

**Gesangskontrolle durch Neurone des Zentralkomplexes:
physiologische und immunzytochemische Untersuchungen an
primären Zellkulturen aus dem Feldheuschreckengehirn**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Christian Heck
aus
Mönchengladbach**

Göttingen 2007

D 7

Referent: Prof. Dr. Ralf Heinrich

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Stumpner

Tag der mündlichen Prüfung:

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	7
2.1	Versuchstiere	7
2.2	Pharmakologische Gesangsstimulation und intravitale Markierung von Hirneuronen	7
2.2.1	Versuchsaufbau und Präparation	7
2.2.2	Versuchsdurchführung	9
2.3	Zellkultur	9
2.3.1	Steriltechnik	9
2.3.2	Gewinnung der Primärkultur	10
2.3.3	Histologische Untersuchungen der kultivierten Zellen	11
2.3.4	Auswertung	12
2.4	Markierungen im Heuschreckengehirn	13
2.4.1	Lokalisation markierter Neurone	13
2.4.2	Doppelfärbung	13
2.5	Elektrophysiologie	14
2.5.1	Versuchsaufbau	14
2.5.2	Durchführung	15
2.5.3	Datenauswertung	16
2.6	Optophysiological Messungen zytosolischer Kalziumkonzentrationen kultivierter Neurone	17
2.6.1	Beladen der Zellen mit Fura2/AM	17
2.6.2	Versuchsaufbau	18
2.6.3	Durchführung	18
2.6.4	Datenauswertung	19
3	Ergebnisse	21
3.1	Primärzellkulturen aus dem Heuschreckengehirn von <i>Ch. biguttulus</i>	21
3.1.1	Allgemeine Charakterisierung der Primärzellkulturen	21
3.1.2	Detektion intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen	29
3.1.3	Anti-mAChR Immunzytochemie in Primärzellkulturen	30

3.1.4	Anti-mAChR Immunzytochemie an intravital markierten Neuronen	32
3.2	Histologische und immunzytochemische Untersuchungen an Hirnschnitten von <i>Ch. biguttulus</i>	34
3.2.1	DAPI und anti-HRP Doppelfärbung an Hirnschnitten	35
3.2.2	Lokalisation intravital markierter Neurone in Hirnschnitten	37
3.2.3	Immunzytochemischer Nachweis muskarinischer ACh Rezeptoren intravital markierter Neurone in Hirnschnitten	43
3.3	Elektrophysiologische Charakterisierung intravital markierter Neurone in Primärkulturen aus Heuschreckengehirnen von <i>Ch. biguttulus</i>	47
3.3.1	Allgemeine Charakterisierung der elektrischen Ströme intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen	47
3.3.2	Differenzierung zwischen spannungsabhängigen und gleichrichtenden Kanälen intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen	54
3.3.3	Pharmakologisch ausgelöste elektrische Ströme intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen	60
3.4	Optophysiological Messungen zytosolischer Kalziumkonzentrationen in Primärkulturen aus Heuschreckengehirnen von <i>Ch. biguttulus</i>	63
3.4.1	Beladung der Zellen mit Fluoreszenzindikatoren	63
3.4.2	Messung zytosolischer Kalziumkonzentrationen primärkultivierter Neurone nach Applikation von Muskarin	66
3.4.3	Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Muskarinstimulus und zytosolischer Kalziumkonzentration	68
3.4.4	Ursache und Mechanismus der muskarinstimulierten Kalziumantwort intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen	70
3.4.5	Patch-clamp Untersuchungen intravital markierter Neuronen mit positiver Reaktion auf Muskarinapplikation	81
3.4.6	Oszillierende Schwankungen der Kalziumkonzentration in Primärzellkulturen	83
4	Diskussion	85
4.1	Methodik der Coinjektion farbstoffgekoppelter Dextrane	85
4.1.1	Vergleich der Zellzahlen intravital markierter Neurone in Hirnschnitten und Zellkulturen	86
4.2	Zellkulturen	87
4.2.1	Nährmedien und ihr Einfluss auf die Primärzellkulturen	87
4.2.2	Überlebensrate der Zellen in Primärzellkulturen	87
4.2.3	Differenzierung zwischen Neuronen und Gliazellen	88
4.2.4	Immunzytochemie in Primärzellkulturen	90

4.3	Hirnschnitte	91
4.3.1	Einordnung intravital markierter Neurone in die Anatomie des Zentralkomplexes	91
4.3.2	Anti-mAChR Immunzytochemie an intravital markierten Neu- ronen	93
4.4	Elektrophysiologische Untersuchungen intravital markierter Neurone .	96
4.4.1	Auswärts gerichtete Stöme	96
4.4.2	Einwärts gerichtete Ströme	99
4.4.3	Nikotinische Acetylcholin-Kanäle	100
4.5	Optophysiological Messungen zytosolischer Kalziumkonzentrationen	100
4.5.1	Beteiligung regulatorischer Mechanismen am muskarinerg ver- mittelten Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration . .	104
4.6	Resumee	107
5	Zusammenfassung	108
	Literaturverzeichnis	110
	Anhang	120

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der für die Kontrolle des akustischen Kommunikationsverhaltens entscheidenden Strukturen	2
1.2	Schematische Darstellung des Phospholipase C Second Messenger Signalwegs	4
1.3	Schematische Darstellung des Adenylatzyklase Second Messenger Signalwegs	4
2.1	Schema des Messplatzes zur Druckinjektion	8
2.2	Schematischer Aufbau des Elektrophysiologiesetups	15
2.3	Anregungs- und Emissionsspektrum von Fura2/AM	17
2.4	Schematischer Aufbau des Imagingsetups	19
3.1	Trypanblaufärbung primärkultivierter Hirnzellen von <i>Ch. biguttulus</i> .	22
3.2	Propidiumjodid und anti-HRP Doppelfärbung primärkultivierter Hirnzellen von <i>Ch. biguttulus</i>	23
3.3	Detailansicht einer Propidiumjodid und anti-HRP Doppelfärbung primärkultivierter Hirnzellen von <i>Ch. biguttulus</i>	24
3.4	DAPI und anti-HRP Doppelfärbung primärkultivierter Hirnzellen von <i>Ch. biguttulus</i>	25
3.5	Detailansicht einer DAPI und anti-HRP Doppelfärbung primärkultivierter Hirnzellen von <i>Ch. biguttulus</i>	26
3.6	DAPI und anti-Repo Doppelfärbung primärkultivierter Hirnzellen von <i>Ch. biguttulus</i>	27
3.7	Ungerichtetes multipolares Neuritenwachstum primärkultivierter Neurone unterschiedlichen Kulturalters	27
3.8	Bipolares Neuritenwachstum primärkultivierter Neurone unterschiedlichen Kulturalters	28
3.9	Neuritenwachstum primärkultivierter Neurone unterschiedlichen Kulturalters, die einen physischen Kontakt zu benachbarten Zellen bilden	28
3.10	CY3 gekoppelte SAP-47 Immunmarkierung primärkultivierter Hirnzellen von <i>Ch. biguttulus</i>	29
3.11	Intravitalmarkierung primärkultivierter Hirnzellen von <i>Ch. biguttulus</i>	29

3.12	Detailansicht einer intravital markierten Hirnzelle von <i>Ch. biguttulus</i> in Zellkultur	30
3.13	DAPI Kernfärbung eines intravital markierten Neurons von <i>Ch. biguttulus</i> in Zellkultur	30
3.14	Immunzytochemischer Nachweis muskarinischer ACh-Rezeptoren in primärkultivierten Hirnneuronen von <i>Ch. biguttulus</i>	31
3.15	Immunzytochemischer Nachweis muskarinischer ACh-Rezeptoren eines intravital markierten Neurons von <i>Ch. biguttulus</i> in Zellkultur	32
3.16	Detailansicht eines primärkultivierten intravital markierten Neurons mit mAChR assoziierter Immunmarkierung	33
3.17	Schematische Darstellung eines Heuschreckengehirns mit Fokus auf den Zentralkomplex	34
3.18	Mit anti-HRP und DAPI doppelgefärbter horizontaler Hirnschnitt durch das zentrale Protocerebrum von <i>Ch. biguttulus</i>	36
3.19	Z-Projektion der maximalen Intensität eines konfokal gescannten Horizontalschnittes nach Injektion eines biotinkoppelten Dextrans in das intakte Heuschreckengehirn	37
3.20	Z-Projektion der maximalen Intensität eines konfokal gescannten Horizontalschnittes nach Injektion eines biotinkoppelten Dextrans in das intakte Heuschreckengehirn	38
3.21	Z-Projektion der maximalen Intensität eines konfokal gescannten Horizontalschnittes nach Injektion eines biotinkoppelten Dextrans in das intakte Heuschreckengehirn	39
3.22	Z-Projektion der maximalen Intensität eines konfokal gescannten Horizontalschnittes nach Injektion eines biotinkoppelten Dextrans in das intakte Heuschreckengehirn	40
3.23	Konfokal gescannter Horizontalschnitt nach Injektion eines biotinkoppelten Dextrans in das intakte Heuschreckengehirn	42
3.24	Intravital injizierte Dextranfärbung mit anti-mAChR assoziierter Immunmarkierung eines Horizontalschnittes des Heuschreckengehirns	44
3.25	Detailansicht einer intravital injizierten biotinkoppelten Dextranfärbung mit anti-mAChR assoziierter Immunmarkierung eines Horizontalschnittes des Heuschreckengehirns	46
3.26	Auswärtsgerichtete Ströme intravital markierter primärkultivierter Neurone in der Whole-Cell Konfiguration	48
3.27	Strom/Spannungsrelation gemittelter Auswärtsströme, der in Abb. 3.26 dargestellten Whole-Cell Ableitungen	49
3.28	Strom/Spannungsrelation gemittelter Auswärtsströme von intravital markierten Neuronen	50

3.29	Mittlere Maximalamplituden des Auswärtsstroms von intravital markierten Neuronen des Typs A und B bei einer geklemmten Kommandospannung von 20 mV	51
3.30	Quotienten der transienten und der persistierenden Komponenten des Auswärtsstroms von Neuronen des Typ A und B bei einer Klemmspannung von 20 mV	52
3.31	Auswärtsströme einer Whole-Cell Ableitung nach Zugabe von 10 mM TEA in die Extrazellulärlösung	53
3.32	Auswärtströme eines intravital markierten Neurons des Typ B in der Whole-Cell Konfiguration nach unterschiedlichen Vorpulsen	54
3.33	Darstellung der Stromamplituden derselben Zelle nach unterschiedlichen Vorpulsen, zu Beginn und am Ende der depolarisierenden Kommandospannungen in einer Strom/Spannungskurve	55
3.34	Strom/Spannungsdifferenz der maximalen Auswärtsströme nach Vorpulsen von -120 mV und -20 mV des intravital markierten Neurons aus Abb. 3.32/3.33	56
3.35	Auswärtsstrom und Strom/Spannungsrelation eines intravital markierten Neurons des Typ A nach einem Vorpuls von -20 mV	57
3.36	Amplituden des intravital markierten Neurons aus Abb. 3.35 zu Beginn und am Ende der 200 ms dauernden Kommandospannungen in einer Strom/Spannungskurve	58
3.37	Änderung der Strom/Spannungsrelation eines intravital markierten Neurons des Typs A in Abhängigkeit von der Dauer der Ableitung	60
3.38	Gemessene Einwärtsströme eines intravital markierten Neurons nach Applikation von 1 mM Acetylcholin	61
3.39	Applikation von 1 mM Acetylcholin zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Ableitung	62
3.40	Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer mit Oregon Green beladenen intravital markierten Zelle	64
3.41	Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer mit Fura/AM beladenen intravital markierten Zelle	65
3.42	Auftragung registrierter Kalziumkonzentrationszunahmen gegen die Halbwertsbreite der Reaktionsdauer aller intravital markierten Zellen, die positiv auf einen Muskarinstimulus reagierten	67
3.43	Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle nach Muskarinstimuli unterschiedlicher Konzentrationen	69
3.44	Schematische Darstellung zellulärer Kontrollmechanismen der zytosolischen Kalziumkonzentration	71

3.45	Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration kultivierter Neurone nach Koffeinapplikation	72
3.46	Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle nach Inhibition der IP ₃ R durch 2-APB . . .	74
3.47	Vergleich der Amplituden des relativen zytosolischen Kalziumkonzentrationsanstiegs intravital markierter Neurone nach Applikation von Muskarin in normaler und kalziumfreier Extrazellulärlösung	75
3.48	Vergleich der Halbwertsbreiten der Kalziumantwort intravital markierter Neurone nach Applikation von Muskarin in normaler und kalziumfreier Extrazellulärlösung	75
3.49	Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle nach Inhibition des PLC durch Neomycin . .	78
3.50	Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle nach Inhibition der PLC durch U-73122 . . .	79
3.51	Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle nach Aktivierung der PLC durch m-3M3FBS	80
3.52	Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration eines intravital markierten Neurons	81
3.53	Auswärtsstrom und Strom/Spannungsrelation des in Abb. 3.52 unmittelbar zuvor optisch abgeleiteten intravital markierten Neurons . .	82
3.54	Messung der oszillierender zytosolischer Kalziumkonzentrationsschwankungen primärzkultivierter Zellen von <i>Ch. biguttulus</i>	84
4.1	Rekonstruktion von Locustatachykinin I (A) und -II (B) immunreaktiven Neuronen	92

1 Einleitung

Die Neurowissenschaft befasst sich mit dem Aufbau und der Funktionsweise von Nervensystemen. Sie beinhaltet unter anderem Disziplinen, wie die Neurophysiologie, die sich mit den molekularen und zellbiologischen Grundlagen der neuronalen Verarbeitung beschäftigt und die Neuropsychologie, welche die Fähigkeiten des Nervensystems als Gesamtkomplex betrachtet. Ein relativ junges Teilgebiet der Neurowissenschaft ist die Neuroethologie, die neurophysiologische und neuropsychologische Ansätze miteinander verknüpft. Im Focus stehen dabei Mechanismen, die auf der Ebene einzelner Zellen oder kleiner Netzwerke direkten Einfluss auf das Verhalten des Organismus haben (Heiligenberg 1991). Ein besonders prominentes Beispiel hierfür ist der Kiemenrückziehreflex von *Aplysia californica*, dessen zelluläre und molekulare Grundlagen detailliert entschlüsselt werden konnten (Kandel et al. 1986).

Weil bei der Erforschung allgemein gültiger Prinzipien neuronaler Mechanismen des Verhaltens überwiegend invasive Verfahren zum Einsatz kommen, bieten sich Invertebraten als geeignete Modellorganismen an. Neben ethischen Gesichtspunkten haben diese den Vorteil, dass ihre Nervensysteme leicht zugänglich sind und im Vergleich zu Vertebraten mit einer geringeren Anzahl von Neuronen ähnlich komplexe Aufgaben lösen.

Die innerartliche Kommunikation der Grashüpfer offeriert ein System, an dem das Zusammenspiel ethologischer und zellulärer Aspekte im Hinblick auf die Grundlagen von Verhaltenssteuerung modellhaft untersucht werden kann. Dieses als Stridulation bezeichnete Verhalten dient der Partnerfindung (Lockgesang) und der Balz (Werbe- gesang), sowie bei territorialen Arten auch der Abgrenzung eines Reviers (Rivalen- gesang). Männchen und Weibchen verfügen über ein Repertoire angeborener Laut- muster, die durch rhythmisches Streichen einer kutikulären Zahnreihe (Schrilleiste) auf der Innenseite der Hinterbeinfemura gegen eine verhärtete Flügelader (Schrill- kante) der Tegmina erzeugt werden (Faber 1953, Jacobs 1953, Elsner 1974). Das Repertoire der Lautmuster und der diesen zugrunde liegenden Singbewegungen ist genetisch determiniert und unterliegt, soweit bekannt, keinen Lernprozessen. Durch diese Konstanz und die Möglichkeit verschiedene Gesangstypen eindeutig einem kon- kreten Verhaltenskontext zuordnen zu können, bietet die Stridulation der Feldheu- schrecken die Option, durch pharmakologische Intervention Erkenntnisse über die zugrunde liegenden Erregungsvorgänge und deren Mechanismen zu erlangen.

In bisherigen Untersuchungen zur Gesangssteuerung konnte der funktionelle Beitrag verschiedener zentralnervöser Strukturen ermittelt werden. Die motorische Steuerung der Stridulationsbewegungen erfolgt über mustergenerierende Netzwerke im metathorakalen Ganglion (Gramoll und Elsner 1987, Hedwig 1992a;b, Ocker und Hedwig 1996). Die Mustergenerierung ist hemisegmental organisiert (Ronacher 1989; 1991) und wird über intra- und interganglionäre Strukturen koordiniert (Heinrich et al. 1997). Auswahl, sowie die Bestimmung der Dauer und Intensität des Gesangs unterliegen jedoch der Kontrolle des Gehirns. Im anterioren Bereich des Protocerebrums konnten tonisch aktive deszendierende Neurone identifiziert werden, die sowohl hinreichend als auch notwendig für die Aktivierung der thorakalen Mustergeneratoren sind und damit die Kriterien von Kommandoneuronen erfüllen (Hedwig 1994). Verschiedene Kommandoneurone kontrollieren jeweils die Ausführung eines bestimmten Gesangstyps und sind damit direkt mit Verhaltensreaktionen assoziiert (Hedwig 1994, Hedwig und Heinrich 1997). Die Entscheidung, ob Gesang ausgelöst wird und welches Gesangsmuster der Situation angemessen erscheint, wird jedoch, nach Integration interner und externer sensorischer Informationen, von Neuronen eines präsynaptisch zu den Kommandoneuronen gelegenen Netzwerks getroffen. Frühe Experimente von Huber (1964) deuteten auf eine Beteiligung der Pilzkörper und des Zentralkomplexes hin. Der Zentralkomplex ist ein hochgradig strukturiertes Neuropilgebiet, dem eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung sensorischer Informationen und der daran gekoppelten Kontrolle und Ausführung von Verhalten zugesprochen wird (Hanesch et al. 1989, Homberg 1991, Strauss und Heisenberg 1993, Ilius et al. 1994, Vitzthum et al. 2002).

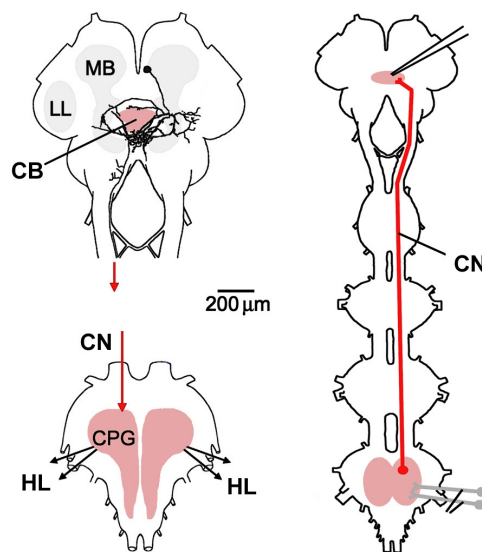


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der für die Kontrolle des akustischen Kommunikationsverhaltens entscheidenden Strukturen. CB Zentralkomplex; CN Kommandoneuron; CPG zentraler Mustergenerator; HL Hinterbein; LL unteres laterales Neuropil; MB Pilzkörper (verändert nach Heinrich et al. (2001))

Mittels Injektionen neuroaktiver Substanzen in Neuropilregionen des Protocerebrums kann Gesangsverhalten ausgelöst werden. Dabei unterscheiden sich die produzierten Bewegungs- und Lautmuster nicht vom artspezifischen natürlichen Gesang. Bisher konnte in zwei Gebieten des Protocerebrums Gesang pharmakologisch stimuliert werden. In einem posterior und dorsal vom Zentralkomplex gelegenen Neuropil, in welchem die Kommandoneurone dendritisch verzweigen, und in der oberen und unteren Division des Zentralkörpers (Heinrich und Elsner 1997, Heinrich et al. 2001). Neben dem Neuropeptid Proktolin und dem Katecholamin Dopamin konnte vor allem dem Neurotransmitter Acetylcholin eine zentrale Bedeutung für die Gesangsauslösung zugeordnet werden (Abb. 1.1). Generell unterscheidet man zwei Typen cholinergere Rezeptoren, den nikotinischen (nACh) und den muskarinischen Acetylcholinrezeptor (mACh).

Der nikotinsche ACh-Rezeptor verdankt seinen Namen der selektiven Aktivierbarkeit durch Nikotin. Dieser Rezeptortyp ist bei Vertebraten an der motorischen Endplatte und im Zentralnervensystem lokalisiert, wohingegen er bei Insekten in nahezu allen zentralnervösen Neuropilen exprimiert wird und insbesondere als vorherrschender Transmitter sensorischer Afferenzen gilt. Bei den der Säugetiere nACh-Rezeptoren differenziert man zwischen der embryonalen und adulten Variante, die sich in einer Untereinheit und dadurch in ihrem Aktivierungs- und Desensitierungsverhalten unterscheiden. Nach Bindung von zwei ACh Molekülen an die α -Untereinheiten des Rezeptors wird der Kanal kurzzeitig für Kationen permeabel, was zu einer Depolarisation der postsynaptischen Nervenzelle oder des Muskels führt (Breer et al. 1981). Durch Injektion von Nikotin oder eines nikotinischen Agonisten in den Zentralkomplex akustisch kommunizierender Feldheuschrecken, kann ein mit kurzer Latenz auftretender, kurzzeitiger Gesang stimuliert werden.

Muskarinische Agonisten lösen dagegen nach längerer Latenz länger andauernde Stridulation aus, deren Intensität sich allmählich steigert (Heinrich und Elsner 1997). Der muskarinische ACh-Rezeptor gehört zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Durch Bindung des Liganden an den Rezeptor zerfällt das mit dem Rezeptor assoziierte G-Protein nach Austausch eines GDP-Moleküls gegen ein GTP-Molekül, in eine $\beta\gamma$ - und eine α -Untereinheit. Diese Untereinheiten stimulieren oder hemmen in der Regel zytosolische Enzyme und initiieren dadurch Reaktionskaskaden, die im Gegensatz zu ionotropen Rezeptoren längerfristige Veränderungen des physiologischen Zustandes der Zelle bewirken. Bei Vertebraten konnten bisher fünf verschiedene Typen muskarinischer ACh-Rezeptoren kloniert werden. Diese führen nach ihrer Aktivierung entweder zu einer Hemmung der Adenylatzyklase (Abb. 1.3) und damit zu einer Verminderung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), oder zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) (Abb. 1.2), welche das Glycolipid der Zellmembran Phosphoinositol-

4,5-diphosphat (PIP₂) in die Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) umwandelt (Nathanson 1989, Felder et al. 1995).

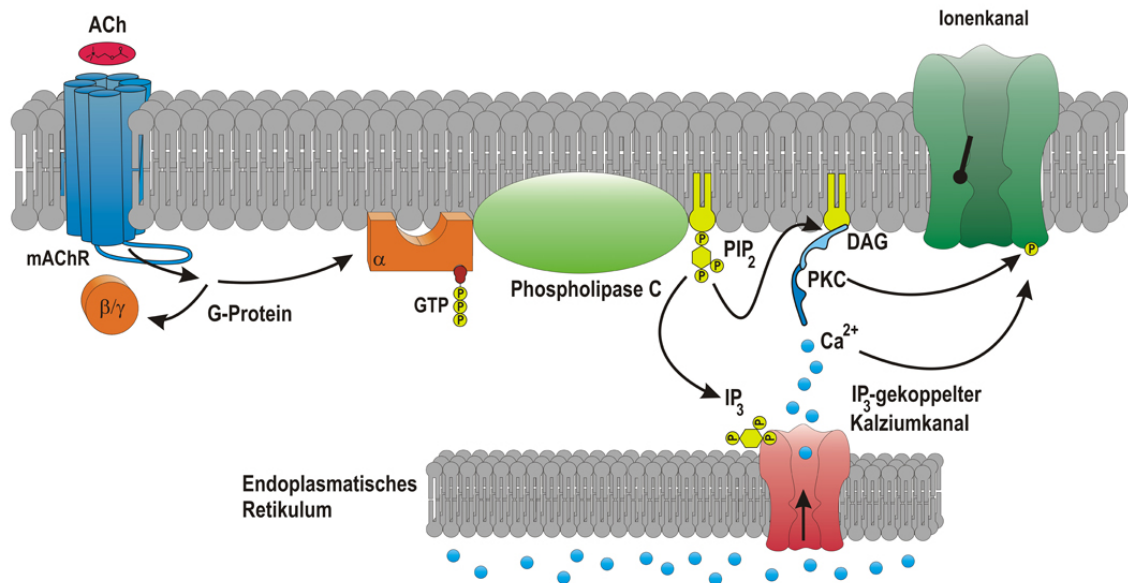


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Phospholipase C Second Messenger Signalwegs. ACh Acetylcholin; DAG Diacylglycerin; GTP Guanosintri-phosphat; IP₃ Inositol-1,4,5-trisphosphat; mAChR muskarinischer Acetylcholin Rezeptor; PKC Proteinkinase C; PIP₂ Phosphoinositol-4,5-diphosphat

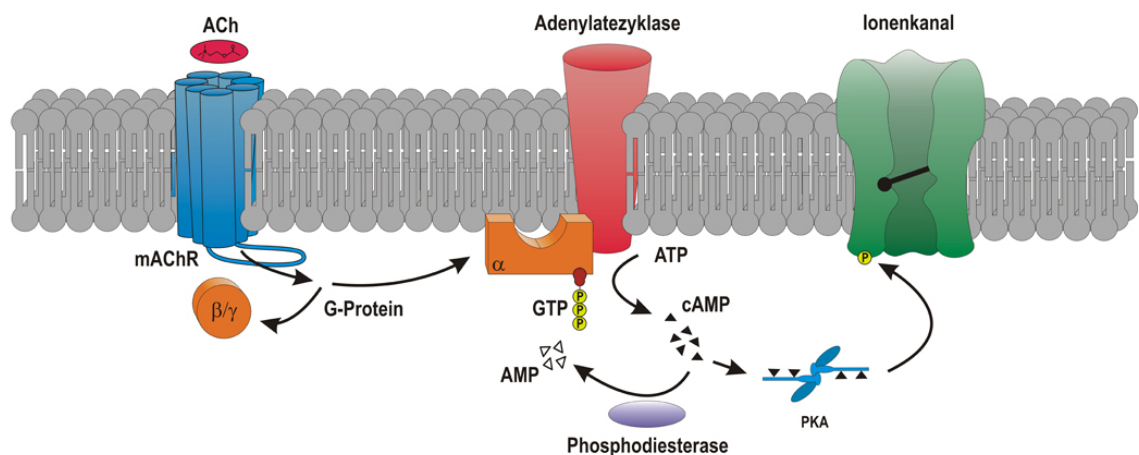


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Adenylatzyklase Second Messenger Signalwegs. ACh Acetylcholin; AMP Adenosinmonophosphat; ATP Adenosintri-phosphat; cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat; GTP Guanosintri-phosphat; PKA Proteinkinase A

Bisher konnte nur ein mACh-Rezeptor bei Insekten (aus *Drosophila melanogaster*) kloniert werden (Shapiro et al. 1989, Onai et al. 1989). Pharmakologische und funktionelle Untersuchungen deuten jedoch auch bei Insekten auf die Präsenz mehrerer Rezeptortypen mit verschiedenen G-Protein gekoppelten Signalwegen hin (Abdallah et al. 1991, Hannan und Hall 1993). Injektionen membranpermeabler Substanzen, die direkt mit einzelnen Komponenten der potentiell aktivierten Signalwege interagierten, zeigten eine Beteiligung der Adenylatzyklase und der Phospholipase C an der Kontrolle des Stridulationsverhaltens von Feldheuschrecken (Heinrich et al.

2001, Wenzel et al. 2002). Gesang konnte Beispielsweise durch direkte Aktivierung der Adenylatzyklase mittels Forskolin, durch Steigerung der zytosolischen cAMP Konzentration mittels Applikation von 8Br-cAMP und durch Hemmung des cAMP umwandelnden Enzyms Phosphodiesterase ausgelöst werden (Abb. 1.3). Evidenzen für eine muskarinerg vermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase wurden bisher nur an Gewebeextrakten und transfizierten Zellen von Säugetieren gefunden (Enyedi et al. 1982, Olianias und Onali 1992).

Wenzel et al. (2002) konnten zeigen, dass die Hemmung der Phospholipase C durch U-73122 (inhibiert die PLC direkt) oder Neomycin (blockiert PIP₂, das Substrat der PLC) muskarinerg induzierten Gesang vollständig unterdrücken kann. Pharmakologische Interventionen mit den beiden möglichen, über die PLC vermittelten Second Messenger Signalwegen zeigten jedoch bisher keine signifikanten Effekte.

Aus diesen Befunden folgerten Wenzel et al. (2002), dass sowohl durch Adenylatzyklasen als auch durch PLC initiierte Second Messenger Signalwege an der Gesangsauslösung beteiligt sind. Ob beide Signalwege in denselben Zentralkörperneuronen exprimiert sind und wie sie gegebenenfalls bei der Gesangsinitiierung miteinander interagieren könnten, konnte bisher nicht geklärt werden. Deshalb sollte im Rahmen dieser Dissertation eine Methode zur vitalen Markierung der Gesang kontrollierenden Zentralkörperneurone und ihrer anschließenden Untersuchung in dissoziierter Zellkultur entwickelt werden.

Zur Markierung der an der Gesangskontrolle beteiligten Neurone wurde ein neuronaler Tracer in die Hirnregionen, in denen Stridulation zuverlässig ausgelöst werden konnte, coappliziert. Die verwendeten Tracer waren kleine (MW 3.000 und 10.000) fluoreszenz- oder biotinkgekoppelte Dextrane. Neben der Möglichkeit, die Morphologie einzelner Nervenzellen vollständig darzustellen (Glover et al. 1986, Fritsch und Wilms 1990, Fritsch 1993, Heinrich et al. 1998, Reischig und Stengl 2002, Reischig et al. 2004), offeriert diese Art der Markierung auch, gefärbte Neurone in einer primären Kultur vereinzelter Neurone wieder zu finden und einer detaillierten physiologischen Analyse zugänglich zu machen (Lakes-Harlan et al. 1998, Grünwald 2002).

Seit der Etablierung der ersten neuronalen Primärzellkultur aus der Schabe *Periplaneta americana* (Chen und Levi-Montalcini 1970) ist die Entwicklung der Kultivierungsmethoden kontinuierlich fortgeschritten (Beadle 2006). Insbesondere Modelorganismen wie der Tabakswärmer (*Manduca sexta*) (Hayashi und Hildebrandt 1990, Mercer et al. 1995), die Taufliege *Drosophila melanogaster* (Wu et al. 1981) und die Feldheuschrecken *Locusta migratoria* (Kirchhof und Bicker 1992, Pfahlert und Lakes-Harlan 1997) und *Schistocerca gregaria* (Giles et al. 1978, Giles und Usherwood 1985) sind für solche in vitro Studien herangezogen worden.

Überwiegend dienten die Zellkulturen detaillierten morphologischen Analysen (De-

vaud et al. 1995), aber auch der elektrophysiologischen Charakterisierung isolierter Neurone (Lees et al. 1985), da ausgedehnte Zellen im Tier schwierig auf eine Spannung zu klemmen sind und sich die den Erregungsvorgängen zugrunde liegenden Ströme somit nur schwer ermitteln lassen. Die Methode der Patch-Clamp Technik (Hamill et al. 1981) ermöglichte auch den Zugang zu filigraneren Somata, wie denen der Kenyonzellen der Pilzkörper (Cayre et al. 1998, Benkenstein et al. 1999, Wüstenberg und Grünewald 2004). Ableitungen in der Whole-Cell-Konfiguration bleiben über lange Zeit stabil, was die pharmakologische Charakterisierung mittels Druck- und Badapplikationen vereinfacht. Da die isolierten Neurone ihre pharmakologische Identität beibehalten, konnten auch rezeptorvermittelte Ionenströme an Zellkulturen umfangreich analysiert werden (Beadle et al. 1989, Aydar und Beadle 1998, Barbara et al. 2005). Eine weitere Möglichkeit Membranpotentiale oder Konzentrationen von kleinen Molekülen oder Ionen in Zellen und Geweben zu messen, bietet die Kopplung mit fluoreszierenden Indikatormolekülen (Tsien 1989).

In der vorliegenden Arbeit wird neuronales Tracing mit morphologischen Kontrollen *in situ* und der physiologischen Charakterisierung isolierter Neurone kombiniert. Ziel ist es, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, am Gesangsverhalten beteiligte Neurone selektiv zu markieren und für eine physiologische Charakterisierung zugänglich zu machen. Bei der Charakterisierung intravital markierter Neurone kommen elektro- und optophysiologische Methoden zum Einsatz. Die Untersuchungen sollen neue Erkenntnisse zur Kontrolle des Gesangsverhaltens von Feldheuschrecken erbringen und die bisherigen, *in vivo* gewonnenen Einblicke ergänzen.

Dazu sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Generelle Charakterisierung von Primärzellkulturen des Heuschreckengehirns von *Ch. biguttulus*.
- Potentiell pharmakologisch stimulierte Zentralkomplexneurone vital markieren und unter zusätzlichen Identitätskontrollen in Kultur identifizieren, sowie intravital markierte Neurone in Hirnschnitten anhand ihrer Färbemuster bekannten Neuroneklassen zuzuordnen.
- Etablierung eines Patch-Clamp-Setups und generelle Charakterisierung spannungs- und ligandenabhängiger Kanäle intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen mittels elektrophysiologischer Methoden.
- Pharmakologische Stimulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren intravital markierter Neurone und Analyse muskarinischer Reaktionen mittels optophysiologischer Methoden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Untersuchungen wurden an adulten Männchen der Art *Ch. biguttulus* durchgeführt. Die Tiere wurden während des Sommers auf verschiedenen Wiesen rund um Göttingen gefangen und im Labor bei 30 °C mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14/10 h gehalten. Frisches Gras und junger Weizen, sowie Grillenaufzucht- und Basisfischfutter dienten als Nahrung. In den Wintermonaten stand die F1 Generation der im Vorjahr gefangenen Tiere zur Verfügung. Für die Eiablage wurden mit feuchtem Vermiculat gefüllte Behältnisse in den Käfigen aufgestellt. Die eingesammelten Gelege der Weibchen wurden für die notwendige Diapause mindestens drei Monate in einem Kühlschrank (4 °C) gelagert. Für die Weiterentwicklung wurden sie in einen Wärmeschrank (25 °C) überführt, wo sie nach etwa einer Woche schlüpften.

2.2 Pharmakologische Gesangstimulation und intravitale Markierung von Hirnneuronen

2.2.1 Versuchsaufbau und Präparation

Der Fixierung der Versuchstiere in der Messapparatur (Schema in Abb. 2.1) diente eine mit Sylgard (Silicon Elastomer Kit, Dow Corning, Midland) beschichtete Plattform, die mit einem Kugelgelenk auf einem schwingungsgedämpften Tisch befestigt war. Mit Hilfe eines Kolophonium-Bienenwachs-Gemisches wurde der Kopf der Heuschrecke am Pronotum fixiert. Das Pronotum wurde zusätzlich durch eine Wachsbrücke am Tierhalter befestigt. Um das Oberschlundganglion freizulegen wurde die dorsale Kutikula des Kopfes mit einem Skalpell V-förmig vom mittleren Frontbereich lateral bis hinter die Komplexaugen eingeschnitten. Ein weiterer frontaler Schnitt ermöglichte das laterale Aufklappen der Kopfkapsel in Richtung der Komplexaugen. Die lateral weggeklappten Teile der Kopfkapsel wurden mit Minutiennadeln im Sylgard des Tierhalters fixiert. Nach vorsichtiger Entfernung von dorsalen Teilen der Kopfkapsel, sowie Tracheen, Luftsäcken und Muskulatur lag die dorsale Seite des

Oberschlundganglions frei. Das Gehirn wurde während des gesamten Experiments zum Schutz vor Austrocknung mit Locusta-Ringer bedeckt (siehe Anhang).

Pharmaka und Tracer wurden durch spitz ausgezogene (Elektrodenziehgerät Nari-shige PE-2, London) Doppelkammerkapillaren injiziert (Harvard Apparatus TGC 200-10, Holliston), die an einem Elektrodenhalter eines mechanischen Mikromanipulators (Leica, Wetzlar) angebracht wurden. Über spezielle Anschlussstücke (Acu-firm 1405 LL-4, Dreieich) und Kunststoffschläuche wurden die Kammern der Elektroden mit der Injektionspumpe (WPI PV820, Berlin) verbunden und mit einem Kolophonium-Bienenwachs-Gemisch luftdicht verklebt. Dies ermöglichte die Applikation zweier verschiedener Substanzen an dieselbe Stelle im Gehirn. Vor Beginn des Experiments musste die Spitze der Kapillare unter optischer Kontrolle (Binocular Leica MS5, Wetzlar) auf einen Durchmesser von etwa 10 – 15 μm abgebrochen und die Stärke und Dauer des Druckpulses so justiert werden, dass die austretende Menge der Agenzien ca. 1 – 3 nl betrug (Heinrich und Elsner 1997).

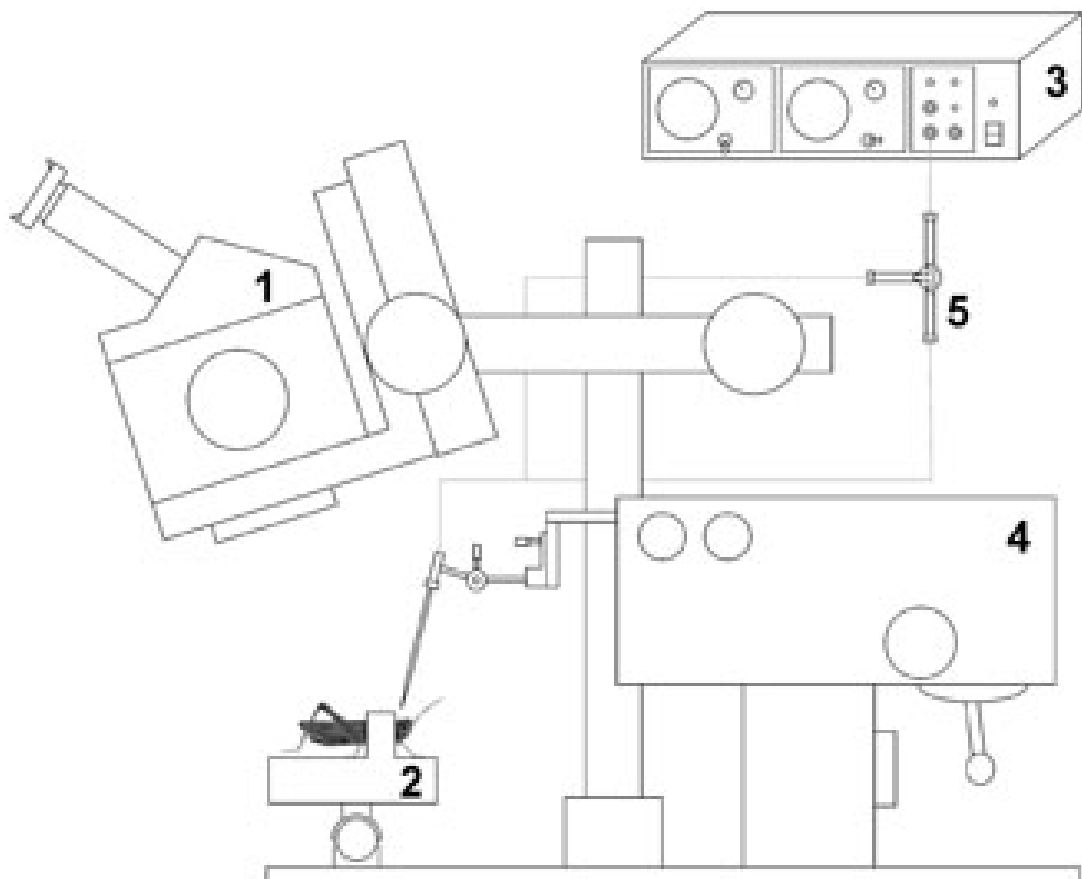


Abbildung 2.1: Schema des Messplatzes zur Druckinjektion. 1 Binocular, 2 Tierhalter, 3 Injektionspumpe, 4 Mikromanipulator, 5 Dreiwegehahn.

