

Summary

The highly conserved nature of ion channels, synapse proteins and molecular pathways underlying brain function suggests a large degree of functional correspondence of neuronal mechanisms that underlie the generation of behaviors throughout the animal kingdom. Many insect neurons can be readily identified *in vivo* and *in vitro* and exhibit a rich blend of ionic currents and second messenger molecules. Therefore, this study uses identified insect neurons to analyze cellular properties underlying neuronal excitability and tries to link these cellular attributes to behavioral function and to the structural development of individual neurons.

Calcium is a charge carrier as well as a second messenger molecule that is very important for different aspects of intracellular processing. The existence of multiple mechanisms to regulate the various tasks calcium has to fulfill is crucial. This can be achieved by mechanisms either operating independently or acting in concert. In this study we presented a novel calcium signaling pathway in which intracellular calcium signals were mediated in a voltage dependent manner without calcium influx from the external medium using isolated locust dorsal unpaired median (DUM) neurons as a model. Using the calcium imaging technique along with patch-clamp recordings we observed increases in the intracellular calcium concentration via release from internal stores. This release was voltage-dependent but calcium influx-independent. Depolarizing the cell membrane led to calcium release likely mediated by a voltage activated G-protein that mediated inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) synthesis by activation of membrane bound phospholipase C (PLC). IP₃ in turn activated store operated calcium channels which led to increased intracellular calcium concentrations. The molecular mechanism of voltage activated intracellular calcium release remains unknown. It was beyond the scope of this study to try to unravel the molecules mediating voltage-dependent intracellular calcium signaling. However, it has been demonstrated that eag potassium channel subunit possesses a voltage sensor that operates independently from opening of the channel, and therefore, from ion flux through the pore (Hegle *et al.*, 2006). In addition gating currents have been found in classical ligand gated ion channel (Ben-Chaim *et al.*, 2006). Therefore, well described ion channels might be good candidates for further analysis on the underlying molecular mechanisms.

To link intrinsic properties of central neurons to behavior we used the well described *Drosophila* flight system. The five motoneurons innervating the adult dorsolongitudinal flight muscle (DLM) are easy to identify. One of which is the motoneuron 5 (MN5) that innervates the DLM contralaterally. From other *in vivo* approaches it had been known that activity of

MN5 can be recorded by using the patch-clamp technique. To answer questions regarding the function of intrinsic properties of single identified neurons for behavior, we first characterized the wildtype MN5 with regard to potassium currents *in situ*. The MN5 expresses an endogenous A-type potassium current consisting of two compounds, one of which was calcium-dependent. Additionally, two slow delayed rectifier-like currents, one calcium-dependent the other not, are expressed. Typical sensitivity of the A-type current and the delayed rectifier-like current to 4-aminopyridine (4-AP, 1mM) and tetra-ethyl-ammonium-chloride (TEA, 10mM), respectively, were observed. Double knock-down of *Shaker* and another potassium channel gene, *ether-à-go-go (eag)*, led to decreased A-type current amplitudes and also to shifts regarding the activation voltage. Expression of a constitutively open potassium channel (EKO) which is a modulated *Shaker* A-type channel led to a shift in the activation voltage, but the expected inability to inactivate the A-type current was not observed. This might be caused by space clamp problems related to axonal localization of EKO channels, as demonstrated by confocal analysis of the localization of GFP tagged EKO channels. Future analysis should focus the contribution of the sequenced potassium channel genes for the different potassium currents observed in MN5. This can be achieved by targeted RNAi knock-down of these genes followed by patch-clamp analysis *in situ* as established in this study.

To test whether mutations in potassium channel genes alter excitability of MN5 we used the same fly lines as mentioned above, and also one additional fly line with single knock-down of *eag*. Wildtype MN5 *in situ* showed phasic firing patterns upon current injection. Knocking down *eag* led to increased firing frequencies but firing responses were still phasic. Double knock-down of *eag* and *Shaker* turned the MN5 from a phasic firer into a tonically firing motoneuron, whereas expression of EKO abolished firing. Both, knock-down and also EKO expression, which have opposing effects on excitability, led to increased dendritic length but by different mechanisms. Double knock-down of *eag* and *Shaker* resulted in increased dendritic branch formation, whereas EKO expression mediated increased elongation of the individual dendritic branches. From these data we conclude that dendritic branching and dendritic segment elongation are controlled by different mechanisms which can be addressed *in vivo* by different manipulations of a neurons intrinsic excitability. These data demonstrate that dendritic segment elongation and dendritic branching are controlled by different molecular mechanisms which can be addressed separately by different manipulations of intrinsic activity. *Drosophila* offers a great genetic tool box for future analysis of the underlying intracellular signaling cascades.

