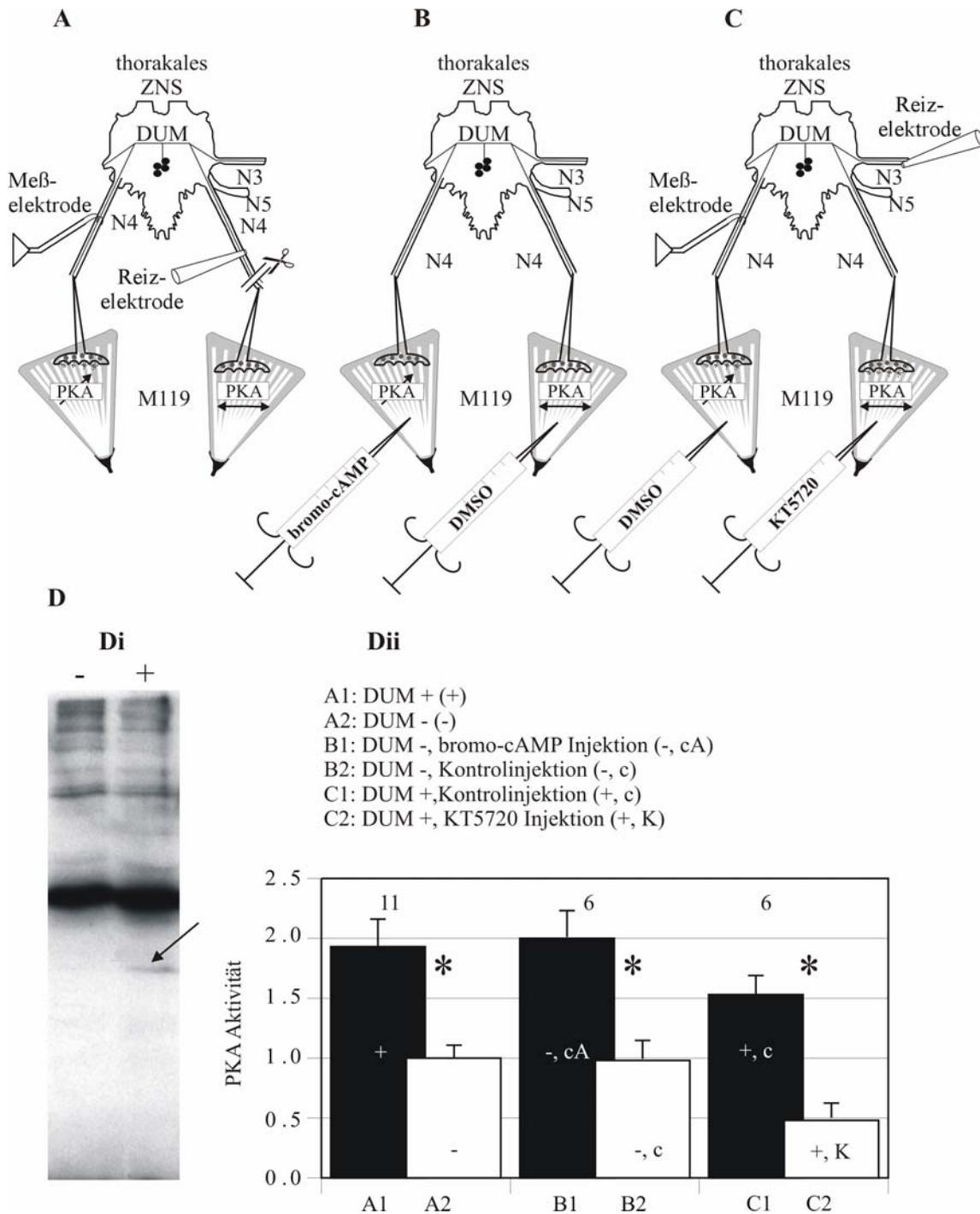


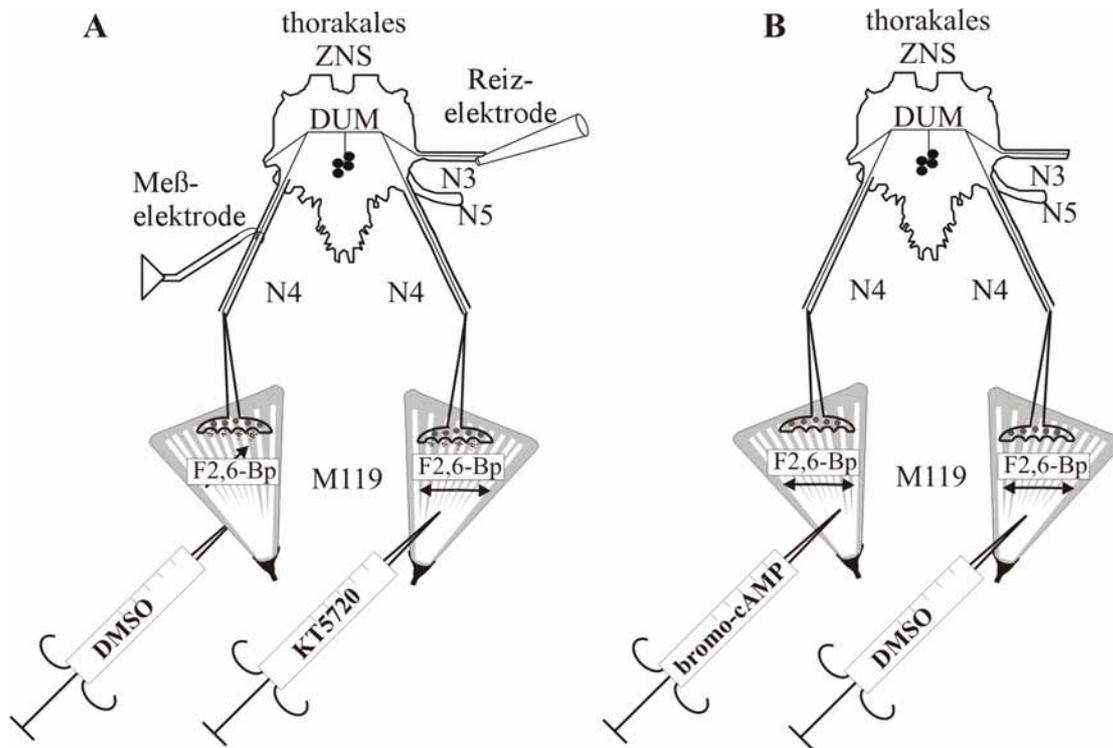
Abb.25: In **A**, **B** und **C** sind die unterschiedlichen Versuchsanordnungen für die PKA Bestimmung in den Flugmuskeln dargestellt. In **A** wurde einer der beiden Muskeln M119 denerviert und die DUM Zellen antidrom für 20 Minuten mit 1Hz stimuliert. In **B** wurde keiner der beiden Muskeln denerviert. Ein Muskel wurde mit dem cAMP Donor 8-bromo-cAMP behandelt; der andere Muskel wurde mit DMSO behandelt. In diesem Ansatz wurden die DUM Zellen nicht stimuliert. In **C** blieben beide M119 innerviert und die DUM Zellen wurden über Nerv 3 stimuliert. In einen der Muskeln wurde der PKA Blocker KT 5720 und in den Kontrollmuskel DMSO injiziert. In allen 3 Versuchsansätzen wurden die Muskeln nach 20 Minuten aus dem Tier präpariert und die PKA Aktivität über ein Substratphosphorylierungssay bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Dii** dargestellt und entsprechend der Versuchsansätze benannt. **Di** zeigt

exemplarisch einen Ausschnitt aus einem Röntgenfilm. Die zusätzliche Bande markiert das von der aktivierten PKA umgesetzte Substrat.

3.3.4. DUM Neuron vermittelte Erhöhungen des F2,6BP Gehalts in M119 erfordern erhöhte PKA Aktivität

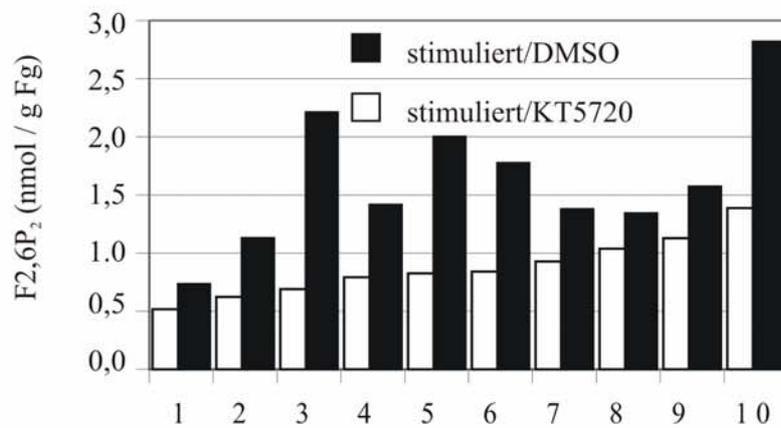
Um zu testen, ob der Signalweg über die PKA notwendig oder sogar ausreichend ist, um die durch DUM Zell Aktivität vermittelte Erhöhung des F2,6BP Gehalts hervorzurufen, wurde folgender Versuch durchgeführt. Beide Muskeln M119 blieben innerviert, und die DUM Zellen wurden über Nerv 3 stimuliert (Abb.26A), so dass die Muskeln M119 auf beiden Seiten von der Aktivität der DUM Neurone beeinflusst wurden. In einen der beiden Muskeln M119 wurde der PKA Blocker KT5720 injiziert. Im Anschluss wurde der Gehalt an F2,6BP bestimmt. In allen 10 Tieren enthielt der behandelte Muskel deutlich weniger F2,6BP als der Kontrollmuskel. Im Mittel war der Gehalt an F2,6BP in den Kontrollmuskeln doppelt so hoch wie in den Muskeln, die mit KT 5720 behandelt wurden (Abb.26Ai, $p < 0.01$). Dies bedeutet, dass der PKA Signalweg für die Signaltransduktion von Oktopamin zur Erhöhung von F2,6BP notwendig ist.

Um zu testen, ob er auch ausreichend ist, wurde in einer letzten Versuchsreihe in einen der Muskeln M119 der cAMP Donor 8-bromo-cAMP injiziert. Der zweite Muskel wurde mit DMSO behandelt und diente zur internen Kontrolle (Abb.26B). Beide Muskeln waren vollständig innerviert, hatten aber keine DUM Zell Stimulation erfahren. In Kapitel 3.3.3. wurde gezeigt, dass die Injektion von 8-bromo-cAMP die PKA Aktivität in M119 signifikant zu erhöhen vermag. Im Gegensatz dazu führten Injektionen von 8-bromo-cAMP jedoch nicht zu einer Erhöhung des F2,6BP Gehalts im Muskel M119 (Abb.26Bi, gepaarter T-test, $p > 0.2$). Das bedeutet, dass der PKA Signalweg nicht ausreicht, um die Signaltransduktion von Oktopamin nach F2,6BP zu vermitteln.