2.2.2 Versuchsdurchführung

Nach der Freipräparation der dorsalen Oberfläche des Heuschreckengehirns erfolgte das Einstechen der Kapillare in den zentralen Bereich des Protocerebrums, der sich in vorangegangenen Arbeiten (Heinrich und Elsner 1997, Heinrich et al. 2001, Wenzel et al. 2002) als zuverlässiger Stimulationsort für die artspezifische Stridulation erwiesen hatte. Als effektive Stimulationsorte konnten der Zentralkörper, sowie das zu diesem posterior und dorsal liegende dendritische Verzweigungsgebiet der Stridulationskommandoneurone ermittelt werden. Nach wiederholtem, zuverlässigem Auslösen des Gesangs durch Muskarininjektion (1 mM; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) an einem bestimmten Stimulationsort wurde an derselben Stelle ein fluoreszenz- oder biotinkoppeltes Dextran (0,5%; Tetramethylrhodamin, Rhodamingreen, oder Biotin (10.000 MW, Lysine fixable, Invitrogen, Karlsruhe) injiziert. Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass die Dextrane weitgehend selektiv über die Postsynapsen in die zentralnervösen Neurone aufgenommen werden, sich in diesen ausbreiten und anhand der dextrangekoppelten Marker in den Zellkörpern detektiert werden können (Heinrich et al. 1997, Reischig und Stengl 2002, Reischig et al. 2004). Die Kopfkapsel wurde anschließend mit steriler Vaseline versiegelt und das Tier für 24 h in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Steriltechnik

Das Anlegen der Primärkulturen erfolgte unter einer Reinluftwerkbank (Horizontal Laminar Flow Cabinet, Series CLF 475, Clean Air Technik, Utrecht). Vor Inbetriebnahme der Sterilbank wurde diese mit UV-Licht bestrahlt und mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

Gebrauchsgegenstände wie Pasteurpipetten (Brand, Wertheim), Pipetten (Eppendorf, Hamburg), Deckgläser (10 mm, Hartenstein, Würzburg) und Laborgefäße wurden vor ihrer Nutzung autoklaviert (EL 2540 Benchttop Sterilizer, Tuttnauer, Breda).

Kulturgefäße (Cell Culture Dish, Corning Inc., New York) und Spritzen (1 ml mit Nadel, Terumo, Leuven und 5 ml B. Braun, Melsungen), sowie die benutzten Flüssigmedien (L15 Leibowitz, HBSS, Invitrogen, Karlsruhe; fötales Kälberserum Sigma-Aldrich, Hamburg) wurden steril vom Händler bezogen. Dem Flüssigmedium L15 wurde 0,5% Gentamycin (Sigma-Aldrich, Hamburg) beigemischt und das fötale Kälberserum wurde vor der Zugabe nochmals steril gefiltert (Minisart, Porengröße 0,2 µm, Sartorius, Göttingen).

Mit Ausnahme der Medien wurden die Materialien nach der Autoklavierung bis zum Gebrauch in einem von UV-Licht durchfluteten Metallschrank (Eigenbau) aufbewahrt.

2.3.2 Gewinnung der Primärkultur

Zum Abtöten exogener Keime wurde der Kopf der Heuschrecke nach vorsichtiger Entfernung des Vaselinepfropfens kurz in 70 %iges Ethanol getaucht. Das Tier wurde in einer mit Sylgard beschichteten und mit Locusta-Ringer (siehe Anhang) gefüllten Präparationsschale fixiert. Bei der anschließenden Extraktion des Gehirns musste sorgsam darauf geachtet werden, den Oesophagus der Heuschrecke nicht zu beschädigen, da es sonst zu erheblicher Kontamination des Nervengewebes durch den austretenden Inhalt kommen konnte.

Das so isolierte Gehirn wurde in eine mit modifiziertem Flüssigmedium (L15 mit 0,5 % Gentamycin) gefüllte Kulturschale überführt. Da die Sterilität des Mediums während der Präparation nicht gewährleistet werden konnte, wurde das Gehirn unter der Sterilbank nochmals in eine neue Kulturschale überführt. Um die spätere Dissoziation zu vereinfachen wurde das Hirngewebe im Wärmeschrank (Umluft-Trockenschrank Heraeus UT 6060 AR Kendro, Heraeus, Hanau) durch ein Enzymgemisch aus Collagenase/Dispase (je 1 mg/ml, Sigma-Aldrich, Hamburg) für 15 min angedaut. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion und zur Erleichterung der Zelldissoziation wurden die Hirne anschließend für 15 min in Kalzium- und Magnesiumfreier HBSS-Lösung inkubiert. Die mechanische Vereinzelung der Zellen erfolgte in einem 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock-Tube durch mehrfaches Einsaugen in eine 100 µl Eppendorf-Pipette. Die Tubes wurden danach kurz zentrifugiert (Quick Spin 7000, Süd-Laborbedarf, Gautling) und der Überstand abpipettiert. Die Zellpellets wurden in 100 µl modifiziertem Flüssigmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf ein rundes Deckglas (10 mm) in einer Kulturschale gegeben.

Um die Anheftungsbedingungen der Zellen zu optimieren wurde das Deckglas zuvor eine Stunde mit sterilem Conavalin A (1 mg/ml; Lectin von *Canavalia ensiformis*, Sigma-Aldrich, Hamburg) beschichtet und anschließend dreimal mit salzhaltigem Phosphatpuffer (PBS 0,1 M) gewaschen. Damit die Zellen sich auf dem beschichteten Deckglas absetzen konnten, wurde die Kulturschale erst nach einer Stunde mit 4 ml modifiziertem Medium (L15 mit 0,5 % Gentamycin und 5 % Fötale Kälberserum) aufgefüllt. Die Primärkultur wurde in einem Brutschrank (B 6120, Heraeus, Hanau) bei 29 °C in Raumtemperatur und angefeuchteter Luft gehalten.

Elektrophysiologische Experimente sowie optische Ableitungen wurden etwa 24 h nach Kulturnahme durchgeführt. Bei den für histologische Untersuchungen vorgesehenen Kulturen wurde das Medium alle zwei Tage ausgetauscht.

2.3.3 Histologische Untersuchungen der kultivierten Zellen

2.3.3.1 Vitalitätsnachweis

Mit Hilfe des Markers Trypanblau sollte die Vitalität der dissoziierten und in Kultur genommenen Zellen untersucht werden.

Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff, der für Vitalfärbungen gebräuchlich ist. Lebende Zellen schließen den sauren Farbstoff aus und tote Zellen werden dunkelblau angefärbt. Da Trypanblau zytotoxisch für die Zellen ist, muss die Beobachtung jedoch nahezu unmittelbar nach Farbstoffzugabe durchgeführt werden.

Das Medium der Zellkultur wurde für 30 s durch eine 0,5 %ige Trypanblau Lösung ausgetauscht. Anschließend wurde die Kultur vorsichtig mit PBS gespült und unmittelbar danach lichtmikroskopisch ausgewertet.

2.3.3.2 Kernfärbung

Um Genaueres über die Eigenschaften der kultivierten Zellen zu erfahren wurden Kernfärbungen mit Markierungen durch unterschiedliche spezifische Antikörper kombiniert.

Der Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, Hamburg), durchdringt perforierte Membranen nekrotischer Zellen und lagert sich zwischen Nukleinsäuren im Zellkern an. Die fixierten (1 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer (PB)) Kulturen wurden für 10 min mit Propidiumiodid (1:1000) inkubiert.

Des Weiteren wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich, Hamburg) eingesetzt, der an die DNS bindet und somit ebenfalls für Kernfärbungen genutzt werden kann. Die Kulturen wurden nach einstündiger Fixierung (4 % PFA in PB) für 30 min mit DAPI (1:1000) inkubiert.

2.3.3.3 Immunzytochemische Charakterisierung

Die Zellkulturen wurden für eine Stunde in PFA (4 % in PB) fixiert. Anschließend erfolgte eine Spülung mit PBS und die Permeabilisierung mit Triton-X-100 haltigem PBS (0,1 %). Um eventuelle Hintergrundfärbungen gering zu halten, wurde mit einem Blockpuffer (10 % Normalserum des Tieres, aus dem der sekundäre Antikörper stammt, 0,25 % BSA in PBS/0,1 % Triton-X-100) geblockt. Die Lösungen mit den primären Antikörpern wurden ebenfalls in Blockpuffer angesetzt und bei 4 °C über Nacht mit den kultivierten Zellen inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Zellen für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Das Eindeckeln der Kulturen in PBS/Glycerin (1:1) auf Objekträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) erfolgte nach mehrmaligem Spülen mit PBS/0,1 % Triton-X-100.

Folgende primäre und sekundäre Antikörper wurden benutzt:

Name	Tier	Konzentration	Quelle
α -mAChR	Rabbit	1:500	DB Sattelle
α -HRP	Rabbit	1:100	Sigma
α -SAP-47	Mouse	1:100	A Hofbauer
α -Repo	Mouse	1:50	DSHB

Tabelle 2.1 Verwendete primäre Antikörper.

Die Spezifität des verwendeten Antikörpers gegen mAChR für Insekten wurde bei *Drosophila melanogaster* (Blake et al. 1993) und *Ch. biguttulus* (Hoffmann et al. 2007) nachgewiesen, die des α -HRP-Antikörpers bei *Drosophila melanogaster* (Jan und Jan 1982) und *Schistocerca gregaria* (Jan und Jan 1982, Snow et al. 1987, Schäfer und Lakes-Harlan 2000). Der α -Repo-Antikörper ist spezifisch für *Drosophila melanogaster* (Campbell et al. 1994, Xiong et al. 1994) und *Schistocerca gregaria* (Halter et al. 1995). Für den α -SAP-47- (Reichmuth et al. 1995) konnte eine Spezifität bisher bei *Drosophila melanogaster* gezeigt werden.

Name	Tier	Konzentration	Quelle
α -rabbit Cy2	Goat	1:1000	Jackson
α -rabbit FITC	Goat	1:1000	Invitrogen
α -mouse Cy3	Goat	1:1000	Invitrogen
α -rabbit Alexa 633	Goat	1:300	Invitrogen

Tabelle 2.2 Verwendete sekundäre Antikörper.

2.3.4 Auswertung

Immunzytochemisch oder histologisch markierte Zellkulturen wurden mit dem inversen Mikroskop CKX 41 (Olympus, Hamburg) und dem Konfokalen Laser Scan Mikroskop TCS SP2 (Leica, Wetzlar) betrachtet und fotografiert. Kontrastoptimierung, sowie die Anwendung eventueller Filter (Mean oder Median) und die Überlagerung von Bildausschnitten unterschiedlicher Fluoreszenz erfolgten mit dem Open Source Grafikprogramm WCIF ImageJ (Version 1.37c).

Die Bestimmung von Colokalisation erfolgte über die Methode der Distanzbasierenden Colokalisation (Bolte und Cordellières 2006) mit dem ImageJ Plugin JACoP. Mit diesem Plugin wird der Schwerpunkt einer gefärbten Struktur bestimmt. Die Schwerpunkte der gefärbten Strukturen unterschiedlicher Fluoreszenz werden anschließend

miteinander verglichen. Wenn der Abstand der beiden detektierten Schwerpunkte der verschiedenen Fluoreszenzfärbungen unterhalb des Auflösungsvermögens des Mikroskops liegt, wird dies als Colokalisation betrachtet und hervorgehoben.

Die im Ergebnisteil dargestellten Bilder wurden in CorelDraw (Version 12, CorelDraw Corporation) weiter bearbeitet und zu Abbildungen arrangiert.

2.4 Markierungen im Heuschreckengehirn

2.4.1 Lokalisation markierter Neurone

Um die Lage und Struktur der potentiell pharmakologisch stimulierten Neurone im Heuschreckengehirn zu ermitteln, wurde für ihre Markierung ein biotinkoppeltes Dextran verwendet. Nach Extraktion des Gehirns erfolgte die Fixierung mit PFA (4% in PB) über Nacht. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde das Präparat in ein Gelatine/Albumin Gemisch eingebettet und mit PFA (4% in PB) nachfixiert. Von dem eingebetteten Gehirn wurden nach einem Tag mit einem Vibratom (VT 1000S, Leica, Wetzlar) 50 µm dicke Horizontalschnitte erstellt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Schnitte mit fluoreszenzgekoppeltem Streptavidin (Alexa 488 in PBS/0,1% Triton-X-100, 1:1000) inkubiert, welches mit hoher Affinität an das im Gewebe fixierte Biotin bindet. Nach erneutem Spülen wurden die Schnittpräparate auf Objektträger überführt, mit PBS/Glycerin (1:1) überschichtet und eingeschlossen. Die Schnitte konnten nun unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert werden.

2.4.2 Doppelfärbung

Die Markierung von Hirnneuronen durch Injektion eines biotinkoppelten Dextrans wurde in einigen Experimenten mit einer Antikörperfärbung gegen muskarinische ACh-Rezeptoren kombiniert.

Die Visualisierung des injizierten Biotins wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Bei Doppelfärbungen mit einem Antikörper gegen mAChR erfolgte die 48-stündige Inkubation mit dem primären Antikörper vor der Zugabe von Streptavidin. Abweichend zu Tabelle 2.1 lag die bei Schnitten verwendete Konzentration des primären Antikörpers bei 1:200. Der sekundäre Antikörper wurde gemeinsam mit Streptavidin inkubiert. Um ein Überstrahlen des Emissionslichts der verwendeten Fluorochrome zu vermeiden, wurde ein mit Alexa 633 gekoppelter sekundärer Antikörper gewählt (siehe Tabelle 2.2).

2.5 Elektrophysiologie

2.5.1 Versuchsaufbau

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung intravital markierter Zellen sollte ein Patch-Clamp-Setup errichtet werden.

Der Aufbau (Schema in Abb. 2.2) wurde auf einem schwingungsdämpfenden Tisch (Eigenbau; schwere Aluminiumplatte auf einem Metallrahmen in Sand gebettet und auf Tennisbällen gelagert) positioniert und durch einen Faradaykäfig vor elektrischen Störungen isoliert. Zur optischen Kontrolle wurde das inverse Mikroskop CKX 41 (Olympus, Hamburg) benutzt. Der Quecksilberbrenner U-LH100HG (Olympus Hamburg) und ein Filterset, bestehend aus einem dichrotischen Spiegel (DM500 und DM570), einem Anregungs- (BP460-490C und BP480-550C) und einem Sperrfilter (BA520IF und BA590) ermöglichten die Detektion gängiger Fluorochrome wie FITC, TRITC und Rhodamin. Zusätzlich war das Mikroskop mit einer, über eine externe Kontrollbox gesteuerten Kamera (DP12, Olympus, Hamburg) ausgerüstet.

Als Verstärker diente der analoge EPC 8 (Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz), der jedoch mittels des Acquisition Interface LIH 1600 (Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz) zum Teil über einen Computer (AMD Athlon XP 2500, 1,8 GHz) bedient werden konnte.

Die Ableitelektroden GB150T-8P (Science Products, Hofheim) wurden mit einem Patch-Programm des Elektrodenpullers Flaming/Brown P87 (Sutter Instruments, Novato) gezogen. Als indifferente Elektrode diente ein chlorierter Silberdraht.

Ein mechanischer Mikromanipulator (Eigenbau aus Elementen der Firmen Newport Corporation, Irvine und Physik Instrumente, Karlsruhe) ermöglichte eine genaue Positionierung der Glaspipette. Die elektronische Ansteuerung eingebauter Piezoelemente (Physik Instrumente, Karlsruhe) ermöglichte eine feinere Abstimmung bei der Formierung der Loose Patch-Clamp-Cell-Konfiguration.

Ein Zu- und Abflusssystem sorgte für einen kontinuierlichen Austausch der Badlösung. Der Zufluss wurde über ein spannungsgesteuertes (BPS-4, Scientific Instruments, New York) Perfusionssystem mit vier Reservoirs (ALA-VM4, Scientific Instruments, New York) kontrolliert. Zu- und Ablauf der Badlösung in die Messkammer erfolgte mittels modifizierter Pipettenspitzen, über deren Justierung der Flüssigkeitsspiegel reguliert werden konnte. Für einen laminaren Abfluss der Badlösung sorgte die Mini-Membran-Vakuumpumpe N86KN.18 (KNF Neuberger, Freiburg).

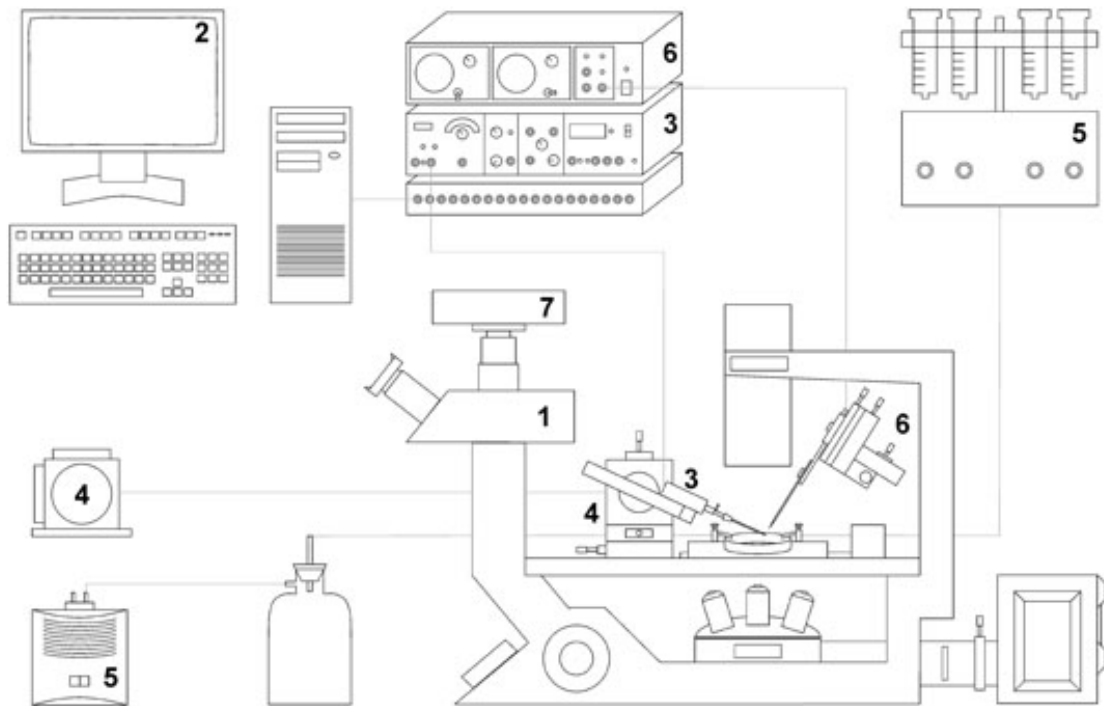


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau des Elektrophysiologiesetups. 1 Inverses Mikroskop, 2 Computer, 3 Patch-Clamp-Verstärker, 4 Mikromanipulator, 5 Perfusionssystem, 6 System zur Druckapplikation von Pharmaka, 7 Kamera.

2.5.2 Durchführung

Die Ableitungen intravital markierter Neurone in primären Zellkulturen erfolgten als Patch-Clamp-Messungen in der Whole-Cell-Konfiguration (Hamill et al. 1981).

Zuerst wurde die auf dem Deckglas gewachsene Zellkultur in die Messkammer überführt. Als Messkammer diente der Deckel der Kulturschale (Cell Culture Dish, Corning Inc., New York). Ein konisch geschliffenes Plastikinetz zentrierte das Deckglas mit der Zellkultur und verringerte das Flüssigkeitsvolumen in der Messkammer auf 2 ml. Der Zu- und Abfluss der Badlösung (ES1, siehe Anhang) erfolgte über ovale Ausbuchtungen im Inlett und ermöglichte einen turbulenzfreien Flüssigkeitsaustausch im Messbereich der Kammer.

Die frisch gezogenen, filamentfreien Elektroden wurden mit einem Mikroloader (Eppendorf, Hamburg) mit gefilterter Pipettenlösung (PS1, siehe Anhang; Minisart, Porengröße $0,2\ \mu\text{m}$, Sartorius, Göttingen) befüllt und eventuelle Luftblasen wurden entfernt.

Das Anlegen eines leichten Überdrucks auf die Pipette verhinderte das Verstopfen ihrer Spitze beim Eintauchen ins Bad. Das Offsetpotential, resultierend aus der Differenz zwischen dem chlorierten Silberdraht und der Pipettenlösung wurde durch eine Angleichung der Spannung kompensiert. Die durchschnittliche Offsetkorrektur V_p -Offset betrug $1,1\ \text{mV}$.

Mittels eines Testpulses (± 10 mV) wurde der proportionale Strom gemessen und der Widerstand der Pipette errechnet. Die benutzten Elektroden hatten Widerstände von 2 – 4 M Ω .

Es folgte die Formierung der Loose Patch-Clamp-Konfiguration über die elektronische Feinsteuerung des Mikromanipulators. Das Aufsetzen der Pipette auf der Zelloberfläche konnte sowohl optisch, durch einen halbmondförmigen Schatten um die Elektrodenspitze im Reliefkontrast, als auch durch einen Anstieg des Pipettenwiderstandes ermittelt werden. Die Entfernung des Überdrucks reichte meist aus, um einen dichten Abschluß zwischen Pipettenrand und Zelloberfläche („Seal“) herzustellen. Durch kurzes Anlegen eines leichten Unterdrucks wurde die Cell-Attached-Konfiguration stabilisiert und der Widerstand des Abschlusses in den Gigaohm Bereich erhöht („Gigaseal“). Das Haltepotential wurde auf -70 mV geklemmt und der kapazitive Widerstand der Pipette wurde kompensiert. Die Elektrodenkapazität betrug 5 pF. Mittels kurzen, leichten Saugens wurde die Membran der Zelle durchbrochen und der Ableitmodus in die Whole-Cell-Konfiguration überführt.

Die Datenaufnahme und die Applikation von Messprotokollen, also die Steuerung der Klemmspannung bei Voltage-Clamp Messungen und des Klemmstromes bei Current-Clamp Messungen, erfolgte über die Software Patchmaster v2.15 (Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz).

2.5.3 Datenauswertung

Mit der programmeigenen Online Analyse der Software Patchmaster konnten sowohl statistische Parameter als auch komplette Datenspuren in verschiedenen Formaten exportiert werden. Die statistisch ausgewerteten Parameter einer Datenspur wurden im ASCII Format exportiert und in das Programm Excel (Excel 2002, Microsoft) eingelesen. Vergleichende Statistik, wie die Bestimmung von Mittelwerten und Standardabweichungen zwischen verschiedenen Datenspuren sowie deren Darstellung als Diagramme erfolgten mit dem Programm Excel. Da bei den zum Teil relativ kleinen Stichprobengrößen eine Normalverteilung der zugrunde liegenden Werte nicht immer gewährleistet werden konnte, wurde zum Test auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Stichproben ein nicht parametrischer Rangtest (Mann Whitney U Test Sachs (2004)) herangezogen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$) wurden die Unterschiede der verglichenen Werte als signifikant angesehen und mit einem Stern (*) markiert.

Die im Ergebnisteil abgebildeten Ableitspuren wurden zunächst im Format Pulse v8.6 exportiert und mit Hilfe eines Makros in das Programm Igor Pro (Version 4.08; WaveMetrics) eingelesen. Diagramme und dargestellte Ableitspuren wurden

Anschließend in CorelDraw (Version 12, CorelDraw Corporation) weiter bearbeitet und zu Abbildungen arrangiert.

2.6 Optophysiological Messungen zytosolischer Kalziumkonzentrationen kultivierter Neurone

2.6.1 Beladen der Zellen mit Fura2/AM

Zur Messung der Kalziumkonzentration wurde der Fluoreszenzindikator Fura2/AM (Grynkiewicz et al. 1985) verwendet. Dieses Derivat eines Kalziumchelators hat als Komplex mit Ca^{2+} sein Absorptionsmaximum bei einer kürzeren Wellenlänge als in Abwesenheit von Ca^{2+} , so dass es in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration zu einer Verschiebung seines Anregungsspektrums kommt. Da Fura2 nicht membranfähig ist, wurde die Substanz in Form eines membranfähigen Acetoxymethylesters (Fura2/AM, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Nach der Aufnahme in lebende Zellen wird die Esterbindung durch endogene Esterasen gespalten, wodurch ein Ausreten des Farbstoffs verhindert wird und es zu einer Akkumulation von Fura2 in den Zellen kommt.

Das Beladen mit dem Ca^{2+} -Indikator erfolgte in einer kleinen temperaturregulierten Kammer auf einem Schüttler (Eigenbau). Die Zellkulturen wurden für 20 min bei 34°C in 0,5 ml modifizierten L15 Medium (siehe oben) mit $4\ \mu\text{l}$ Fura2-Lösung ($5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DMSO+10 % Pluronic für eine optimale Dispergierung) inkubiert und anschließend in ES1-Lösung (siehe Anhang) überführt.

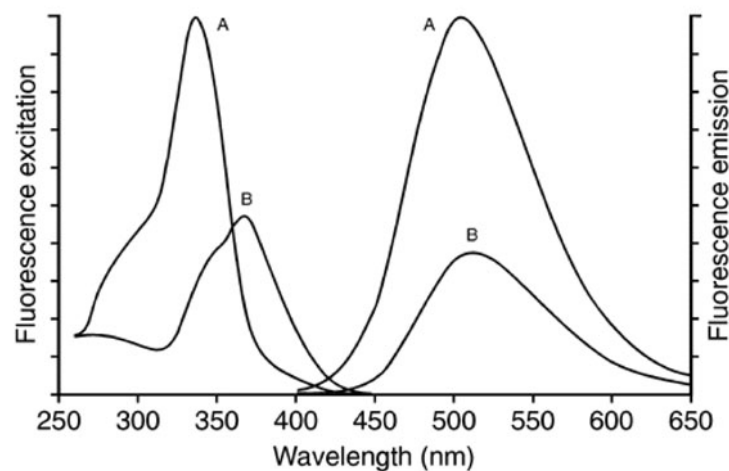


Abbildung 2.3: Anregungs- und Emissionsspektrum für Ca^{2+} gebundenes und Ca^{2+} freies Fura2. (verändert nach Grynkiewicz et al. (1985))

2.6.2 Versuchsaufbau

Die Fluoreszenzuntersuchungen (Schema in Abb. 2.4) wurden an einem aufrechten Mikroskop (Axioskop FS, Zeiss, Wetzlar) mit einem Wasserimmersionsobjektiv (x40, NA=0,75; Zeiss, Wetzlar) durchgeführt, welches mit einem druckluftgefederten Tisch (Eigenbau) verschraubt war.

Als Lichtquelle diente eine Xenon-Hochdrucklampe, deren Licht mit einem nachgeschalteten Monochromator (Polychrome II, TILL Photonics, Gräfelfing) spektral aufgeteilt wurde. Das monochromatische Licht wurde mit den für die Messung benötigten Wellenlängen 340/380 nm bzw. 555 nm über einen Lichtleiter in das Mikroskop eingekoppelt. Anschließend passierte es den für die Detektion der verwendeten Fluorochrome optimierten Filtersatz, bestehend aus dichroiden Spiegeln und Emissionsfiltern für Fura2 (450 – 480 nm) und für Tetramethylrhodamindextran (580 – 850 nm), um schließlich über ein Linsensystem (x0,69) von einem CCD Kamerachip (Sensicam em, PCO, Kelheim) registriert zu werden. Die mit dem Mikroskopisch verbundene Messkammer bestand aus einem, mit einem Glasboden verklebten, konisch geschliffenen Plastikintlett. Der Zu- und Abfluss der Badlösung erfolgte über Kanülen, die an der Messkammer fixiert waren. Eine Peristaltikpumpe (Watson Marlow 205 U, Rommerskirchen/Anstel) sorgte für einen kontinuierlichen Austausch der Badlösung in der Messkammer. Der elektronische Mikromanipulator (MM3A-EM, Kleindiek, Reutlingen) erlaubte die Positionierung der Applikationspipette (Bio-Medical Instruments, Warren, gezogen mit DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente, Augsburg) bis dicht vor die zu untersuchenden Zellen. Mittels der Druckpumpe PDES-02D (NPI, Tamm) wurden die in den Experimenten verwendeten Pharmaka in die Badlösung appliziert. Der Monochromator und die Kamera wurden über einen Computer (Celeron 2 GHz) mit der Software Imaging Workbench 5.2 (INDEC BioSystems, Santa Clara) gesteuert.

2.6.3 Durchführung

Nach Akkumulation des Ca^{2+} -Indikators in den kultivierten Zellen wurde das kulturtragende Deckgläschen in der Mitte der Messkammer fixiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Monochromators die Wellenlänge der Xenonlampe auf die Anregung des Dextranfarbstoffs eingestellt (555 nm) und die Kultur nach markierten Neuronen durchsucht. Nach erfolgreicher Detektion einer markierten Zelle wurde die Applikationspipette vorsichtig in unmittelbarer Nähe des Neurons (ca. 20 μm) positioniert. Danach wurde der gewählte Bildausschnitt sowohl mit dem für Tetramethylrhodamin als auch dem für Fura2 optimierten Anregungs- und Filtersystem mit der CCD Digitalkamera abfotografiert. Im Anschluss daran erfolgte die über den Computer gesteuerte optische Ableitung. Abwechselnd wurden die ausgewählten Zellen mit

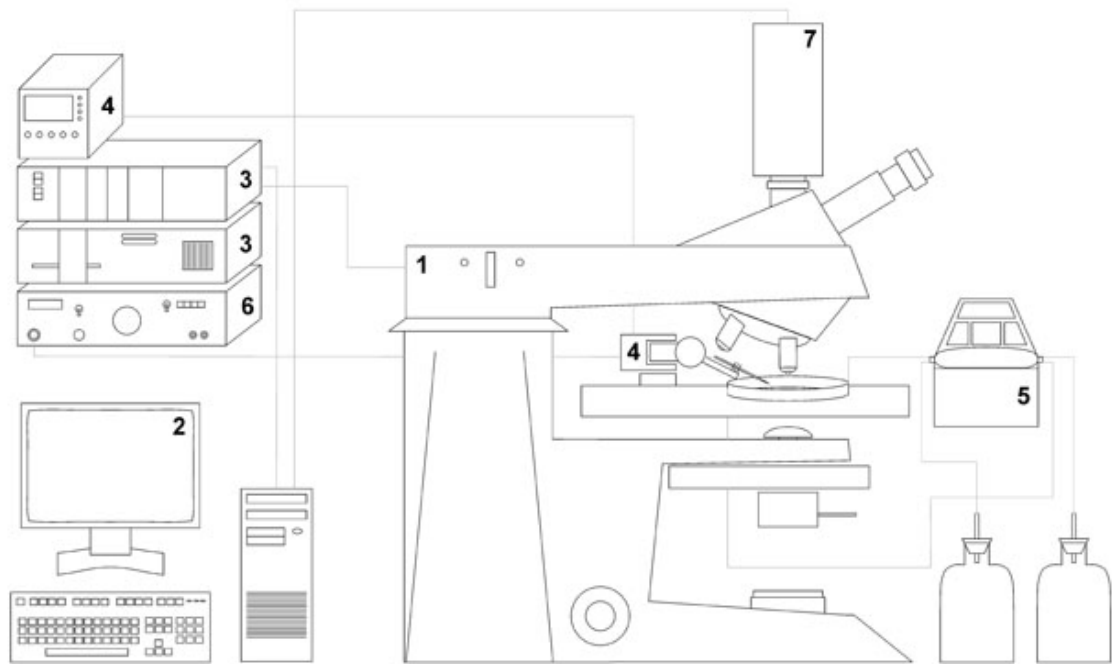


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau des Imagingsetups. 1 aufrechtes Mikroskop, 2 Computer, 3 Xenonlampe und Monochromator, 4 Mikromanipulator, 5 Perfusionssystem, 6 Applikationssystem für Pharmaka, 7 Kamera.

Licht der Wellenlängen 360 nm und 390 nm mit einer Frequenz von 1 Hz bestrahlt und Änderungen der relativen Helligkeit als kontinuierliche Änderungen (im Filmformat AVI) in drei separaten Spuren für je 360 nm, 390 nm Anregung und als Quotient beider Wellenlängen mit der Software Imaging Workbench (Version 5.2 INDEC Systems) digital registriert. Die Druckapplikation (1 Bar für 200 ms) der verwendeten Pharmaka erfolgte 50 s nach Beginn der Messung. Das Einwaschen modifizierter Lösungen oder die Zugabe hemmender Substanzen erfolgte über das Perfusionssystem. Folgende Substanzen kamen bei den pharmakologischen Experimenten in unterschiedlichen Konzentrationen zum Einsatz: Acetylcholin, 2APB, 8-Br-cGMP, Coffein, Muskarin, m-3M3FBS (alle von Sigma-Aldrich, Hamburg), Neomycin (ICN, Eschwege), U-73122 (Biomol, Hamburg).

2.6.4 Datenauswertung

Mit der Software Imaging Workbench konnten die im AVI Filmformat gespeicherten Aufnahmen gesichtet und Änderungen der relativen Helligkeit in den ausgewählten „Regions of Interest“ (ROI's) über die Zeit in einem STA Datenformat exportiert werden. Bildausschnitte der Zellkulturen wurden im TIF Bildformat exportiert. Kon-

trastoptimierung sowie die Anwendung eventueller Filter (Mean oder Median) und die Überlagerung der Kulturbilder unterschiedlicher Fluoreszenz, erfolgten mit dem Open Source Grafikprogramm WCIF ImageJ (Version 1.37c).

Die Änderungen der relativen Helligkeit des emittierten Lichtes der verschiedenen Wellenlängen wurden im STA Datenformat in das Programm Excel importiert und mit einer eigenen Matrix ausgewertet. Dabei wurde zunächst F_0 als Mittelwert der relativen Helligkeit des emittierten Lichtes der ersten 30 s einer Ableitung definiert und $F_{\Delta} = \frac{F_t - F_{t_0}}{F_{t_0}}$ für alle Datenpunkte bestimmt. Anschließend wurde durch die ersten 30 s und die letzten Minuten einer Ableitung eine Regressionsgerade gelegt. Steigung und Achsenschnittpunkt der Regressionsgeraden wurden mit der normierten Ableitspur verrechnet um die maximale Amplitude der Datenspur zur Bestimmung des maximalen Kalziumkonzentrationsanstiegs in Prozent ermitteln zu können. Das halbe Maximum der Amplitude diente der Berechnung der Halbwertsbreite (Full Width at Half Maximum oder FWHM) als Maß für die Signaldauer.

Die Bestimmung der maximalen Amplitude und der Halbwertsbreite der optisch registrierten Kalziumsignale wurde für die Wellenlänge 390 nm und den Quotienten der Wellenlängen 360 nm und 390 nm durchgeführt.

Vergleiche zwischen zwei Stichproben wurden mit einem nicht parametrischen Rangtest (Mann Whitney U-Test (Sachs 2004)) auf Signifikanz ($p < 0,05$) untersucht. Bei dem Vergleich der Reaktionen von markierten und nicht markierten Zellen auf die Applikation von Muskarin kam ein Chi Quadrat Test (Vierfeldertest (Sachs 2004)) zur Anwendung ($p < 0,001$).

Die im Ergebnissteil abgebildeten Ableitspuren wurden zunächst im STA Datenformat in Clampfit (Version 9.2, Axon Instruments) exportiert um sie in das Bildformat TIF zu konvertieren. Bilder, Diagramme und dargestellte Ableitspuren wurden anschließend in CorelDraw (Version 12, CorelDraw Corporation) weiter bearbeitet und zu Abbildungen arrangiert.

3 Ergebnisse

3.1 Primärzellkulturen aus dem Heuschreckengehirn von *Ch. biguttulus*

3.1.1 Allgemeine Charakterisierung der Primärzellkulturen

3.1.1.1 Absolute Zellzahlen der Primärzellkulturen

Sowohl die Gesamtzahl der Zellen einer Kultur, als auch die Verteilung auf den Deckgläschen variierte stark zwischen den verschiedenen Präparationen. Mögliche Gründe dafür sind die unterschiedlich intensive mechanische Vereinzelung und verschiedene Chargen des FCS. In der Regel war die Dichte der Zellen einer Kultur im Zentrum des Deckgläschens am höchsten und nahm zur Peripherie hin ab.

Um die ungefähre Zellzahl der Kulturen zu ermitteln, wurden die Zellen von 20 abfotografierten Bildern aus unterschiedlichen Bereichen derselben Kultur (Alter 2 Tage) gezählt und der Mittelwert auf die Gesamtfläche der Kultur hochgerechnet. Das ergab eine durchschnittliche Zelldichte von $11,2 (\pm 4,7)$ Zellen pro $0,01 \text{ m}^2$ ($n=7$). Bezogen auf die gesamte Fläche des Deckgläschens ergibt das eine Gesamtzellzahl von 87.940 Zellen pro Kultur (unveröffentlichte Daten von Gocht).

3.1.1.2 Vitalität und Identität der kultivierten Hirnzellen

Der durch den Vereinzelungsprozess bedingte Verlust der axonalen und dendritischen Fortsätze dürfte viele Neurone irreparabel schädigen und zum Zelltod führen. Um den Anteil der nach Kulturnahme überlebenden Hirnzellen zu ermitteln, wurden drei verschiedene Markierungen (mittels Trypanblau, Propidiumjodid und DAPI) durchgeführt. Des Weiteren wurden neuron- und gliaspezifische Marker eingesetzt, um die zelluläre Identität der kultivierten Zellen festzustellen. Beides, der Anteil vitaler Zellen und ihre Identität, ließ sich jedoch nur in einer Gesamtbetrachtung der unter beiden Gesichtspunkten durchgeführten Färbungen beurteilen. Deshalb sollen im Folgenden zunächst die generellen Ergebnisse der einzelnen Markierungsverfahren dargestellt werden, bevor diese anschließend für die Bestimmung der Lebendzellzahl und Zelltypen zusammengeführt werden.

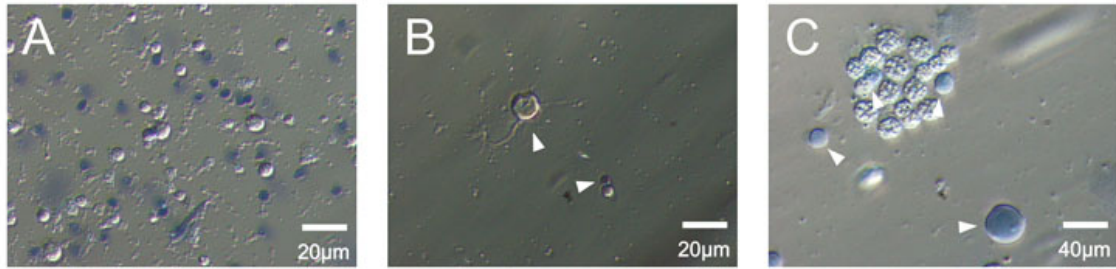


Abbildung 3.1: Trypanblaufärbung primärkultivierter Hirnzellen von *Ch. biguttulus*. A: Bild eines typischen Kulturausschnitts mit durch Trypanblau markierten und unmarkierten Zellkörpern. B: Trypanblau gefärbte tote Zelle neben ungefärbtem Neuron mit Neuriten. C: Große gefärbte Zelle neben einer Zellgruppe überwiegend intakter Zellen. Durchlichtbilder im Reliefkontrast. Kulturalter zwei Tage.