Zusammenfassung

Die hochkonservierte Struktur von Ionen-Kanälen, Synapsenproteinen und molekularen Signalwegen, die einer normalen Funktion des Gehirns unterliegen, lassen darauf schließen, dass eine Art Korrespondenz zwischen den verschiedenen neuronalen Mechanismen existiert, die der Entstehung von Verhalten im gesamten Tierreich unterliegen. Viele Insekten-Neurone können leicht sowohl *in vivo* als auch *in vitro* identifiziert werden, und sie besitzen eine Vielzahl verschiedener Ionenströme und Sekundärer Botenstoff-Moleküle. Aus diesem Grund verwendeten wir für diese Studie Insekten-Neurone, um die der neuronalen Erregbarkeit zugrunde liegenden intrinsischen Eigenschaften zu analysieren und sie an bestimmtes Verhalten zu knüpfen.

Kalzium fungiert sowohl als Ladungsträger als auch als Sekundärer Botenstoff. Diese Eigenschaft ist sehr wichtig für verschiedene Aspekte intrazellulärer Vorgänge. Um dieser Vielzahl von Aufgaben gerecht zu werden, müssen die Kalzium-abhängigen Prozesse in der Zelle gut voneinander getrennt werden. Das wird entweder durch unabhängige Prozesse gewährleistet, oder verschiedene Mechanismen finden zeitgleich statt. In dieser Arbeit demonstrierten wir die Existenz eines neuen Kalzium-Signalswegs, bei dem Kalzium-Signale spannungsabhängig ohne Kalzium-Einstrom über die Zellmembran auftraten. Als Modellsystem verwendeten wir isolierte dorsale ungepaarte median gelegene (DUM) Neurone aus dem Metathorakalganglion der Wüstenheuschrecke als Modell-System. Unter Verwendung der „Calcium-Imaging“ Technik zusammen mit der „Patch-Clamp“ Technik konnten wir eine durch die Ausschüttung von Kalzium aus internen Speichern verursachte Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration beobachten. Die Ausschüttung von Kalzium aus internen Speichern war spannungsabhängig, aber unabhängig von Kalzium-Einstrom. Eine Depolarisation der Zellmembran führte wahrscheinlich zur Aktivierung eines spannungsabhängigen G-Proteins, das unter Beteiligung von Membran-gebundener Phospholipase C (PLC) über bereits bekannte Signalwege zur Synthese von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) führte. IP₃ aktivierte wiederum Kalzium-Kanäle in der Speicher-Membran, was zur Ausschüttung von Kalzium ins Zytoplasma führte und dort die Kalzium-Konzentration erhöhte. Der molekulare Mechanismus der spannungsabhängigen Freisetzung von Kalzium ist allerdings weiterhin unbekannt. In der vorliegenden Studie war es nicht möglich, die zugrunde liegenden Prozesse aufzuklären. In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass die *eag* (*ether-à-go-go*) Kalium-Kanal Untereinheit einen Spannungssensor besitzt, der unabhängig von einer Kanal-Öffnung und damit auch von Ionenströmen durch die Kanalpore ist (Hegle *et al.*, 2006). Darüber hinaus hat man „gating-currents“ in klassischen Liganden-

gesteuerten Ionen-Kanälen gefunden (Ben-Chaim *et al.*, 2006). Gut untersuchte Ionenströme scheinen somit gute Kandidaten für die Aufklärung weiterer molekularer Mechanismen von Kanal-Modulationen zu sein.