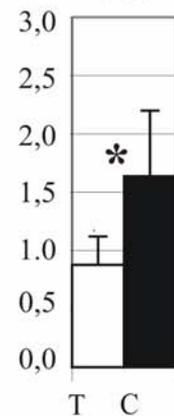


Ai

Einzeltiere (n = 10)

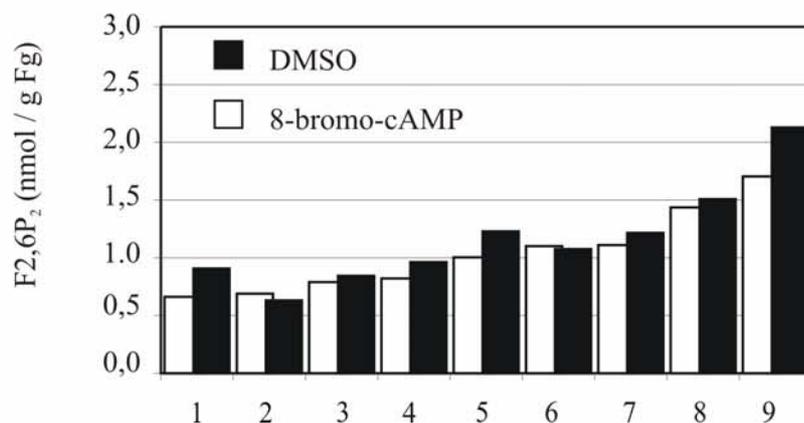


Mittelwert



Bi

Einzeltiere (n = 9)



Mittelwert

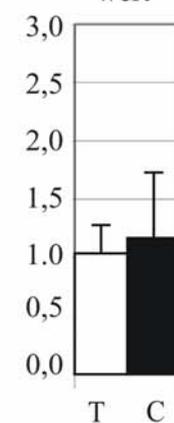


Abb.26: In **A** und **B** sind die Versuchsanordnungen zur Bestimmung des Gehalts von Fructose 2,6-Bisphosphat dargestellt. In **A** wurde keiner der beiden Muskeln M119 denerviert. Die DUM Zellen wurden über Nerv 3 stimuliert. Ein Muskel wurde mit dem PKA Blocker KT 5720 behandelt und in den anderen DMSO injiziert. Nach 20 Minuten Stimulation mit 1 Hz wurden die Muskeln herauspräpariert und der Fructose 2,6-Bisphosphat Gehalt bestimmt. In **Ai** sind die Messwerte der 10 Einzelexperimente dargestellt. Der Gehalt an F2,6-Bp in den mit Blocker behandelten Muskeln lag deutlich unter dem der Kontrollmuskeln. In **B** wurde in einen der Muskeln der cAMP Donor 8-bromo-cAMP injiziert und der andere Muskel mit DMSO behandelt. In diesem Versuchsansatz wurden die DUM Zellen nicht stimuliert. Wie man in **Bi** sehen kann wurde in keinem der neun Einzelexperimente der Gehalt an Fructose 2,6-Bisphosphat durch die Applikation des Donors wesentlich erhöht.

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

3.4.1. Ermittlung der neuronalen Aktivität identifizierter Motoneurone durch chronische Implantation extrazellulärer Hakenelektroden

Wie in Kapitel 3.1. ausgeführt, eignet sich die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Technik der chronischen Elektrodenimplantation hervorragend für die dauerhafte, kontinuierliche Aufzeichnung der Aktivität von Motoneuronen. In diesem Kapitel soll eine Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. C. Duch vorgestellt werden, die sich mit dem Einfluss neuronaler Aktivität auf Motoneurone während der Larvalentwicklung von *Manduca sexta* befasst.

Der Tabakswärmer *Manduca sexta* ist neben *Drosophila melanogaster* einer der Modellorganismen, an denen der Einfluss von Steroidhormonen auf die Metamorphose von holometabolen Insekten untersucht wurde. Zum einen wurde an diesen Systemen der Einfluss von Steroidhormonen auf die Modifikation neuromuskulärer Elemente während der postembryonalen Entwicklung gezeigt (Weeks und Truman, 1986; Truman, 1990, 1996; Levine et al., 1995; Levine und Weeks, 1996), zum anderen, dass die Ausführung definierter Sequenzen motorischer Aktivität unter der Kontrolle von Steroid- und Peptidhormonkaskaden steht (Gammie und Truman, 1997; Zitnan et al., 1999, Mesce und Fahrbach, 2002). Trotz dieser umfangreichen Arbeiten über die hormonelle Kontrolle der neuronalen und muskulären Veränderungen während der

Metamorphose holometaboler Insekten ist nur wenig darüber bekannt, in wieweit andere Mechanismen während der Metamorphose eine Rolle spielen könnten. Bei dem hemimetabolen Insekt *Locusta migratoria* wurde eine aktivitätsabhängige Strukturdynamik beim Einwachsen sensorischer Neurone in das ZNS während der Larvalentwicklung gezeigt (Pflüger et al., 1994). Von der Embryonalentwicklung bei Vertebraten ist bekannt, dass sowohl sensorische Aktivität, als auch vom ZNS generierte endogene Aktivität eine Rolle spielen (Katz und Shatz, 1996). Um eine solche Aussage über die postembryonale Entwicklung bei holometabolen Insekten machen zu können, wäre als erster Schritt die Ermittlung neuronaler Aktivität im lebenden, sich normal entwickelnden Tier die erste Grundvoraussetzung. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Technik der chronischen Implantation von Hakenelektroden bietet dazu methodisch die Möglichkeit.

Bei einer solchen Untersuchung ist von Vorteil, wenn die Wildtyp Entwicklung der zu untersuchenden Neurone bekannt ist. Dies ist der Fall für den dorsolongitudinalen Flugmuskel (DLM) und seine Innervation bei *Manduca sexta*. Dieser entwickelt sich während der Metamorphose aus degenerierenden larvalen Muskelfasern und extrinsischen Myoblasten (Duch et al., 2000). Jedes der fünf adulten Muskelfaserbündel wird von einem Motoneuron innerviert, die schon in der Larve angelegt sind und dort Muskulatur der dorsalen Körperwand innervieren (Abb.27B, Duch et al., 2000). Während der Metamorphose persistieren diese 5 Motoneurone. Die Zellkörper von MN1-MN4 sind im Prothorakalganglion, die von MN5 im Mesothorakalganglion lokalisiert (Abb.27A). Während des späten Larvallebens ziehen sich die Terminale dieser Motoneurone von den degenerierenden larvalen Muskeln zurück und bilden Tufts aus hochkondensiertem Membranmaterial. Während des Puppenstadiums wachsen von diesen Tufts neue Terminale auf den sich entwickelnden DLM aus (Duch et al.; 2000).

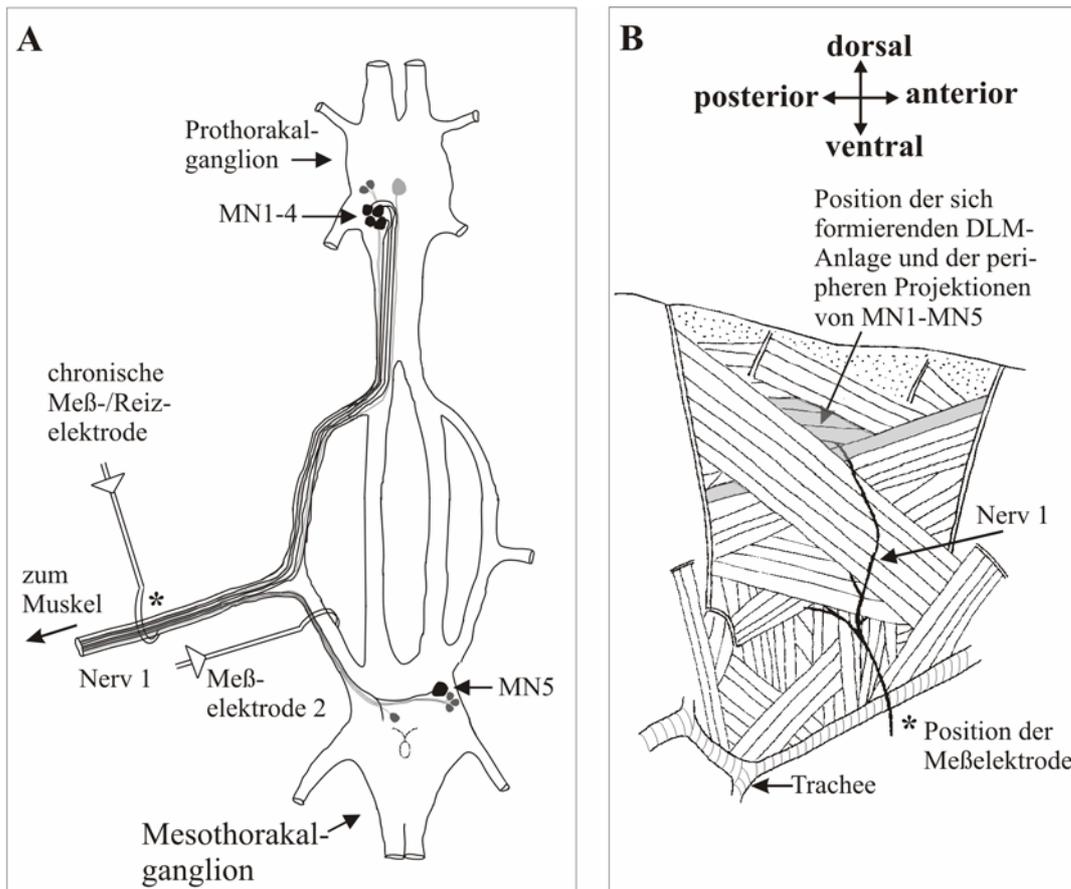


Abb.27: Schematische Darstellung der ersten beiden thorakalen Ganglien und der Muskulatur der mesothorakalen Körperwand. In **A** ist schematisch die Versuchsanordnung zur Identifizierung der motorischen Einheiten dargestellt. Die mit dem Stern markierte Elektrode zeigt die Stelle an Nerv 1, an der in allen Experimenten die extrazelluläre Elektrode chronisch implantiert wurden. Über eine Umschaltbox ließ sich diese Elektrode sowohl als Messelektrode als auch als Reizelektrode einsetzen. Die Messelektrode 2 wurde zur Identifikation der motorischen Einheiten auf dem mesothorakalen Abschnitt von Nerv 1 angebracht. Die schematische Darstellung zeigt darüber hinaus wie die Motoneurone MN1-5 in den Ganglien lokalisiert sind. MN1-5 sind schwarz gezeichnet. Andere Motoneurone mit kleineren Zellkörpern und dünneren Axonen sind in dunkelgrau gezeichnet. Der Zellkörper eines weiteren großen Motoneurons, das im Prothorakalganglion dicht an der Mittellinie liegt, ist hellgrau gezeichnet. Der Zellkörper des VUM Neurons im Mesothorakalganglion ist als offener Kreis dargestellt. In **B** ist schematisch eine Übersichtszeichnung der Muskulatur der mesothorakalen Körperwand dargestellt. Die grau abgesetzten Muskelfasern zeigen das Areal des zukünftigen DLM. Sie sind von den Motoneuronen MN1-5 innerviert. Alle anderen Motoneurone die in **A** dargestellt sind, innervieren Muskelfasern, die mehr ventral gelegen sind. Der Stern in **B** markiert die Stelle in der in allen Experimenten die chronischen Elektroden implantiert wurden. (Abbildungen modifiziert nach Duch und Mentel, 2002, in Vorbereitung)