Die Trypanblaufärbung beruht auf dem Umstand, dass nur die vitalen Zellen den durch die Zellmembran eindringenden Farbstoff aktiv wieder heraustransportieren können, während sich der Farbstoff in sterbenden oder abgestorbenen Zellen im Zytosol anreichert.

Die Auswertung von mit Trypanblau behandelten Kulturen ergab, dass 60 % der Zellen in physiologisch schlechtem Zustand oder bereits abgestorben waren ($\pm 10,4\%$; $n=4$). Der Anteil der Zellen, die den Farbstoff wieder heraustransportieren konnten, betrug 40 %. Wie in dem Übersichtsbild (Abb. 3.1 A) dargestellt, sind die mit Trypanblau gefärbten Zellen zumeist kleiner als die Intakten. Weiterhin kann man erkennen (Abb. 3.1 C), dass alle nicht markierten Zellen eine granulierte Oberfläche besitzen und mit Trypanblau gefärbte Zellen keine Granulierung aufweisen. Das Neuron in Abbildung 3.1 B mit dem großen Soma zeigt keine Trypanblau Färbung und hat bereits nach zwei Tagen neue Fortsätze ausgebildet. Die Regeneration von Fortsätzen kann ebenfalls als Indiz für einen vitalen Zustand gewertet werden.

Der bei Wirbeltieren zur Kernfärbung nekrotischer Zellen eingesetzte Kernmarker Propidiumjodid bietet im Vergleich zu Trypanblau den Vorteil, dass es fixierbar ist und somit die Kombination mit einer Antikörperfärbung ermöglicht. Die in Abbildung 3.2 beispielhaft gezeigte Übersicht einer Propidiumjodid und anti-HRP Doppelfärbung vermittelt einen Eindruck der Anzahl vitaler Neurone in Zellkulturen.

Alle kultivierten Hirnzellen zeigten eine Propidiumjodid assoziierte Fluoreszenz, wobei die Intensität der Markierung stark unterschiedlich war (Abb. 3.2 A).

In der Detailansicht (Abb. 3.3) wird der Unterschied in der Intensität der Kernfärbung nochmals deutlich (Abb. 3.3 B). Das Neuron mit der deutlichen anti HRP Markierung (Abb. 3.3 C) zeigt eine schwächere Kernfärbung als die beiden anderen Zellen. Im differenziellen Interferenzkontrast kann man erkennen, dass die Oberfläche der Zellen mit starker Propidiumjodid Färbung glatter ist als die des nur schwach markierten Neurons.

Durchschnittlich zeigten 69,6 % der Zellen eine starke Propidiumjodidfärbung ($\pm 2,4\%$; $n=5$). Zu den 30,4 % der schwach gefärbten Zellen konnten keine Unterschiede

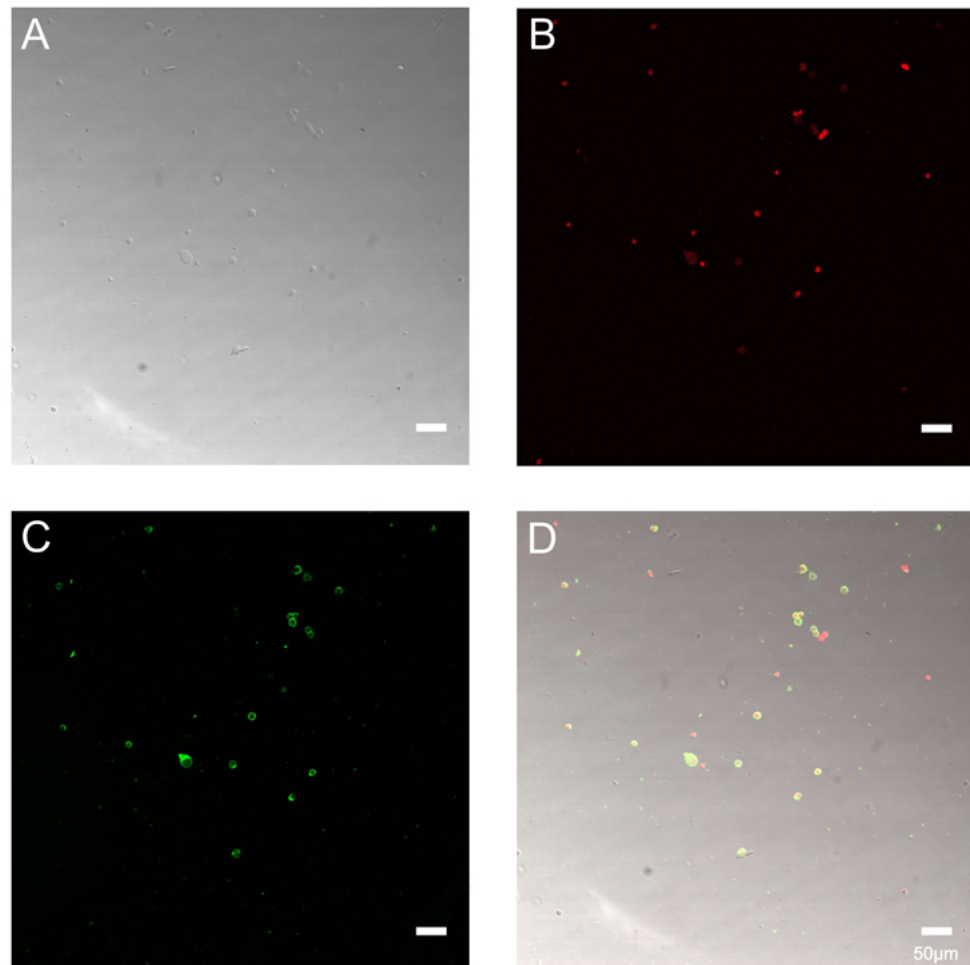


Abbildung 3.2: Propidiumjodid und anti-HRP Doppelfärbung primär kultivierter Hirnzellen von *Ch. biguttulus*. A: Ausschnitt der Zellkultur im differenziellen Interferenzkontrast. B: Rote Fluoreszenz: Propidiumjodid positiv gefärbte Zellen. C: Grüne Fluoreszenz: FITC gekoppelte anti-HRP Immunmarkierung D: Überlagerung der Bilder A, B und C. Konfokale Laserscanbilder. Kulturalter 2 Tage.

bezüglich ihrer Größe festgestellt werden, jedoch zeigten schwach gefärbte Zellen immer eine deutliche Granulierung.

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Vitalitätsmarker, so zeigt sich, dass die Anzahl der Trypanblau gefärbten Zellen einer Kultur von der Anzahl der deutlich durch Propidiumjodid markierten Zellen um ungefähr 10% abweichen ($60\% \pm 10,2$ zu $69,6\% \pm 2,4$). Die schwach mit Propidiumjodid gelabelten Zellen haben jedoch ebenso wie die unmarkierten Zellen bei dem Trypanblau Vitalitätstest eine ausgeprägte Granulierung.

Um das Verhältnis von vitalen zu toten oder sterbenden Zellen genauer zu klären, wurde deshalb zusätzlich eine DAPI Kernfärbung durchgeführt und mit einer anti-HRP Immunmarkierung kombiniert. Unveröffentlichte Ergebnisse von Gocht zeigten, dass auch mit einer DAPI Färbung zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden kann. Eine granuliert DAPI Kernfärbung zeigt lebende und eine gleichmäßig diffuse DAPI Kernfärbung tote Zellen an.

Das DIK Bild der mit DAPI markierten Zellen zeigt, dass der überwiegende Teil

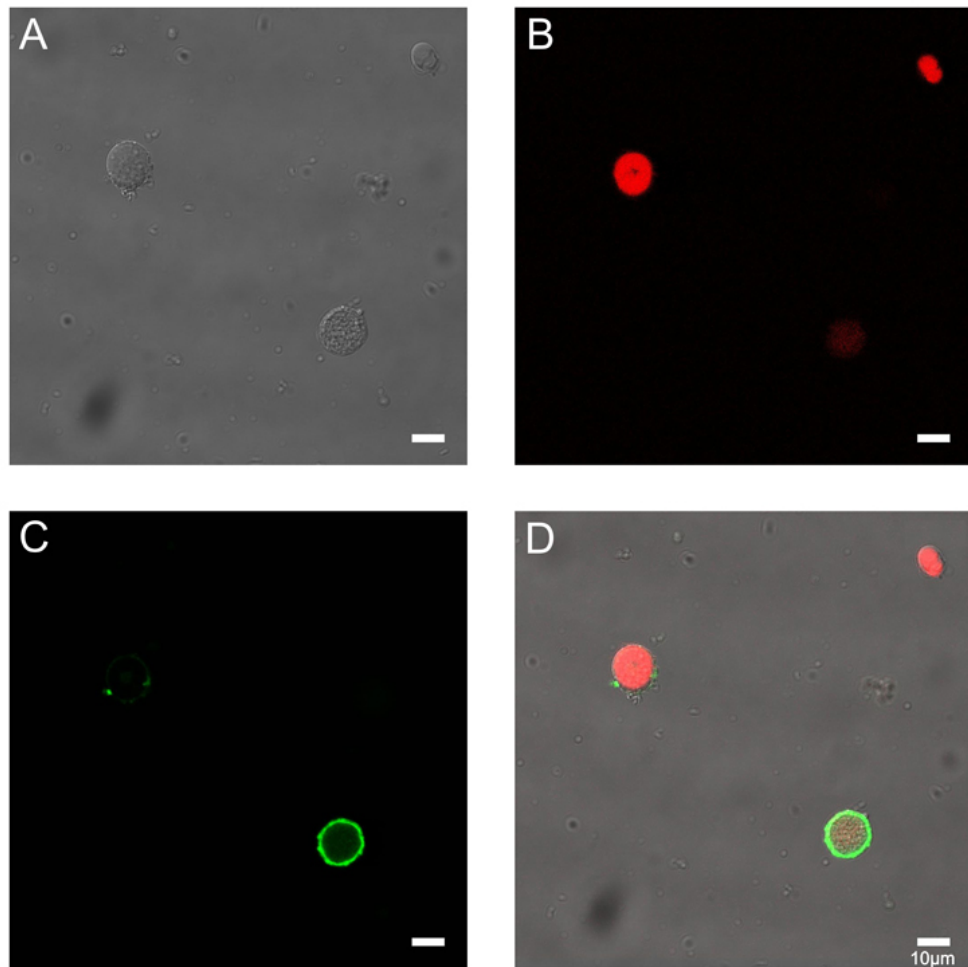


Abbildung 3.3: Detailansicht einer Propidiumjodid und anti-HRP Doppelfärbung primärkultivierter Hirnzellen von *Ch. biguttulus*. A: 3 Zellen im differentiellen Interferenz Kontrast. B: Rote Fluoreszenz: Propidiumjodid gefärbte Zellen. C: Grüne Fluoreszenz FITC gekoppelte anti-HRP Immunmarkierung. D: Überlagerung der Bilder A, B und C. Konfokale Laserscanbilder. Kulturalter 2 Tage.

der kleineren Zellen eine glatte Oberfläche aufweist (Abb. 3.4 A). Die vergrößerte Darstellung der mit DAPI markierten Zellen macht bei den beiden zentral gelegenen Zellen deutlich, dass die granulierte Oberfläche auch in der UV-Anregung sichtbar bleibt. (Abb. 3.5 B). Wenn man den Unterschied in der Oberflächenstruktur der Zellen bei einer DAPI Färbung als Differenzierungskriterium heranzieht, um die Verteilung von vitalen und potentiell toten Zellen zu berechnen, zeigen im Durchschnitt 61,2% der Zellen eine glatte und 38,9% der Zellen eine granulierte Zelloberfläche ($\pm 5,4\%$; $n=11$, unveröffentlichte Daten von Gocht). Auch dieser Vergleich zeigt dieselbe Tendenz wie die beiden herkömmlichen Vitalitätsmarker.

Der als Identitätsmarker verwendete Antikörper anti-HRP detektiert Oberflächenmoleküle sensorischer und zentralnervöser Neurone. (Abb. 3.2-3.5 C). Die anti-HRP Markierungsmuster in den Zellkulturen zeigen eine große Variabilität. Der durch Marker erkennbare Kern ist bei einigen Zellen vollständig und großflächig von einer anti-HRP Immunmarkierung umschlossen, wie einige zentral gelegene Zellen in Abbildung 3.2 D anschaulich belegen. Bei anderen Zellen beschränkt sich die Färbung

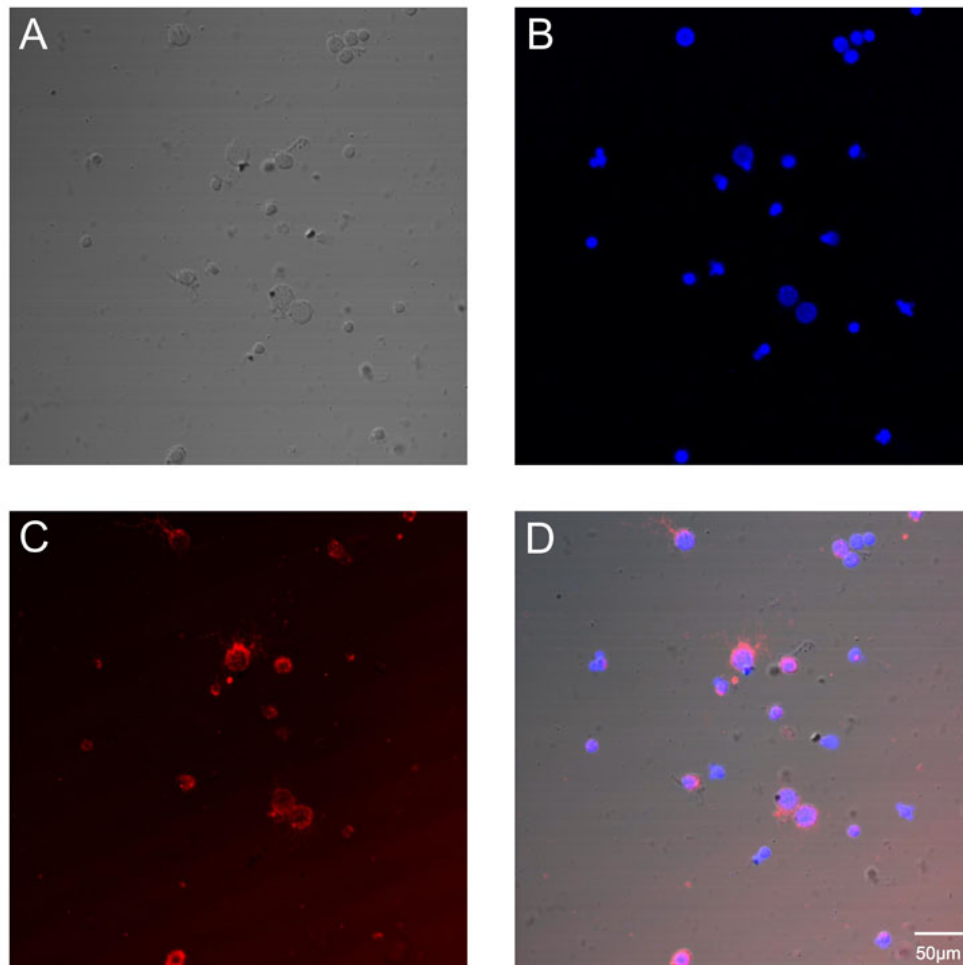


Abbildung 3.4: DAPI und anti-HRP Doppelfärbung primärkultivierter Hirnzellen von *Ch. biguttulus* Hirnzellen in Zellkultur. A: Ausschnitt einer Zellkultur im DIK. B: Blaue Fluoreszenz: DAPI Kernfärbung mit UV-Licht angeregt. C: Rote Fluoreszenz: CY3 gekoppelter anti-HRP Immunmarkierung. D: Überlagerung der Bilder A, B und C. Konfokale Laserscanbilder. Kulturalter 2 Tage.

auf einen schmalen zytosolischen Ring um einen großen Kern, wie in den vergrößerten Ausschnitten der Abbildungen 3.3 D und 3.5 D gut zu erkennen ist.

In Abb. 3.4 D und 3.5 D kann man erkennen, dass einige der anti-HRP positiv gefärbten Strukturen eindeutig vereinzelte Fragmente und keine intakten Zellen mehr sind. Einige der Zellen, die keine Granulierung aufweisen, zeigen eine auf kleine zytosolische Fragmente beschränkte anti-HRP Färbung, wie die kleine Zelle in der Detailansicht Abb. 3.5 unten rechts. Andere glatte Zellen (Abb. 3.4 oben rechts) zeigen absolut keine Antikörpermarkierung.

Durchschnittlich wiesen 69,8 % der Zellen einer Kultur zumindest rudimentär eine anti-HRP Immunmarkierung auf ($\pm 13,7\%$; $n=5$). Sowohl glatte als auch granulierende Zellen konnten eine anti-HRP Markierung aufweisen. Granulierte Zellen zeigten jedoch immer eine den Kern vollständig umschließende anti-HRP Immunfärbung.

Um zwischen Neuronen und Gliazellen in den Kulturen zu differenzieren, wurde zusätzlich eine anti-Repo Immunmarkierung durchgeführt. Der Repo Antikörper detektiert ein gliaspezifisches Homeodomain-Protein, wie in *D. melanogaster* nach-

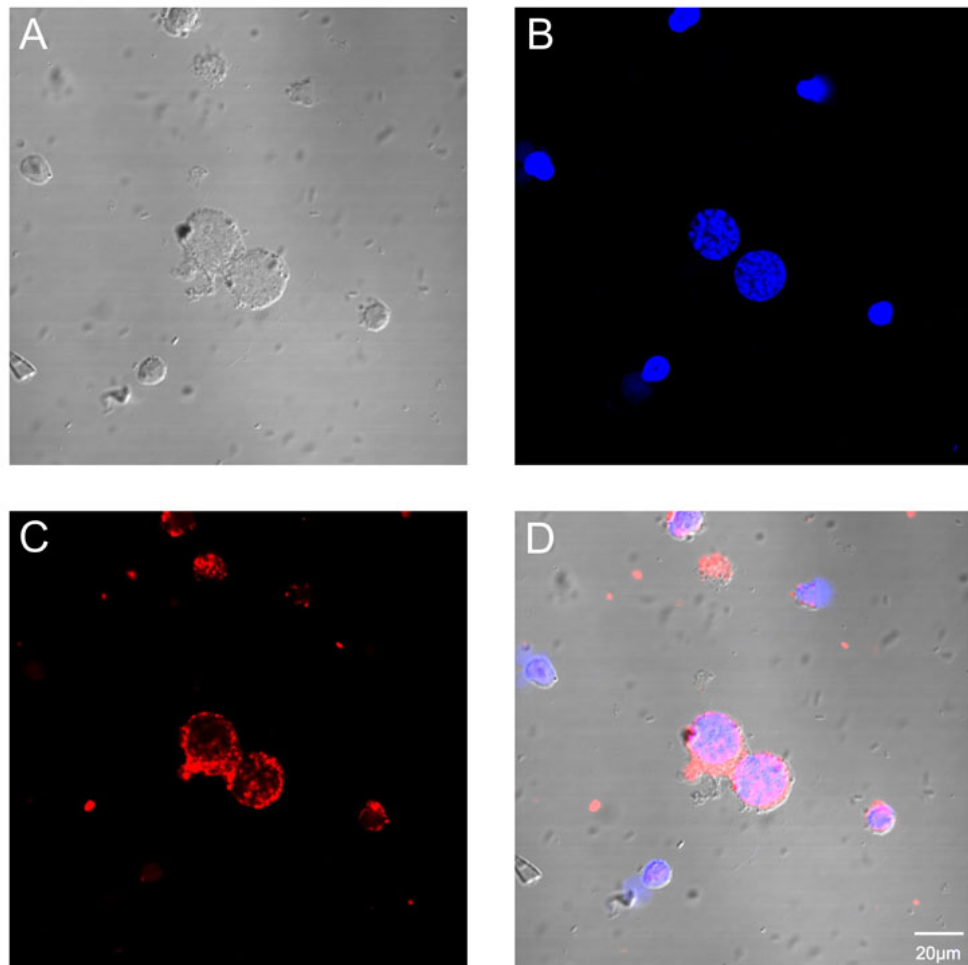


Abbildung 3.5: Detailansicht DAPI und anti-HRP Doppelfärbung primärkultivierter Hirnzellen von *Ch. biguttulus*. Vergrößerte Darstellung einiger Neurone aus Abb. 3.4 A; Vergrößerter Ausschnitt einer Zellkultur im DIK. B: Blaue Fluoreszenz: DAPI Kernfärbung mit UV-Licht angeregt. C: Rote Fluoreszenz: CY3 gekoppelte anti-HRP Immunmarkierung. D: Überlagerung der Bilder A, B und C. Konfokale Laserscanbilder. Kulturalter 2 Tage.

gewiesen (Abb. 3.6 C). Mit dem anti-Repo Antikörper konnten keine kultivierten Zellen aus dem Gehirn von *Ch. biguttulus* markiert werden. (Abb. 3.6 B). Dies könnte als generelles Fehlen von Gliazellen in den Primärzellkulturen gewertet werden, jedoch zeigte auch eine an Hirnschnitten von *Ch. biguttulus* durchgeführte Färbung keine Immunmarkierung von Gliazellen (ohne Abbildung).

Der gegen das *Drosophila*-spezifische Antigen Repo entwickelte Antikörper kann also bei *Ch. biguttulus* nicht zur Unterscheidung von Neuronen und Glia herangezogen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich Zellen ohne granulierte Oberfläche in einem schlechten physiologischen Zustand befinden. Die Anzahl der toten bzw. sterbenden Zellen einer Kultur lag sowohl bei dem Trypanblau- als auch bei dem DAPI-Test bei etwa 60%. Die Propidiumjodidfärbung zeigte mit 69,6% eine höhere Zahl toter Zellen an. Die Kombination von Kernmarkern mit einer anti-HRP Färbung zeigte, dass insbesondere granulierte Zellen eine deutliche Immunfärbung zeigten und somit als Neurone identifiziert werden können. Der umgekehrte Rück-

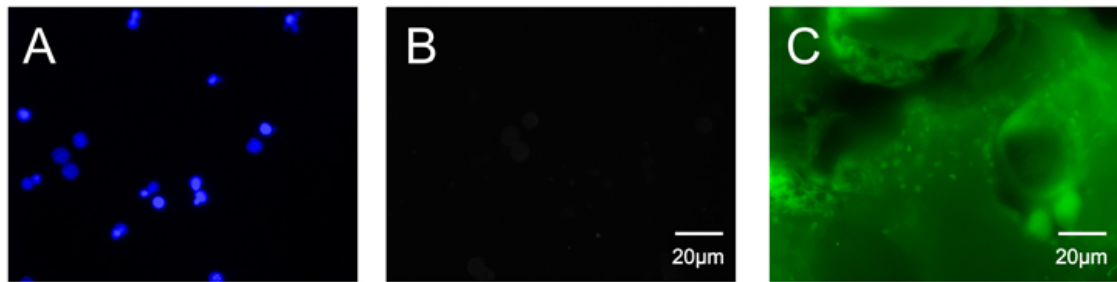


Abbildung 3.6: DAPI und anti-Repo Doppelfärbung primärkultivierter Hirnzellen von *Ch. biguttulus*. A: Blau fluoreszierende mit DAPI markierte Zellkerne kultivierter Hirnzellen. B: Grüne Fluoreszenz: derselbe Bildausschnitt wie A, mit theoretisch Alexa 488 immunmarkierten Gliazellen. C: Grüne Fluoreszenz: Ausschnitt eines Hirnschnittes von *D. melanogaster* dessen Immunmarkierung parallel nach demselben Protokoll durchgeführt wurde wie die Zellkulturfärbung. Alter der in A und B gezeigten Kultur 1 Tag.

schluss, dass Zellen mit glatter Oberfläche keine Neurone sind, kann jedoch nicht gezogen werden. Kultivierte Zellen mit glatter Oberfläche und fehlender anti-HRP Markierung könnten entweder Gliazellen sein oder Neurone in physiologisch schlechtem Zustand, deren Oberflächenantigene bereits degeneriert sind. Eindeutig vitale Zellen ohne anti-HRP Markierung waren in keiner der untersuchten Kulturen zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass die Primärzellkulturen aus dem Gehirn von *Ch. biguttulus* sehr wenige oder gar keine Gliazellen enthielten.

Bezieht man die Ergebnisse der Vitalitätsfärbungen auf die Gesamtzahl der Zellen einer Kultur, so befinden sich durchschnittlich zwischen 27.262 und 35.176 Zellen einer Kultur in einem vitalen Zustand.

3.1.1.3 Neuritenwachstum

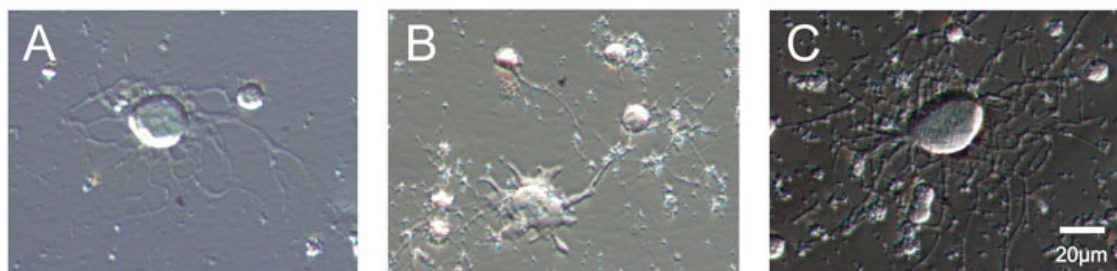


Abbildung 3.7: Ungerichtetes multipolares Neuritenwachstum primärkultivierter Neurone unterschiedlichen Kulturalters. A: Kulturalter 5 Tage. B: Kulturalter 13 Tage. C: Kulturalter 8 Tage. Durchlichtbilder im Reliefkontrast.

Unter optimalen Bedingungen ließen sich die aus dem Heuschreckengehirn vereinzelt Zellen über einen Zeitraum von bis zu 3 Wochen in Kultur am Leben erhalten. Einige der Neurone bildeten in Kultur erneut Fortsätze aus (Abb. 3.7 - 3.9). Die Anzahl der aus den Zellkörpern entspringenden Neuriten variierte stark. Einige Neurone bildeten ein diffuses Netzwerk aus Fortsätzen und erzeugten physische Kontakte zu eigenen Neuriten und benachbarten Zellen (Abb. 3.7 B und Abb. 3.7 C). Mit steigendem Kulturalter nahm sowohl die Anzahl der Neuriten (Abb. 3.7 C), als auch der Durchmesser der gebildeten Fortsätze zu (Abb. 3.7 B).

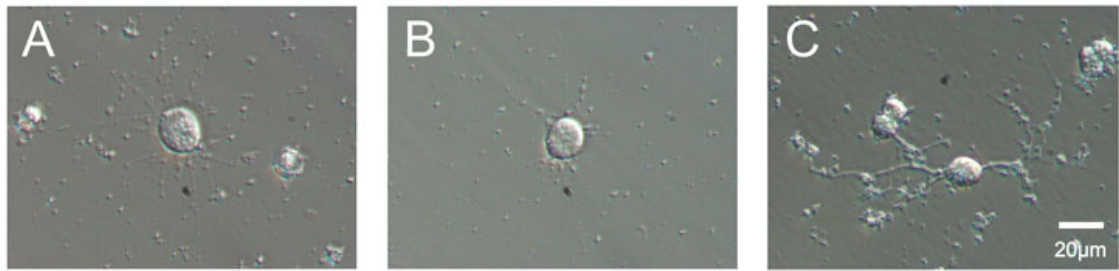


Abbildung 3.8: Bipolares Neuritenwachstum primärkultivierter Neurone unterschiedlichen Kulturalters. A: Kulturalter 3 Tage. B: Kulturalter 3 Tage. C: Kulturalter 10 Tage. Durchlichtbilder im Reliefkontrast.

Neben dem beschriebenen ungerichteten Wachstum mehrerer bis vieler am Soma entspringender Fortsätze, konnte auch der bipolare Auswuchs von Neuriten beobachtet werden (Abb. 3.8). Die nach relativ kurzer Dauer in Kultur fotografierten Zellen in den Abbildungen 3.8 A und 3.8 B zeigen die Ausbildung feiner Fortsätze mit knotigen Verdickungen. Die Auswüchse der Zelle im Zentrum der Abb. 3.8 C zeigen eine deutlich bipolare Orientierung. Das Neuron bildet auch einen physischen Kontakt zu dem Neurit einer benachbarten Zelle.

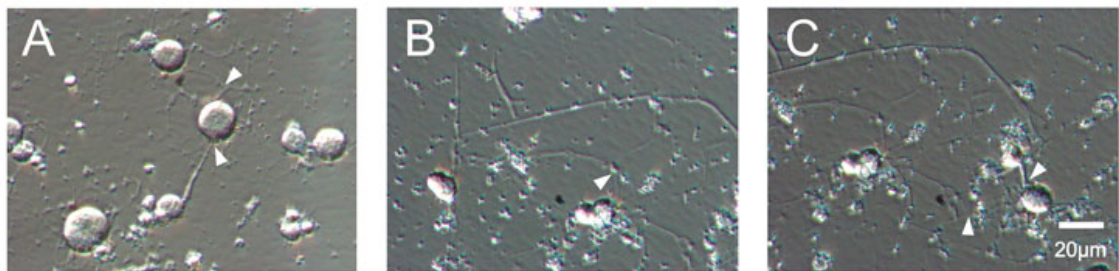


Abbildung 3.9: Neuritenwachstum primärkultivierter Neurone unterschiedlichen Kulturalters, die einen physischen Kontakt zu benachbarten Zellen bilden. A: Kulturalter 3 Tage B: und C: Überlappende Bildausschnitt derselben Kultur (Alter 10 Tage), der eine Zelle mit besonders langen Neuriten zeigt. Durchlichtbilder im Reliefkontrast.

Im Gegensatz zu den in Abbildung 3.7 dargestellten Neuronen, die ein stark verzweigtes Neuritensystem ausgebildet hatten, regenerierten andere Neurone auch nach längerer Kulturdauer lediglich einzelne oder wenig verzweigte lange Fortsätze (Abb. 3.9). Diese Fortsätze konnten eine beachtliche Länge von bis zu 140 µm (Abb. 3.9 B und 3.9 C) erreichen. Die abgebildeten Neurite schienen zumindest physische Kontakte zu benachbarten Zellen oder deren Fortsätzen zu bilden (Abb. 3.9 A). Ob es sich bei den Kontakten eventuell um funktionelle Synapsen handelte konnte nicht geklärt werden. Durch immunzytochemische Färbungen des mit synapsenassoziierten Proteins SAP-47 konnten keine spezifischen Markierungen der physischen Zellkontakte kultivierter Zellen festgestellt werden (Abb. 3.10). Die nahezu gleichmäßige Färbung aller in Abbildung 3.10 sichtbaren Zellen und die zusätzliche Markierung von Zellfragmenten lassen an der Aussagekraft der anti-SAP-47 Immunfärbungen in Zellkulturen zweifeln. Der verwendete Antikörper lieferte zumindest auf Schnittpräparaten von *Ch. biguttulus* Gehirnen deutliche Markierungen der synaptischen Neuropile (ohne Abbildung).

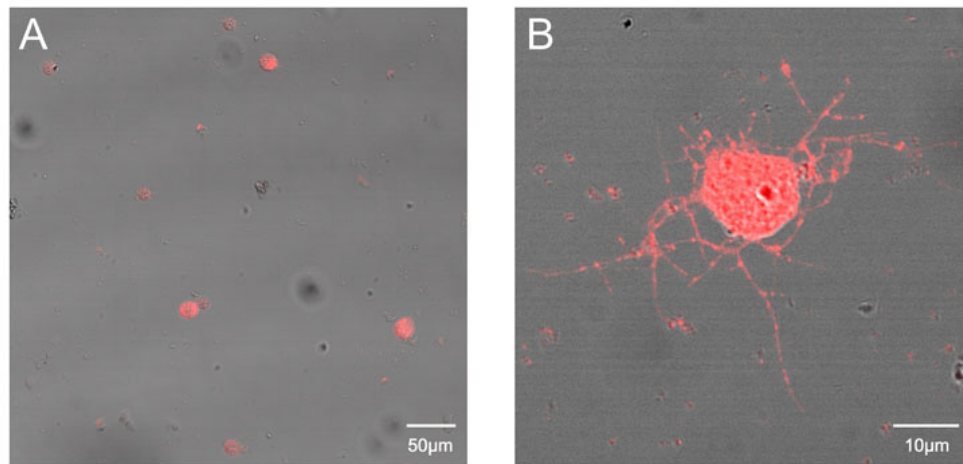


Abbildung 3.10: CY3 gekoppelte SAP-47 Immunmarkierung primärkultivierter Hirnzellen von *Ch. biguttulus*. A: Ausschnitt einer Zellkultur im DIK mit Antikörperfluoreszenz überlagert. B: Detailansicht einer Zelle mit verzweigten Neuriten. Anti-SAP-47 Immunfluoreszenz mit DIK überlagert. Konfokale Laserscanbilder. Kulturalter 8 Tage.

3.1.2 Detektion intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen

Für die intravitale Markierung von Neuronen, die potentiell an der Gesangsauslösung beteiligt sind, wurde Fluoreszenz gekoppeltes Dextran an dieselbe Stelle injiziert, an der zuvor durch Muskarin artspezifischer Gesang ausgelöst werden konnte. Die Öffnung der Kopfkapsel für die pharmakologische Gesangsauslösung und die intravitale Markierung, sowie die Lagerung des Tieres für 24 std in einer feuchten Kammer wirkte sich negativ auf die Zellzahl der Kulturen aus. Die durchschnittliche Zelldichte betrug bei den aus injizierten Heuschrecken stammenden Kulturen $1,7 (\pm 0,24)$ Zellen pro $0,01 \text{ m}^2$ ($n=3$). Bezogen auf die gesamte Fläche des Deckgläschens ergibt das eine Zellzahl von 13.618.

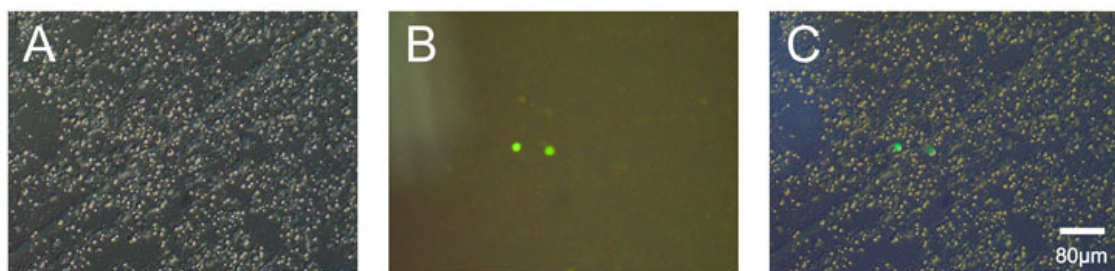


Abbildung 3.11: Intravitalfärbung primärkultivierter Hirnzellen von *Ch. biguttulus*. A: Ausschnitt einer Zellkultur im Durchlicht B: Derselbe Bildausschnitt wie in A zeigt zwei grün fluoreszierende Zellkörper, die den Farbstoff Rhodamingreen-Dextran (10kDa) nach Injektion in ein intaktes Heuschreckengehirn aufgenommen haben. An derselben Injektionsstelle konnte durch Muskarin artspezifischer Gesang ausgelöst werden. C: Überlagerung der Bilder A und B. Bilder im Reliefkontrast. Kulturalter 1 Tag.

Im Vergleich zu nicht vorbehandelten Tieren waren die Kulturen injizierter Heuschreckengehirne darüberhinaus einer größeren Kontaminationsgefahr ausgesetzt und konnten deshalb nur für drei Tage in einem zuverlässig guten physiologischen Zustand gehalten werden. Die später beschriebenen physiologischen Experimente mit

intravital markierten Neuronen wurden deshalb bereits einen Tag nach Kulturnahme durchgeführt.

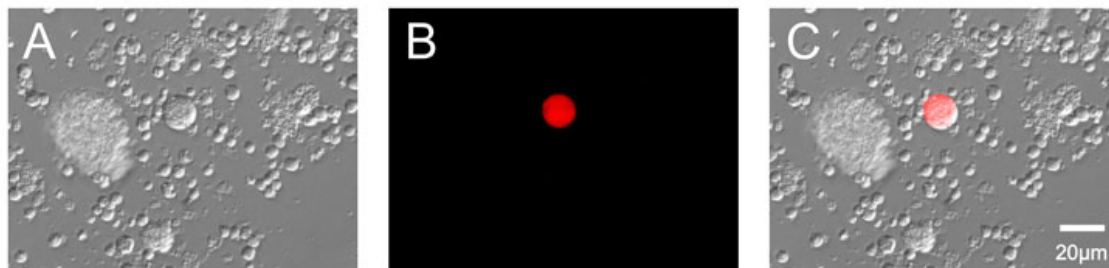


Abbildung 3.12: Detailansicht einer intravital markierten Hirnzelle von *Ch. biguttulus* in Zellkultur. A: Ausschnitt einer Zellkultur aus dem Heuschreckengehirn. B: Derselbe Ausschnitt wie A zeigt eine mit Tetramethylrhodamindextran markierte, rot fluoreszierende Zelle. C: Überlagerung der Bilder A und B. Bilder im Reliefkontrast. Kulturalter 1 Tag.

Im überwiegenden Teil der Primärkulturen, aus zuvor intravital markierten Heuschreckenhirnen konnten mit Tetramethylrhodamindextran gefärbte Zellen wieder gefunden werden. Die Anzahl der markierten Zellen pro Kultur (Abb. 3.11 - 3.13) schwankte zwischen 0 und 7. Die Durchschnittlich gefundene Zahl der markierten Neurone in optisch abgeleiteten Kulturen betrug $3,2 (\pm 1,8; n=22)$.

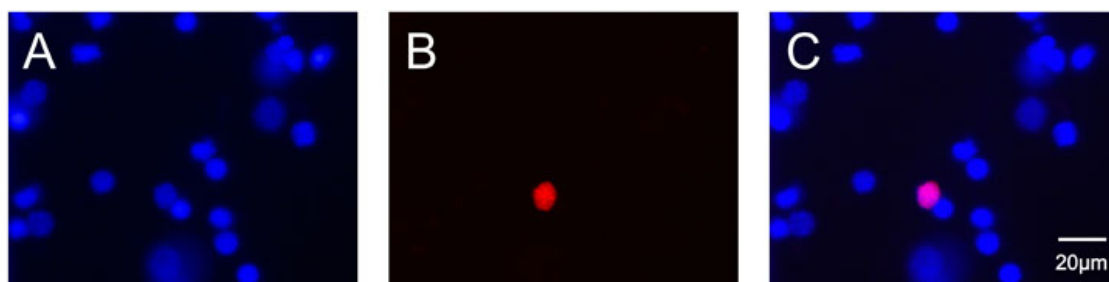


Abbildung 3.13: DAPI Kernfärbung eines intravital markierten Neurons mit anderen Zellen von *Ch. biguttulus* in Zellkultur. A: Blau fluoreszierende mit DAPI markierte Zellkerne kultivierter Hirnzellen. B: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt eine rot fluoreszierende, mit Tetramethylrhodamindextran markierte Zelle. C: Überlagerung der Bilder A und B. Ungefilterte Bilder. Kulturalter 1 Tag.