Um intrinsische Eigenschaften von zentralen Neuronen mit Verhalten zu verknüpfen, verwendeten wir das Flugsystem von *Drosophila*. Der dorsolongitudinale Flugmuskel (DLM) von *Drosophila* wird von fünf leicht identifizierbaren Motoneuronen innerviert. Eines dieser Motoneurone ist das Motoneuron 5 (MN5), das den Flugmuskel kontralateral innerviert. Aus anderen *in vivo* Studien ist bekannt, dass die Aktivität des MN5 unter Zuhilfenahme der „Patch-Clamp“ Technik untersucht werden kann. Um nun Fragen zur Vernetzung intrinsischer Eigenschaften von identifizierten Neuronen mit assoziiertem Verhalten beantworten zu können, charakterisierten wir zunächst das MN5 *in situ* hinsichtlich seiner Kalium-Kanal-Ausstattung. Das MN5 exprimiert einen nativen *Shaker* A-Typ Kalium-Strom, der aus zwei Komponenten besteht. Eine dieser Komponenten ist Kalzium-abhängig. Zusätzlich wurden zwei langsame verzögert rektifizierende Kalium-Ströme gemessen, von denen ebenfalls einer Kalzium-abhängig war. Wir konnten die typische 4-Aminopyridin- (4-AP, 1mM) bzw. Tetra-Ethyl-Ammonium-Chlorid-Sensitivität (TEA, 10mM) des A-Stroms bzw. des langsam rektifizierenden Stroms beobachten. Der Doppel-„Knock-Down“ von *Shaker* und *ether-à-go-go (eag)* Kalium-Kanälen führte zu verringerter A-Strom Amplitude und zu Verschiebungen bezüglich des Aktivierungspotentials. Die Expression eines konstitutiv offenen, modulierten *Shaker* Kalium-Kanals (EKO), der im Gegensatz zum nativen *Shaker* Kalium-Kanal nicht inaktiviert, führte ebenfalls zu einem veränderten Aktivierungspotential. Entgegen allen Erwartungen inaktivierte der A-Typ Kalium-Strom. Die Ursache hierfür könnten „Space Clamp“ Probleme sein, da EKO-Kanäle sich im Axon befinden, das nicht in der Nähe des Somas liegt, was durch die Aufnahme konfokaler Bilderstapel GFP-markierter EKO-Kanäle gezeigt werden konnte. In zukünftigen Projekten sollte nun die Beteiligung der bislang sequenzierten Kalium-Kanal-Gene an den im MN5 exprimierten Kalium-Strömen untersucht werden. Dies kann man durch gerichtetes Ausschalten von Genen mit Hilfe der RNAi Technik gefolgt von *in situ* „Patch-Clamp“ Analysen erreichen, wie in der vorliegenden Studie gezeigt.

Um zu testen, ob Mutationen in Kalium-Kanal-Genen zu einer veränderten Erregbarkeit des MN5 führen, untersuchten wir die Erregbarkeit in den gleichen Fliegenlinien, die wir schon für die Charakterisierung der Kalium-Ströme verwendet haben. Zusätzlich wurde ein Einzel-„Knock-Down“ von *eag* untersucht. Das Wildtyp MN5 zeigte auf Strom-Injektion phasische Erregung. Der *eag* Einzel-„Knock-Down“ führte ebenfalls zu

phasischer Erregung als Antwort auf Strom-Injektion, allerdings mit erhöhter Frequenz. Der Doppel-„Knock-Down“ von *eag* und *Shaker* machte aus dem phasisch feuernenden MN5 ein tonisch feuernendes Motoneuron. Die Expression von EKO hingegen führte zum Verschwinden von Aktionspotentialen. Sowohl der Doppel-„Knock-Down“ von *eag* und *Shaker* als auch die Expression von EKO, die entgegengesetzte Effekte auf die Erregung des MN5 hatten, führten zu einer Erhöhung der dendritischen Gesamtlänge des MN5, hervorgerufen durch verschiedene Mechanismen. Der Doppel-„Knock-Down“ von *eag* und *Shaker* führte zu einer Erhöhung der, wohingegen die Expression von EKO in einer Erhöhung der Länge der einzelnen Dendriten resultierte. Bezogen auf unsere Ergebnisse folgern wir, dass die Verzweigung von Dendriten und die Verlängerung dendritischer Segmente unterschiedlichen Mechanismen folgen, die *in vivo* durch Manipulation der intrinsischen Erregbarkeit aufgeschlüsselt werden können. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Verlängerung dendritischer Segmente und die Verzweigung von Dendriten verschiedenen Mechanismen unterliegen, die durch unterschiedliche Manipulationen der intrinsischen Aktivität getrennt voneinander untersucht werden können. *Drosophila* bietet eine große Bandbreite genetisch möglicher Manipulationen, um die beteiligten intrazellulären Signalkaskaden aufklären zu können.

References

Ben-Chaim Y, Chanda B, Dascal N, Bezanilla F, Parnas I, Parnas H (2006) Movement of 'gating charge' is coupled to ligand binding in a G-protein-coupled receptor. *Nature* 444: doi: 10.1038/nature05259

Hegle AP, Marble DD, Wilson GF (2006) A voltage-driven switch for ion-independent signaling by ether-à-go-go potassium channels. *PNAS* 103: 2886-2891.