Gegenstand des hier vorgestellten gemeinsamen Projekts mit Dr. C. Duch ist die Untersuchung dieser fünf Motoneurone. Um ihre Aktivität im fünften Larvenstadium zu beschreiben, wurden die Hakenelektroden zu verschiedenen Zeitpunkten an Nerv 1 implantiert (Abb.27 A), und die neuronale Aktivität über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden aufgezeichnet. Das fünfte Larvenstadium lässt sich in Bezug auf die

Entwicklung vor der Puppenhäutung in weitere Stadien einteilen, die sowohl durch morphologische Änderungen, als auch typische Verhaltensweisen charakterisiert sind (siehe Einleitung und Material & Methoden). Fünf Tage vor der Puppenhäutung beginnt die so genannte Wanderphase. Sie beginnt mit dem Einstellen der Nahrungsaufnahme am Tag W0. Es folgen drei grundlegende Verhaltensweisen in den Stadien W1 und W2. Diese Stadien sind geprägt von Umherkriechen, Eingraben und dem Bau einer Kammer. Es folgt eine Phase, in der es nur noch zu reduzierten Bewegungen kommt (W3), bis hin zur vollkommenen Reglosigkeit im Stadium W4 (Reinecke et al., 1980; Dominick und Truman, 1984a). In Abbildung 28 sind exemplarisch repräsentative Abschnitte von je einer Stunde der einzelnen Stadien dargestellt. Sowohl die Gesamtaktivität als auch die rekrutierten Motoeinheiten sowie die Muster der auftretenden Bursts unterschieden sich in den untersuchten Stadien. Die Änderungen der motorischen Aktivität waren für die jeweiligen Entwicklungsstadien typisch und sind in der Abbildung 28 getrennt dargestellt. In der linken Spalte ist der Zeitpunkt der Aufnahme angegeben und rechts daneben das Entwicklungsstadium nach den Kriterien, wie im Material und Methodenteil beschrieben. Für jedes dieser Stadien ist eine Stunde repräsentativer Aktivität in der linken Spalte dargestellt. Um die einzelnen Muster der Bursts zu verdeutlichen, wurden Abschnitte dieser Aufzeichnung in einer größeren zeitlichen Auflösung in der mittleren und der rechten Spalte dargestellt. Die grauen Unterlegungen markieren den Bereich, der in der jeweils rechts davon gelegenen Spalte vergrößert dargestellt wurde. In allen Entwicklungsstadien kam es zu Burstaktivität, wobei sich sowohl die Muster der Bursts als auch die rekrutierten Motoeinheiten in diesen Burst zwischen den Stadien unterschieden. Um diese Änderungen beschreiben zu können, wurde zwischen Motoeinheiten unterschiedlicher Amplitude unterschieden. Drei Amplitudengrößen wurden hierfür unterschieden, sie sind in der Abbildung 28 durch Pfeile markiert, die die Nummern 1 bis 3 tragen. In dem Stadium W2 und W2l traten Motoeinheiten von großer (Kategorie 1) und mittlerer Amplitude (Kategorie 2) auf. Die Einheit der Kategorie 1 war im Stadium W2 stark aktiv. Fast immer gleichzeitig oder aber in unmittelbar zeitlicher Nähe vor oder nach einem Burst dieser Motoeinheit traten Bursts der Kategorie 2 auf. Im Stadium W2l nahm die Aktivität der Einheiten der Kategorie 1 stark ab und war ab dem Stadium W3e nicht mehr zu beobachten. Diese Motoaktivität der Kategorie 1 könnte von einem Motoneuron stammen, das auf der Mittellinie des Prothorakalganglions liegt und dessen Axon den größten Durchmesser hat. Dafür spricht die große Amplitude dieser Einheit in den Aufnahmen. Dieses

Motoneuron unterliegt während der späten larvalen Entwicklung dem programmierten Zelltod (Duch, unveröffentlichte Ergebnisse), was der Grund dafür sein könnte, warum diese Einheit nach dem Stadium W21 nicht mehr zu beobachten war. Motoeinheiten mit mittlerer Amplitude wurden als Kategorie 2 definiert. Bei diesen Einheiten handelte es sich um die Motoneurone MN1-5 (Abb.27, 28). Zwischen dem Stadium W21 und W4 nahmen die Bursts der Einheiten der Kategorie 2 kontinuierlich ab. Dieser Rückgang bezog sich sowohl auf die Anzahl als auch auf die Dauer der Bursts (Abb.28). In den Stadien W31 und W4 traten Bursts der Kategorie 2 kaum auf. Um auszuschließen, dass es sich bei dieser Beobachtung nicht nur um eine Verschlechterung der Ableitung handelte, wurden Elektroden in späteren Stadien implantiert. In fünf Tieren, die sich im Stadium W3 befanden, wurden Elektroden implantiert und die neuronale Aktivität aufgezeichnet. Die Ableitungen in diesen Kontrolltieren führten zu dem gleichen Ergebnis, wie es oben beschrieben wurde. Die Daten, die in diesen Kontrollexperimenten erhoben wurden, sind in die weiter unten dargestellte quantitative Beschreibung der Änderung der motorischen Aktivität während der späten larvalen Phase eingegangen. Ab dem Stadium W31 war die Aktivität von Einheiten kleiner Amplitude zu beobachten. Diese Einheiten wurden als Kategorie 3 definiert. Es ist möglich, dass es sich bei den Einheiten um Motoneurone mit kleinen Zellkörpern und sehr dünnen Axonen handelt (Abb.27, 28), die die mehr ventral gelegene Muskulatur der Körperwand innervieren. Dass es sich bei diesen Einheiten nicht um afferente Axone handelte, die ebenfalls durch Nerv 1 laufen, wurde durch taktile Stimulation überprüft. Trotz wiederholter taktile Reizung an unterschiedlichen Stellen, waren keine Einheiten der Kategorie 3 in der Ableitung zu beobachten. Dies stimmt auch mit der Tatsache überein, dass Motoneurone in der Regel Axone größeren Durchmessers haben, woraus ein besseres Signal - Rauschverhältnis in extrazellulären Ableitungen resultiert. Aufgrund dieser Beobachtungen gehen wir davon aus, dass es sich bei den Einheiten der Kategorie 3 um die kleinen Motoneurone handelte, die aber bis jetzt hinsichtlich ihrer Zielmuskeln noch nicht identifiziert sind. Der Zeitpunkt der Puppenhäutung wurde optisch überprüft. Ab dem Zeitpunkt, zu dem die Tiere mit der Abstreifung ihrer larvalen Kutikula begannen, traten erneut Bursts der Kategorie 2, also der Motoneurone MN1-MN5, auf (Abb.28). Die Periodendauer betrug 24.3 ± 5.1 s (Mittelwert und Standardabweichung wurden von je 20 Bursts in 6 Tieren ermittelt). Die motorischen Muster, die während der Puppenhäutung von Nerv1 des Mesothorakalganglions abgeleitet wurden, sind somit etwas länger als die motorischen Muster der

Puppenhäutung, wie sie in anderen Arbeiten von abdominalen Nerven in isolierten Nervensystemen von *Manduca* beschrieben wurden (Durchschnittlich 18s, Weeks und Truman, 1984; Gammie und Truman, 1997).