Alle mit Dextran markierten Zellen zeigten eine granuliert Oberflächenstruktur (Abb. 3.13). Der überwiegende Anteil der markierten Neurone zeichnete sich durch ein verhältnismäßig großes Soma aus (Abb. 3.11 und 3.12).

3.1.3 Anti-mAChR Immunzytochemie in Primärzellkulturen

Injektionen muskarinischer Agonisten in zentrale Neuropile des Protocerebrums von *Ch. biguttulus* lösen von allen bisher getesteten Pharmaka am zuverlässigsten den artspezifischen Gesang aus. Neurone, die durch die Injektion muskarinischer Agonisten direkt erregt werden, müssen auch die entsprechenden Rezeptoren exprimieren. Der zur intravitalem Markierung verwendete Tracer wurde an einer Stelle injiziert, an der mit Muskarin Gesang stimuliert werden konnte. Der qualitative und quantitative Nachweis muskarinischer Rezeptoren in intravital markierten Neuronen kann

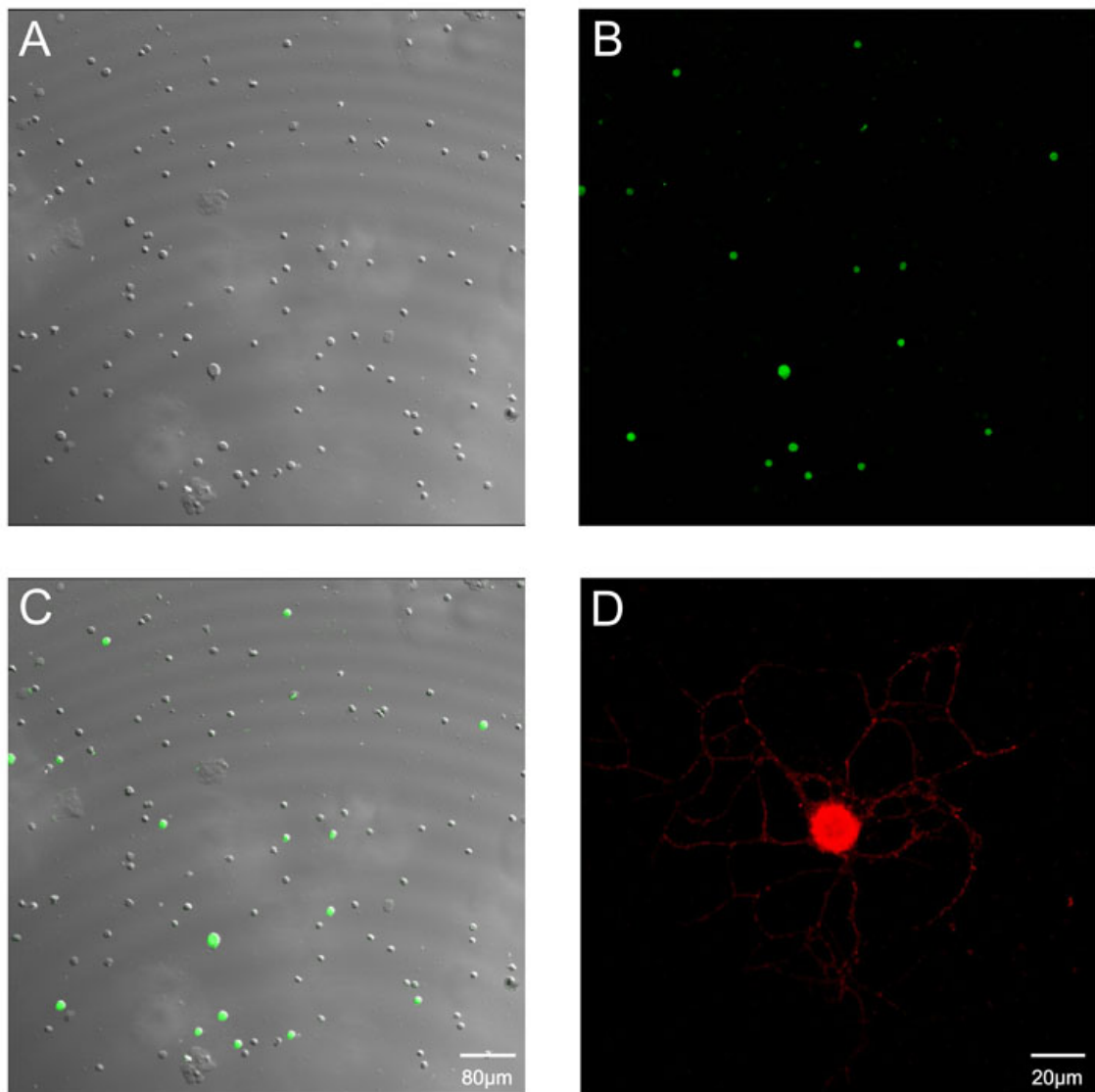


Abbildung 3.14: Immunzytochemischer Nachweis muskarinischer ACh-Rezeptoren in primärkultivierten Hirnneuronen von *Ch. biguttulus*. A: Ausschnitt einer Zellkultur aus dem Heuschreckengehirn im DIK. B: Grüne Fluoreszenz: FITC gekoppelte anti-mAChR Immunmarkierung. C: Überlagerung der Bilder A und B. D: Detailansicht einer Zelle mit CY3 gekoppelter anti-mAChR assoziierter Immunmarkierung in roter Fluoreszenz mit sichtbar gefärbten Neuriten. Konfokale Laserscanbilder. Kulturalter Bild A-C 2 Tage. Kulturalter Bild D 17 Tage.

als zusätzliches Indiz dafür gewertet werden, dass diese Neurone direkt durch das ins zentrale Protocerebrum injizierte Muskarin stimuliert wurden und die Gesangs-auslösende Erregung vermittelt haben.

Antikörperfärbungen gegen den muskarinischen Rezeptor konnten erfolgreich an kultivierten Hirnzellen von *Ch. biguttulus* durchgeführt werden (Abb. 3.14). Immunpositive Zellen konnten eindeutig von nicht markierten Zellen unterschieden werden. Die Färbungen zeigten in jüngeren Kulturen eine gleichmäßige Verteilung auf der Oberfläche des Zellkörpers. In älteren Kulturen, in denen Neuritenwachstum zu beobachten war, konnten mAChR positive Markierungen auch in Fortsätzen detektiert werden. Die Immunmarkierung auf den Neuriten wies ein unregelmäßigeres Färbemuster auf. In unregelmäßigen Abständen war die Färbung intensiver ausgeprägt

(3.14 D). Diese Regionen intensiver Färbung korrelierten nicht mit etwaigen Verzweigungen der Fortsätze. Eine Auszählung der mit den mAChR Antikörper markierten Zellen ergab, dass durchschnittlich 22% der Neurone einer Kultur (n=12) den muskarinischen Rezeptor exprimierten.

3.1.4 Anti-mAChR Immunzytochemie an intravital markierten Neuronen

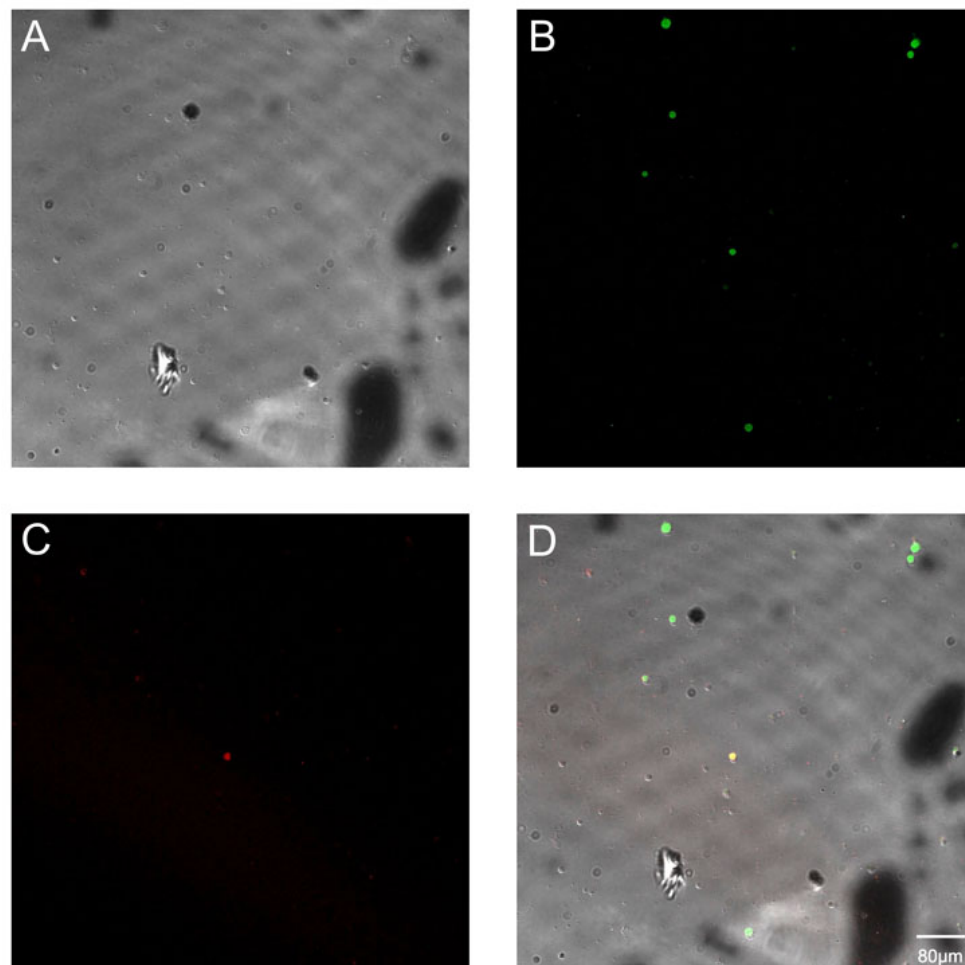


Abbildung 3.15: Immunzytochemischer Nachweis muskarinischer ACh-Rezeptoren eines intravital markierten Neurons von *Ch. biguttulus* in Zellkultur. A: Ausschnitt einer Zellkultur im DIK. B: Grüne Fluoreszenz: CY2 gekoppelte anti-mAChR Immunmarkierung. C: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt eine rot fluoreszierende, mit Tetramethylrhodamindextran markierte Zelle. D: Überlagerung der Bilder A, B und C. Konfokale Laserscanbilder. Kulturalter 1 Tag.

Neurone, die intravital mit einem Dextran gekoppelten Farbstoff markiert wurden, zeigten ebenfalls eine mACh Rezeptor assoziierte Immunreaktivität.

Abbildung 3.15 D zeigt ein Übersichtsbild mit einer durch Dextran gefärbten Zelle im Zentrum, welche ebenfalls eine anti-mAChR positive Immunmarkierung aufweist. In der Überlagerung des differenziellen Interferenzkontrastbildes mit den Fluoreszenzaufnahmen werden neben der in Abb. 3.15 C gut erkennbaren Dextranfärbung weitere rot fluoreszierende Flächen sichtbar. Bei genauerer Betrachtung erkennt man

jedoch, dass es sich dabei nicht um intakte Zellen, sondern lediglich um Zellreste handelt.

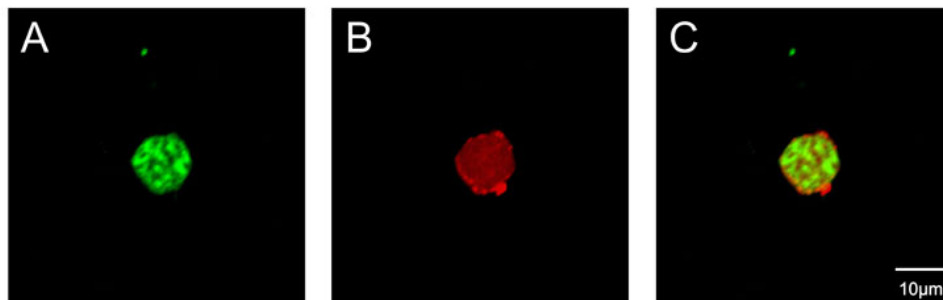


Abbildung 3.16: Detailansicht eines intravital markierten Neurons mit mAChR assoziierter Immunmarkierung. A: CY2 gekoppelte, grün fluoreszierende Anti-mAChR Immunmarkierung B: Rote fluoreszenz des intravital mit Tetramethylrhodamindextran markierten Neurons. C: Überlagerung der Bilder A und B. Konfokale Laserscanbilder. Kulturalter 1 Tag.

Im Gegensatz zu der Übersichtsabbildung der mAChR Immunfärbung (Abb. 3.14) erkennt man in der Detailansicht der Doppelfärbung (Abb. 3.16), dass die grün fluoreszierende Immunmarkierung (Abb. 3.16 A) die Oberfläche der Zelle unregelmäßig anfärbt. Die rot fluoreszierende Dextranmarkierung (Abb. 3.16 B) hingegen füllt das Soma gleichmäßig aus.

In allen Kulturen, die intravital markierte Zellen aufwiesen und bei denen eine anti-mAChR Immunfärbung durchgeführt wurde, zeigten die markierten Neurone auch eine mACh Rezeptor assoziierte Immunreaktivität (n=3).

3.2 Histologische und immunzytochemische Untersuchungen an Hirnschnitten von *Ch. biguttulus*

Die bei der Beschreibung der Hirnschnitte verwendete Terminologie der Hirnstrukturen beruht auf Straussfeld (1976) und die Nomenklatur zur Anatomie des Zentralkörperkomplexes auf Homberg (1991), Homberg et al. (1999), Müller et al. (1997) (Abb. 3.17). Lage und Richtungsbezeichnungen beziehen sich immer auf die Neuraeis.

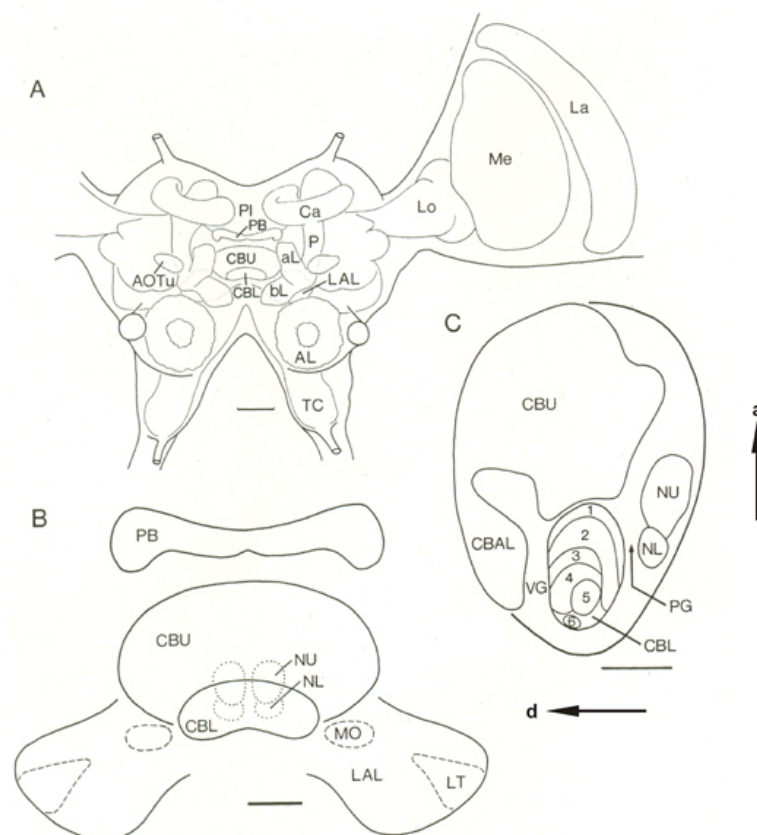


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung eines Heuschreckengehirns mit Fokus auf den Zentralkomplex. A: ventrale Ansicht des Gehirns. AL Antennalloben; al α -Loben der Pilzkörper; bL β -Loben der Pilzkörper; AOTu anteriore optische Tuberkel; Ca Calices der Pilzkörper; CBL untere Division des Zentralkörpers; CBU obere Division des Zentralkörpers; La Lamina; LAL laterale Akzessorische Loben; Lo Lobula; Me Medulla; P Pedunkulus der Pilzkörper; PB Protocerebrale Brücke; PI Pars Intercerebralis; TC Tritocerebrum; Maßstab 200 μm . B: horizontale Detailansicht des Zentralkomplexes. LT laterale Triangel; NL untere Division der Noduli; NU obere Division der Noduli; MO mediane Olive. Maßstab 100 μm . C: Sagittaler Schnitt durch den Zentralkörper. Die Richtungspeile beziehen sich auf die Sagittalansicht des Zentralkörpers. a anterior; CBAL anteriore Lippe des Zentralkörpers; d dorsal; PG posteriore Spalte; VG ventraler Spalt. Maßstab 50 μm . (verändert aus Müller et al. 1997)

3.2.1 DAPI und anti-HRP Doppelfärbung an Hirnschnitten

Die Doppelmarkierung eines Hirnschnittes mit anti-HRP und DAPI diente nach den misslungenen Versuchen einer Gliamarkierung dazu, einen Überblick über die Verteilung von Gliazellen und Neuronen im Gehirn zu erlangen. Zellen, die sowohl eine DAPI Kernfärbung als auch eine anti-HRP Markierung aufweisen, können so als Neurone identifiziert werden. Gliazellen sind die Zellen, welche nur eine DAPI Kernfärbung zeigen.

Abbildung 3.18 A zeigt die Epifluoreszenzaufnahme eines Horizontalschnittes durch die obere Division des Zentralkörpers eines Heuschreckengehirns. Die großen zentralen Neuropilbereiche und die peripher gelegenen Somata zeigen eine deutliche anti-HRP Immunmarkierung.

Die DAPI Färbung (Abb. 3.18 B) zeigt anterior zu den α -Loben und median zwischen der oberen Division des Zentralkörpers und der Pars Intercerebralis gelegene blau fluoreszenzierende Kerne. Da die für Neurone typische anti-HRP Markierung um den Zellkern herum hier nicht sichtbar ist, handelt es sich hierbei um Gliazellen.

Die Überlagerung der anti-HRP Immunfärbung mit dem blau fluoreszierenden DAPI Kernmarker (Abb. 3.18 C) zeigt besonders an den lateralen Grenzen der peripheren Somaregionen blau fluoreszierende Kerne, die keine Colokalisation mit dem HRP-Marker aufweisen.

Deutlich zeigt eine Detailansicht des inferioren medianen Protocerebrums (Abb. 3.18 D, E) den ausgesparten Zellkern der anti-HRP markierten Neurone. In der Überlagerung mit dem blau fluoreszierenden DAPI Kernmarker (Abb. 3.18 F) ist hier beispielhaft eine ganze Schicht lateral gelegener Zellen sichtbar, die keine anti-HRP Färbung aufweisen. In diesem Detailausschnitt entspricht die Anzahl der Zellen die eine Colokalisation mit dem HRP-Marker aufweisen (=Neurone), ungefähr der Anzahl der Zellen, die lediglich eine Kernmarkierung aufweisen (=Glia).

Die Kombination der anti HRP Immunmarkierung mit dem Kernmarker DAPI zeigt, dass überwiegend in den äußeren Bereichen der peripheren Somaregionen von Neuronen des Protocerebrums Zellkörper zu finden sind, die nur eine Kernfärbung aufweisen. Zellkörper mit DAPI Färbung und ohne HRP Markierung sind wahrscheinlich Gliazellen. Die Anzahl der Zellkörper, die in der Gesamtübersicht in Abbildung 3.18 A durch ihre Immunmarkierung eindeutig als Neurone identifiziert werden können, ist größer als die Anzahl der potentiellen Gliazellen im Heuschreckengehirn.

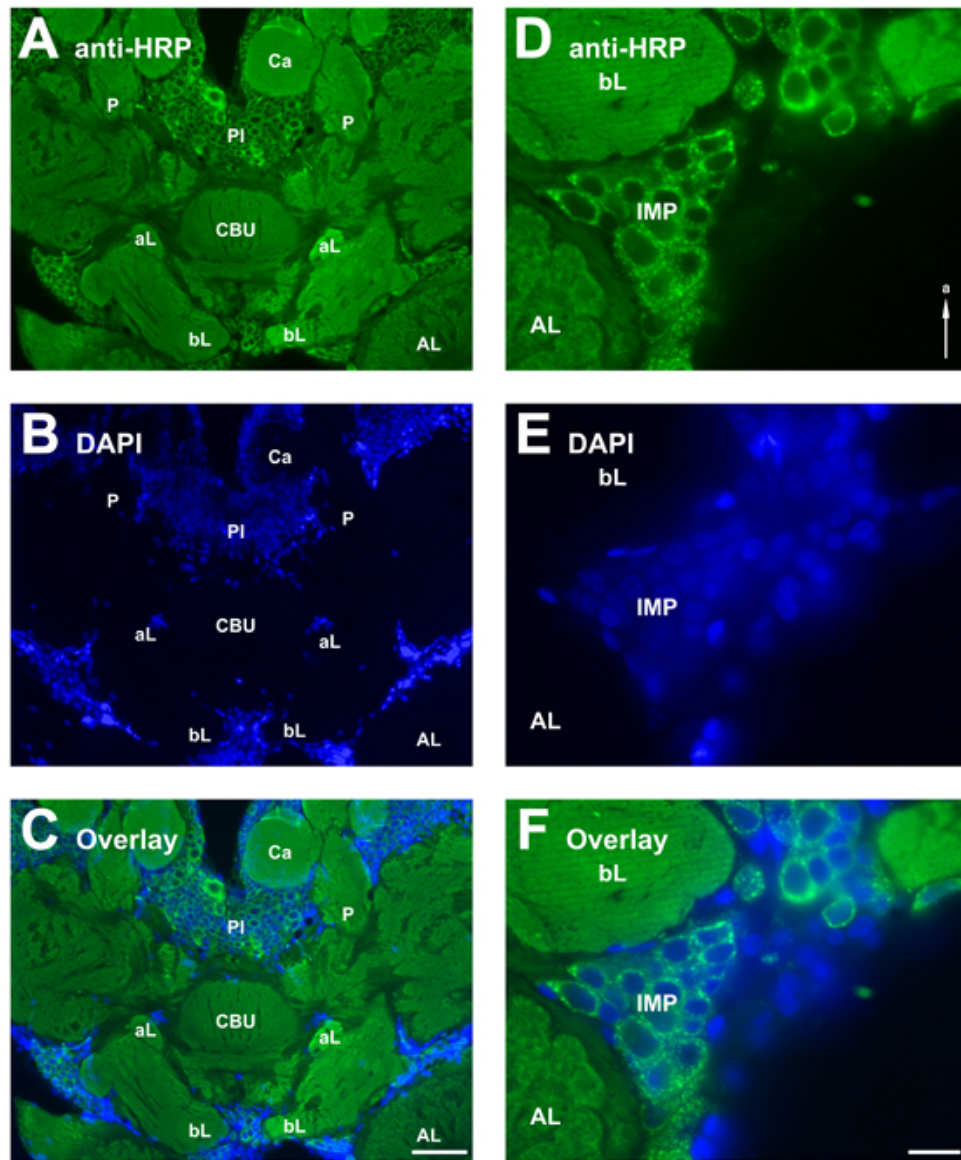


Abbildung 3.18: Mit anti-HRP und DAPI doppelgefärbter horizontaler Hirnschnitt durch das zentrale Protocerebrum von *Ch. biguttulus*. A: Grüne Fluoreszenz: anti-HRP Immunmarkierung B: Blaue Fluoreszenz: DAPI Kernmarkierung C: Überlagerung von Abb. A und Abb. B. Zellkörper mit DAPI Kernfärbung und fehlender HRP-Markierung sind wahrscheinlich Gliazellen. D: Grüne Fluoreszenz: Detailausschnitt von Abb. A mit Fokus auf das inferiore mediane Protocerebrum. E: Blaue Fluoreszenz: DAPI Kernfärbung desselben Detailausschnitts. F: Überlagerung von Abb. D und Abb. E. Durch die Überlagerung werden peripher gelegene Gliazellen des IMP sichtbar. AL Antennallobus; aL α -Loben; bL β -Loben; Ca Calices; CBU obere Division des Zentralkörpers; IMP inferiores medianes Protocerebrum; P Pedunculus; PI Pars Intercerebralis; Maßstab A-C 80 μm ; D-F 10 μm .

3.2.2 Lokalisation intravital markierter Neurone in Hirnschnitten

Die Lokalisation intravital markierter Neurone in Hirnschnitten diente dazu, die Anzahl In-situ gefärbter zu Neurone ermitteln. Die Einordnung von Lage und Struktur der intravital markierten Zellen in den Kontext der bekannten anatomischen Strukturen des Heuschreckengehirns und insbesondere des Zentralkörpers könnte jedoch zusätzlich Folgerungen über ihren Typ und ihre funktionelle Einordnung in das Netzwerk des Zentralkörperneuropils ermöglichen.

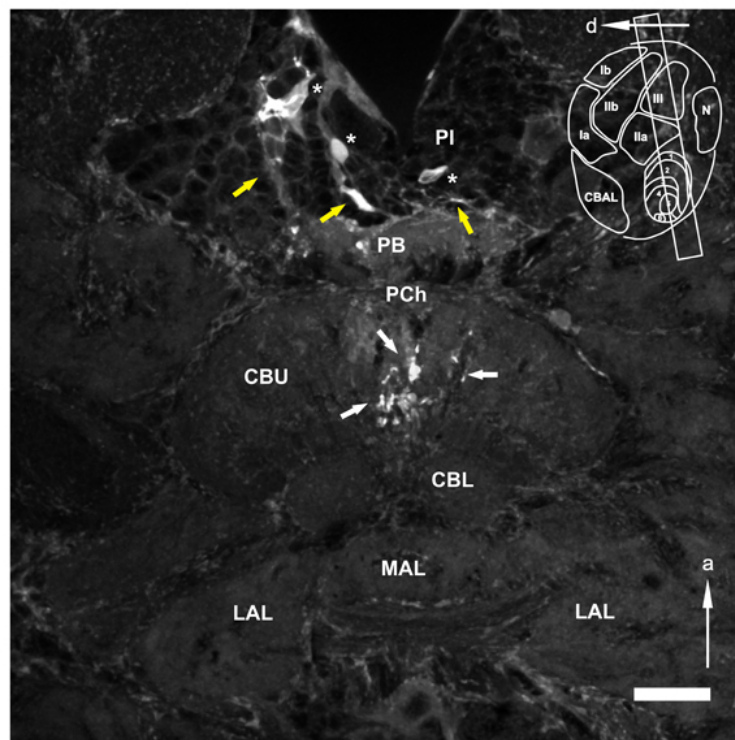


Abbildung 3.19: Z-Projektion der maximalen Intensität eines konfokal gescannten Horizontalschnittes nach Injektion eines biotinkoppelten Dextrans in das intakte Gehirn. Die Verteilung wurde durch fluoreszenzgekoppeltes Streptavidin sichtbar gemacht. Die Pfeile markieren gefärbte Fasern und die Sternchen Somata, die den Farbstoff aufgenommen haben. bl β -Loben; CBU obere Division des Zentralkörpers; CBL untere Division des Zentralkörpers; LAL laterale Akzessorische Loben; MAL medianer Akzessorischer Lobus; PB Protocerebrale Brücke; PI Pars Intercerebralis. Maßstab 50 μ m. Die schematische Sagittalansicht des Zentralkörpers am Bildrand veranschaulicht die Lage der Schnittebene.

Abbildung 3.19 zeigt den Horizontalschnitt eines Heuschreckengehirns, in welchem die Verteilung eines Biotin gekoppelten Dextrans durch fluoreszenzgekoppeltes Streptavidin sichtbar gemacht wurde. Der Schnitt zeigt Strukturen der beiden Zentralkörperdivisionen, sowie die lateralen Akzessorischen Loben und Teile der Protocerebralen Brücke.

Dem Färbemuster nach zu urteilen, erfolgte die Injektion des Dextrans in den medianen posterioren Bereich der oberen Division des Zentralkomplexes. Hier lassen sich gefärbte Neuriten erkennen (weiße Pfeile), deren Verlauf der kolumnären Struktur der oberen Division des Zentralkörpers entspricht. Zirkulär um diese Fasern hat

lauf und Verzweigungen in einer nicht näher zu bestimmenden Schicht der oberen Division.

Es sind keine Färbungen in der unteren Division des Zentralkörpers zu entdecken.

Die Markierungen posterior lateral, entlang des medianen Akzessorischen Lobus in Richtung des inferioren lateralen Protocerebrums, kann man als den Verlauf eines Neuriten interpretieren (blauer Pfeil). Die blass und diffus gefärbte Struktur im inferioren lateralen Protocerebrum kann nicht eindeutig identifiziert werden (violetter Pfeil).

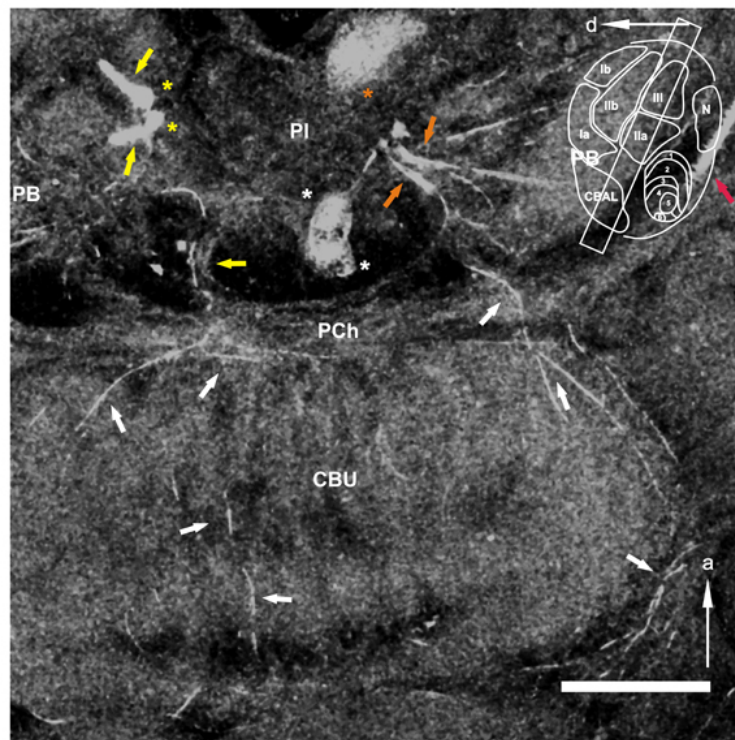


Abbildung 3.21: Z-Projektion der maximalen Intensität eines konfokal gescannten Horizontalschnittes nach Injektion eines biotinkoppelten Dextrans in das intakte Gehirn. Die Verteilung wurde durch fluoreszenzgekoppeltes Streptavidin sichtbar gemacht. Pfeile markieren gefärbte Fasern und die Sternchen Somata, die den Farbstoff aufgenommen haben. CBU obere Division des Zentralkörpers; PB Protocerebrale Brücke; PCh posteriores Chiasma; PI Pars Intercerebralis. Maßstab 50 μm . Die schematische Sagittalsicht des Zentralkörpers am Bildrand veranschaulicht die Lage der Schnittebene.

Der Schnitt eines anderen, intravital markierten Heuschreckengehirns (Abb. 3.21) liefert ein ähnliches Verteilungsmuster der Streptavidin gekoppelten Fluoreszenz. Der Horizontalschnitt verläuft durch die obere Division des Zentralkörperkomplexes und schneidet die nach ventral gebogenen Ausläufer der Protocerebralen Brücke.

Rechtsseitig ist der fächerförmige Verlauf gefärbter Neuriten sichtbar, die aus der Pars Intercerebralis in die Protocerebrale Brücke ziehen (orange Pfeile). Der Durchmesser, der aus der Pars Intercerebralis in die Protocerebrale Brücke eintretenden Fasern, ist wesentlich größer als der der Neuriten, die aus der Protocerebralen Brücke in das Posteriore Chiasma ziehen.

Bei den kräftig gefärbten Strukturen im linksseitigen anterioren Bereich der Pars Intercerebralis konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um kleine Somata mit breiten Fortsätzen, oder lediglich um Fasern mit einem großen Durchmesser handelt (gelbe Pfeile und Sternchen). Die beiden Strukturen median posterior in der Pars Intercerebralis sind mit großer Wahrscheinlichkeit gefärbte Somata. Ausgehend von diesen Somata kann dem Verlauf einer Faser bis in den rechten Teil der Protocebralen Brücke gefolgt werden (weiße Sternchen). Die diffus gefärbte Struktur im anterior medianen Bereich der Pars Intercerebralis könnte ein großes Soma sein, da Abbildung 3.20 die intravitale Markierung großer Somata belegt. Dies kann jedoch nicht mit absoluter Sicherheit gesagt werden (oranges Sternchen).

Gefärbte Fasern verlaufen von dem Posterioren Chiasma lateral an den Grenzen der oberen Division entlang (weiße Pfeile). Andere erkennbare Faserteile scheinen im Protocerebralen Chiasma zu kreuzen und in die obere Division zu ziehen (weiße Pfeile).

Ein besonders kräftiger Neurit oder ein Fasertrakt zieht lateral an der Protocerebralen Brücke entlang nach anterior in Richtung des Calix oder des Ocellarnervs (roter Pfeil). Der weitere Verlauf dieser Färbung konnte jedoch auf anderen Schnitten der Serie nicht ermittelt werden.

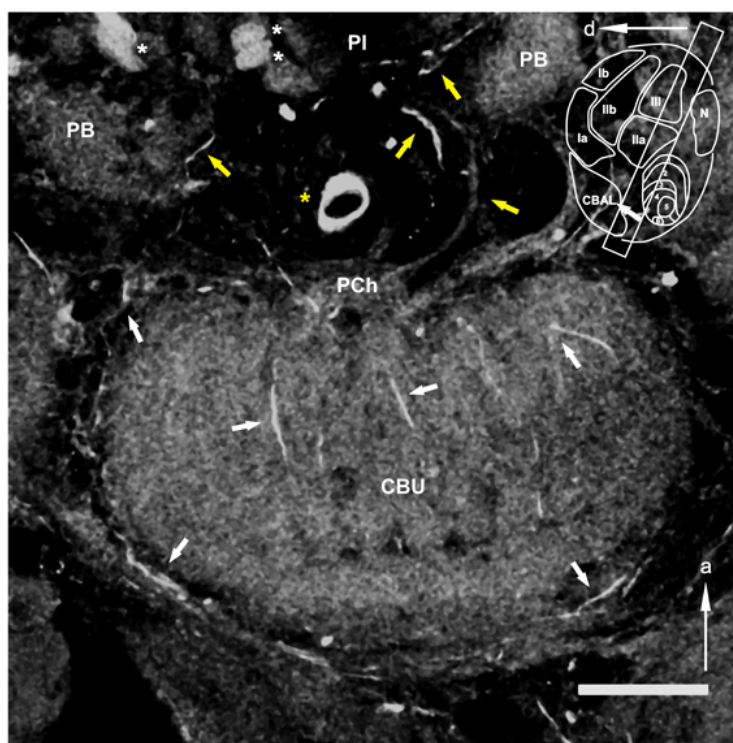


Abbildung 3.22: Z-Projektion der maximalen Intensität eines konfokal gescannten Horizontalschnittes nach Injektion eines biotinkgekoppelten Dextrans in das intakte Gehirn. Die Verteilung wurde durch fluoreszenzgekoppeltes Streptavidin sichtbar gemacht. Pfeile markieren gefärbte Fasern und die Sternchen Somata, die den Farbstoff aufgenommen haben. CBU obere Division des Zentralkörpers; PB Protocerebrale Brücke; PCh Protocerebrales Chiasma; PI Pars Intercerebralis. Maßstab 50 µm. Die schematische Sagittalsicht des Zentralkörpers am Bildrand veranschaulicht die Lage der Schnittebene.

Der ventral zu Abbildung 3.21 gelegene histologische Schnitt (Abb. 3.22) desselben Heuschreckenhirns zeigt median posterior in der Pars Intercerebralis eine Struktur, die Ähnlichkeit mit einer horizontal angeschnittenen Trachee hat. Setzt man die Färbung jedoch in Bezug zu dem dorsal gelegenen Schnitt (Abb. 3.21), scheint es wahrscheinlicher, dass es sich um einen ventralen Teil der median posterior gelegenen Somata (gelbes Sternchen) mit ungefärbtem Zellkern handelt. Die beiden anterior dazu in der Pars Intercerebralis gelegenen gefärbten Strukturen, sind eindeutiger als Somata zu identifizieren. Sie zeigen eine leicht granuliert Oberfläche, wie die Färbungen der Zellen in Primärzellkulturen. Das weiter lateral dazu gelegene Sternchen markiert eine Färbung die nicht klar zugeordnet werden konnte. Aufgrund der Lage und den Färbungen des dorsal gelegenen histologischen Schnittes (3.21) könnte es sich auch hier um Somata handeln (weißes Sternchen).

Weiterhin sieht man gefärbte Neuriten aus der Protocerebralen Brücke in das Posteriore Chiasma ziehen (gelbe Pfeile). Einige Fasern scheinen zu kreuzen und verlaufen weiter durch die Kolumnen der oberen Division des Zentralkörpers (weiße Pfeile). Posterior sind Faserfragmente zu erkennen, die lateral entlang der Grenzen der oberen Division verlaufen.

Abbildung 3.23 zeigt einen horizontalen Schnitt durch die ventrale Ebene des Zentralkörpers eines intravital markierten Heuschreckengehirns, in dem die U-förmig nach ventral gebogenen Strukturen der Protocerebralen Brücke und der unteren Division des Zentralkörperkomplexes zu erkennen sind.

Der laterale linksseitige Bereich der Pars Intercerebralis zeigt eine Färbung, die dem Muster der immunhistochemischen anti-HRP markierten Somata in Abb. 3.18 gleicht. Es wird sich hier um Somata mit ungefärbtem Zellkern handeln (weiße Sternchen).

Auch auf diesem histologischen Schnitt sind im Posterioeren Chiasma kreuzende Fasern sichtbar (gelbe Pfeile), die weiter in die obere Division des Zentralkörpers verlaufen. An den lateralen Grenzen der nach ventral gebogenen Protocerebralen Brücke sind ebenfalls Neuritenfragmente zu erkennen, deren Verlauf jedoch nicht weiter rekonstruiert werden kann (gelbe Pfeile). In der oberen Division des Zentralkörpers selbst sind Fasern identifizierbar, die aus der Protocerebralen Brücke ziehend im zentralen Bereich verzweigen.

Am deutlichsten ist auf der Abbildung 3.23 ein dicker Neurit zu erkennen, der lateral aus der oberen Division in den nach ventral gebogenen rechtsseitigen Teil der unteren Division des Zentralkörpers zieht (blauer Pfeil). Vor seinem Eintritt in die untere Division spaltet sich die gefärbte Struktur (violetter Pfeil).

Das Färbemuster der unteren Division lässt die Vermutung zu, dass sich die Faser dort fein verzweigt (violetter Pfeil). Es könnte sich hier um prä- oder postsynaptische

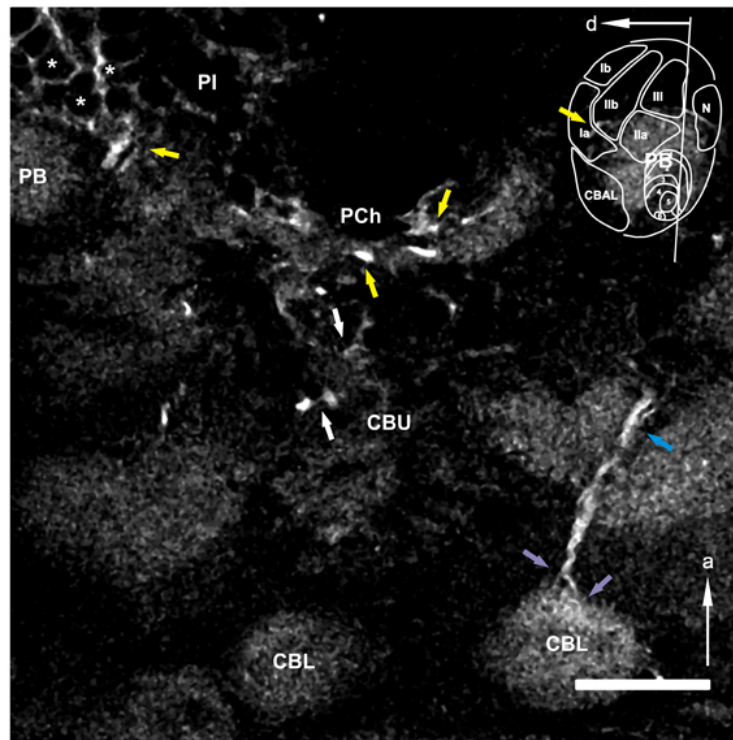


Abbildung 3.23: Konfokal gescannter Horizontalschnitt nach Injektion eines biotinkoppelten Dextrans in das intakte Gehirn. Die Verteilung wurde durch fluoreszenzgekoppeltes Streptavidin sichtbar gemacht. Pfeile markieren gefärbte Fasern und die Sternchen Somata, die den Farbstoff aufgenommen haben. CBU obere Division des Zentralkörpers; CBL untere Division des Zentralkörpers; PB Protocerebrale Brücke; PCh Protocerebrales Chiasma; PI Pars Intercerebralis. Maßstab 50 µm. Die schematische Sagittalansicht des Zentralkörpers am Bildrand veranschaulicht die Lage der Schnittes.

Bereiche des gefärbten Neurons handeln.

Wenn man die Markierungsmuster der Schnitte verschiedener intravital injizierter Heuschreckengehirne vergleicht, wird deutlich, dass überwiegend Somata der Pars Intercerebralis die Streptavidin gekoppelte Fluoreszenzfärbung aufweisen. Die Zahl der gefärbten Somata variiert zwischen 3 und 14 in verschiedenen Präparationen. Es kann jedoch keine genaue Zahl angegeben werden, weil die gefärbten Strukturen nicht immer eindeutig als Somata identifiziert werden konnten.

In allen Schnitten zeigen gefärbte Neuriten einen Verlauf durch die verschiedenen Schichten der oberen Division des Zentralkörpers. Immer wurden gefärbte Strukturen detektiert, die lateral an den Grenzen der oberen Division des Zentralkörpers entlang verlaufen. In keinem Präparat konnten markierte Neurone vollständig rekonstruiert werden. Feine Verzweigungen, die auf synaptische Strukturen hindeuten würden, konnten nur einmal im ventralen Bereich der unteren Division des Zentralkörpers gezeigt werden.

Der Zentralkomplex wird von tangentialen und kolumnären Neuronen innerviert (Homberg 1991, Müller et al. 1997, Vitzthum et al. 2002). Ihre organisierte Gliederung bildet die Schichten und Spalten des Zentralkörpers. Die Lage der dextranmarkierten Somata in der Pars Intercerebralis und der Verlauf der markierten

Neuriten im Zentralkomplex deuten darauf hin, dass fast ausschließlich Neurone gefärbt wurden, die der Klasse der kolumnären Neurone zugeordnet werden konnten.

3.2.3 Immunzytochemischer Nachweis muskarinischer ACh Rezeptoren intravital markierter Neurone in Hirnschnitten

Um die spezifische Aufnahme biotinkgekoppelter Dextrane von Neuronen, die an der artspezifischen Gesangsauslösung beteiligt sind zu untersuchen, wurde bei einem Hirnschnitt, der eine intravital markierte Färbung aufwies, zusätzlich eine anti-mAChR Immunfärbung durchgeführt. Der Nachweis von muskarinischen Rezeptoren bei intravital gelabelten Neuronen wäre ein gutes Indiz dafür, dass der Tracer wirklich von den Neuronen inkorporiert wurde, die an der selben Injektionsstelle direkt mit Muskarin stimuliert wurden.

Abbildung 3.24 A zeigt einen Horizontalschnitt durch die obere und untere Division des Zentralkörpers, in dem das injizierte Dextran durch grüne Fluoreszenz sichtbar gemacht wurde. Im anterioren Bereich der Pars Intercerebralis sind deutlich zwei Somata gefärbt (weiße Sternchen). Posterior dazu zeigen drei weitere Somata eine schwächere Färbung. Ausgehend von einem der deutlich gefärbten Somata kann man einer Faser folgen, die lateral an der Protocerebralen Brücke entlang zieht (gelbe Pfeile).

Von lateral kommend ziehen gefärbte Fasern in die dritte Schicht der oberen Division des Zentralkörpers. Im zentralen Bereich des Zentralkörpers ist die Färbung besonders intensiv. Hier kann man den kolumnären Verlauf von Fasern mit unterschiedlichem Durchmesser und verschieden starker Färbung erkennen. Insbesondere kann ein auf der linken Seite gelegener, dicker Faserstrang durch die gesamte obere Division bis in die untere Division des Zentralkörpers verfolgt werden (weißer Pfeil). Im posterioren Bereich der oberen Division des Zentralkörpers kann man Fasern erkennen, die lateral entlang seiner Grenzen verlaufen (weißer Pfeil).

Dem Verlauf der gefärbten Fasern kann bis in die untere Division des Zentralkörpers gefolgt werden. Die linksseitige Färbung in der unteren Division kann als feine Verästelung des von anterior kommenden Neuriten interpretiert werden und auf Verzweigungen in einem synaptischen Neuropil hindeuten (oranger Pfeil). Die übrigen gefärbten Strukturen in der unteren Division zeigen ein anderes Muster und konzentrieren sich im posterioren Bereich (roter Pfeil).

Posterior des Zentralkomplexes ist eine Faser zu erkennen, die in den rechtsseitigen lateralen Akzessorischen Lobus zieht und dort zu verzweigen scheint (blaue Pfeile).

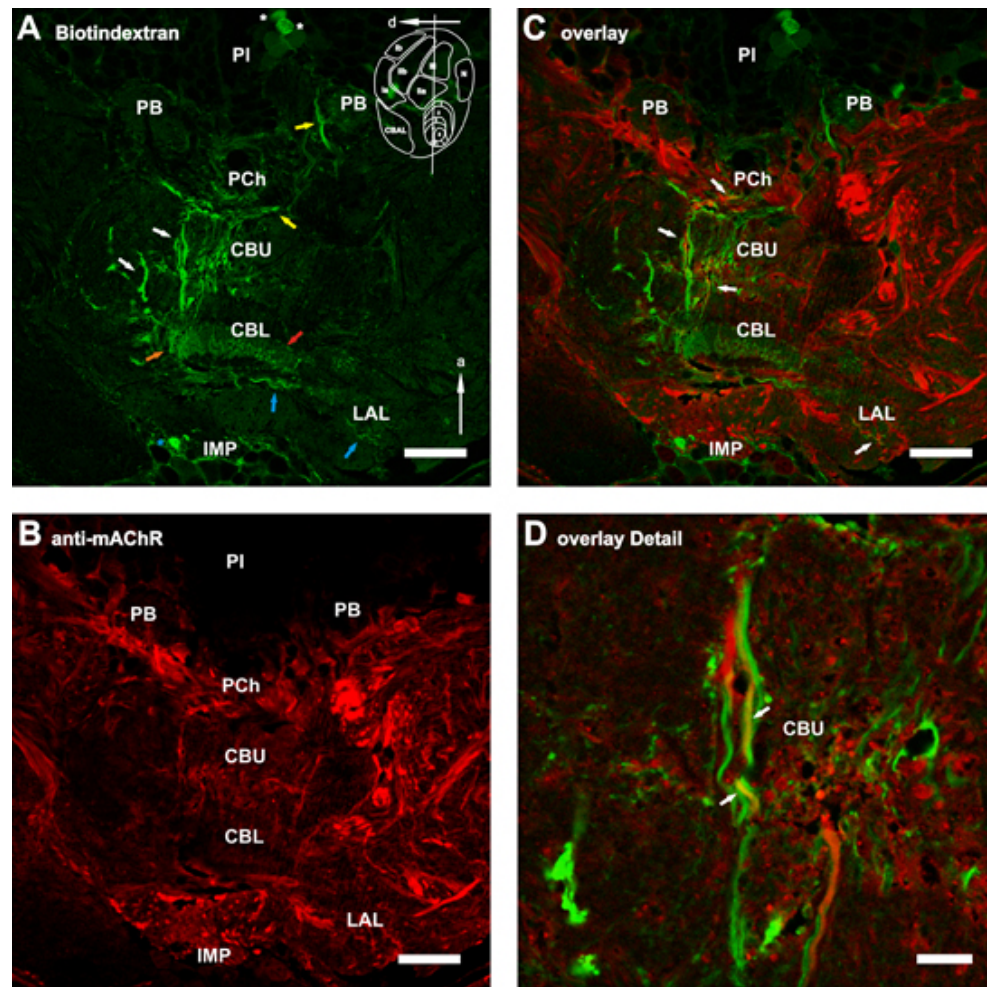


Abbildung 3.24: Z-Projektion der maximalen Intensität eines konfokal gescannten Horizontalschnittes nach Injektion eines biotinkoppelten Dextrans in das intakte Gehirn. Die Verteilung wurde durch mit grüner Fluoreszenz gekoppeltes Streptavidin sichtbar gemacht. Die Färbung wurde mit einer rot fluoreszierenden anti-mAChR Immunmarkierung überlagert. CBU obere Division des Zentralkörpers; CBL untere Division des Zentralkörpers; IMP inferiores medianes Protocerebrum; LAL laterale Akzessorische Loben; LALcom Kommissur der lateralen Akzessorischen Loben; PB Protocerebrale Brücke; PCh Protocerebrales Chiasma; PI Pars Intercerebralis. A: Grüne Fluoreszenz: Die Pfeile markieren gefärbte Fasern und die Sternchen Somata, die den intravital injizierten Farbstoff aufgenommen haben. B: Rote Fluoreszenz: anti-mAChR Immunmarkierung C: Überlagerung der Bilder A und B. Die Pfeile markieren Faserfragmente, die sowohl eine grüne, als auch eine rote Fluoreszenz aufweisen. D: Detailansicht der überlagerten Färbungen. Die Pfeile markieren doppelt gefärbte Neuriten. Abb. A C Maßstab 50 µm. Abb. D Maßstab 10 µm. Die schematische Sagittalanzeige des Zentralkörpers am Bildrand von Bild A veranschaulicht die Lage der Schnittebene.

Im inferioren medianen Protocerebrum ist ein gefärbtes Soma deutlich zu erkennen (blaues Sternchen).

Die weit gefächerten Verzweigungen der gefärbten Fasern in der unteren Division des Zentralkörperkomplexes und das gefärbte Soma im inferioren medianen Protocerebrum deuten darauf hin, dass bei dieser intravitalem Injektion auch ein tangentiales Neuron markiert wurde. Die Lage der übrigen gefärbten Somata und auch der Verlauf der Fasern lateral entlang der Grenzen und durch die kolumnären Bündel der oberen Division des Zentralkörpers, zeigen ein ähnliches Muster wie die Färbungen in Abbildung 3.2.2.

Die anti-mAChR Immunmarkierung (Abb. 3.24 B) in roter Fluoreszenz zeigt auch deutliche Färbungen in der Peripherie des Zentralkomplexes. Weiterhin ist auffällig,

dass in den Somabereichen der Pars Intercerebralis und des inferioren medianen Protocerebrums keine rot fluoreszierende Färbung zu entdecken ist.

In der oberen Division des Zentralkörpers zeigt die anti-mAChR Immunmarkierung ein ähnliches Verteilungsmuster, wie die durch Streptavidin sichtbar gemachte Intravitalmarkierung. In der unteren Division und der Protocerebralen Brücke ist die rot fluoreszierende Immunmarkierung nur sehr schwach ausgeprägt.

Abbildung 3.24 C zeigt die Überlagerung einer Dextranmarkierung mit einer anti-mAChR Immunfärbung. Überschneidungen der rot fluoreszierenden Immunmarkierung und der grün fluoreszierenden Intravitalmarkierung treten nur im posterioren Chiasma, der oberen Division des Zentralkörpers und dem lateralen Akzessorischen Lobus auf (weiße Pfeile).

Der in Abbildung 3.24 D vergrößert dargestellte Detailausschnitt zeigt den kolumnären Verlauf von Fasern in der oberen Division des Zentralkörpers. Zwischen Fasern, die entweder nur die anti-mAChR Immunmarkierung oder die Intravitalmarkierung aufweisen, ist der Verlauf von Neuriten zu erkennen, die beide Fluoreszenzfärbungen aufweisen (Pfeile).

Um zu ermitteln, ob es sich bei den in Abbildung 3.24 C durch Pfeile gekennzeichneten Strukturen wirklich um Colokalisationen beider Markierungen handelt, wurde mit höher auflösenden Scans der in Abbildung 3.25 A eingerahmten Detailausschnitte eine Zentroidbestimmung nach Bolte und Cordelières (2006) durchgeführt. Wenn die ermittelten Schwerpunkte der gefärbten Strukturen unterhalb des Auflösungsvermögens des Mikroskops liegen, sind die Färbungen der Strukturen colokalisiert. Diese Bereiche werden in den Detailaufnahmen weiß hervorgehoben.

Wenn man die Zentroidbestimmung in Abbildung 3.25 B mit dem identischen Detailausschnitt 3.24 D vergleicht, fallen Unterschiede auf. Die weißen Bereiche von Abbildung 3.25 B, in denen eine Colokalisation errechnet wurde, stimmen nicht exakt mit den Bereichen in Abb. 3.24 D überein, in denen die Überlagerung der grünen Dextran- und roten mAChR-Markierungen gelb hervortreten. Die durch Pfeile markierte posterior gelegene Faser weist jedoch auf beiden Abbildungen eine Colokalisation der Färbungen auf. Insgesamt zeigen in diesem Detailausschnitt

Der Detailausschnitt in Abbildung 3.25 C weist im Protocerebralen Chiasma eine deutlich intensivere mAChR Färbung auf als im Bereich der oberen Division des Zentralkörpers. Weiße Pfeile markieren die Fasern, in denen beide Färbungen colokalisieren.

Der vergrößerte Ausschnitt des lateralen Akzessorischen Lobus (Abb. 3.25 D) zeigt lediglich ein mAChR enthaltendes Faserbündel, welches von der linken Seite in den Akzessorischen Lobus zieht. Die beiden größeren dextranmarkierten Fasern (weiße Pfeile) weisen beide zumindest zum Teil eine Colokalisation mit der anti-mAChR

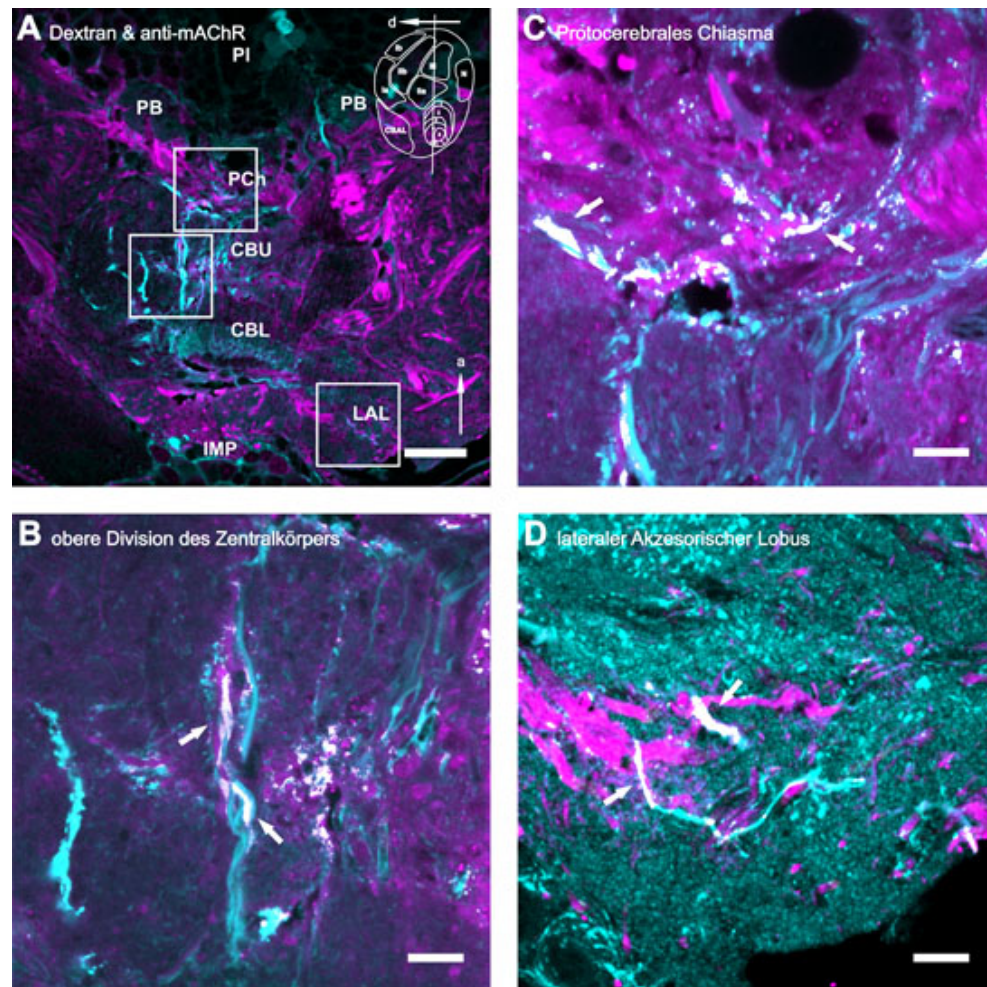


Abbildung 3.25: Z-Projektion der maximalen Intensität eines konfokal gescannten Horizontalschnittes, nach Injektion eines biotinkoppelten Dextrans in das intakte Gehirn. Die cyanfarbenden Strukturen entsprechen der grün fluoreszierenden Dextranmarkierung aus Abb. 3.24 A, die magentafarbenen der anti-AChR-Immunmarkierung aus Abb. 3.24 B. A: Überlagerung der Dextranfärbung und der anti-AChR-Immunmarkierung. Die Ausschnitte bei denen eine Zentroidbestimmung durchgeführt wurde sind weiß eingerahmt. B: Detailansicht der oberen Division des Zentralkörpers. Strukturen in denen beide Färbungen colokalisieren treten weiß hervor. C: Detailansicht des Protocerebralen Chiasmas. Strukturen in denen beide Färbungen colokalisieren treten weiß hervor. D: Detailansicht des lateralen Akzesorischen Lobus. Strukturen in denen beide Färbungen colokalisieren treten weiß hervor. Abb. A Maßstab 50 μm . Abb. B-D Maßstab 10 μm . Die schematische Sagittalsicht des Zentralkörpers am Bildrand von Bild A veranschaulicht die Lage der Schnittebene.

Färbung auf. Die feinere, posterior gelegene Faser scheint sich im posterioren Bereich des Lobus zu verzweigen, weist hier jedoch keine mAChR-Immunmarkierung mehr auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Dextraninjektion an einem für Muskarin sensitiven Stimulationsort im Zentralkomplex zwischen 3 und 14 Neurone markiert, von denen einige den muskarinischen Rezeptor exprimieren. Diese Neurone könnten bei der Gesangsstimulation direkt durch das injizierte Muskarin stimuliert worden sein.

3.3 Elektrophysiologische Charakterisierung intravital markierter Neurone in Primärkulturen aus Heuschreckengehirnen von *Ch. biguttulus*

Mit Hilfe von Whole-Cell Patch-Clamp Ableitungen von Zellen in Primärkulturen von *Ch. biguttulus* sollten die verschiedenen Stromkomponenten der intravital markierten Zentralkomplexneurone charakterisiert werden. Ziel war es, die gemessenen ein- und auswärtsgerichteten Ströme anhand ihrer Strom/Spannungsrelation zu analysieren und bestimmten Ionen und Kanaltypen zuzuordnen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten nach Möglichkeit durch pharmakologische Blockexperimente gestützt werden. Ein weiteres Ziel war die Bestimmung des pharmakologischen Profils intravital markierter Neurone durch den Nachweis ligandengesteuerter Ionenströme.

3.3.1 Allgemeine Charakterisierung der elektrischen Ströme intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen

Die Whole-Cell Patch-Clamp Ableitungen wurden an Neuronen durchgeführt, die 24 h zuvor mit einem Fluoreszenz gekoppelten Dextran intravital markiert wurden. Die Injektion des Dextrans erfolgte an einer Stelle, an der unmittelbar zuvor durch eine Injektion von Muskarin artspezifischer Gesang ausgelöst werden konnte.

Insgesamt wurden 23 intravital markierte Neurone in Zellkultur abgeleitet. Das Ruhemembranpotential der Zellen betrug durchschnittlich $-44,5 \text{ mV}$ ($\pm 6,5$). Die gemessenen Kapazitäten zeigten eine hohe Standardabweichung $17,6 \text{ pF}$ ($\pm 13,7$), was sowohl auf eine großen Variabilität der Somagröße als auch der elektrischen Stromdichte zurückzuführen ist. Der Durchmesser der Somata schwankte zwischen 6 und $25 \mu\text{m}$.

Ausgehend von dem ermittelten Membranpotential wurde das Haltepotential zunächst auf -40 mV geklemmt und für 20 ms ein hyperpolarisierender Vorpuls von -80 mV gegeben, um eventuelle inaktive Zustände spannungsabhängiger Ionenkanäle zu beenden.

Die in Ganzzelleableitungen durch depolarisierende Spannungspulse ausgelösten Ströme waren von großen auswärts gerichteten Strömen dominiert. Die Abbildung 3.26 zeigt zwei typische Beispiele der gemessenen Auswärtsströme intravital markierter Neurone. Die dargestellten Ableitungen unterscheiden sich deutlich in ihren Maximalamplituden. Der maximale auswärts gerichtete Strom, bei der in Abbildung 3.26 A gezeigten Ableitung, lag bei $5,58 \text{ nA}$. Im Vergleich dazu hatte der maximale

auswärts gerichtete Strom der Ableitung aus Abbildung 3.26 B eine Amplitude von 1,15 nA.

Der Vergleich der mittleren Ströme der in Abb. 3.26 dargestellten Ableitungen in einer Spannungskurve verdeutlicht einen weiteren Unterschied. Während die in Abbildung 3.27 B gezeigte I-V Kurve ab einer Depolarisation auf -30 mV etwas linear kontinuierlich ansteigt, erreicht der auswärtsgerichtete Strom der in Abbildung 3.27 A dargestellten Strom/Spannungskurve sein Maximum bei einer Depolarisation auf 30 mV und verringert sich bei noch positiveren Potentialen wieder.

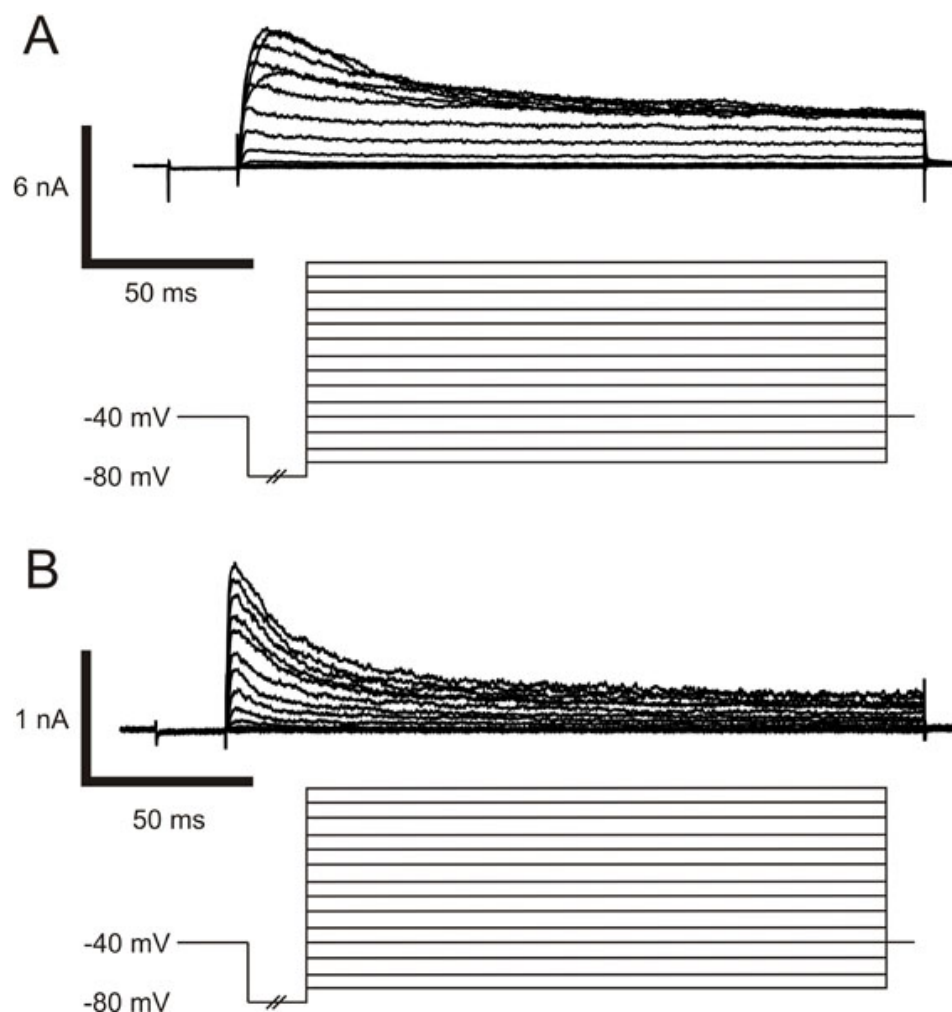


Abbildung 3.26: Typische auswärtsgerichtete Ströme von intravital markierten Neuronen in der Whole-Cell Konfiguration. Die Zellen wurden zunächst auf -40 mV geklemmt. Einer initialen Hyperpolarisation (-80 mV) folgte eine Erhöhung der Klemmspannung (10 mV Schritte) von -70 mV auf 60 mV. Die Pulsdauer betrug 200 ms. A: Die Ableitung zeigt im Vergleich zu B zeigt sowohl der initiale Strom zu Beginn des Spannungspulses, als auch der persistierende Strom über die gesamte Stimulusdauer einen stärkeren Gesamtstrom. B: Der Initialstrom ist im Vergleich zur persistierenden Stromamplitude stärker ausgeprägt auch wenn der auswärts gerichtete Gesamtstrom schwächer ist.

Die in Abb. 3.27 B dargestellte Strom/Spannungskurve einer Zelle zeigt die typische Strom- Spannungsbeziehung eines Kalium Kanals.

Bei wie Abbildung 3.26 A dargestellten Zellen wird der Auswärtsstrom ab einer angelegten Spannung zwischen 30 und 40 mV geringer. Dies kann seine Ursache entweder in der Schließung von Kanälen haben, die eine Komponente des auswärtsgerichteten Stroms tragen, oder in einem Einwärtsstrom der den weiter linear ansteigenden Auswärtsstrom überlagert.

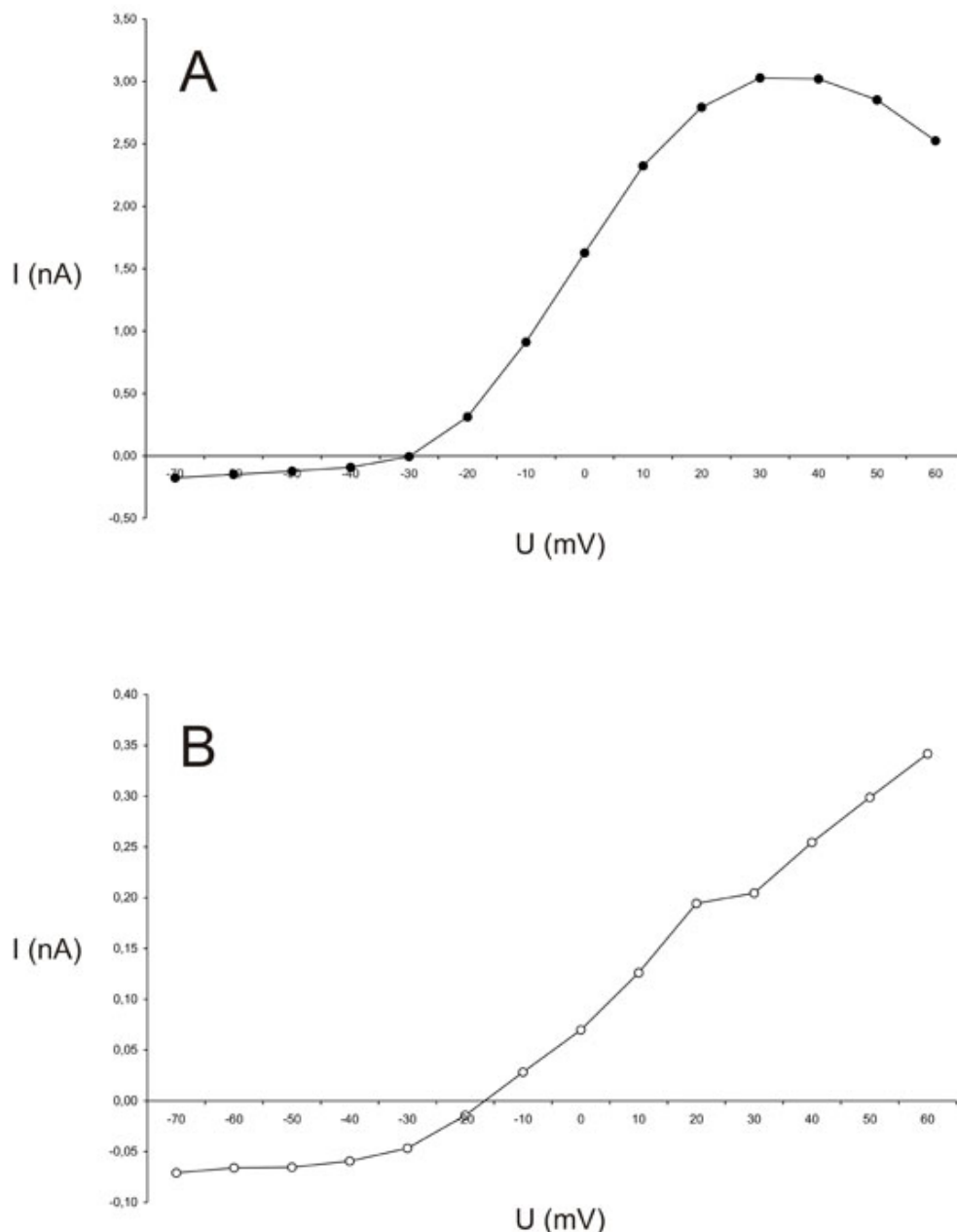


Abbildung 3.27: Strom/Spannungsrelation gemittelter Auswärtsströme, der in Abb. 3.26 dargestellten Whole-Cell Ableitungen. A: Strom/Spannungskurve der Ableitung 3.26 A. Die Ströme wurden in normaler physiologischer Lösung registriert und durch Spannungssprünge auf -70 mV bis 60 mV ausgelöst (Erhöhung in 10 mV Schritten nach einem Vorpuls von -80 mV). Der auswärts gerichtete Gesamtstrom erreicht sein Maximum bei 30 mV und fällt bei weiterer Positivierung des Membranpotentials wieder ab. B: Strom/Spannungskurve der Ableitung 3.26 B. Ab einer Spannung von -40 mV steigt die Amplitude des auswärts gerichteten Stroms linear an.

Es wurden keine Einwärtsströme detektiert, die auf die Präsenz von Natrium-Kanälen hindeuten.

Im Folgenden wurden die Ableitungen von intravital markierten Neuronen nach dem oben beschriebenen Kriterium unterschieden. Zellen, die eine Reduktion des Auswärtsstroms bei hohen Spannungen zeigten, wurden dem Typ A zugeordnet. Neurone, die keine Abweichung vom linearen Verlauf ihrer I-V Relation zeigten, wurden Typ B zugeteilt. Von den 23 an markierten Neuronen durchgeführten Patch Clamp Ableitungen konnten 12 der untersuchten Zellen dem Typ A und 11 Neurone dem Typ B zugeordnet werden.

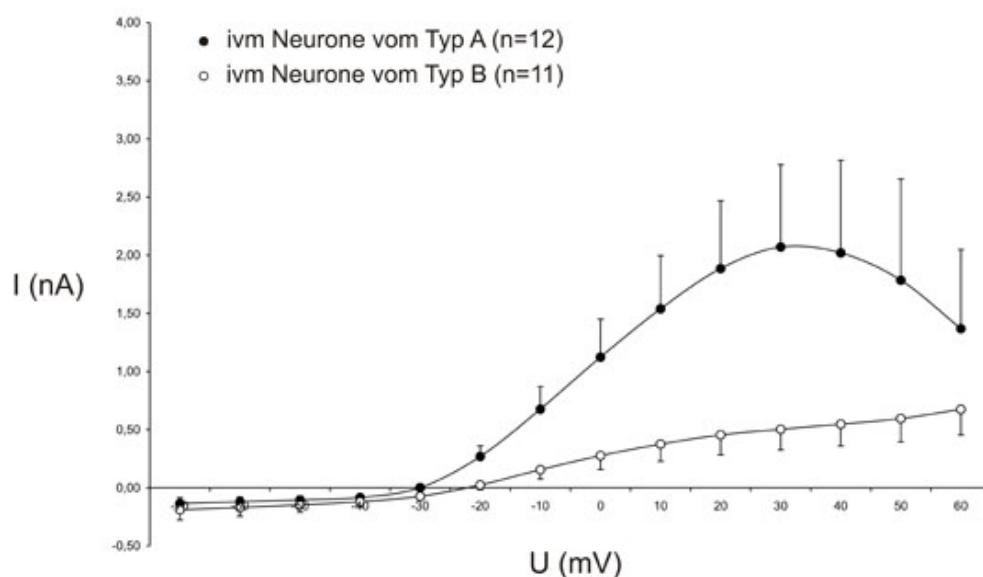


Abbildung 3.28: Vergleich zwischen der Strom/Spannungsrelation gemittelter Auswärtsströme aller Neurone die Typ A oder Typ B zugeordnet wurden. Die Ströme wurden in physiologischer Lösung registriert und durch Spannungssprünge auf -70 mV bis 60 mV ausgelöst (Erhöhung in 10 mV Schritten nach einem Vorpuls von -80 mV). Bei Neuronen des Typs A liegt das Maximum ihres Auswärtsstroms zwischen 30 und 40 mV. Zellen die dem Typ B zugeordnet wurden haben ab einer angelegten Spannung von -30 mV eine lineare Strom/Spannungsrelation.

Der Vergleich der Strom/Spannungsbeziehung der Neurone, die den Klassen A und B zugeordnet wurden, zeigt eine generelle Diskrepanz in der Intensität ihrer Auswärtsströme ab einer angelegten Kommandospannung von -30 mV. Da es bei Depolarisationen auf Potentiale von über 20 mV bei einigen Neuronen des Typs A bereits zu einer Reduktion der Amplitude des Gesamtauswärtsstroms kam, wurde für statistische Vergleiche von Amplituden der gemessene Auswärtsstrom bei Klemmspannung von 20 mV als Referenz herangezogen. Die mittlere maximale Stromamplitude für Neurone des Typs A betrug $1.885,8 \pm 582,2$ pA und war signifikant höher als die der Neurone des Typs B ($455,2 \pm 171,6$ pA; $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Abb. 3.29).

Dagegen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den berechneten Kapazitäten der beiden Neuronenklassen festgestellt werden ($17,17 \pm 16,5$ pF für Typ A und $17,97 \pm 11,1$ pF für Typ B). Die signifikant höhere Amplitude des Auswärtsstroms bei Neuronen des Typs A bei nahezu gleicher Kapazität, deutet demnach auf einen

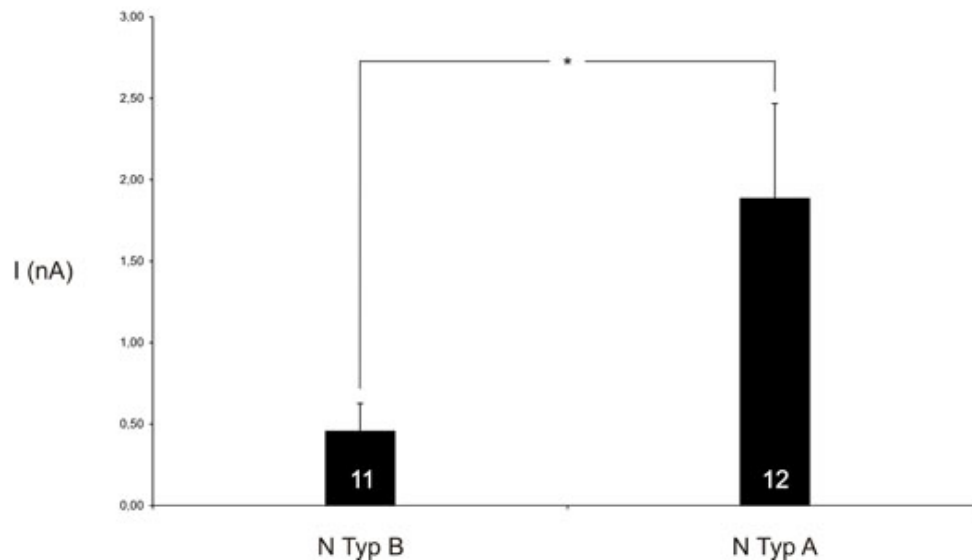


Abbildung 3.29: Darstellung der mittleren maximalen Amplitude des Auswärtsstroms von Neuronen des Typs A und B bei einer geklemmten Kommandospannung von 20 mV. Die Neurone vom Typ A haben signifikant größere Auswärtsströme als die Zellen vom Typ B ($p < 0,05$; Mann Whitney U Test).

Unterschied in der Somagröße zwischen den Neuronenklassen hin. Die Standardabweichungen der berechneten Kapazitäten sind jedoch so hoch, dass nicht entschieden werden kann, ob Unterschiede der maximalen Auswärtsströme ausschließlich auf Differenzen in der Zellgröße oder auf zusätzlichen Unterschieden in der Ionenkanaldichte beruhen.

Bezugnehmend auf die Abbildung 3.26 fällt als weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen den dargestellten Ableitungen eine stärkere transiente Komponente des Auswärtsstroms zu Beginn des Spannungssprungs bei Neuronen des Typ B auf. Bei Depolarisationen auf Spannungen über -20 mV wird das Maximum des transienten Stroms in weniger als 3 ms erreicht und fällt danach exponentiell auf das Niveau eines bis zum Ende des Stimulus persistierenden Auswärtsstroms ab.