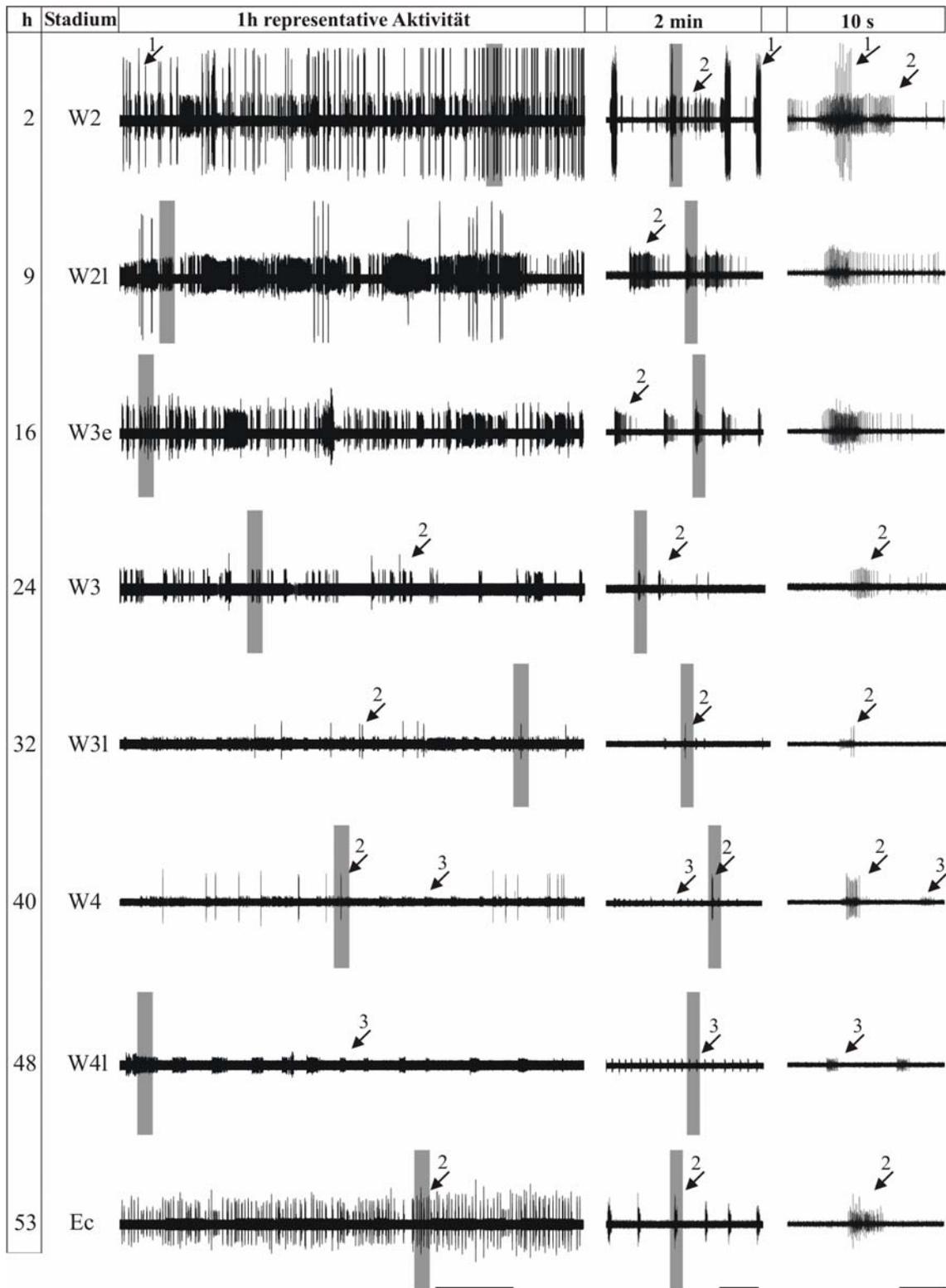


Abb.28: Kontinuierliche Ableitungen von Nerv 1 in vivo, abgeleitet von sich normal entwickelnden Tieren vom Stadium W2 bis zur Puppenhäutung. Die linken Spuren zeigen exemplarisch Abschnitte von je einer Stunde Dauer zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten eines Tieres. Ein Tier wurde als repräsentatives Beispiel ausgesucht. Die Ableitung stammt nur aus diesem Tier und wurde kontinuierlich von W2 bis zur Puppenhäutung aufgezeichnet. Der Zeitpunkt nach Implantation der Elektrode und das jeweilige Stadium in dem sich das Tier befand, sind links angegeben (W2 nach 2 Stunden, W2l nach 9 Stunden, W3e nach 16 Stunden, W3 nach 24 Stunden, W3l nach 32 Stunden, W4 nach 48 Stunden und Puppenhäutung nach 53 Stunden). Für jedes Stadium wurden zwei Minuten in einer größeren zeitlichen Auflösung dargestellt. Diese sind in den mittleren Spuren dargestellt und zeigen die für dieses Stadium typische Aktivität. Die in den mittleren Spuren dargestellten Abschnitte entsprechen den grau unterlegten Bereichen auf der linken Seite. Die typischen Aktivitätsmuster bzw. Bursts der einzelnen Stadien sind in der rechten Spur in Abschnitten zu 10 Sekunden dargestellt. Die hier dargestellten Abschnitte entsprechen den in den mittleren Spuren grau unterlegten Bereichen. Die unterschiedlichen motorischen Einheiten wurden nach unterschiedlichen Amplitudengrößen unterschieden und sind mit nummerierten Pfeilen gekennzeichnet. Es wurden drei Kategorien von motorischen Einheiten unterschieden. Der Maßstab für die linke Spur betrug 600s, für die mittlere Spur 30s und für rechte Spur 3 Sekunden. (Abbildungen modifiziert nach Duch und Mentel, 2002, in Vorbereitung).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass:

1. sich die beschriebenen neuronalen Aktivitätsmuster in den unterschiedlichen Stadien während der späten larvalen Entwicklung von *Manduca sexta* sowohl in in ihrer Aktivität insgesamt als auch in der Rekrutierung der daran beteiligten Motoeinheiten und den Mustern der auftretenden Bursts signifikant unterschieden. Die beobachteten Unterschiede waren für die jeweiligen Entwicklungsstadien spezifisch.
2. die Entwicklungsstadien W3 und W4 durch einen deutlichen Aktivitätsrückgang charakterisiert waren. Dieser war nicht auf eine sich verschlechternde Ableitung zurückzuführen, da Implantationen in spätere Entwicklungsstadien zu gleichen Ergebnissen führten.
3. Motoeinheiten der Kategorie 2 während der Häutung aktiv waren, auch wenn sie während eines Zeitraums von 20 Stunden vor der Häutung keine Aktivität zeigten.

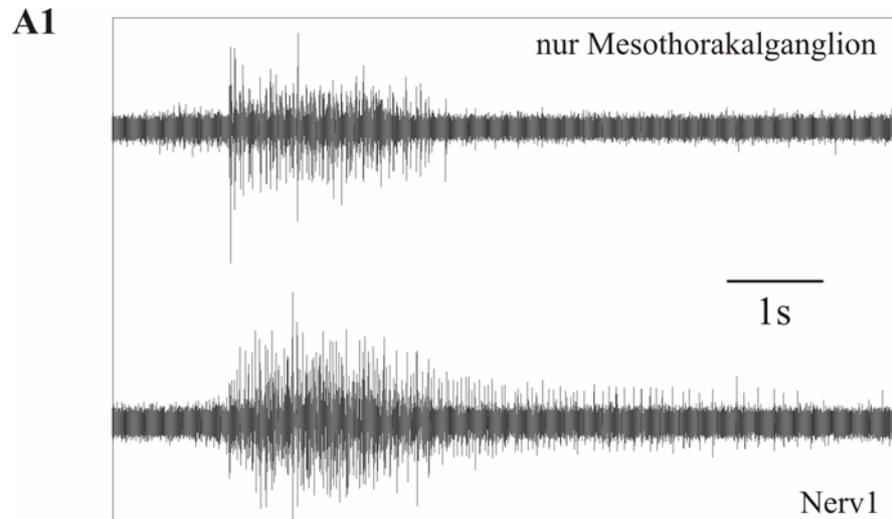
All dies weist darauf hin, dass sich die Aktivitätsmuster, die von Nerv 1 zwischen den Entwicklungsstadien W2 und der Puppenhäutung abgeleitet wurden, in einer typischen Art änderten, die als stadienspezifisch bezeichnet werden können.

Um die entwicklungsbedingten Änderungen der motorischen Aktivität quantitativ genauer beschreiben zu können, wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurde

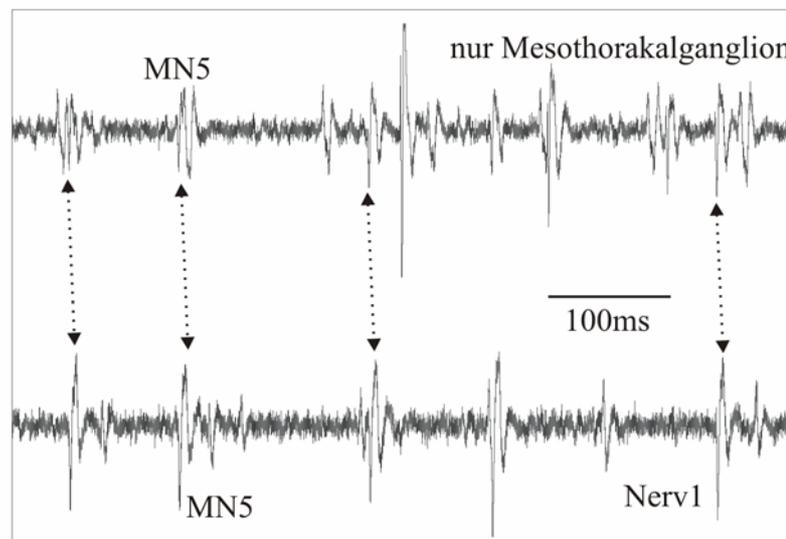
versucht, einige der Motoeinheiten zu identifizieren, zum anderen wurden sowohl Spikes als auch Bursts in Aufnahmen von 12 Tieren gezählt und statistisch ausgewertet.

3.4.2. Identifikation von Motoeinheiten in chronischen extrazellulären Ableitungen

Um die Motoeinheiten in den extrazellulären Ableitungen näher identifizieren zu können, wurden zwei extrazelluläre Elektroden in das Tier implantiert. Eine Elektrode wurde an der üblichen Stelle, wie sie in Abbildung 27A dargestellt ist, an Nerv 1 und darüber hinaus eine zweite Elektrode an dem mesothorakalen Zweig von Nerv 1 angebracht (siehe Abb.27A). Es sei hier noch einmal erwähnt, dass die Zellkörper der Motoneurone MN1-5 in unterschiedlichen Ganglien lokalisiert sind. Die Zellkörper der Motoneurone MN1-MN4 liegen im Prothorakalganglion, der des MN5 liegt im Mesothorakalganglion. Die Axone dieser Motoneurone projizieren durch einen jeweils separaten Abschnitt von Nerv 1. Diese verschmelzen nach einem kurzen Abschnitt zu einem Nervenstrang. Implantiert man also eine der Elektroden an dem separaten Abschnitt von Nerv 1, der zum Mesothorakalganglion führt, misst man neben der Aktivität anderer Motoneurone nur die Aktivität von MN5. Mit dieser Versuchsanordnung ließ sich die Einheit von MN5 in den extrazellulären Ableitungen identifizieren, da kein anderes Axon einer großen motorischen Einheit in beiden extrazellulären Ableitungen zu finden war (Abb.29A1). Andere große motorische Einheiten, die sich in der Ableitung des mesothorakalen Abschnitts beobachten ließen, innervieren Muskeln, die proximal zur Implantationsstelle an Nerv 1 liegen und daher nicht in der Ableitung von Nerv 1 zu finden waren. Die in Abbildung 29A2 durch Pfeile markierten Signale wurden in beiden Ableitungen als Ereignisse markiert und multiple Überläufe angefertigt (Abb.29A3). Als Trigger für die multiplen Überläufe aus Nerv 1 wurden die markierten Ereignisse aus dem mesothorakalen Abzweig von Nerv 1 verwandt, für die multiplen Überläufe aus dem mesothorakalen Abzweig die markierten Ereignisse aus Nerv 1. Die in Abbildung 29A3 dargestellten multiplen Überläufe von Nerv 1 und dem mesothorakalen Abzweig von Nerv 1 zeigen somit, dass es sich um die Aktivität von MN5 handeln muß.



A2 selektive Ausschnittsvergrößerung



A3

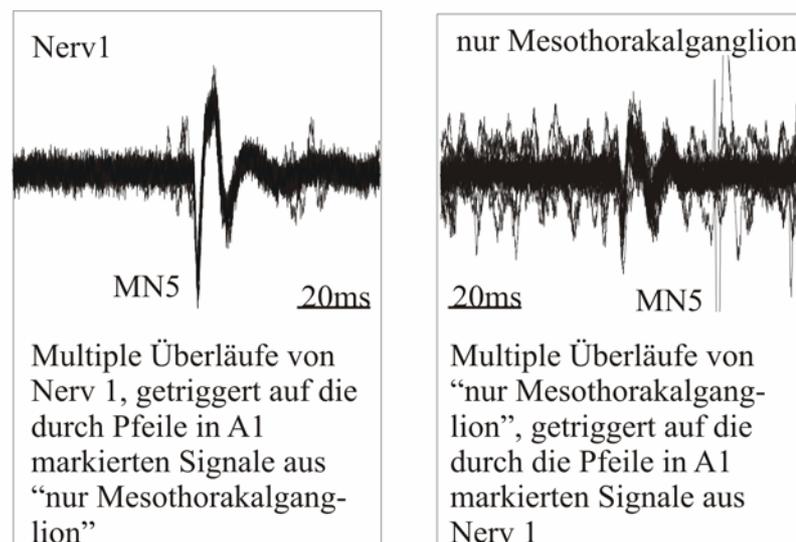


Abb.29: Identifikation motorischer Einheiten individueller Motoneurone in chronischen extrazellulären Ableitungen. In **A1** sind simultane extrazelluläre Ableitungen von Nerv 1 und dem mesothorakalen

Abschnitt von Nerv 1 dargestellt (siehe Abb. 27A). Sie zeigen exemplarisch die für W2 typischen Aktivitätsmuster. In **A2** ist eine Ausschnittsvergrößerung eines Bursts aus A1 abgebildet. Die durch Pfeile miteinander verbundenen Signale markieren die Spikes von MN5 in der Ableitung, die am mesothorakalen Abzweig abgeleitet wurde (obere Spur) und in der Ableitung von Nerv 1. **A3** zeigt multiple Überläufe der Spikes von MN5 aus beiden Ableitungen. Die multiplen Überläufe aus Nerv 1 wurden auf die Signale der Ableitung aus dem mesothorakalen Abschnitt getriggert; die multiplen Überläufe aus dem mesothorakalen Abschnitt wurden auf die Signale aus Nerv 1 getriggert. In beiden Fällen kann man deutlich erkennen, dass sich die Signale klar und ohne Streuung abzeichnen. Es handelt sich somit um ein Signal, das in beiden Elektroden mit konstanter zeitlicher Verzögerung auftritt. Es handelt sich um Signale von MN5, da dies das einzige Signal ist, das beide Messpunkte passiert.