Um das Verhältnis von transienten zu persistierenden Auswärtsströmen zu ermitteln, wurde für beide Neuronenklassen der Quotient aus dem maximalen Auswärtsstrom zu Beginn und dem maximalen Auswärtstrom am Ende des Depolarisationspulses bei einer Kommandospannung von 20 mV berechnet.

Das Verhältnis zwischen dem transienten und dem persistierenden Auswärtsstrom ist bei Neuronen des Typs B signifikant größer als bei Zellen der Klasse A ($2,51 \pm 0,67$ nA bei Typ B zu $1,42 \pm 0,13$ nA bei Typ A; $p < 0,05$; Mann Whitney U Test). Ein deutlicher transienter Peak des Auswärtstroms zu Beginn einer Depolarisation könnte also ebenfalls als Kriterium zur elektrophysiologischen Differenzierung von intravital markierten Neuronen herangezogen werden.

Die Ganzzellaufzeichnungen von Neuronen, die in Zellkultur eine Dextranmarkierung aufwiesen, zeigten nur auswärts gerichtete Gesamtströme. Der lineare Verlauf der Strom/Spannungskurven zwischen -50 und 20 mV deutet darauf hin, dass der Au-

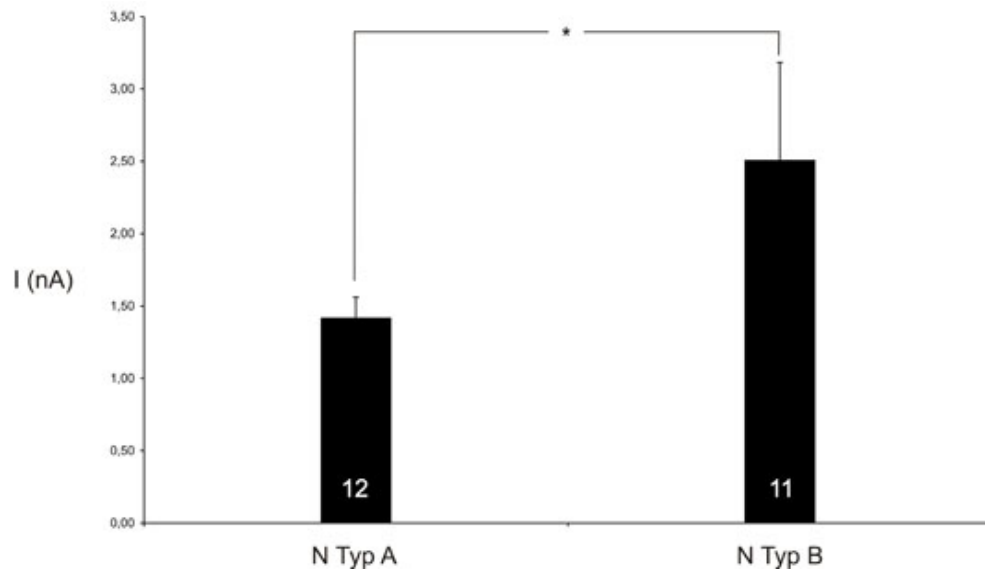


Abbildung 3.30: Darstellung des Quotienten der transienten und der persistierenden Komponente des Auswärtsstroms von Neuronen des Typ A und B bei einer Klemmspannung von 20 mV. Der Quotient zwischen den zu Beginn und den am Ende einer Depolarisation auftretenden Strömen ist bei Neuronen vom Typ B signifikant höher als bei Zellen des Typ A ($p < 0,05$; Mann Whitney U Test).

wärtsstrom von Kaliumkanälen vom Typ der „delayed rectifier“ K_{dr} oder I_K getragen wird.

In einem Kontrollexperiment, in dem eine Messung in einer Extrazellulärlösung mit dem Kaliumkanal Antagonisten Tetraethylammonium (TEA; 10 mM) durchgeführt wurde, konnte der Auswärtsstrom eines intravital markierten Neurons jedoch nicht geblockt werden (Abb. 3.31 A). Die Strom/Spannungsrelation zeigt auch nach der Zugabe von TEA immer noch den typischen Verlauf eines von I_K Kanälen getragenen Auswärtsstroms (Maximum Abb. 3.31 B). Mit einer maximalen Amplitude von 7,26 nA ist der Auswärtsstrom im Vergleich zu den gemittelten Stromstärken anderer Neurone (Abb. 3.28) sehr hoch, so dass davon auszugehen ist, dass keine kaliumabhängigen Komponenten des Auswärtsstroms geblockt wurden. Die abgeleitete Zelle zeigt keines der Charakteristika, die eine Einordnung in eine der beiden Neuronenklassen ermöglichen würde. Es kann nicht mit absoluter Sicherheit gesagt werden, ob die abgeleitete Zelle zu einer der typischerweise intravital markierten Neuronenklassen gehört oder ob die für die Klasseneinteilung herangezogenen Charakteristika durch die Zugabe von TEA maskiert wurden.

Bei der Messung in Extrazellulärlösung mit TEA konnte jedoch ein schnell inaktivierender Einwärtsstrom zu Beginn der angelegten Spannungspulse ab einer Depolarisation auf -30 mV beobachtet werden (Abb. 3.31 B weiße Kreise). Der einwärts gerichtete Strom erreicht sein Maximum von 1,68 nA bei einer Spannung von 10 mV. Bei einer Spannung von 30 mV erlangt der Einwärtsstrom mit 3 ms seine maximale zeitliche Ausdehnung. Bei einer angelegten Klemmspannung von 10 mV inaktiviert der Einwärtsstrom bereits nach 0,4 ms. Der Verlauf der Strom/Spannungsrelation sowie die schnelle Inaktivierung des Einwärtsstroms und ein Maximum im Bereich

einer Klemmspannung von 30 bis 10 mV deuten darauf hin, dass der gemessene Strom von Natriumkanälen getragen wird.

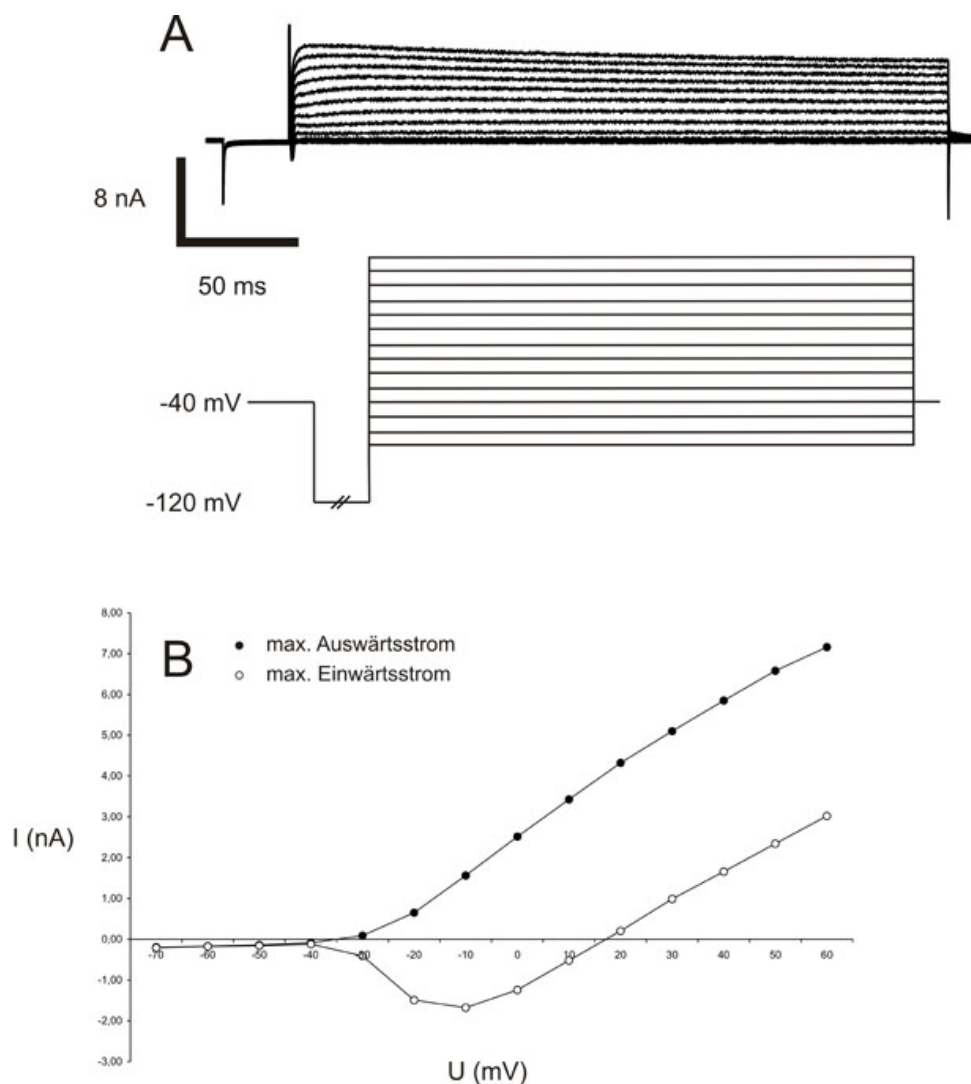


Abbildung 3.31: Auswärtsströme einer Whole-Cell Ableitung nach Zugabe von 10 mM TEA in die Extrazellulärlösung. Die Zelle wurde zunächst auf -40 mV geklemmt. Der vorausgegangenen Hyperpolarisation (-80 mV) folgte eine Erhöhung der Klemmspannung (10 mV Schritte) auf -70 mV bis 60 mV A: Gemessener Auswärtsstrom mit dargestelltem Pulsprotokoll. B: Strom/Spannungsrelation Maxima der gemessenen Aus- und Einwärtsströme. Der Auswärtsstrom zeigt den typischen Verlauf eines von Kalium getragenen Stroms. Der Einwärtsstrom hat die klassische Strom/Spannungsrelation eines von Natrium getragenen Stroms.

Aufgrund unterschiedlicher Strom/Spannungsrelationen bei angelegten Kommandospannungen von über 20 mV, wurden die abgeleiteten Neurone in zwei Klassen unterteilt. Ausgehend von diesem Kriterium konnten signifikante Unterschiede in den Maximalamplituden des Auswärtsstroms und in dem Verhältnis von transienten zu persistierenden Strömen zwischen den beiden Neuronenklassen festgestellt werden. Ob die Differenz in der Stromstärke des Auswärtsstrom auf Unterschiede in der Somagröße und/oder der Stromdichte zurückzuführen ist, konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Bei Ganzzelleableitungen unter normalen Bedingungen konnten keine von Natrium getragenen Einwärtsströme detektiert werden.

3.3.2 Differenzierung zwischen spannungsabhängigen und gleichrichtenden Kanälen intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen

Durch Modifikation des Vorpulses auf eine positivere Spannung kann verhindert werden, dass spannungsabhängige Kanäle aus dem inaktiven in den geschlossenen aktivierbaren Zustand wechseln.

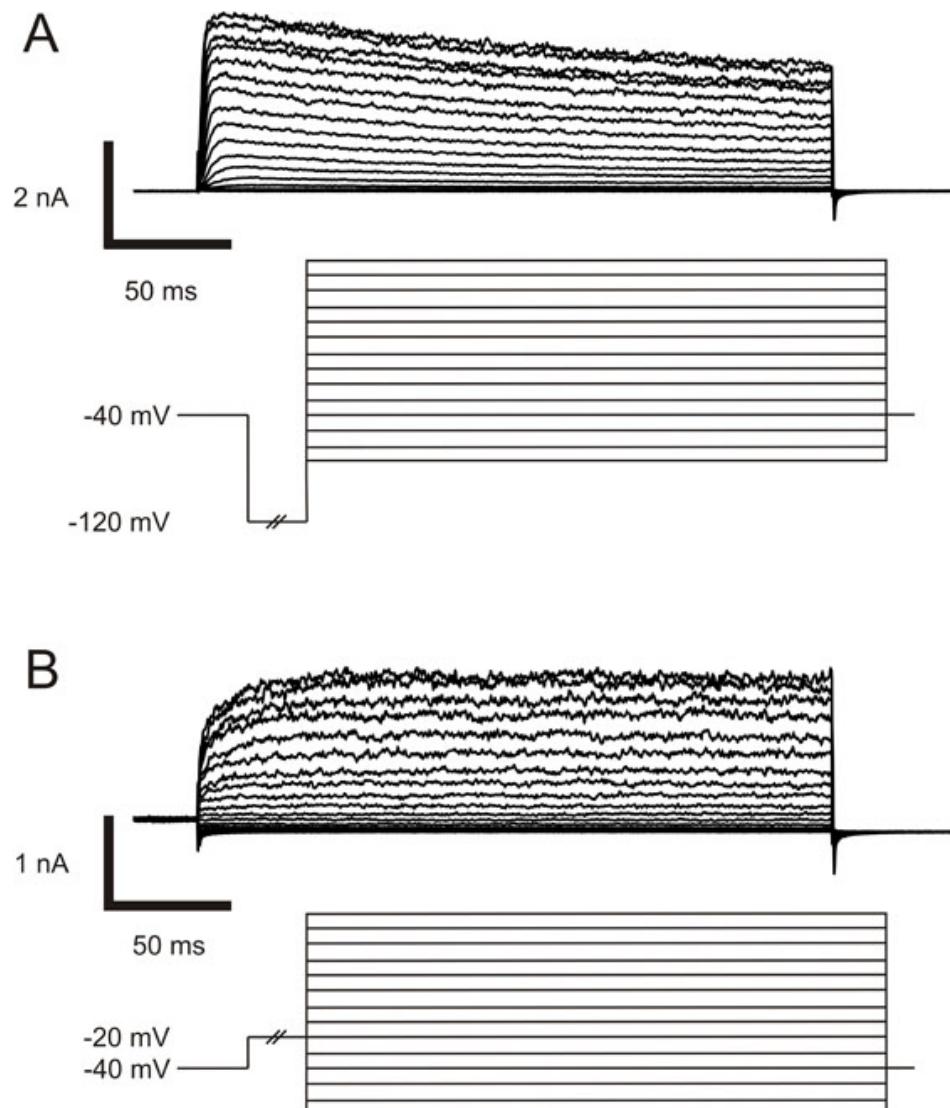


Abbildung 3.32: Auswärtströme eines intravital markierten Neurons des Typ B in der Whole-Cell Konfiguration nach unterschiedlichen Vorpulsen. Das Neuron wurde zunächst auf -40 mV geklemmt. Den verschiedenen Vorpulsen folgte eine Schrittweise Erhöhung der Klemmspannung (10 mV Schritte) von -100 mV auf 90 mV. Die Pulsdauer betrug 200 ms. A: Die Antwort der Zelle auf unterschiedliche Klemmspannungen nach einem Vorpuls von -120 mV. B: Der Auswärtstrom derselben Zelle wie in A nach einem Vorpulses von -20 mV.

Im Folgenden wurde unmittelbar nach einem Spannungsprotokoll mit einem Vorpuls von -120 mV für 20 ms dasselbe Protokoll mit einem Vorpuls von -20 mV wiederholt. Abb. 3.32 zeigt das Antwortverhalten einer Zelle, die anhand ihrer Strom/Spannungsrelation dem Neurontyp B zugeordnet werden kann. Zu Beginn der Klemmspannung ist bei einem Vorpuls von -120 mV ein transients Auswärtstrom zu

erkennen, der langsam auf die Amplitude des persistierenden Auswärtsstroms abflacht. Der auswärtsgerichtete Strom nach einem Vorpuls von -20 mV zeigt, statt des transienten Peaks zu Beginn der depolarisierenden Klemmspannung, eine sigmoide Annäherung an den maximalen persistierenden Auswärtsstrom, der erst gegen Ende des Spannungspulses erreicht wird.

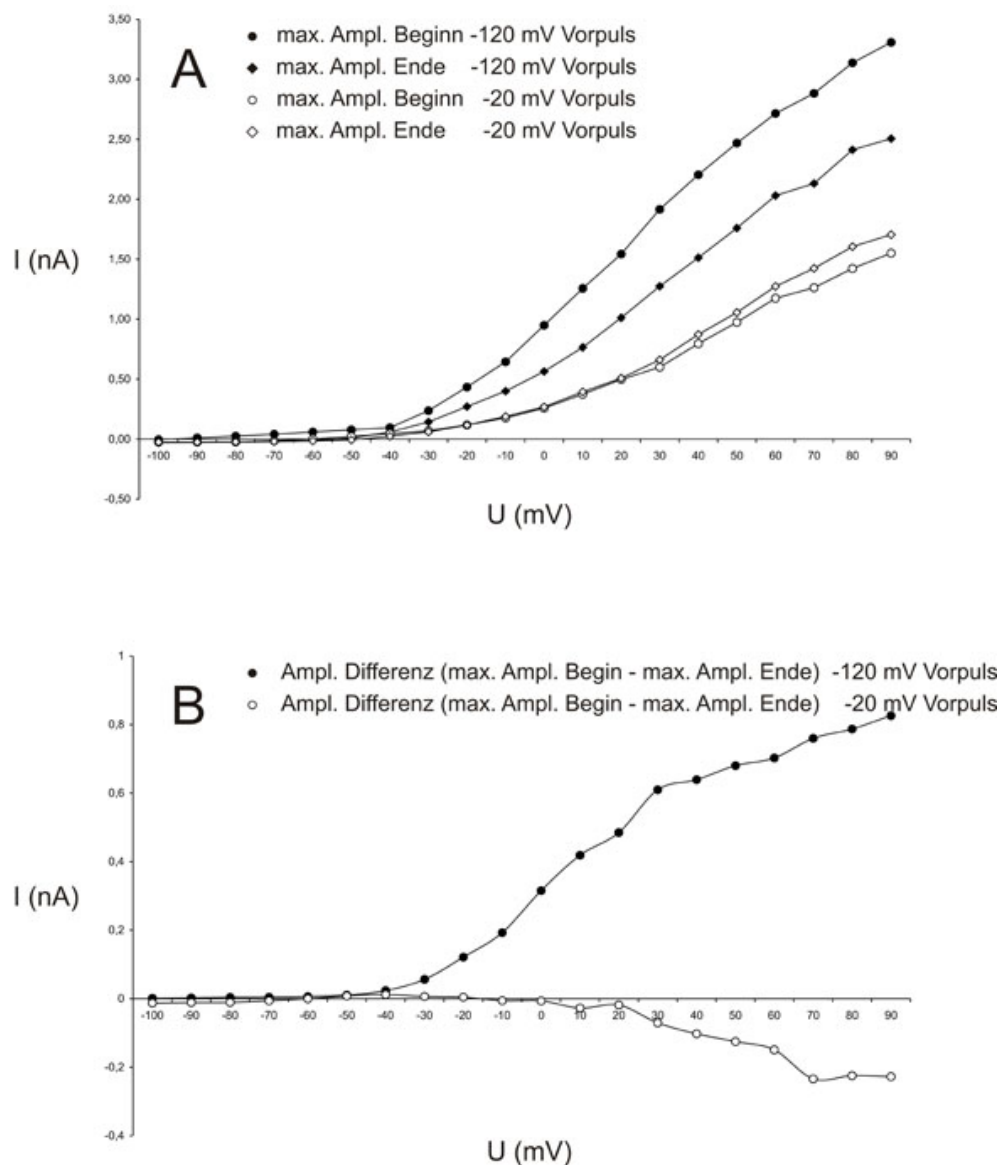


Abbildung 3.33: Darstellung der Amplituden derselben Zelle nach unterschiedlichen Vorpulsen, zu Beginn und am Ende der depolarisierenden Kommandospannungen in einer Strom/Spannungskurve. A: Darstellung der maximalen Amplituden der ersten (Kreis) und letzten (Raute) 10 ms der angelegten Klemmspannung nach einem Vorpuls von -120 mV (schwarz) und -20 mV (weiß). B: Die Differenz zwischen den maximalen Amplituden zu Beginn und zum Ende des Spannungspulses nach einer Vorspannung von -120 mV (schwarz) und -20 mV (weiß).

Der transiente Anteil des Auswärtsstroms der Neurone des Typs B ist also spannungsabhängig.

In Abbildung 3.33 A sind die Strom/Spannungsrelationen der beiden in Abb. 3.32 dargestellten Ableitungen für die zu Beginn und die am Ende auftretenden Auswärtsströme aufgetragen. Es wurde jeweils der maximale Auswärtsstrom der ersten und letzten 10 ms des Spannungssprungs ermittelt. Die maximale Stromstärke bei

einer Klemmspannung von 90 mV lag bei dem Messprotokoll mit einem Vorpuls von -120 mV bei 3,31 nA und trat unmittelbar zu Beginn der Depolarisation auf. Die gemessene maximale Amplitude des in unmittelbarer Folge durchgeführten Protokolls mit einem Vorpuls von -20 mV lag bei 1,7 nA und wurde erst nach 200 ms Dauer der angelegten Klemmspannung von 90 mV erreicht. Die Differenz der maximalen Amplituden zu Beginn und am Ende der depolarisierenden Klemmspannung bei unterschiedlichen Vorpulsen ist in Abb. 3.33 B aufgetragen.

Die gemessenen Stromstärken des Protokolls mit dem Vorpuls von -120 mV (schwarz) zeigen ab einer angelegten Spannung von -40 mV einen nahezu linearen Anstieg. Die Differenz der beiden Maximalamplituden zu Beginn und Ende des Spannungspulses beträgt nach einem Vorpuls von -120 mV bei einer Klemmspannung von 90 mV 826 pA.

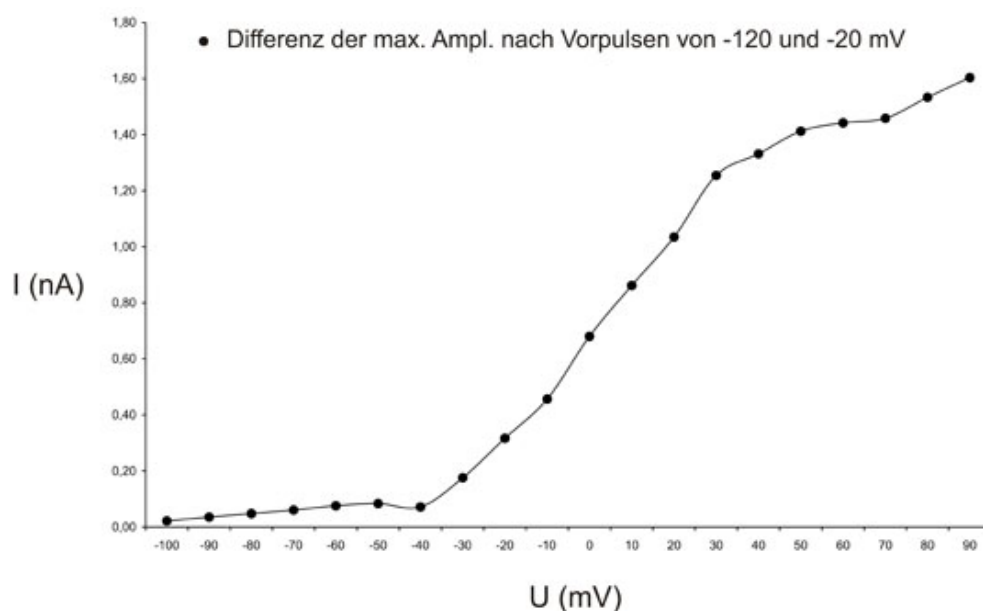


Abbildung 3.34: Strom/Spannungsdifferenz der maximalen Auswärtsströme nach Vorpulsen von -120 mV und -20 mV des intravital markierten Neurons aus Abb. 3.32/3.33. Die so ermittelte Komponente des Auswärtsstroms ist der Anteil, der durch spannungsabhängige Kanäle getragen wird.

Die gemessenen maximalen Stromstärken bei Durchführung des Protokolls mit einem Vorpuls von -20 mV zeigen bis zu einer angelegten Spannung von 0 mV keinen Unterschied zwischen Beginn und Ende des depolarisierenden Pulses. Ab einer Kommandospannung von 10 mV wird die Differenz der gemessenen Amplituden der ersten und letzten 10 ms der Klemmspannung negativ, das heißt, dass die Amplituden zum Ende des Kommandopulses größer sind als zu Beginn und die transiente Komponente vollständig verschwunden ist. Die Differenz nach einem Vorpuls von -20 mV beträgt 227 pA bei einer Klemmspannung von 90 mV. Durch die Subtraktion der abgeleiteten Maximalamplituden nach den verschiedenen Vorpulsen kann der Anteil des spannungsaktivierten Stroms am jeweiligen Gesamtstrom der verschiedenen Klemmspannungen ermittelt werden.

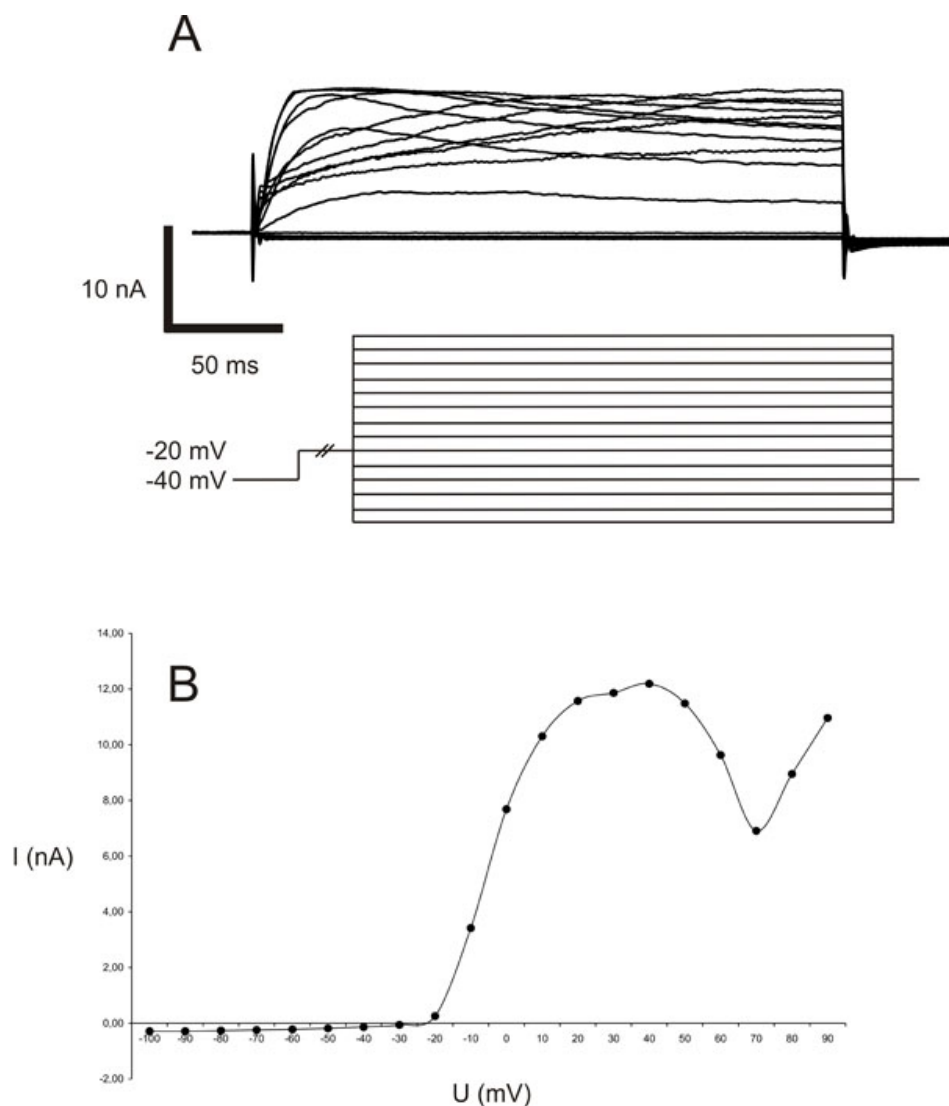


Abbildung 3.35: Auswärtsstrom und Strom/Spannungsrelation eines intravital markierten Neurons des Typ A nach einem Vorpuls von -20 mV. Das Neuron wurde zunächst auf -40 mV geklemmt. Dem Vorpuls folgte eine schrittweise Erhöhung der Klemmspannung (10 mV Schritte) auf -100 mV bis 90 mV. Die Pulsdauer betrug 200 ms. A: Auswärtsstrom nach einer Depolarisation des Vorpulses auf -20 mV. B: Strom/Spannungsrelation des maximalen Auswärtsstroms bei Klemmspannungen von -100 bis 90 mV.

Abbildung 3.34 zeigt die Stromamplitudendifferenz zwischen Beginn und Ende des Spannungsstimulus in Abhängigkeit des Vorpulses. Die Strom/Spannungskurve hat von -30 mV bis 30 mV einen linearen Verlauf. Ab einer Klemmspannung von 30 mV verringert sich der der auswärts gerichtete Strom wieder. Die gemessene Maximalamplitude des so ermittelten spannungsabhängigen Stroms bei einer Klemmspannung von 90 mV betrug 1,6 nA. Das entspricht ungefähr der Hälfte des gemessenen Gesamtstroms (3,31 nA) und liegt im Bereich der Standardabweichung des für alle abgeleiteten Zellen ermittelten Quotienten (Abb. 3.30) aus transientem und persistierendem Auswärtsstrom (Abb. 3.30 und Text in Abschnitt 3.3.1).

Eine exakte Bestimmung der Differenz zwischen spannungsabhängigen und der persistierenden Komponente des auswärtsgerichteten Stromes von Neuronen des Typs A konnte nicht durchgeführt werden, da eine unmittelbare Wiederholung der Mess-

protokolle mit unterschiedlichen Vorpulsen nicht erfolgreich war. In Abb. 3.35 B wird jedoch deutlich, dass die maximale Amplitude des Auswärtsstroms auch bei einem Vorpuls von -20 mV bei 40 mV erreicht wurde. Genau wie in den in Abb. 3.28 dargestellten Experimenten mit Neuronen des Typs A nimmt der Auswärtsstrom bei Klemmspannungen zwischen 40 und 60 mV ab.

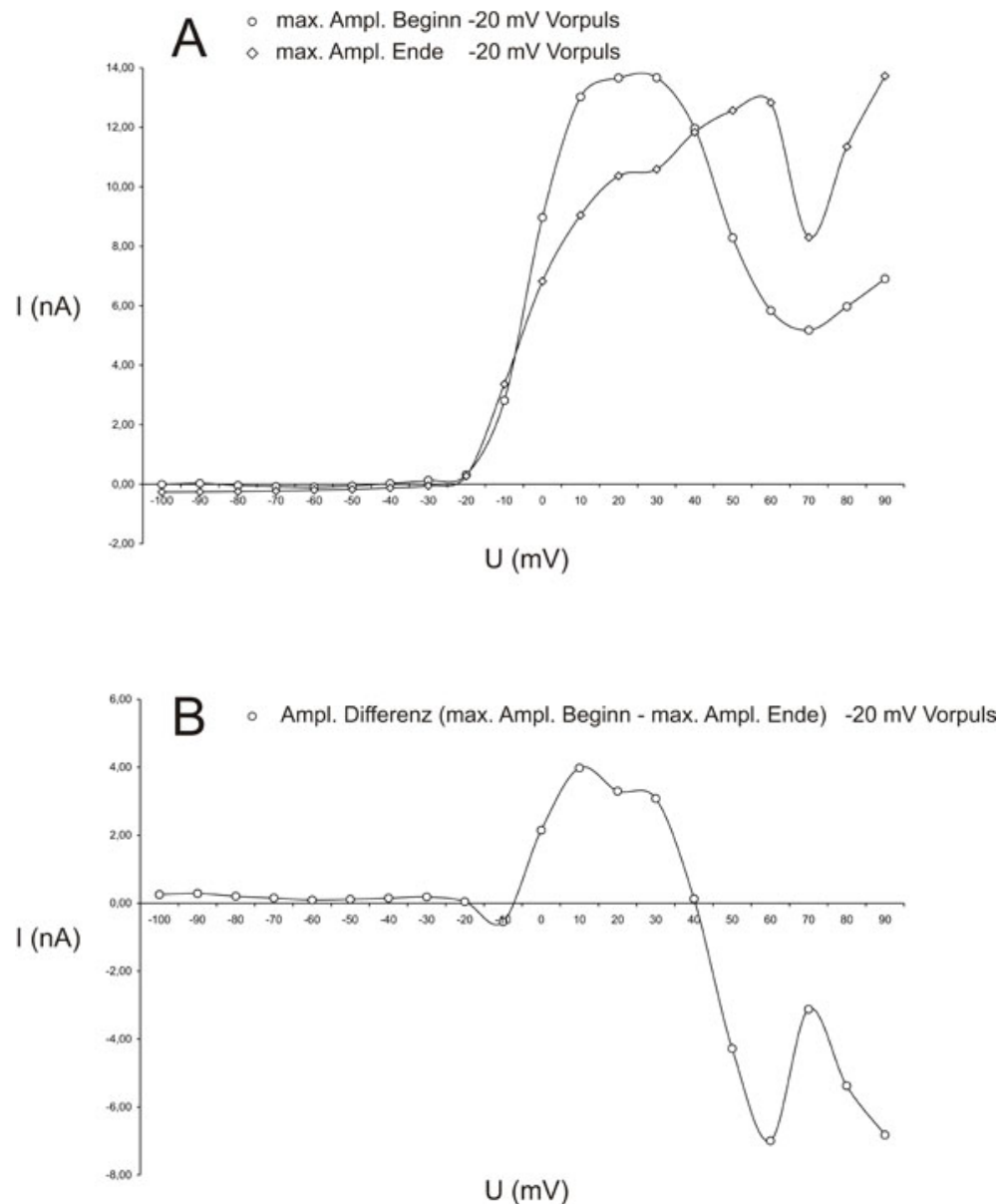


Abbildung 3.36: Darstellung der Amplituden des intravital markierten Neurons aus Abb. 3.35 zu Beginn und am Ende der 200 ms dauernden Kommandospannungen in einer Strom/Spannungskurve. A: Maximale Stromamplituden der ersten (Kreise) und letzten (Rauten) 10 ms der angelegten Klemmspannung nach einem Vorpuls von -20 mV. B: Differenz zwischen den maximalen Stromamplituden zu Beginn und zum Ende des Spannungspulses nach einem Vorpuls von -20 mV.

Die Komponente, welche den Auswärtsstrom bei Spannungen zwischen 30 und 40 mV reduziert, ist also nicht Abhängig von einem hyperpolarisierenden Vorpuls. Bei dem in Abbildung 3.35 veranschaulichten Pulsprotokoll wurde jedoch anders als bei den Experimenten zur allgemeinen Charakterisierung der Ströme auf Spannungen bis

100 mV geklemmt. Hierdurch wird ein erneuter Anstieg des auswärtsgerichteten Gesamtstroms bei Klemmspannungen positiver als 70 mV sichtbar.

Eine Auftragung der Strom/Spannungsrelation (Abb. 3.36 A) der maximalen Amplituden für die ersten und letzten 10 ms der angelegten Klemmspannungen zeigt eine Verschiebung der Maxima. Das Maximum des Auswärtsstroms unmittelbar nach Anlegen der Klemmspannung wurde bei einem Spannungssprung auf 30 mV erreicht, während der ermittelte Auswärtsstrom nach 200 ms bei einem Potential von 60 mV sein Maximum erreichte.

Sowohl bei den gemessenen Strömen zu Beginn als auch am Ende der Spannungspulse bleibt der „N-Förmige“ Verlauf der Strom/Spannungskurve erhalten. Das lokale Minimum des Auswärtsstroms liegt sowohl zu Beginn als auch am Ende der Spannungspulse bei 70 mV. Der Wendepunkt verschiebt sich allerdings in der fortlaufenden Zeit der angelegten Klemmspannung von 30 zu 60 mV.

Der Unterschied der Stromstärke zwischen den Auswärtsströmen ist in Abbildung 3.36 B als Differenz in einer Strom/Spannungskurve aufgetragen. Ab einer Klemmspannung von 40 mV ist die Differenz negativ, was bedeutet, dass die schwach ausgeprägte transiente Komponente des Auswärtsstroms (Abb. 3.30) auch bei Neuronen des Typ A spannungsabhängig ist.

Neurone des Typ B haben eine spannungsabhängige Komponente, die circa die Hälfte des gesamten Auswärtsstroms beträgt und den transienten Peak am Beginn der Spannungspulse bewirkt. Spannungsabhängigkeit und die schnelle Inaktivierung der transienten Komponente sprechen dafür, dass es sich hier um einen A Strom handelt, also einen Kaliumstrom der von K_A oder I_A Kanälen getragen wird.

Der Gesamtauswärtsstrom der Neurone des Typs A setzt sich aus mindestens drei Komponenten zusammen. Das Anlegen von Klemmspannungen über 60 mV hat gezeigt, dass der Auswärtsstrom ein lokales Minimum bei 70 mV erreicht. Dadurch wird der Verlauf der Strom/Spannungsrelation bei positiven Spannungen N-förmig. Es konnte gezeigt werden, dass dieses zweite Minimum bei 70 mV nicht von einem hyperpolarisierenden Vorpuls abhängig ist. Der N-förmige Verlauf des Auswärtsstroms bei einer Strom/Spannungskurve, bei der auf unphysiologisch hohe Spannungen geklemmt wurde ist typisch für Ströme, die von kalziumabhängigen Kaliumkanälen getragen werden.

Der schwächer als bei Typ B Neuronen ausgeprägte transiente Peak zu Beginn der Spannungspulse ist auch bei Neuronen des Typ A spannungsabhängig und wird wahrscheinlich von K_A Kanälen getragen.

3.3.3 Pharmakologisch ausgelöste elektrische Ströme intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen

Eine pharmakologische Analyse des Kanalbesatzes von intravital markierten Neuronen war nicht erfolgreich, da sich die Zellen nur für einen begrenzten Zeitraum stabil in der Whole-Cell-Konfiguration ableiten ließen. Abb. 3.37 zeigt die Veränderung der Strom/Spannungsrelation einer im Whole-Cell modus abgeleiteten Zelle über einen Zeitraum von 5 min, bei der in einminütigem Abstand das auch in 3.3.1 verwendete Pulsprotokoll durchgeführt wurde. Nach den Kriterien, die in 3.3.1 zur Einteilung der Neurone in unterschiedliche Klassen herangezogen wurden, gehört dieses Neuron zum Typ A. Die Maximale Amplitude des Auswärtsstroms von 4,04 nA wurde bei einer Klemmspannung von 30 mV zu Beginn der Messung registriert. Schon nach zwei Minuten lag die Maximalamplitude des gemessenen Auswärtsstroms bei 1,97 nA und wurde bereits bei einer angelegten Spannung von 10 mV erreicht. Die schnelle Reduktion des Auswärtsstroms lässt auf einen starken Leckstrom schließen, der das intrazelluläre Milieu der Zelle kontinuierlich an die Ionenkonzentration der Extrazellulärlösung angleicht.

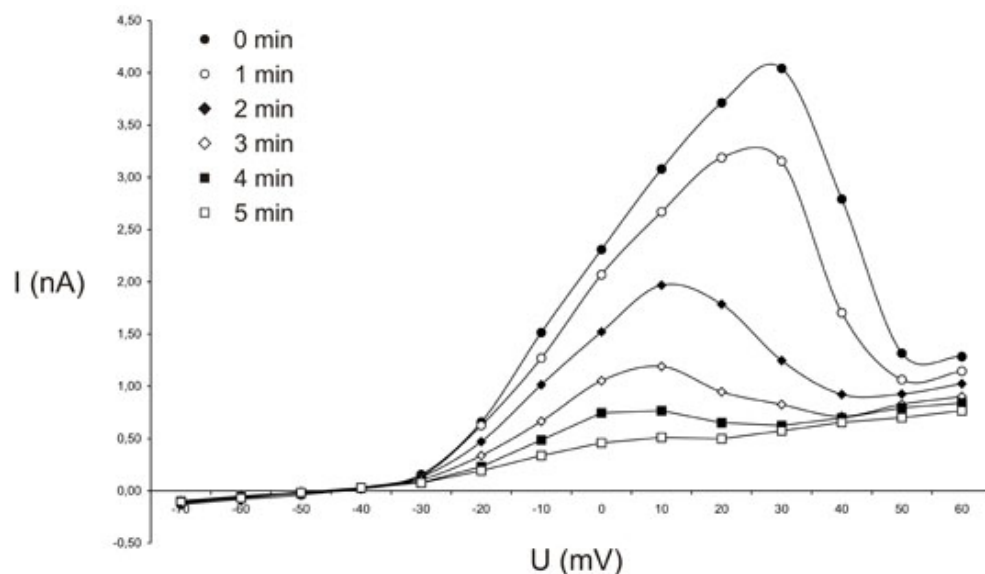


Abbildung 3.37: Änderung der Strom/Spannungsrelation eines intravital markierten Neurons des Typs A in Abhängigkeit von der Dauer der Ableitung. Die Zelle wurde zunächst auf -40 mV geklemmt. Der vorausgehenden Hyperpolarisation (-80 mV) folgte eine Erhöhung der Klemmspannung (10 mV Schritte) auf -70 mV bis 60 mV. Der Abstand zwischen den Messungen betrug jeweils 1 min.

An der Messapparatur der Arbeitsgruppe von PD Dr. B. Grünwald, in der Abteilung Neurobiologie der Freien Universität Berlin konnte jedoch durch Applikation des Neurotransmitters Acetylcholin ($100 \mu\text{m}$) ein einwärts gerichteter Strom in einer intravital markierten Zelle ausgelöst werden. Hierbei wurde Acetylcholin mittels einer Kapillare 200 ms nach anlegen der Klemmspannung in die unmittelbare Nähe der Zelle appliziert, während das markierte Neuron in der Whole-Cell-Konfiguration abgeleitet wurde. Die Steuerung der Druckapplikation, sowie die Datenaufnahme erfolgten

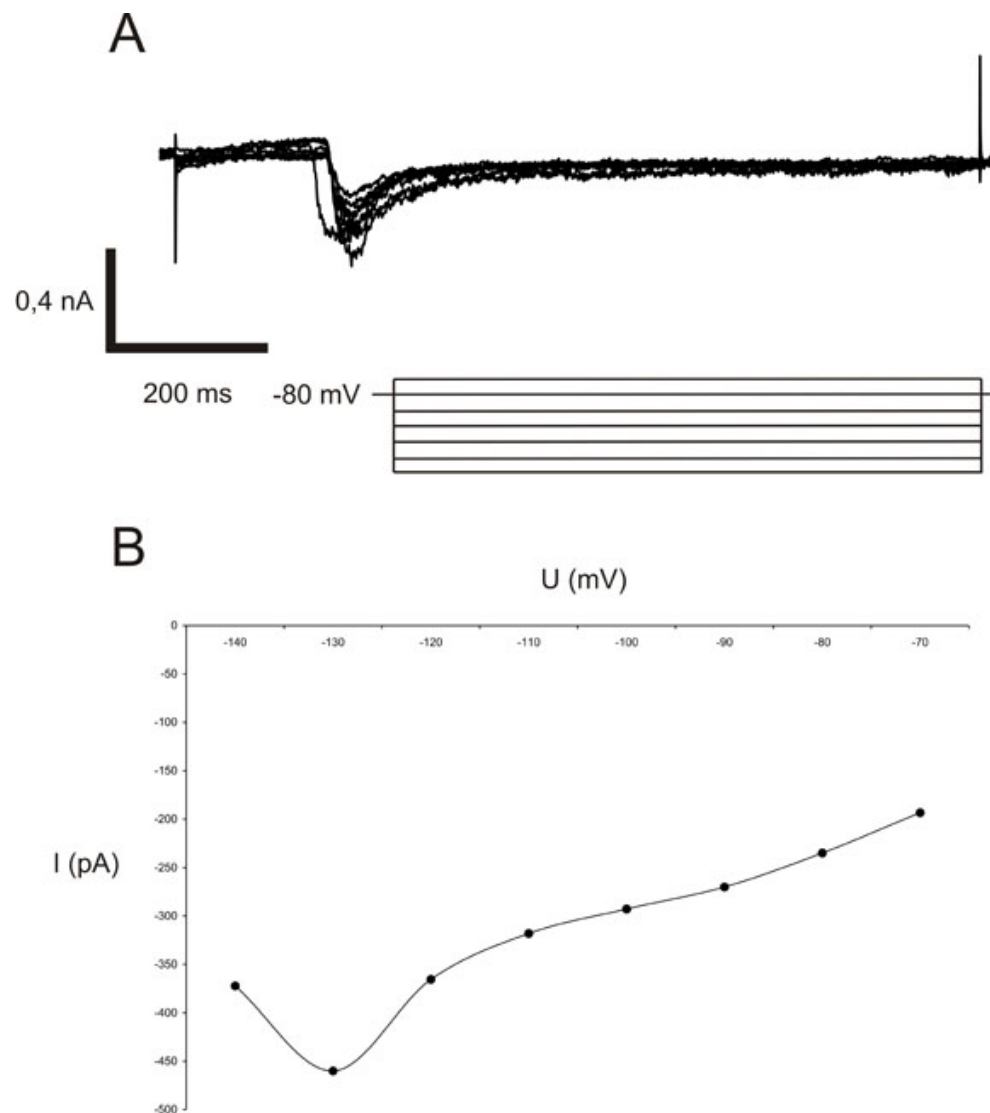


Abbildung 3.38: Gemessene Einwärtsströme eines intravital markierten Neurons nach Applikation von 1 mM Acetylcholin. Einem Haltepotential von -80 mV folgte eine Schrittweise Änderung der Klemmspannung (10 mV Schritte) von -70 auf -140 mV. A: Abgeleitete Einwärtsströme nach der Applikation von 1 mM ACh bei den im Protokoll dargestellten Klemmspannungen. B: Strom/Spannungsrelation des Einwärtsstroms bei angelegten Klemmspannungen von -140 mV bis 70 mV.

in diesem Fall mit der Software Pulse (Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz). Die Zelle wurde ausgehend von einem -80 mV Haltepotential in 10 mV Schritten von -70 auf -140 mV hyperpolarisiert. Abbildung 3.38 B zeigt die Strom/Spannungsrelation der Ableitung aus Abbildung 3.38 A. Der maximale Einwärtsstrom von $0,46$ nA wurde bei einer Klemmspannung von -130 mV registriert.

Die Strom/Spannungsrelation zeigt den typischen Verlauf eines durch nikotinsche Acetylcholinrezeptoren vermittelten Einwärtsstroms. Eine Kontrolle durch einen pharmakologischen Block wurde nicht durchgeführt, jedoch führte die zweite Applikation von Acetylcholin 200 ms nach einer Vorangegangenen zu keiner erneuten Reaktion der Zelle (Abb. 3.39). Die in der Literatur zu findende Zeitkonstante für die Aktivierbarkeit von ACh-Rezeptor-Kanälen nach ihrer Desensibilisierung liegt bei etwa 300 ms. Es handelt sich also bei den gemessenen Strömen um einen ACh vermittelten

Einwärtsstrom. Eine durch die Druckapplikation mechanisch vermittelte Zellreaktion kann ausgeschlossen werden.

In dieser Messung konnte bei einem markierten Hirnneuron in Zellkultur ein durch Acetylcholin stimulierter Einwärtsstrom identifiziert werden. Die Desensibilisierung des Rezeptorkanals für über 200 ms nach der Transmitterapplikation deutet auf einen durch nikotinische ACh-Rezeptor-Kanäle getragenen Einwärtsstrom hin.

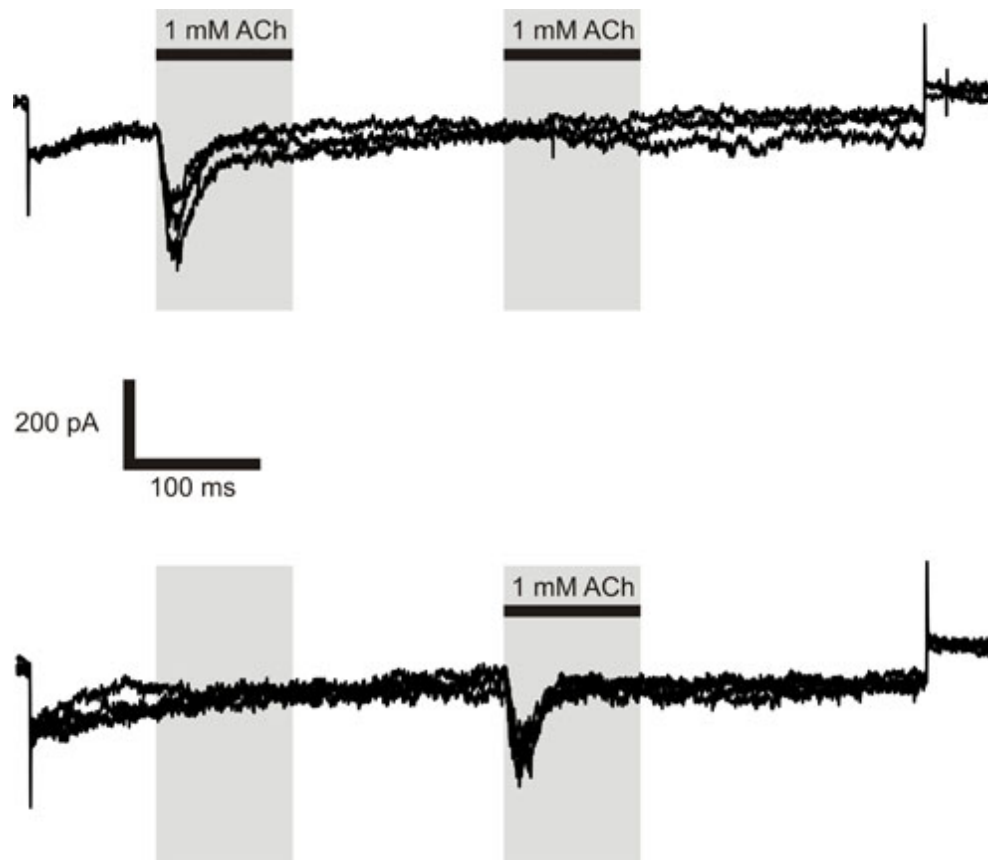


Abbildung 3.39: Applikation von 1 mM Acetylcholin zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Ableitung bei einem Haltepotential von -80 mV. In der oberen Spur wurde 200 ms nach der ersten Applikation von ACh ein zweiter, identischer Puls appliziert. Die untere Spur zeigt eine Kontrolle, bei welcher der erste Puls ausgelassen wurde. Hier löst der zum selben Zeitpunkt nach Einstellen des Haltepotentials applizierte ACh-Stimulus den typischen Einwärtsstrom aus.

3.4 Optophysiologische Messungen zytosolischer Kalziumkonzentrationen in Primärkulturen aus Heuschreckengehirnen von *Ch. biguttulus*

Messungen von Ionenkonzentrationen mittels optischer Registrierungsmethoden, bieten im Vergleich zur Elektrophysiologie einige Vorteile im Bezug auf bestimmte Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.

Einer der Vorteile der optischen Mikrofluorometrie ist, dass Informationen über Änderungen des physiologischen Zustandes einer Zelle gewonnen werden können, ohne diese dabei zu beschädigen.

Ein weiterer Vorteil der optischen Ableitmethode ist, dass Untersuchung von Second-Messenger-Signalwegen direkt möglich sind, sofern ein Fluoreszenzindikator zur Verfügung steht, der eine Detektion der involvierten Signalmoleküle erlaubt. Während elektrophysiologischer Ableitungen in der Whole-Cell-Konfiguration werden lösliche zelluläre Substanzen dagegen nach kurzer Zeit durch die Pippettenlösung ausgewaschen und somit Untersuchungen von Second-Messenger-Signalwegen, an denen frei lösliche Enzyme und Proteine beteiligt sind, deutlich erschwert.

Vorhergehende Arbeiten an intakten Präparationen hatten die Beteiligung des Adenylatzyklase- und Phospholipase C-Signalwegs an der Gesangsauslösung bei Feldheuschrecken der Art *Ch. biguttulus* belegt (Heinrich und Elsner 1997, Wenzel et al. 2002). Die Aktivierung des Phospholipase C Second Messenger Signalwegs führt unter anderem zur Bildung des Botenstoffes IP₃, welcher rezeptorvermittelt die intrazellulären Kalziumspeicher des endoplasmatischen Retikulums öffnet und zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration der Zelle führt.

Der Nachweis einer Zunahme der zytosolischen Kalziumkonzentration nach Applikation muskarinischer Agonisten bei intravital markierten Neuronen in Primärzellkulturen, wäre ein starkes Indiz für die Spezifität der angewendeten Färbemethode.

3.4.1 Beladung der Zellen mit Fluoreszenzindikatoren

In Vorversuchen wurden die Primärkulturen aus Heuschreckengehirnen mit verschiedenen Fluoreszenzindikatoren unter variierenden Inkubationszeiten beladen. Ziel war es, einen kalziumsensitiven Farbstoff zu ermitteln, der von den Zellen zuverlässig aufgenommen wird und dessen emittierte Fluoreszenz einen guten Kontrast zur unspezifischen Hintergrundfluoreszenz bildet.

In den ersten Experimenten wurden die Zellen mit dem Kalziumfarbstoff Oregon Green beladen. Abbildung 3.40 A zeigt einen Ausschnitt einer Zellkultur nach Beladen der Zellen mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff. Die Kultur wurde für

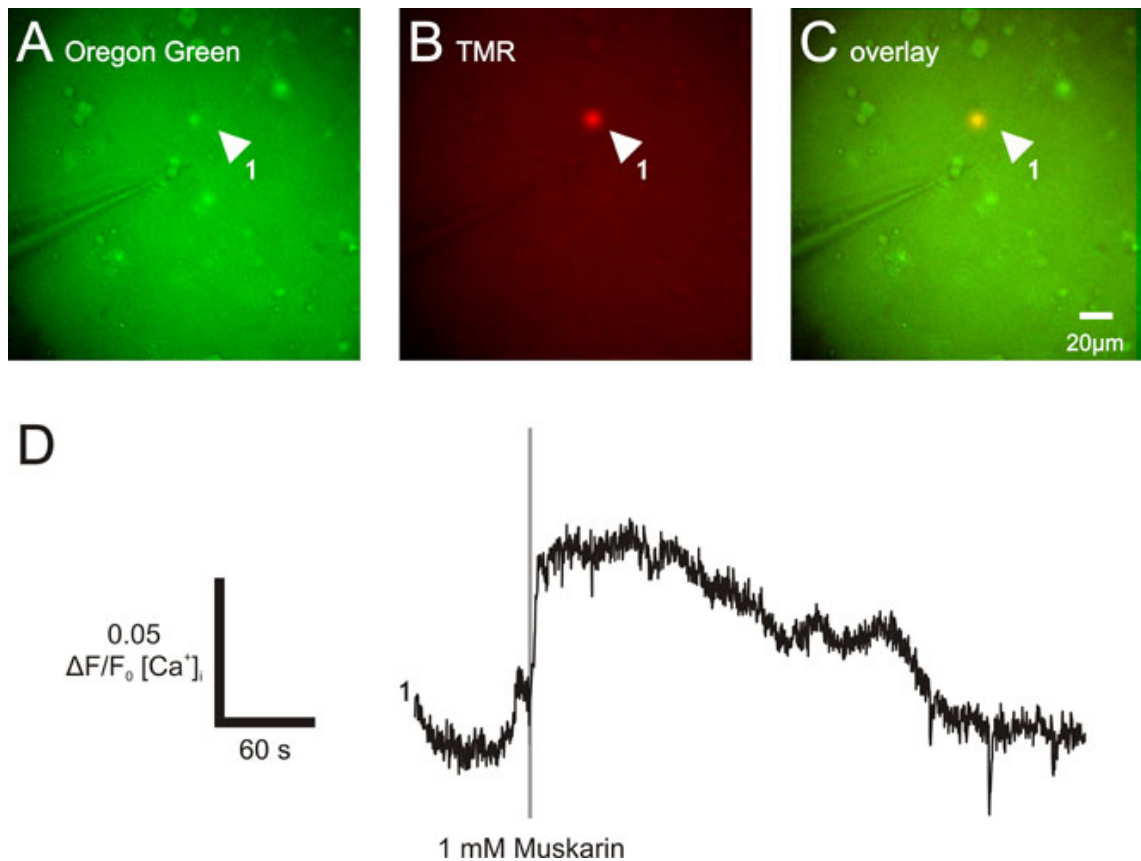


Abbildung 3.40: Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer mit Oregon Green beladenen intravital markierten Zelle. A: Übersichtsbild eines Kulturausschnitts. Zellen, die den kalziumsensitiven Farbstoff Oregon Green aufgenommen haben, zeigen eine grüne Fluoreszenz. B: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt eine rot fluoreszierende Zelle, die den dextrangekoppelten Farbstoff Tetramethylrhodamin bei der intravitalem Markierung aufgenommen hat. C: Überlagerung der Bilder A und B. D: Messung der relativen Kalziumkonzentration der in den Bildausschnitten A-C mit 1 markierten Zelle. Aufgetragen ist die normierte Intensität des emittierten Lichtes der Wellenlänge 488 nm über die Zeit. Nach Applikation von 1 mM Muskarin reagiert die Zelle mit einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration.

30 min mit Oregon Green (2 $\mu\text{l/ml}$) inkubiert. Zellen, die den Farbstoff aufgenommen haben, heben sich in hellerem grün vom Hintergrund ab. Abbildung 3.40 B zeigt denselben Bildausschnitt wie Abb. 3.40 A, wobei die rote Fluoreszenz ein intravital markiertes Neuron zeigt. Die Hintergrundfärbung ist im roten Fluoreszenzbereich deutlich niedriger. Hinzu kommt, dass nicht alle Zellen, die nach den Erkenntnissen aus Abschnitt 3.1.1 als vital eingestuft wurden, den Kalziumfarbstoff aufnahmen, wogegen einige Zellfragmente mit derselben Intensität leuchteten wie intakte Zellen, die den Fluoreszenzindikator aufgenommen hatten.

Weiterhin konnte es bei den Inkubationen der Kulturen mit Oregon Green vorkommen, dass überhaupt keine Zellen den Farbstoff aufnahmen. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden. Auch Variationen der Inkubationszeiten von 10 min bis zu 1 h und die schrittweise Erhöhung der Konzentration des Kalziumfarbstoffs auf 4 $\mu\text{l/ml}$ verbesserte die Farbstoffaufnahme der Zellen nicht. Die relative Kalziumkonzentration der in Abb. 3.40 intravital markierten Zelle stieg nach der Applikation von 1 mM Muskarin (1 bar; 0, 2s) um 6% an.

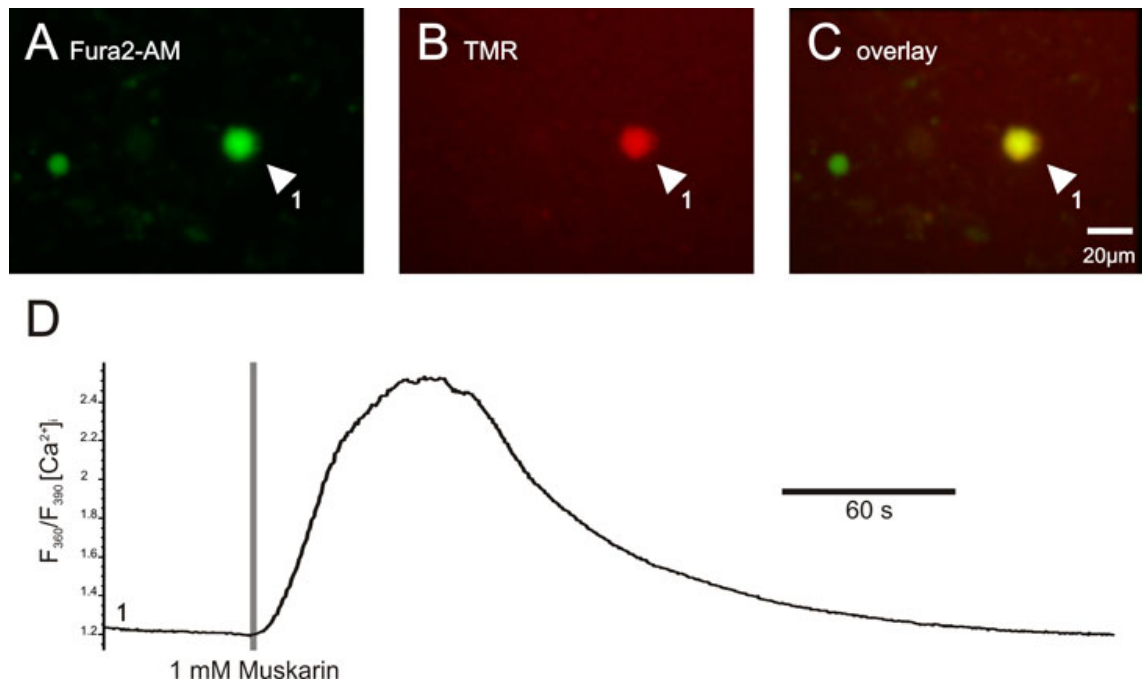


Abbildung 3.41: Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer mit Fura/AM beladenen intravital markierten Zelle. A: Übersichtsbild eines Kulturausschnitts. Zellen, die den kalziumsensitiven Farbstoff Fura2/AM aufgenommen haben, zeigen eine grüne Fluoreszenz. B: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt eine rot fluoreszierende Zelle, die den dextrangekoppelten Farbstoff Tetramethylrhodamin bei der intravitale Markierung im intakten Heuschreckengehirn aufgenommen hat. C: Überlagerung der Bilder A und B. D: Messung der relativen Kalziumkonzentration der in den Bildausschnitten A-C mit 1 markierten Zelle. Aufgetragen ist der Quotient der Intensität des emittierten Lichtes der Wellenlängen 360 und 390 nm über die Zeit. Nach Applikation von 1 mM Muskarin reagiert die Zelle mit einem deutlichen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration um ca. 59%.

Da die Zellen den Farbstoff Oregon Green nicht immer aufnahmen, wurde mit Fura2/AM ein weiterer Fluoreszenzindikator auf seine Eignung getestet. Nach anfänglichen Variationen der Inkubationszeit, stellte sich bei einer Konzentration von 2 $\mu\text{l/ml}$ eine Inkubationszeit von 20 min als optimal für eine zuverlässige Befüllung der kultivierten Zellen heraus. Abb. 3.41 zeigt eine intravital markierte Zelle, die auf die Applikation von 1 mM Muskarin mit einem deutlichen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration (um 59%) reagiert. Die Ableitspur ist im Vergleich zu Abbildung 3.40 nahezu rauschfrei und die Zellen, die den Kalziumfarbstoff aufgenommen haben, heben sich wesentlich deutlicher von der Hintergrundfluoreszenz ab (Abb. 3.41 A) als die Oregon Green gelabelten Zellen (Abb. 3.40 A). Das Problem, dass die Zellen den Kalziumfarbstoff nicht aufnahmen, trat bei Verwendung von Fura2/AM nicht auf. Deshalb wurden die folgenden Experimente ausschließlich mit dem Fluoreszenzindikator Fura2/AM nach dem in 2.6.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

3.4.2 Messung zytosolischer Kalziumkonzentrationen primärkultivierter Neurone nach Applikation von Muskarin

Schon in den Vorversuchen zur Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzindikators und zur Optimierung der Inkubationszeiten, konnte bei einigen Zellen ein durch Muskarin stimulierter Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration beobachtet werden. Der Fokus der weiteren Untersuchungen lag vor allem auf den Reaktionen der Neurone, die nach der pharmakologischen Gesangsstimulation durch Muskarin mit fluoreszenzgekoppelten Dextranen markiert wurden.

Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden als Änderungen der Fluoreszenzintensität des Quotienten der emittierten Wellenlängen 360 und 390 nm über die Zeit registriert. Das in Abb. 3.41 untersuchte intravital markierte Neuron reagierte auf die Applikation von Muskarin mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration von 59 %. Die Kalziumreaktion der Zelle hatte einen parabolischen Verlauf, bei der der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration steiler verlief, als die anschließende Annäherung der Kalziumkonzentration auf das Niveau vor der Muskarinapplikation. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität erfolgte exponentiell, so dass die Ausgangskonzentration erst nach ca. 278,6 s wieder erreicht wurde, wobei der exakte Zeitwert, aufgrund der im letzten Teil des Fluoreszenzsignals langsamen Annäherung an den Ruhewert, nur ungenau zu bestimmen war.

Da bei vielen Messungen die Kalziumkonzentration nur unvollständig auf das Niveau vor Applikation der Pharmaka abfiel, wurde als zeitliche Referenz der Kalziumantwort die Dauer der Reaktion bei halber Maximalamplitude (FWHM oder Halbwertsbreite) herangezogen. Die Halbwertsbreite des Kalziumsignals aus Abbildung 3.41 betrug 86,7 s.

Insgesamt wurde die relative Kalziumkonzentration von 48 markierten Neuronen und 225 unmarkierten Zellen gemessen. Als eindeutige Reaktion auf die Applikation von Muskarin wurde ein Anstieg der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration um mindestens zehn Prozent gewertet. Zellen, die auf die Applikation von Muskarin mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration reagierten, deren zytosolische Kalziumkonzentration jedoch nach Stimulusende nicht mindestens wieder auf die Hälfte des maximal registrierten Niveaus abfiel, wurden nicht gewertet, da ihr einwandfreier vitaler Zustand nicht gewährleistet und die Halbwertsbreite als Referenz der Signaldauer nicht eindeutig bestimmt werden konnte. 5 Experimente sind aufgrund dieses Kriteriums nicht mit in die Auswertung eingegangen.

Die beiden in 2.6.4 beschriebenen Auswertmethoden zur Bestimmung der Amplitude und der Halbwertsbreite kommen zu leicht unterschiedlichen Ergebnissen.

Berücksichtigt man bei der relativen Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration lediglich die Änderung der Intensität des emittierten langwelligeren Lichtes (390 nm), so erfüllen 58,3% aller intravital markierten Zellen das Kriterium des Anstiegs der relativen intrazellulären Kalziumkonzentration um mindestens 10% nach einem Muskarinpuls.

Die zytosolische Kalziumkonzentration erhöhte sich nach der Applikation von Muskarin um durchschnittlich 36,6% ($\pm 15,7$). Die Halbwertsbreite der Reaktionen betrug im Durchschnitt 74,3 s ($\pm 43,5$).

Wenn man den Quotienten der beiden Anregungswellenlängen 360 und 390 nm zur Bestimmung der relativen Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration heranzieht, zeigten 54,2% aller intravital markierten Neurone einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration um mindestens zehn Prozent nach Muskarinapplikation. Durchschnittlich erhöhte sich die Kalziumkonzentration der Zellen nach der Zugabe von Muskarin um 34,4% ($\pm 26,6$) bei einer Halbwertsbreite von durchschnittlich 64,7 s ($\pm 36,6$).

Die Standardabweichungen zeigen bei beiden Auswertmethoden eine große Variabilität der Reaktionen auf Applikation von Muskarin. Im Vergleich dazu sind die Ergebnisse der beiden Auswertmethoden sehr ähnlich und im Folgenden beziehen sich die Angaben der Amplitudenzunahme und der Halbwertsbreite auf die Auswertmethode, bei der der Quotient beider Wellenlängen zur Bestimmung herangezogen wurde, um einen eindeutigeren Bezug zu den abgebildeten Ableitungen zu gewährleisten.

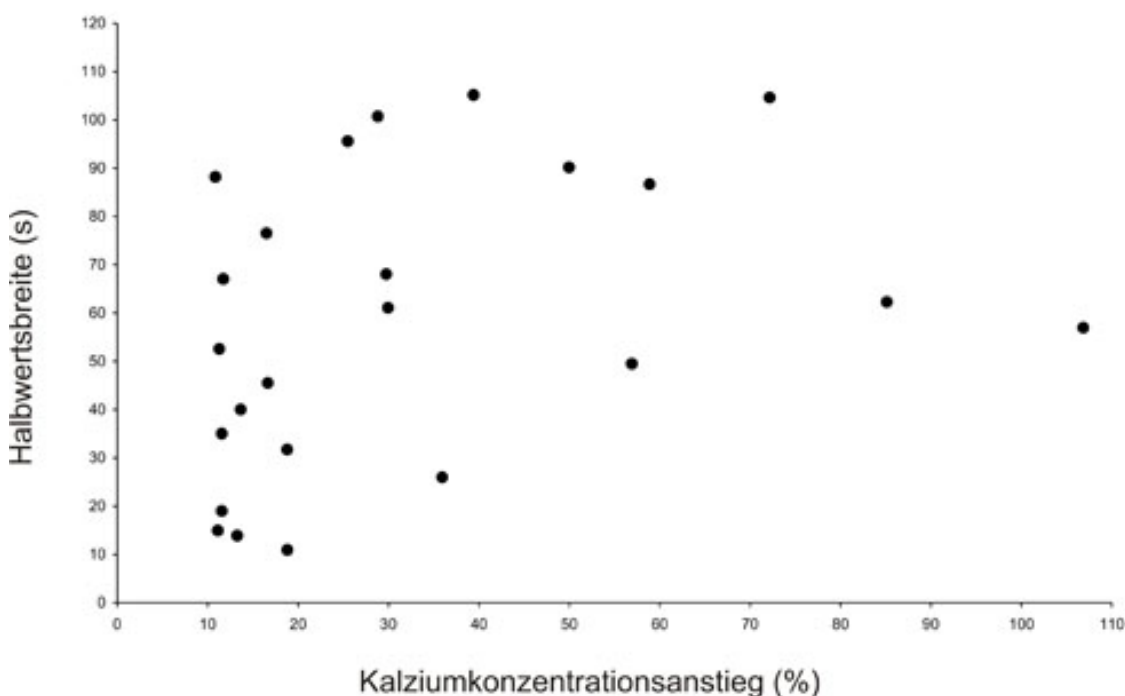


Abbildung 3.42: Auftragung registrierter Kalziumkonzentrationszunahmen gegen die Halbwertsbreite aller intravital markierten Zellen, die positiv auf einen Muskarinstimulus reagierten.

Einige nicht markierte Zellen reagierten ebenfalls auf die Applikation von Muskarin mit einem Anstieg ihrer zytosolischen Kalziumreaktion. Von den insgesamt 225 optisch abgeleiteten Zellen, die keine Intravitalmarkierung aufwiesen reagierten jedoch nur 12 %.

Unabhängig von der Auswertungsmethode ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine intravital markierte Zelle auf einen Muskarinpuls mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration reagiert signifikant größer als bei Zellen ohne eine Dextranmarkierung ($p < 0,001$; Chi-Quadrat-Test).

Insgesamt zeigten 19,4 % der 273 untersuchten Zellen einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration nach einem Muskarinstimulus.

In Abbildung 3.42 sind die registrierten Zunahmen der Kalziumkonzentrationen gegen die Signaldauer aufgetragen. Gerade bei Konzentrationszunahmen von 10 – 20 % streuen die gemessenen Halbwertsbreiten mit Zeiten zwischen 10 – 90 s sehr stark. Nur ein Drittel der optisch abgeleiteten Zellen reagierte auf einen Muskarinstimulus mit einem Konzentrationsanstieg von über 30 % und auch diese Messwerte zeigten in ihrem Verhältnis zu Signalstärke und Signaldauer eine hohe Varianz.

Den höchsten Determinationskoeffizient zwischen der Konzentrationszunahme und der Halbwertsbreite der Signaldauer erreicht man mit einer logarithmischen Regressionskurve ($R^2=0,23$). Aufgrund des geringen Bestimmtheitsmaßes ist eine direkte Abhängigkeit zwischen den maximal registrierten Amplituden des zytosolischen Kalziumkonzentrationsanstiegs nach einem Muskarinstimulus und der gemessenen Signaldauer (Halbwertsbreite) nicht zu ermitteln.

3.4.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Muskarinstimulus und zytosolischer Kalziumkonzentration

Muskarin wurde in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert, um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung der Kalziumantwort in Abhängigkeit der Stimuluskonzentration zu ermitteln.

Es trat jedoch in einigen Experimenten das Problem auf, dass bei untersuchten Zellen nach wiederholter Stimulation die intrazelluläre Kalziumkonzentration nicht wieder konnten Ausgangskonzentration absank. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in einen schlechteren schlechten physiologischen Zustand der Zellen in diesen Kulturen begründet. Die für die Entfernung des Kalziums aus dem Zytosol nötigen Pumpen, werden möglicherweise unzureichend mit Stoffwechelernergie versorgt.

Abbildung 3.43 zeigt das Antwortverhalten eines intravital markierten Neurons auf Muskarinpulse unterschiedlicher Konzentrationen. Die in den Abbildungen mit einer eins gekennzeichnete intravital markierte Zelle zeigt nach der Applikation von 1 mM

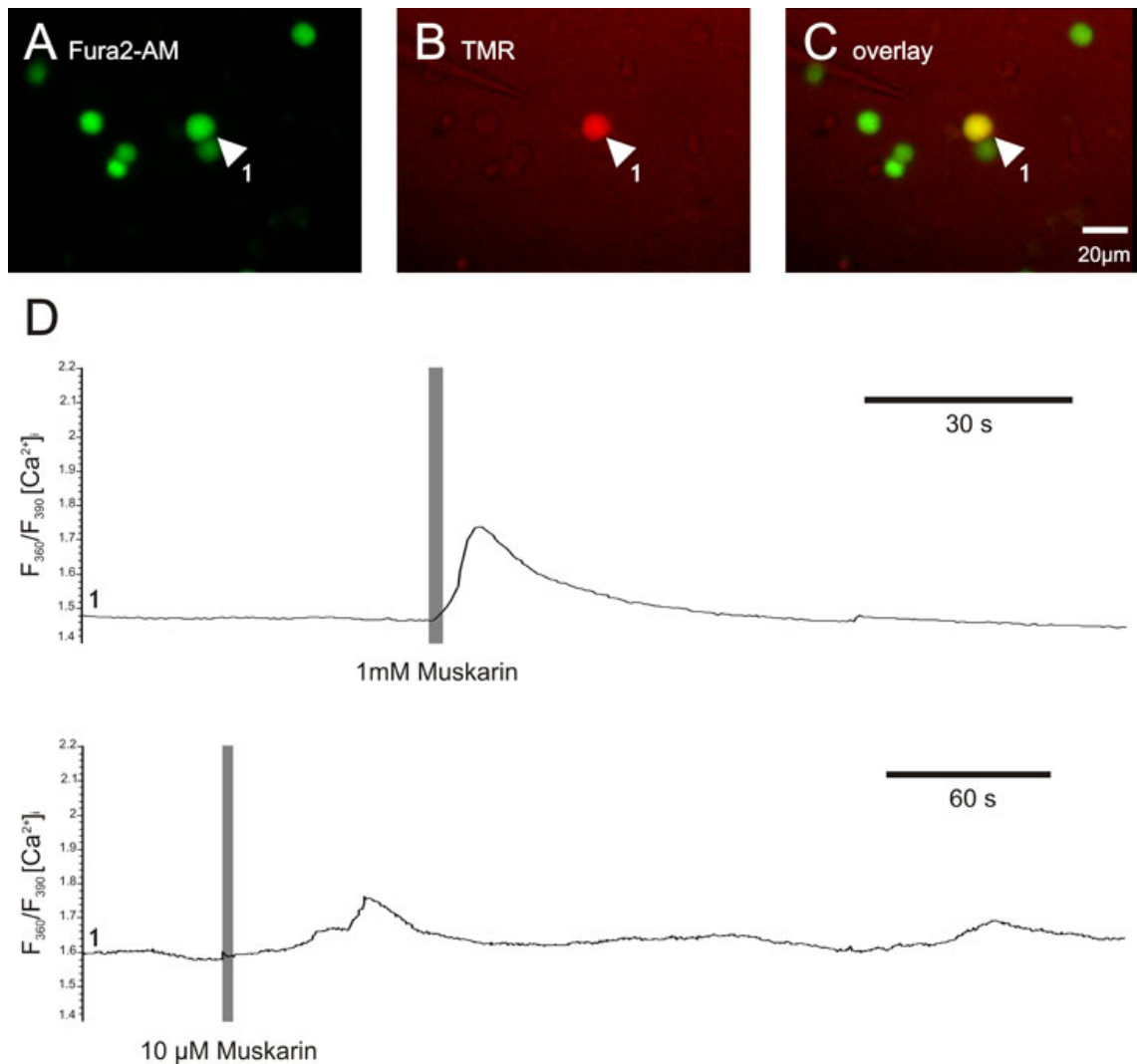


Abbildung 3.43: Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle nach Muskarinstimuli unterschiedlicher Konzentrationen. A: Übersichtsbild eines Kulturausschnitts. Zellen, die den kalzi-umsensitiven Farbstoff Fura2/AM aufgenommen haben, zeigen eine grüne Fluoreszenz. B: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt eine rot fluoreszierende Zelle, die den dextrangekoppelten Farbstoff Tetramethylrhodamin bei der intravitalen Markierung im intakten Heuschreckengehirn aufgenommen hat. C: Überlagerung der Bilder A und B. D: Messung der relativen Kalziumkonzentration der in den Bildausschnitten A-C mit 1 markierten Zelle nach Applikation von Muskarin in unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgetragen ist der Quotient der Intensität des emittierten Lichtes der Wellenlängen 360/390 nm über die Zeit. Nach Applikation von 1 mM Muskarin reagiert die Zelle mit einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration von 18,8%. Nach einer längeren Latenz reagiert dieselbe Zelle auf die Zugabe von 10 µM Muskarin mit einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration von 9,1%.

Muskarin eine Konzentrationszunahme des intrazellulären Kalziums von 18,8% für eine Reaktionsdauer von 10,9 s (Halbwertsbreite). Vergleicht man dies mit der Reaktion auf die Applikation von Muskarin in einer Konzentration von 10 µM, so liegt die maximale Amplitude der Kalziumantwort mit ihrer Konzentrationszunahme von 9,1% bei der Hälfte des zuvor gemessenen Kalziumpeaks. Die Dauer der Kalziumantwort ist dagegen mit einer Halbwertsbreite von 19,5 s fast doppelt so lang wie die Reaktion bei der höheren Konzentration.

Auffällig ist neben den unterschiedlich hohen Kalziumpeaks und den verschiedenen langen Reaktionen auch ein deutlicher Unterschied in der Latenz. Bei der Applikation von Muskarin in der Konzentration von 1 mM, setzt eine meßbare Kalziumant-

wort nahezu unmittelbar ein (0,6 s nach Zugabe von Muskarin bei einer Pulsdauer von 0,2 s). Bei der Applikation von Muskarin in der niedrigen Konzentration ist die Latenz deutlich erhöht. Eine Reaktion auf die Zugabe von Muskarin in einer Konzentration von 10 μM trat erst nach 46,7 s auf.