3.4.3. Quantifizierung entwicklungspezifischer Änderungen der motorischen Aktivität

Um die gesamte Spikeaktivität quantifizieren zu können, wurden die Spikes der Kategorie 2 und 3 für jedes Entwicklungsstadium der späten larvalen Entwicklung in mehreren Tieren getrennt ausgezählt. Spikes der Kategorie 1 wurden vernachlässigt, da sie nur während des Entwicklungsstadiums W2 vorkamen. Jedes Stadium, wie im Material und Methodenteil beschrieben und klassifiziert, hatte eine Dauer von ungefähr 8 Stunden. Um zu vermeiden, dass Überschneidungen zwischen zwei Stadien die Ergebnisse verfälschten, wurden die ersten und die letzten 2-3 Stunden jedes Stadiums verworfen und nur die mittleren 3 Stunden für die Auswertung herangezogen. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der aufgenommenen Motospikes zwischen unterschiedlichen Tieren übereinstimmte (Abb.30A). Um die Anzahl der Spikes verschiedener Entwicklungsstadien und unterschiedlicher Tiere miteinander vergleichen zu können, wurden die Daten von 12 Tieren zusammengefasst. Im oberen Diagramm der Abbildung 30A sind die Mittelwerte der Spikeanzahlen für jedes Stadium dargestellt. Diese sind weitgehend mit den Anzahlen an Spikes für ein einzelnes Tier identisch (ohne Abbildung). Die horizontalen Balken zeigen eine signifikante Änderung in der Spikeanzahl der durch die Balken miteinander verbundenen Stadien an (Newman-Keuls Test, $p \leq 0.05$). Betrachtet man nur die Spikes der Kategorie 2 (MN1-5) zeigt sich eine signifikante Änderung in der Spikezahl vom Stadium W2 bis W3e, von W3 zu W3l und von W4l zur Häutung. Für die motorischen Einheiten der Kategorie

3 zeigt sich eine signifikante Änderung von W2 zu W3e, von W3e zu W3, von W3 zu W4 und von W4 zur Häutung (Newman-Keuls Test, $p \leq 0.05$).

Zusätzlich zur Gesamtheit der Spikes wurden auch die Häufigkeiten und Dauer von Bursts innerhalb einer Stunde betrachtet. Wie man schon in Abbildung 28 erkennen kann, traten Spikes der Kategorie 2 (MN1-5) nach dem Stadium W3 nur noch selten in den Bursts auf. Um zu überprüfen, ob sich die Gesamtanzahl der Bursts pro Stunde, unabhängig von der Form der Bursts und der rekrutierten Einheiten innerhalb der Bursts, veränderte, wurden zunächst folgenden Kriterien festgelegt, die einen Burst beschrieben. Eine Folge von Spikes wurde dann als Burst gezählt, wenn mindestens 10 oder mehr Spikes auftraten, deren Abstand zueinander nicht mehr als 0,2 Sekunden betrug. Es stellte sich heraus, dass die Anzahl der Bursts pro Stunde zwischen den Entwicklungsstadien W2, W3 und W4 konstant blieb (Abb.30D). Die Burstdauer hingegen nahm von W2 zu W3 und Von W3 zu W4 signifikant ab (Neymann- Keuls Test $p \leq 0.05$, Abb.30D). Als Konsequenz ergibt sich, dass die Gesamtdauer aller Bursts pro Stunde sowohl zwischen W2 und W3 als auch zwischen W3 und W4 signifikant abnahm (Newman- Keuls Test $p \leq 0.05$, Abb.30D).

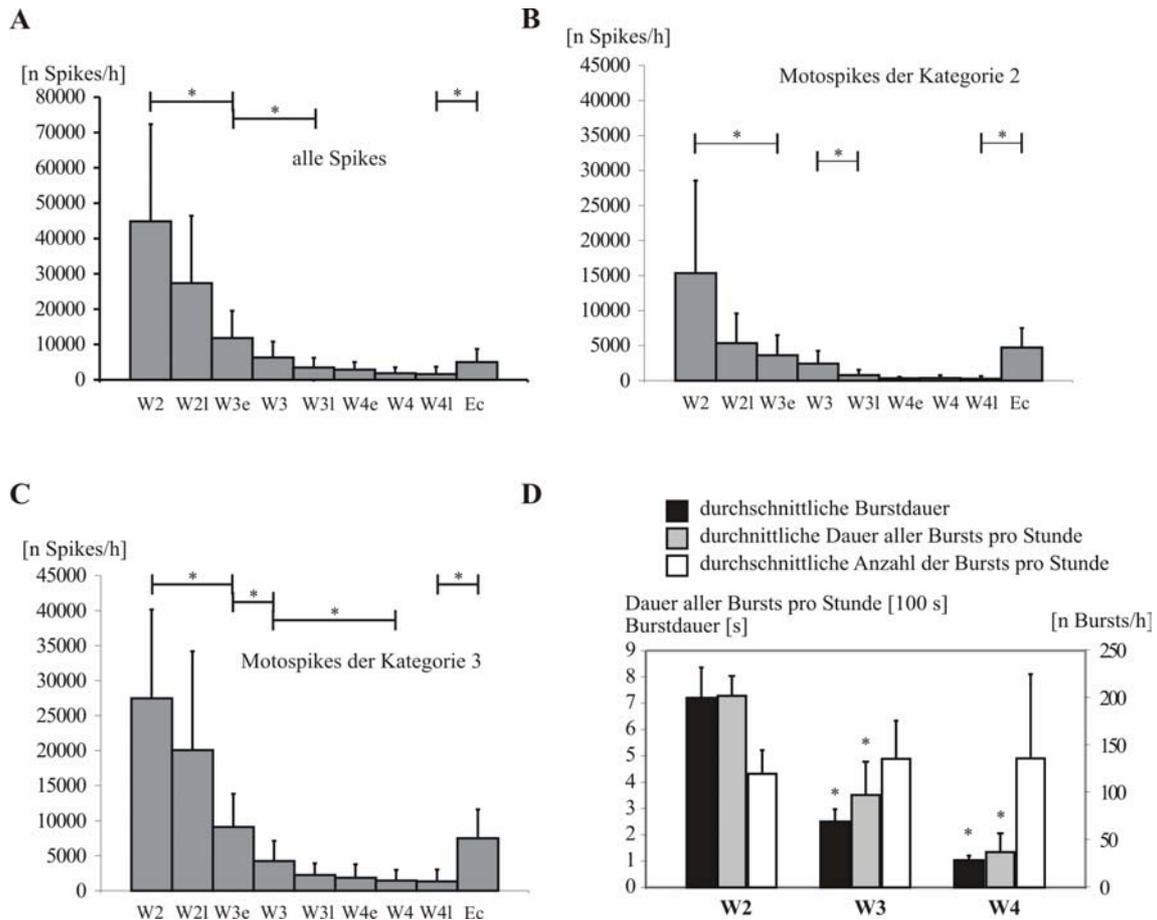


Abb.30: Die Anzahl der Motoneuronspikes pro Stunde und die Dauer der Bursts sind für die einzelnen Entwicklungsstadien charakteristisch. In **A** ist die Summe der motorischen Spikes der Kategorie 2 und 3, die pro Stunde in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien auftraten, dargestellt. In **B** ist die Anzahl der motorischen Spikes der Kategorie 2 dargestellt, die pro Stunde im jeweiligen Entwicklungsstadium auftraten. **C** zeigt die gleiche Darstellung für die motorischen Spikes der Kategorie 3. Jeder Balken zeigt die durchschnittliche Anzahl der Spikes der jeweiligen motorischen Einheiten ermittelt aus zwölf Tieren. Von jedem der zwölf Tiere wurden jeweils 2-3 Stunden der für das jeweilige Entwicklungsstadium repräsentativen Aktivität ausgewählt. Um Überschneidungen der Entwicklungsstadien auszuschließen, wurden die ersten 2-3 und die letzten 2-3 Stunden des jeweils acht Stunden andauernden Entwicklungsstadiums verworfen und nur die mittleren 2-3 Stunden eines jeweiligen Entwicklungsstadiums für die Ermittlung der Daten herangezogen. Die Daten wurden derart zusammengefasst, dass die Anzahl von je 2 bzw. 3 Stunden der individuellen Tiere ermittelt wurde und diese Daten für die Mittelwertbildung gepoolt wurden. Die Werte jedes Stadiums sind in den Diagrammen als Balken repräsentiert. Die vertikalen Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die horizontalen Balken markieren die Stadien in denen es signifikante Unterschiede in der Anzahl der Spikes pro Stunde gibt (Newman-Keuls Test, $p < 0.05$). In **D** ist die durchschnittliche Burstdauer (schwarze Balken), die Dauer der Bursts pro Stunde (graue Balken) und die Anzahl der Bursts pro Stunde (weiße Balken) für die Stadien W2, W3 und W4 ($n=6$) dargestellt. (Abbildungen modifiziert nach Duch und Mentel, 2002, in Vorbereitung).

3.4.4. Antidrome Stimulation von MN1-5

Die oben beschriebene Abnahme der Aktivität der Motoneurone MN1-5 im sich normal entwickelnden Tier korreliert mit einer Anzahl struktureller Veränderungen, die zu diesem Zeitpunkt in dem Tier stattfinden und die für die normale Entwicklung des adulten neuromuskulären Systems entscheidend sind. In dieser Zeit ziehen sich die Terminalen dieser Motoneurone von den degenerierenden Larvalmuskeln zurück (Duch et al., 2000). Die zurückgezogenen Terminalen verbleiben in der Region der zukünftigen DLM Entwicklung und dienen als Signal zur Akkumulation von Myoblasten (Bayliss et al., 2001). Kurz nach der Puppenhäutung, in der diese Motoneurone starke Aktivität zeigen, wachsen die Terminalen von MN1-5 erneut aus und innervieren die sich bildende Muskelanlage des DLM. Um zu testen, ob die Aktivitätsabnahme der Motoneurone für das Zurückziehen ihrer Terminalen wichtig ist, bzw. der sprunghafte Anstieg ihrer Aktivität während der Puppenhäutung als Signal für erneutes Auswachsen dient, wurden Stimulationsexperimente an Nerv 1 im intakten Tier durchgeführt. In 10 Tiere des Stadiums W21 oder W3e wurden Hakenelektroden chronisch implantiert. Die motorische Aktivität wurde solange aufgezeichnet, bis für einen Zeitraum von mindestens 5 Stunden keine Aktivität von MN1-5 mehr zu beobachten war. Durch externe optische Kontrolle wurde überprüft, ob die Tiere das Entwicklungsstadium W31 oder W4 erreicht hatten. War dies der Fall, wurde der Nerv 1 extrazellulär stimuliert. Die Stimulation erfolgte für sechs Stunden mit Bursts von 1 Sekunde Dauer und einer Frequenz von 10 Hz. Der Abstand zwischen zwei Bursts betrug 10 Sekunden (Stimulusprotokoll 1). Die einzelnen Reizpulse innerhalb eines Bursts dauerten 0,1 Sekunden und hatten eine Amplitude von acht Volt. Da nur ein Nerv in einem Tier gereizt wurde, diente die kontralaterale Seite jedes Tieres als interne Kontrolle. Dies war unbedingt notwendig um sicherzustellen, dass strukturelle Effekte auf die durch Stimulation induzierte Aktivität von MN1-5 zurückzuführen waren. Eine zweite Möglichkeit wäre nämlich die Ausschüttung aktiver Substanzen ins Blut, die durch die Stimulation des Nerven hervorgerufen wird. Wäre dies der Fall, sollte sich die stimulierte Seite nicht von der Kontrollseite unterscheiden, da ein über aktive Substanzen vermittelter Effekt beide Körperseiten gleichermaßen beeinflussen sollte. Die Stimulation der Motoneurone MN1-5 in den Entwicklungsstadien W31 bzw. W4e, also zu einem Zeitpunkt, zu dem diese Motoneurone keine Aktivität zeigten, führte zu einer dramatischen Veränderung in der Struktur ihrer peripheren Projektionen

(Abb.31A, B). In einem sich normal entwickelnden Tier sind die Terminalen der Motoneurone zu hochkondensierten Tufts zurückgezogen (Duch et al., 2000). Dies traf auch für die Terminalen der Motoneurone der Kontrollseite zu (Abb.31A und A*). Im Gegensatz dazu waren solche Tufts auf der stimulierten Seite nicht erkennbar (Abb.31B und B*). Die Terminalen der stimulierten Seite waren vielmehr großflächig über der sich entwickelnden Muskelanlage des DLM ausgewachsen. In allen Präparaten orientierten sich die längsten Äste der neu ausgewachsenen Terminalen entlang der longitudinalen Achse des bereits teilweise degenerierten Larvalmuskels, der vorher von den Motoneuronen MN1-5 innerviert war (Abb.31B, weiße Pfeile).

Das Zurückziehen der Terminalen beginnt normalerweise im Stadium W21 und ist zum Zeitpunkt W3 schon weit fortgeschritten (Duch et al., 2000). Um sicherzustellen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt nicht um ein verspätetes Zurückziehen der Terminalen aufgrund der Implantation handelte, wurden Elektroden in Tiere gleichen Alters implantiert, aber nicht stimuliert. In diesen Tieren waren die Terminalen der Motoneurone auf beiden Seiten zurückgezogen und bildeten die charakteristischen hochkondensierten Tufts (Daten nicht dargestellt). Dies bedeutet, dass es sich um ein erneutes Auswachsen aufgrund der Stimulation handelte. Um die axonalen Verzweigungen der Motoneurone ohne benachbarte Axone sensorischer Zellen darstellen zu können (Abb.31A, B weiße Pfeilspitzen), wurden von Dr. Duch dreidimensionale Rekonstruktionen angefertigt. Diese hatten darüber hinaus den Vorteil, dass sich das Ausmaß des erneuten Auswachsens quantifizieren ließ. In Abbildung 31C ist eine solche Rekonstruktion für das in Abbildung 31A und B dargestellte Experiment gezeigt. Für die gesamte Rekonstruktion wurden Länge, Oberfläche und Volumen bestimmt (Abb.31C). Ausgangspunkt für diese Messungen war jeweils der erste Verzweigungspunkt. Alle drei Werte waren für die stimulierte Seite wesentlich höher als für die Kontrollseite (Abb.31C).

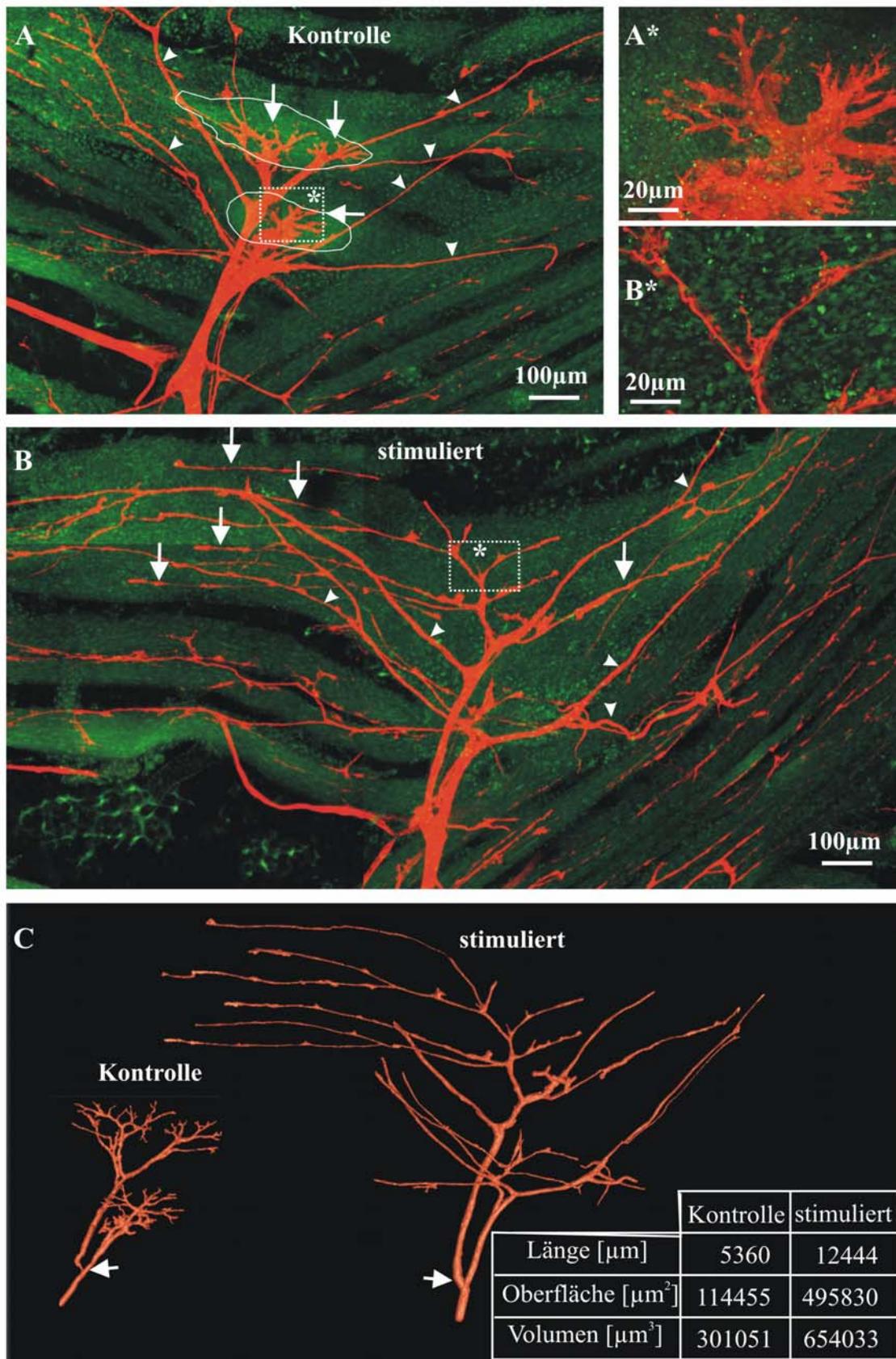


Abb.31: Motorische Aktivität induziert das Auswachsen der Terminalen von Motoneuron MN1-5. In den Abbildungen **A**, **A***, **B** und **B*** wurde auf der stimulierten und der Kontrollseite Nerv 1 mit Neurobiotin markiert und die Zellkerne mit Propidiumiodid. Die Abbildungen zeigen eine repräsentative Abbildung eines Tieres des Stadiums W4, dessen Nerv 1 mit Bursts von 1s Dauer, einer Frequenz von 10 Hz und einer Dauer von 10s zwischen den Bursts für sechs Stunden stimuliert wurde. Die Terminalen der Motoneurone MN1-5 sind in Abbildung **A** und **B** durch Pfeile markiert. Die Axone sensorischer Neurone, deren Zellkörper nicht im Bildausschnitt erfasst sind, wurden durch Pfeilspitzen markiert. Auf der Kontrollseite (**A**) sind die Terminalen der Motoneurone MN1-5 zu hochkondensierten membranösen Tufts zusammengezogen. Eine Vergrößerung dieser Struktur ist in **A*** dargestellt. Im Gegensatz dazu findet man auf der stimulierten Seite keine Tufts (**B***) und die Terminalen der Motoneurone MN1-5 sind großflächig auf dem Gebiet der sich entwickelnden Anlage des DLM ausgewachsen (**B**). Bei den kreisförmig umzeichneten hellen grünen Stellen in **A** handelt es sich um eine dichte Ansammlung von markierten Zellkörpern sich akkumulierender Myoblasten. Diese findet man nur um die hochkondensierten Tufts, jedoch nicht um die ausgewachsenen Terminalen der stimulierten Seite (**B**). Um die Verzweigungen der Terminalen von MN1-5 besser darstellen zu können und das Wachstum der Terminalen quantitativ beschreiben zu können, wurden dreidimensionale Rekonstruktionen angefertigt (**C**). **C** zeigt diese Rekonstruktionen für die Terminalen aus **A** und **B**. Mit Hilfe dieser Rekonstruktionen ließen sich Länge, Oberfläche und Volumen der Terminalen auf der Kontrollseite und der stimulierten Seite ermitteln. Alle Zweige, die sich distal zur ersten Hauptverzweigung (Pfeile in **C**) befanden, wurden vermessen. (Abbildung modifiziert nach Duch und Mentel, 2002, in Vorbereitung)

Sowohl die durch die Stimulation hervorgerufene Zunahme an Länge, Oberfläche und Volumen, als auch die Muster, in denen die stimulierten Seiten auswachsen, ähnelten sich in unterschiedlichen Tieren stark. In Abbildung 32A sind exemplarisch drei weitere Paare von stimulierten Seiten und den dazugehörigen Kontrollen als Rekonstruktionen dargestellt. In allen drei Beispielen zeigten die Kontrollseiten die charakteristischen Tufts hochkondensierter Membran, die man auf keiner der stimulierten Seiten fand (Abb.32A). Auf allen stimulierten Seiten waren die Terminalen der Motoneurone MN1-5 großflächig ausgewachsen und in allen drei Beispielen orientierten sich die längsten Äste der auswachsenden Terminalen parallel zu der longitudinalen Achse des teilweise degenerierten Larvalmuskels, der vorher von MN1-5 innerviert wurde.

In acht nach dem oben beschriebenen Protokoll stimulierten Tieren wurden die Parameter Länge, Oberfläche und Volumen gemessen. Alle drei Messwerte waren auf der stimulierten Seite signifikant höher als auf der Kontrollseite (Abb.32B, t-Test, $p < 0.01$). In allen acht Tieren war die Länge der axonalen Verzweigungen im Durchschnitt um einen Faktor von 2.50 ± 0.49 auf der stimulierten Seite erhöht. Die Oberfläche nahm auf der stimulierten Seite bis zu einem dreifachen zu (3.04 ± 1.02) und das Volumen erhöhte sich um einen Faktor von 2 (2.04 ± 0.67 , Abb.32B). Folglich ist das Oberflächen/Volumenverhältnis auf der Kontrollseite geringer verglichen mit der stimulierten Seite. Das bedeutet, dass das vorzeitige Auswachsen der Axone, das durch die Stimulation induziert wurde, zwar zu längeren Axonen führte, diese jedoch merklich dünner waren (Abb.32B).

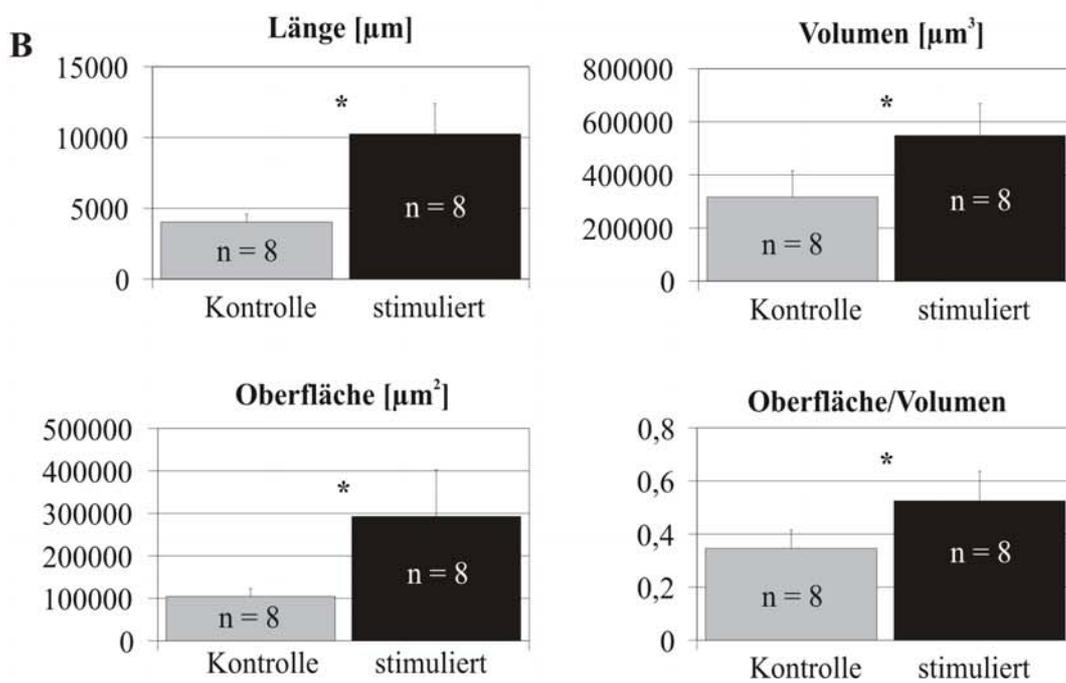
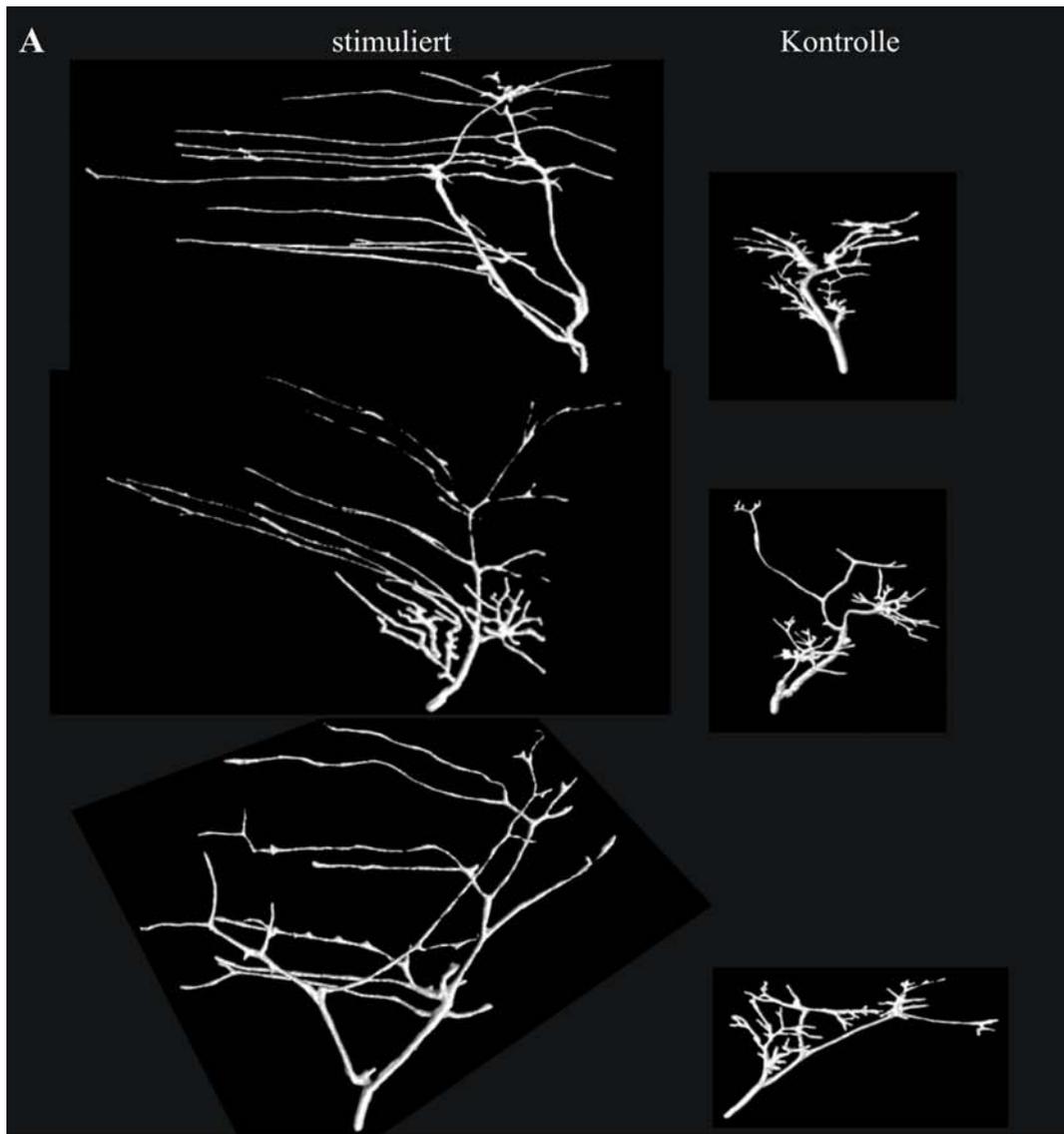


Abb.32: Quantitative Analyse des durch Stimulation induzierten axonalen Auswachsens. In **A** sind drei weitere Beispiele von Tieren, die mit dem Protokoll 1 stimuliert wurden, als Rekonstruktion dargestellt. In der Abbildung **A** sind jeweils drei Paare von stimulierter Seite und Kontrollseite eines Tieres gezeigt. Die Kontrollseiten der jeweiligen Tiere zeigen immer die charakteristischen Tufts, die auf keiner der dazugehörigen stimulierten Seite zu finden sind. Auffällig ist auch, dass die jeweils längsten Axone der neu ausgewachsenen Terminalen parallel zueinander entlang der sich neu entwickelnden Muskelanlage des DLM orientiert sind. In **B** ist die quantitative Analyse der Länge, der Oberfläche, des Volumens und des Oberflächen-/ Volumenverhältnisses der Terminalen von MN1-5 in insgesamt acht Tieren dargestellt. Die Balken zeigen jeweils die Mittelwerte von acht Tieren an; die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (T-test, $p < 0.01$).

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die beobachteten Aktivitätsmuster der Motoneurone MN1-5, wie sie *in vivo* während der Häutung gemessen wurden, ausreichend sind, um das Auswachsen der Axone zu induzieren, wie es normalerweise nach der Puppenhäutung auftritt (Duch et al., 2000). Um dies zu überprüfen, wurden weitere Stimulationsexperimente durchgeführt, in denen dieses Aktivitätsmuster simuliert wurde. Für diese Experimente wurden Tiere des Entwicklungsstadiums W4 gewählt, in denen die axonale Retraktion normalerweise schon weit fortgeschritten und keine Aktivität der Motoneurone MN1-5 mehr zu beobachten war. Die Elektroden wurden wie in den Experimenten zuvor an Nerv 1 implantiert. Die Stimulation erfolgte über zwei Stunden. Während der Häutung feuerten die Motoneurone MN1-5 mit einer Frequenz von 30Hz in Bursts von maximal 1 Sekunde Dauer. Die Zeitspanne zwischen den Bursts betrug im Durchschnitt 24 ± 5 Sekunden (Abb.28). Um diese Muster zu simulieren, wurden Bursts von einer Sekunde Länge mit einer Frequenz von 0.03 Hz appliziert. Da alle fünf Motoneurone an dem Zustandekommen der beobachteten 30 Hz beteiligt sind, wurde eine Frequenz von 6 Hz innerhalb eines Bursts gewählt (Stimulusprotokoll 2). Dieses Protokoll wurde an drei Tieren durchgeführt. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Tiere sofort für drei Stunden auf Eis gelegt und dann unverzüglich präpariert. In Abbildung 33 sind exemplarisch die Terminalen von MN1-5 eines dieser Tiere abgebildet. Auch bei diesen Experimenten kam es zu einem erneuten Auswachsen der Terminalen von MN1-5. Wie man in Abbildung 33 A und B erkennen kann, war das Auswachsen der Terminalen in diesen Fällen zwar nicht so dramatisch wie in den Tieren, die mit dem Stimulusprotokoll 1 stimuliert wurden, doch war es in allen drei Fällen signifikant höher als auf den Kontrollseiten (Abb.33C, t-Test $p < 0.005$). Dies zeigte, dass bereits

geringfügige Aktivität, die den in vivo-Aktivitätsmustern ähneln, ausreichend war, um das erneute Auswachsen der Axone zu induzieren.

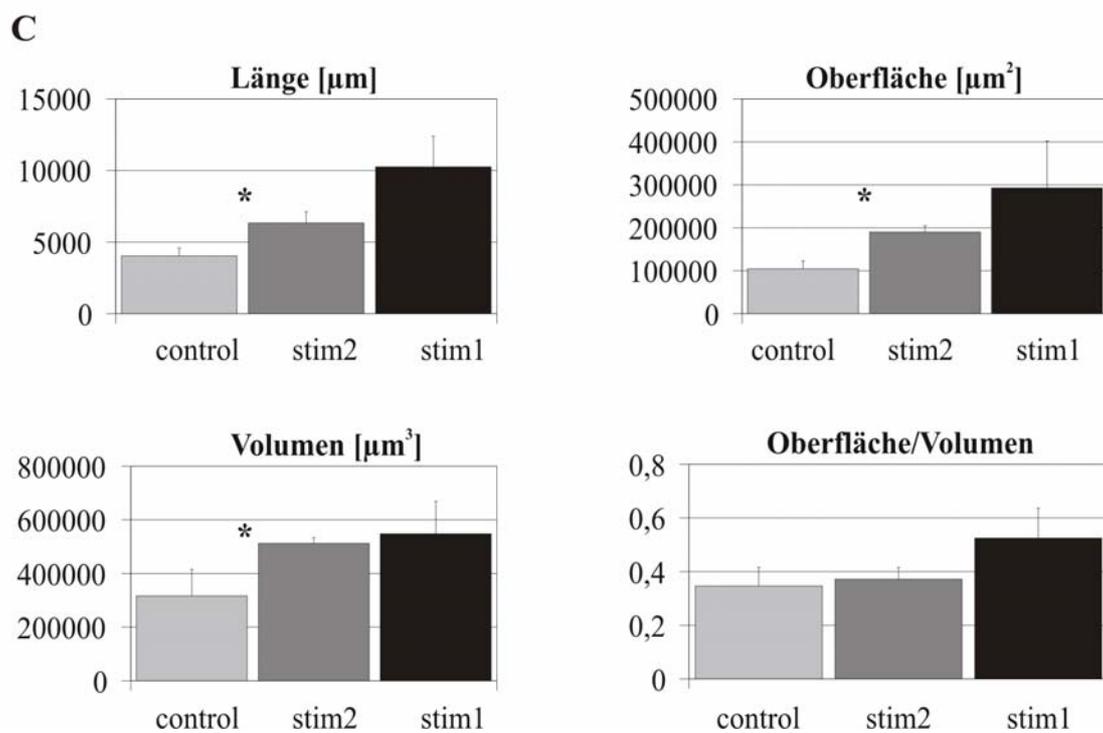
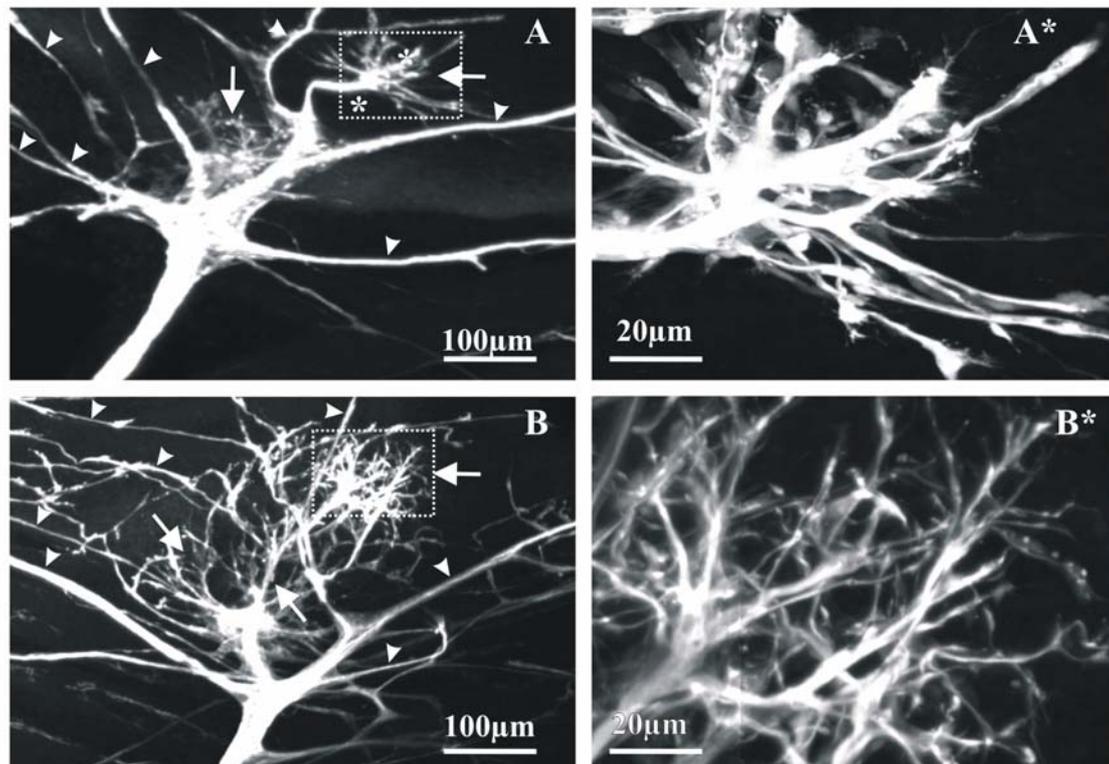


Abb.33: Die Simulation von häutungsähnlicher Aktivität ist für das erneute Auswachsen der Terminalen ausreichend. In Abbildung A, A*, B und B* sind exemplarisch die Kontrollseite und die stimulierte Seite

eines Tieres des Entwicklungsstadiums W4 dargestellt. Bei **A*** handelt es sich um eine Ausschnittsvergrößerung der Kontrollseite, die in **A** dargestellt ist. Der Ausschnitt ist in **A** durch das Kästchen gekennzeichnet. In **B*** ist eine Ausschnittsvergrößerung der stimulierten Seite aus **B** dargestellt. Der Ausschnitt ist in **B** durch das Kästchen gekennzeichnet. Bei dem dargestellten Tier handelt es sich um eins von drei Tieren, die über Nerv 1 mit Bursts von 1s Dauer, einer Frequenz von 6 Hz und einem Abstand von 30s zwischen zwei Bursts für zwei Stunden stimuliert wurde (Protokoll 2). Die Terminalen der Motoneurone MN1-5 sind in **A** und **B** durch Pfeile gekennzeichnet. Die Axone sensorischer Neurone sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet (A und B). Auf der Kontrollseite (A, A*) sind die Terminalen von MN1-5 zu hochkondensierten Tufts zurückgezogen. Auf der stimulierten Seite (B, B*) fehlen diese Tufts, vielmehr lässt sich erkennen, dass es zu einem erneuten Auswachsen der Terminalen von MN1-5 gekommen ist. In **C** ist der quantitative Vergleich der Länge, der Oberfläche, des Volumens und des Oberflächen-/Volumenverhältnisses für Kontrolltiere (n=3), für Tiere, die mit Stimulusprotokoll 2 (n=3) behandelt wurden und für Tiere, die mit Stimulusprotokoll 1 (n=8) stimuliert wurden, als Balkendiagramm dargestellt. Der Stern markiert signifikante Unterschiede zwischen Kontrollseiten und mit Stimulusprotokoll 2 stimulierten Seiten der gleichen Tiere (T-test, $p < 0.05$).

In einem letzten Ansatz wurde überprüft, ob der oben beschriebene Effekt wirklich auf der Tatsache beruht, dass die motorischen Muster, wie sie in vivo beobachtet wurden, simuliert wurden, oder ob alleine die Menge der applizierten Aktivität ausreicht, um diesen Effekt hervorzurufen. Zu diesem Zweck wurde mit einem dritten Stimulusprotokoll stimuliert, das die gleiche Anzahl von Einzelstimuli hatte (1440 Stimuli insgesamt in 2 Stunden), wie das Stimulusprotokoll 2, in dem diese Stimuli jedoch tonisch appliziert wurden. Auch hier wurden drei Tiere des Stadiums W4 ausgewählt. Abbildung 34 zeigt die Terminalen von MN1-5 eines dieser Tiere exemplarisch. In keinem der drei Tiere kam es zu einem vermehrten Auswachsen der Axone von MN1-5. In Abbildung 34A ist die Kontrollseite und in B die stimulierte Seite abgebildet. Auf beiden Seiten erkennt man deutlich die stark zurückgezogenen Terminalen der Motoneurone in Form hochkondensierter membranöser Tufts. Keiner der morphometrischen Parameter wie Länge, Oberfläche oder Volumen zeigte einen signifikanten Unterschied (t-Test $p > 0.2$) zwischen Kontroll- und stimulierter Seite.

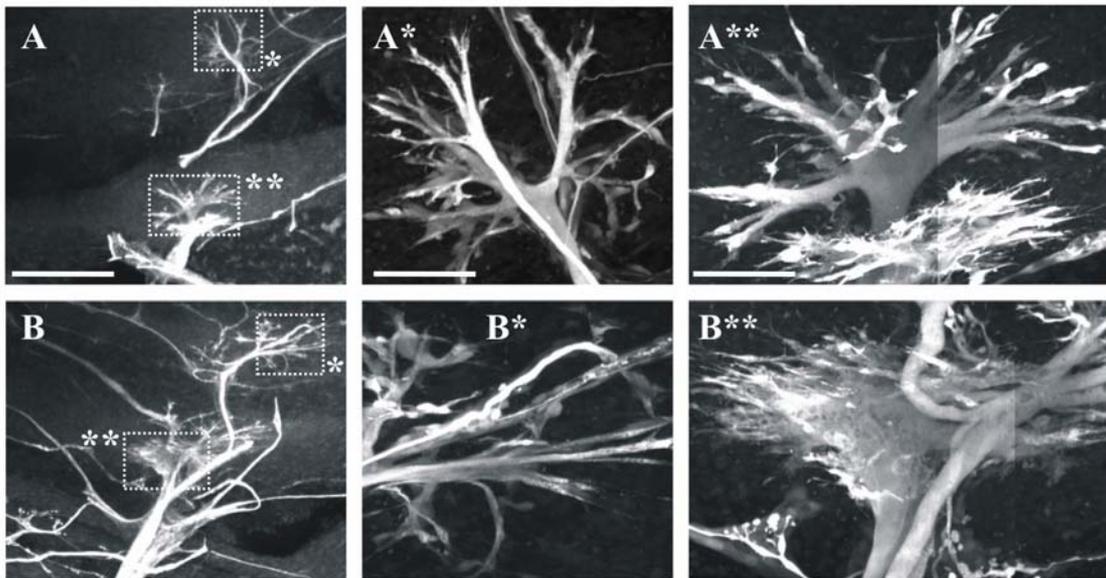


Abb.34: Die Stimulation mit tonischen Reizmustern führte zu keinem axonalen Auswachsen. In **A** und **B** sind exemplarisch sowohl Kontrollseite (**A**) sowie stimulierte Seite (**B**) eines von drei Tieren des Entwicklungsstadiums W4 dargestellt, die über Nerv 1 für zwei Stunden mit einer Frequenz von 0,2 Hz stimuliert wurden (Stimulusprotokoll 3). Sowohl auf der Kontrollseite, als auch auf der stimulierten Seite zeigen sich die hochkondensierten Tufts der zurückgezogenen Motoneurone MN1-5. In **A*** und **A**** handelt es sich um Ausschnittsvergrößerungen der Kontrollseite, die in **A** durch Kästchen markiert sind und in **B*** und **B**** um Ausschnittsvergrößerungen der stimulierten Seite, die durch entsprechende Kästchen in **B** markiert sind. In **A*** und **B*** ist MN5 der jeweiligen Seite als Ausschnittsvergrößerung dargestellt; bei **A**** und **B**** handelt es sich um die prothorakalen Motoneurone MN1-4 der jeweiligen Seite. Der Maßstab in **A** und **B** beträgt 100 μ m und für **A***, **A****, **B*** und **B**** 20 μ m.