Die nachfolgenden Untersuchungen sind mit Muskarin Applikationen in einer Konzentration von 1 mM durchgeführt worden. Da in der Literatur Dosis-Wirkungs-Kurven für muskarinische Acetylcholinrezeptoren in anderen Studien überwiegend mit Subtyp-spezifischen Agonisten bestimmt wurden (Hulme et al. 1990), konnten Muskarinkonzentrationen, die zu einer Sättigung der Kalziumantworten führen, nicht anhand bestehender Literatur abgeschätzt werden. Die geringe Latenz der Reaktion lässt darauf schließen, dass die Konzentration von 1 mM im Sättigungsbereich der Dosis-Wirkungs-Kurve von Muskarin liegt.

3.4.4 Ursache und Mechanismus der muskarinstimulierten Kalziumantwort intravital markierter Neurone in Primärzellkulturen

Kalzium spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung verschiedenster neuronaler Prozesse. Als intrazellulärer Botenstoff triggert Kalzium die Transmitterausschüttung durch präsynaptische Exozytose und initiiert mittel- bis langfristige Modifikationen zellphysiologischer Eigenschaften durch Calmodulin abhängige Aktivierung von Enzymen und veränderte Genexpression.

Abbildung 3.44 fasst verschiedene Mechanismen zusammen, die den intrazellulären Kalziumspiegel eines Neurons beeinflussen können (Berridge 1998). Die dunkelgrünen Strukturen führen zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration. Spannungsabhängige Kanäle und Kalziumkanäle deren Öffnung von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig ist, führen der Zelle Kalzium aus dem Extrazellulärraum zu. Weiterhin verfügen Neurone über intrazelluläre Kalziumspeicher im endoplasmatischen Retikulum. Die Freisetzung von Kalzium aus internen Speichern kann durch Inositoltriphosphat Rezeptoren und Ryanodin Rezeptoren aktiviert werden. Die Aktivierung des Inositoltriphosphat Rezeptors ist abhängig vom gleichnamigen Second Messenger Botenstoff IP_3 . Dieser wird von der Phospholipase C produziert, welche ihrerseits durch G Proteine und G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird. Der Ryanodinrezeptor kann subtypspezifisch durch FKBP12 oder durch cADP-Ribose aktiviert werden. cADP-Ribose ist wie IP_3 der Botenstoff einer Second Messenger Signalkaskade, deren genaue Mechanismen in Neuronen aber noch unklar sind.

Strukturen, welche die zytosolische Kalziumkonzentration reduzieren, sind in dem Schema rot dargestellt. Während die Kalziumpumpe energieabhängig das Kalzium

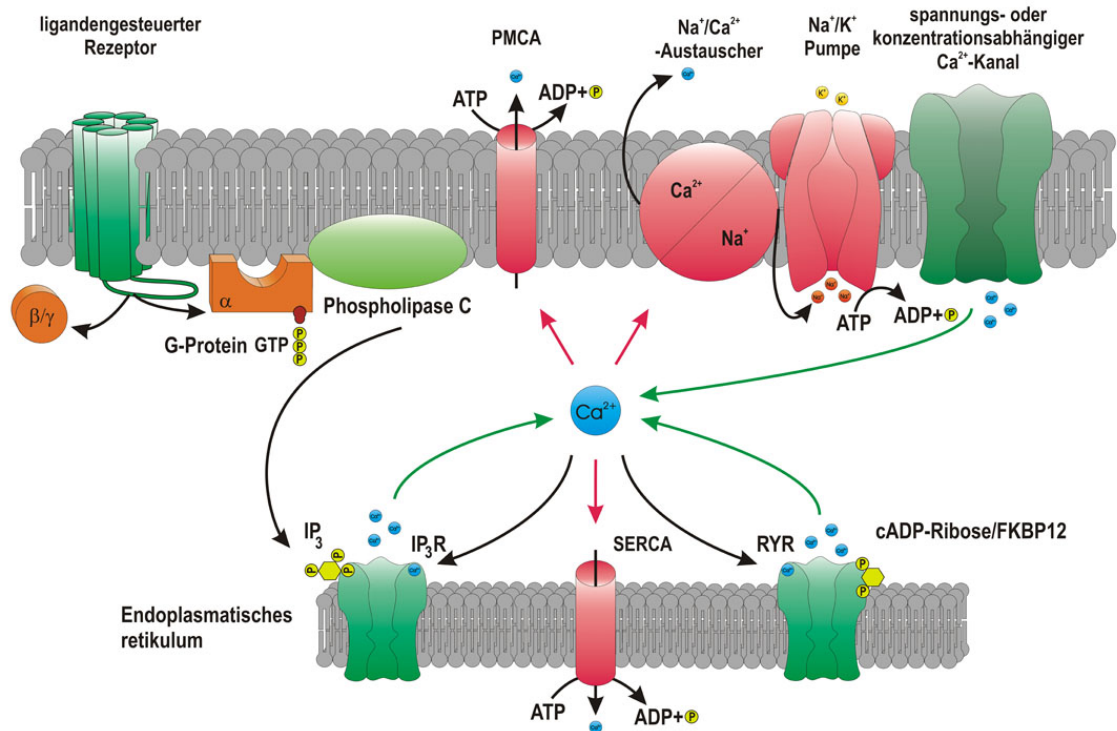


Abbildung 3.44: Schematische Darstellung zellulärer Kontrollmechanismen der zytosolischen Kalziumkonzentration. Dunkelgrüne Strukturen erhöhen die zytosolische Kalziumkonzentration (grüne Pfeile); rote Strukturen pumpen Kalzium stoffwechsellenergieabhängig gegen den Konzentrationsgradienten aus dem Zytosol (rote Pfeile). ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; cADP-Ribose: zyklisches Adenosindiphosphat Ribose; FKBP12: Tacrolimus (FK506) bindendes Protein 12; GTP: Guanosintriphosphat; IP₃: Inositoltriphosphat; IP₃R: Inositoltriphosphat Rezeptor; PMCA: Plasmamembrangebundene Kalziumpumpe; RYR: Ryanodinrezeptor; SERCA: Kalziumpumpe des endoplasmatischen Retikulums.

direkt in den Extrazellulärraum transportiert, nutzt der Kalzium/Natrium Austauscher den von der Natrium/Kaliumpumpe erzeugten extrazellulären Überschuss von Natriumionen aus. Ebenfalls energieabhängig arbeitet die Kalziumpumpe des endoplasmatischen Retikulums.

Im Folgenden werden die Untersuchungen zur Ermittlung der zellulären Mechanismen des durch Muskarin stimulierten Kalziumanstiegs intravital markierter Zellen beschrieben.

3.4.4.1 Aktivierung der Ryanodinrezeptoren durch Koffein

Von Vertebraten ist bekannt, dass sowohl der IP₃- als auch der Ryanodinrezeptor eine wichtige Funktion bei der Erzeugung von Kalzium-Signalen in Neuronen ausüben. Während man IP₃ Rezeptoren überwiegend in den dendritischen Dornfortsätzen und in synaptischen Endigungen findet (Martone et al. 1993; 1997), sind Ryanodinrezeptoren in erster Linie im Soma von Neuronen lokalisiert (Seymour-Laurent und Barish 1995).

Um eine eventuelle Beteiligung des Ryanodinrezeptors an dem Konzentrationsanstieg des zytosolischen Kalziums intravital markierter Neurone nach Muskarinappli-

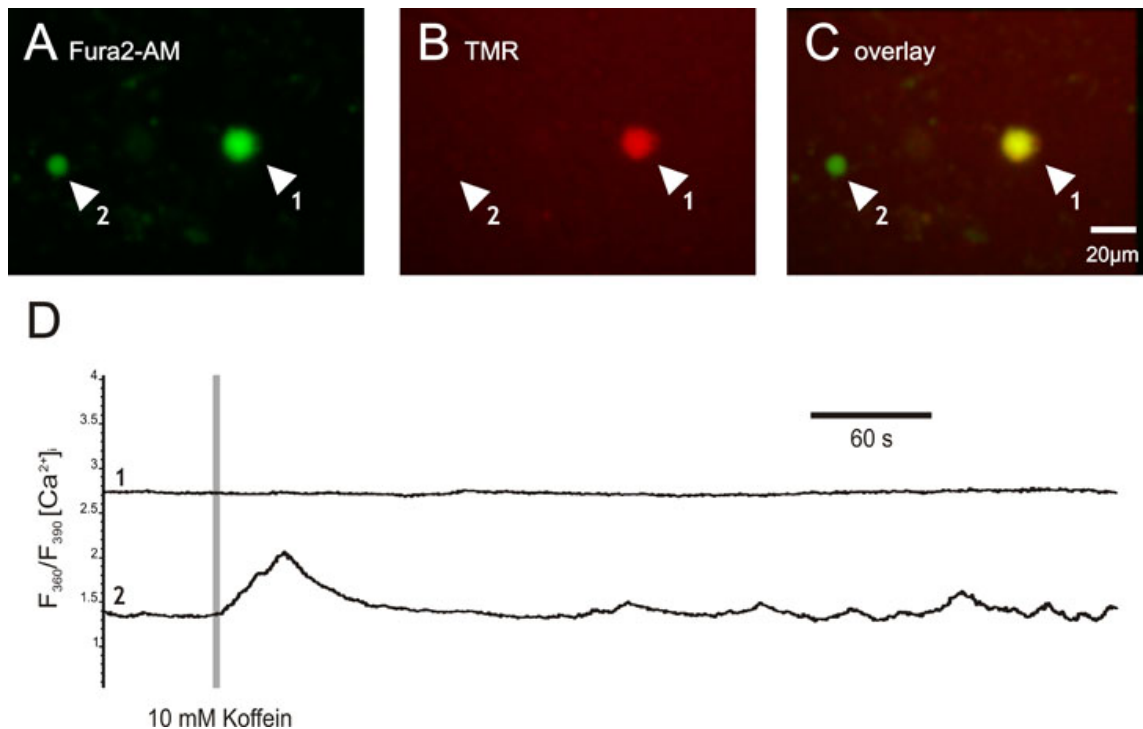


Abbildung 3.45: Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration kultivierter Neurone nach Koffeinapplikation. A: Übersichtsbild eines Kulturausschnitts. Zellen, die den kalziumsensitiven Farbstoff Fura2/AM aufgenommen haben, zeigen eine grüne Fluoreszenz. B: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt eine rot fluoreszierende Zelle, die den dextrangekoppelten Farbstoff Tetramethylrhodamin bei der intravitalem Markierung im intakten Heuschreckengehirn aufgenommen hat. C: Überlagerung der Bilder A und B. D: Messung der relativen Kalziumkonzentration, der in den Bildausschnitten A-C mit 1 und 2 markierten Zellen. Aufgetragen ist der Quotient der Intensität des emittierten Lichtes der Wellenlängen 360/390 nm über die Zeit. Nach Applikation von 10 mM Koffein reagiert die nicht markierte Zelle (2), die keine Intravitalem Markierung aufweist mit einem Anstieg ihrer zytosolischen Kalziumkonzentration. Die Zelle (1), die 10 min zuvor auf die Applikation von 1 mM Muskarin mit einem Anstieg ihrer zytosolischen Kalziumkonzentration reagiert hat (vergleiche Abbildung 3.41, zeigt bei der Applikation von Koffein keine Reaktion.

kation zu untersuchen, wurde 10 min nach einem Muskarinstimulus der Ryanodinrezeptor Agonist Koffein (10 mM) appliziert. Abbildung 3.45 zeigt, dass das intravitalem markierte Neuron, welches zuvor positiv auf eine Muskarinapplikation reagierte (siehe Abb. 3.41), nach der Zugabe von Koffein keine Reaktion zeigte. Eine andere, unmarkierte Zelle reagierte dagegen auf die Applikation von Koffein mit einer Kalziumkonzentrationszunahme um 43 % bei einer Halbwertsbreite von 31,3 s.

Keine der intravitalem markierten Zellen, die auf die Applikation von Muskarin mit einer Kalziumfreisetzung reagierten, zeigte eine Reaktion auf Koffein (n=6). In einem Fall reagierte eine intravitalem markierte Zelle, die jedoch keine Reaktion auf Muskarin zeigte, auf die Applikation von Koffein mit einem kurzen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration (ohne Abbildung).

In Neuronen des Feldheuschreckengehirns erfolgt die durch Muskarin stimulierte Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration ohne Aktivierung von Ryanodinrezeptoren. Ryanodinrezeptoren sind aber in anderen Neuronentypen präsent und an Koffein-stimulierten Kalziumantworten beteiligt.

3.4.4.2 Blockade der IP₃-Rezeptor vermittelten Kalziumfreisetzung intravital markierter Neurone durch 2-Aminoethoxydiphenyl-Borat

2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-APB) ist ein allosterischer Inhibitor der IP₃ Rezeptor vermittelten Kalziumausschüttung in Neuronen des Kleinhirns (Bilmen und Michelangeli 2002). Es wurden auch inhibitorische Effekte auf Kalziumpumpen und Kalziumkanäle nachgewiesen (Peppiatt et al. 2003). Die Wirksamkeit von 2-APB bei Insektenneuronen konnte an einer *Drosophila* S2-Zelllinie gezeigt werden (Cordova et al. 2003).

Um eine Beteiligung des IP₃-Rezeptors an dem zytosolischen Anstieg der Kalziumkonzentration nachzuweisen, wurde ein auf die Applikation von Muskarin reagierendes intravital markiertes Neuron anschließend für 10 min mit 2-APB in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Danach wurde die Reaktion des Neurons auf einen erneuten Muskarinpuls geprüft.

Abbildung 3.46 zeigt die Reaktion eines intravital markierten Neurons vor und nach dem Einwirken von 2-APB. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach dem Einwaschen von 2-APB die Kalzium-Homöostase der Zelle gestört ist. Die Ruhekonzentration von Kalzium im Zytosol der untersuchten Zelle stieg im Verlauf der 10 minütigen Inkubationszeit leicht an und zeigte eine Oszillation ihrer Kalziumkonzentration mit einer Frequenz von ca. 0,2 Hz. Die intravital markierte Zelle reagierte jedoch trotz des Einwirkens von 2-APB auf die Applikation von Muskarin mit einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. Die Amplitude der Kalziumantwort lag über der zuvor gemessenen Reaktion, was auf einen verstärkenden Effekt schließen lässt.

Das Einwirken des allosterischen Inhibitors des IP₃-Rezeptors hat auf die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration bei der intravital markierten Zelle einen verstärkenden Effekt. Die Zelle wird durch 2-APB in ihrer Kalziumhomöostase gestört, was sich durch oszillierende Schwankungen in der Ausgangskonzentration des zytosolischen Kalziums bemerkbar macht. Der Beitrag der IP₃-Rezeptoren ist anhand dieses Experimentes schwer zu verifizieren.

3.4.4.3 Beitrag extrazellulären Kalziums zur muskarinstimulierten zytosolischen Kalziumantwort

Um eine Beteiligung extrazellulären Kalziums an dem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration nach der Applikation von Muskarin zu untersuchen, wurden einige Experimente in kalziumfreier Extrazellulärlösung durchgeführt.

In Abbildung 3.47 sind die in 3.4.2 dargestellten Antworten intravital markierter Neurone auf die Applikation von Muskarin in normaler Extrazellulärlösung vergleichend zu den Messungen in kalziumfreier Lösung dargestellt. Der durchschnittliche

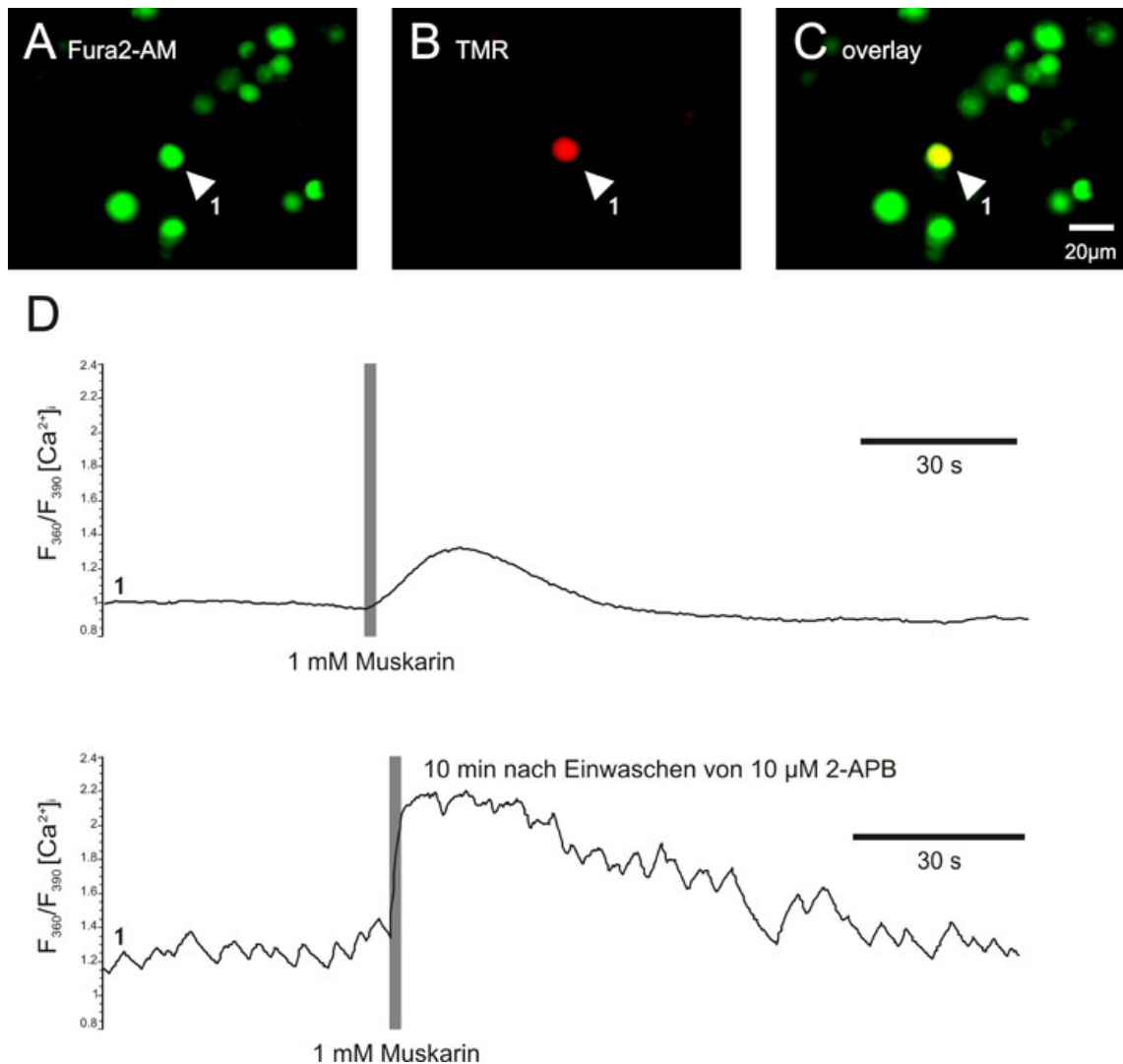


Abbildung 3.46: Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle. A: Übersichtsbild eines Kulturausschnitts. Zellen, die den kalziumsensitiven Farbstoff Fura2/AM aufgenommen haben, zeigen eine grüne Fluoreszenz. B: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt eine rot fluoreszierende Zelle, die den dextranekoppelten Farbstoff Tetramethylrhodamin bei der intravitalem Markierung im intakten Heuschreckengehirn aufgenommen hat. C: Überlagerung der Bilder A und B. D: Messung der relativen Kalziumkonzentration der in den Bildausschnitten A-C mit 1 markierten Zelle. Aufgetragen ist der Quotient der Intensität des emittierten Lichtes der Wellenlängen 360/390 nm über die Zeit. Nach Applikation von 1 mM Muskarin zeigt die intravital markierte Zelle einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. 10 min nach dem Einwaschen von 2-APB zeigt die Zelle eine Oszillation ihrer zytosolischen Kalziumkonzentration, reagiert aber weiterhin auf die Applikation von Muskarin mit einem Anstieg ihrer zytosolischen Kalziumkonzentration, der unter der Einwirkung von 2-APB deutlich größer ist.

Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration nach einem Muskarinpuls betrug in normaler physiologischer Lösung 34,4 % ($\pm 26,6$; $n=26$). Intravital markierte Zellen in kalziumfreier Extrazellulärlösung reagierten auf die Applikation von Muskarin mit einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration um 31,2 % ($\pm 2,2$; $n=4$). Die Amplituden der Kalziumantwort unterschieden sich damit in normaler und kalziumfreier Extrazellulärlösung nicht signifikant ($p < 0,05$; Mann Whitney U Test).

In Abbildung 3.48 ist die Halbwertsbreite der Kalziumreaktion auf die Zugabe von Muskarin in normaler und kalziumfreier Extrazellulärlösung aufgetragen. Die durchschnittliche Halbwertsbreite der Kalziumantwort in normaler Lösung betrug 74,3 s ($\pm 43,5$; $n=26$). Die Halbwertsbreite der Kalziumreaktion intravital markierter Neu-

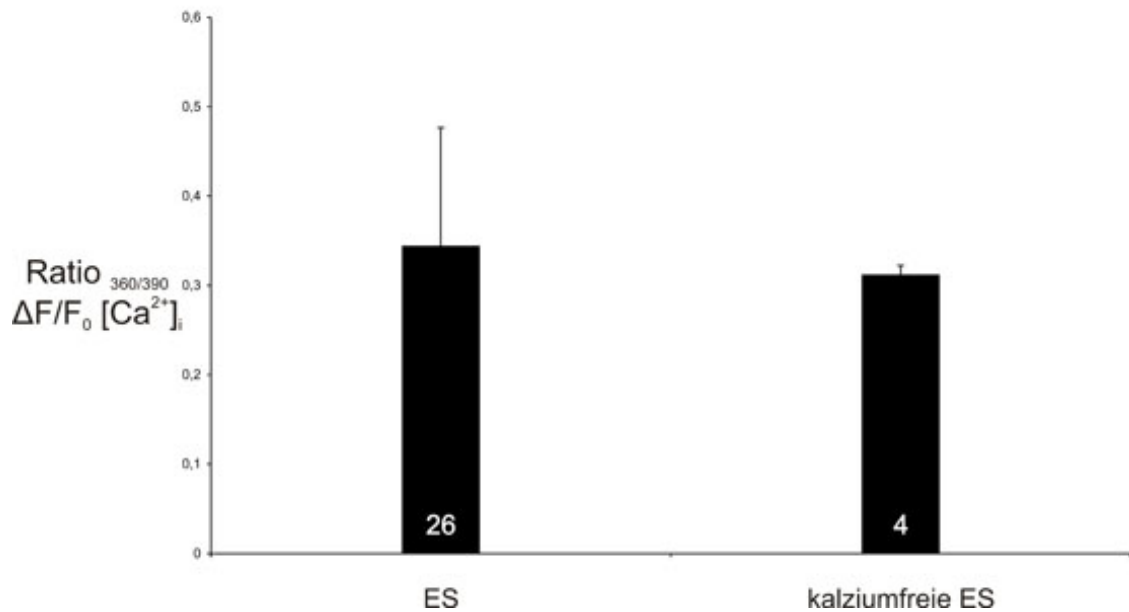


Abbildung 3.47: Vergleich der Amplitude des relativen zytosolischen Kalziumkonzentrationsanstiegs intravital markierter Neuroner nach Applikation von Muskarin in normaler und kalziumfreier Extrazellulärlösung. Die Amplitude des Kalziumkonzentrationsanstiegs unterscheidet sich unter beiden Versuchsbedingungen nicht signifikant ($p < 0,05$; Mann Whitney U Test).

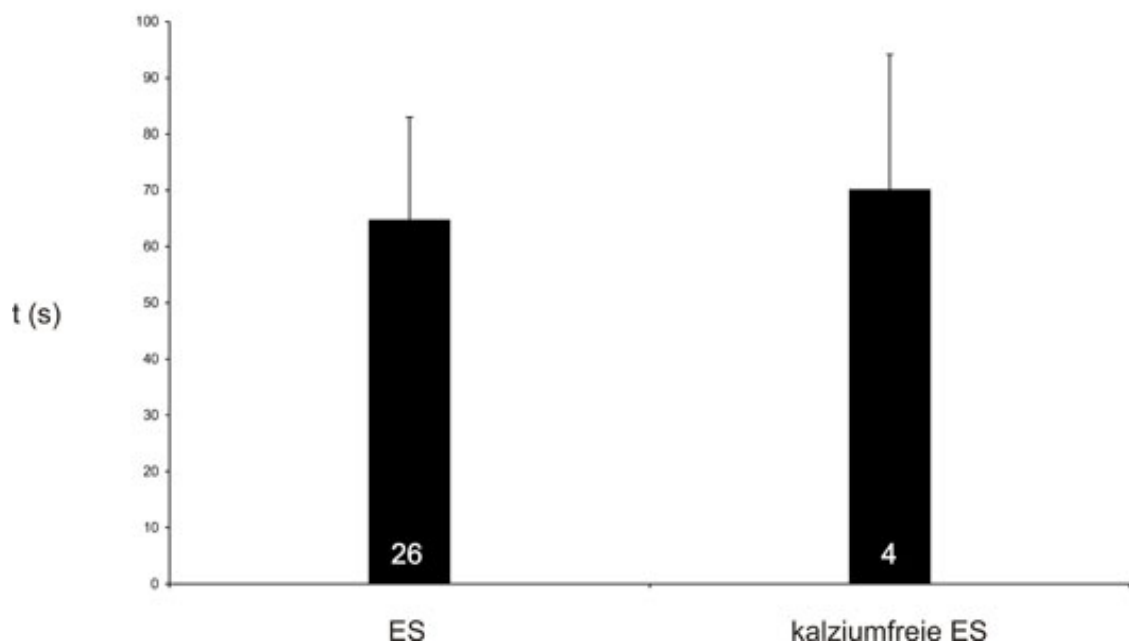


Abbildung 3.48: Vergleich der Halbwertsbreite der Kalziumantwort intravital markierter Neurone nach Applikation von Muskarin in normaler und kalziumfreier Extrazellulärlösung. Die Halbwertsbreite der Kalziumantwort unterscheidet sich unter beiden Versuchsbedingungen nicht signifikant ($p < 0,05$; Mann Whitney U Test).

rone in kalziumfreier Lösung betrug $70,1 \text{ s} (\pm 48,2 \text{ n}=4)$ und unterscheidet sich nicht signifikant von der Halbwertsbreite der Reaktion in normaler Extrazellulärlösung ($p < 0,05$; Mann Whitney U Test).

Diese Ergebnisse deuten drauf hin, dass die extrazelluläre Kalziumkonzentration auf die Dauer und Intensität des zytosolischen Konzentrationsanstiegs der Zellen nach der Applikation von Muskarin keinen Einfluss hat und spannungsabhängige bzw.

durch intrazelluläre Liganden aktivierte Kalziumkanäle in der Plasmamembran nicht am Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration beteiligt sind.

3.4.4.4 Hemmung der Phospholipase C Aktivität in intravital markierten Neuronen durch spezifische Antagonisten

Artspezifischer Gesang, der durch die Injektion von Muskarin in den Zentralkörper ausgelöst wird, kann durch Hemmung der Phospholipase C Aktivität reversibel inhibiert werden (Wenzel et al. 2002).

Um einen Einfluss der Phospholipase C Aktivität auf den Kalziumkonzentrationsanstieg nach Muskarinapplikation in Primärzellkulturen zu untersuchen, wurde der PLC-Inhibitor Neomycin in einer Konzentration von 1 mM für 10 min über das Perfusionssystem eingewaschen. Anschließend wurden die untersuchten Zellen mit einem Muskarinpuls stimuliert und ihre Kalziumantwort mit der eines identischen Stimulus vor Einwaschen des PLC-Inhibitors verglichen. Abbildung 3.49 D zeigt die Änderung der Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle nach der Applikation von Muskarin. Die Zelle zeigt einen Anstieg der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration von 107% für eine Halbwertsbreite von 57s. 10 min nach Einwaschen von Neomycin ist eine Reaktion auf den Muskarinpuls vollständig geblockt. 10 min, nachdem Neomycin über das Perfusionssystem wieder ausgewaschen wurde, reagierte die Zelle erneut auf die Applikation von Muskarin mit einem leichten Anstieg ihrer intrazellulären Kalziumkonzentration um 17,9%. Die Kalziumkonzentration sank jedoch nach dem Muskarinstimulus nicht wieder auf das vorherige Konzentrationsniveau. Stattdessen kommt es nach ca. 5 min zu einem starken und dauerhaften Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration um ca. 70%. Die Zelle scheint durch die vorherige Applikation von Neomycin in der Kalzium-Homoöstase gestört zu sein.

Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration nach einem Muskarinpuls konnte durch Neomycin in Konzentrationen von 1 mM in allen drei durchgeführten Experimenten vollständig geblockt werden. Ein erneuter Anstieg der Kalziumkonzentration nach dem Auswaschen von Neomycin konnte nur in der in Abbildung 3.49 dargestellten Ableitung beobachtet werden. In den übrigen beiden Experimenten war die Ausgangskonzentration des zytosolischen Kalziums nach 10 min Einwirkung von Neomycin bereits so hoch, wie die zuvor durch den Muskarinpuls vermittelte Maximalamplitude.

Da die Hemmung der PLC durch Neomycin in den Primärzellkulturen irreversibel war, bzw. Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase irreversibel schädigte, wurde mit U-73122 ein weiterer Inhibitor getestet. Dieser konnte in vorangegangenen pharmakologischen Untersuchungen an intakten Heuschrecken den durch Muskarin induzierten Heuschreckengesang reversibel hemmen (Wenzel et al. 2002).

Die Hemmung des zytosolischen Kalziumanstiegs durch U-73122 zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die Blockexperimente mit Neomycin. Die in normalem Medium gemessene, durch Muskarin stimulierte Kalziumreaktion wurde in beiden durchgeführten Experimenten durch das Einwaschen von U-73122 vollständig unterdrückt. In Abbildung 3.50 ist eines der Blockierungsexperimente mit U-73122 dargestellt. Die zuvor bei der Applikation von Muskarin gemessene Zunahme des zytosolischen Kalziums um 29,9% war 10 min nach Einwaschen von 10 μ M U-73122 bei einem erneuten Muskarinpuls nicht mehr zu beobachten. Weiterhin ist zu erkennen, dass eine erneute Applikation von Muskarin 10 min nach Auswaschen von U-73122 zu einem mehrere Minuten andauernden, nahezu linearen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration der Zelle führte.

Somit konnten zwei, über unterschiedliche Mechanismen wirkende Inhibitoren der PLC in allen 5 durchgeführten Experimenten die Kalziumreaktion auf die Applikation von Muskarin vollständig blockieren. Im Gegensatz zu den entsprechenden Untersuchungen im intakten Gehirn der Heuschrecken, hatten sowohl Neomycin als auch U-73122 irreversible Wirkungen auf die Kalzium-Homöostase der intravital markierten kultivierten Hirnneurone. Die Ergebnisse lassen jedoch auf eine Beteiligung der Phospholipase C an dem muskarinvermittelten Anstieg der Kalziumkonzentration schließen.

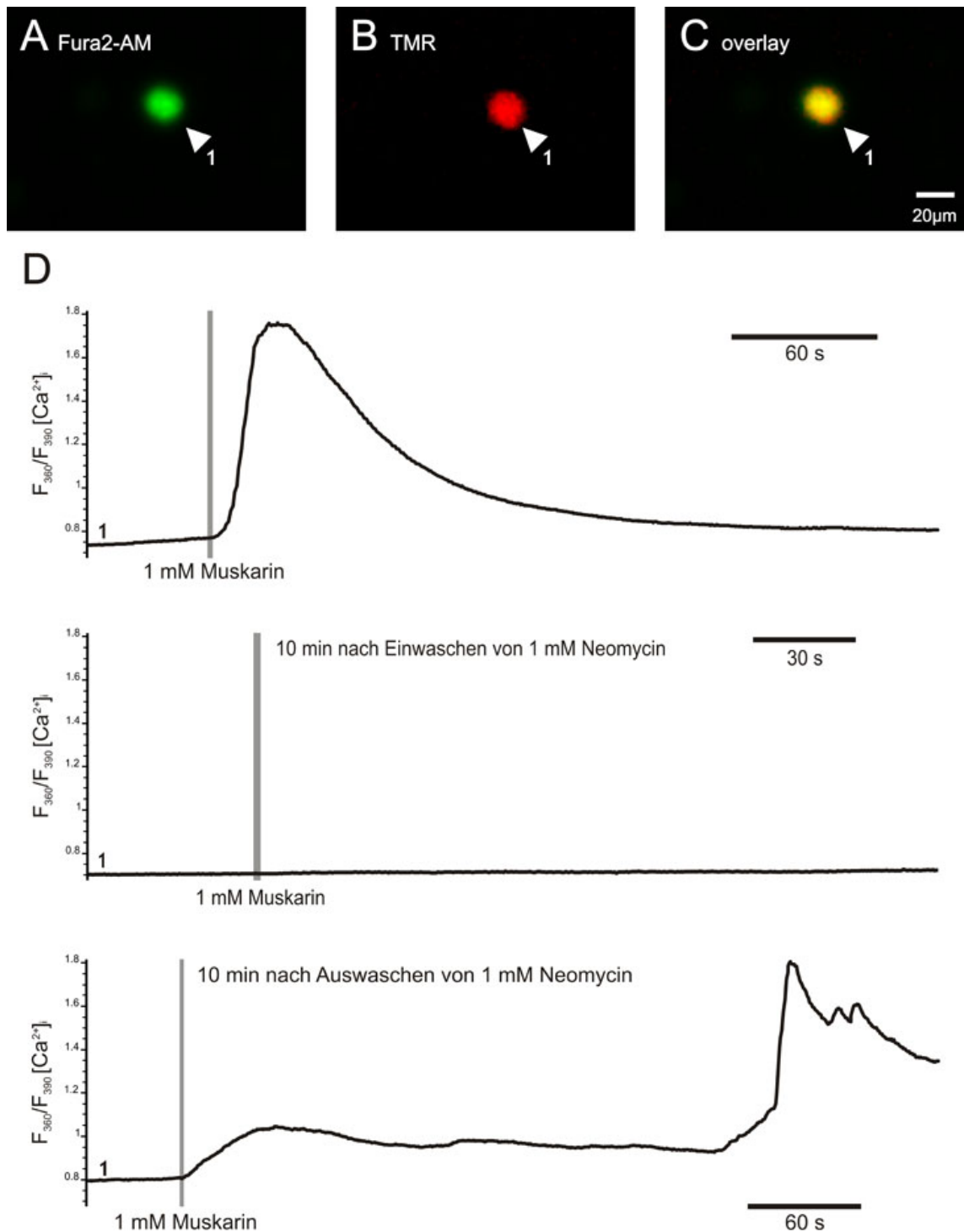


Abbildung 3.49: Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle. A: Übersichtsbild eines Kulturausschnitts. Die Zelle, die den kalziumsensitiven Farbstoff Fura2/AM aufgenommen hat, zeigt eine grüne Fluoreszenz. B: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt, dass die Zelle auch den dextrangekoppelten Farbstoff Tetramethylrhodamin bei der intravitalen Markierung im intakten Heuschreckengehirn aufgenommen hat und rot fluoresziert. C: Überlagerung der Bilder A und B. D: Messung der relativen Kalziumkonzentration der markierten Zelle. Aufgetragen ist der Quotient der Intensität des emittierten Lichtes der Wellenlängen 360/390 nm über die Zeit. Nach Applikation von 1 mM Muskarin zeigt die intravital markierte Zelle einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. 10 min nach dem Einwaschen von 1 mM Neomycin ist die Reaktion der Zelle auf einen Muskarinimpuls vollständig unterdrückt. 10 min nach dem Auswaschen von Neomycin reagiert die Zelle auf die Applikation von Muskarin wieder mit einem Anstieg ihrer intrazellulären Kalziumkonzentration.

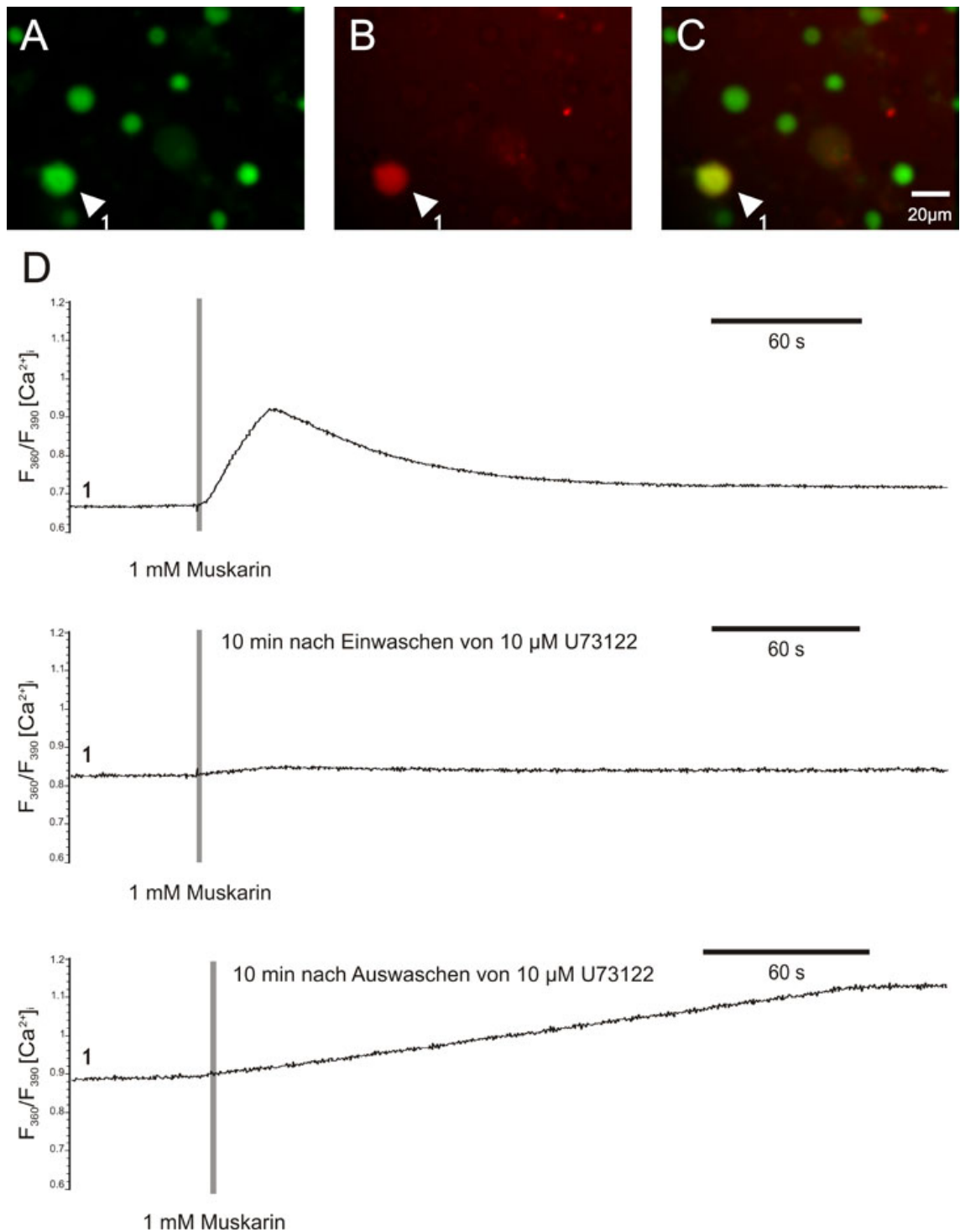


Abbildung 3.50: Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle. A: Übersichtsbild eines Kulturausschnitts. Zellen die den kalziumsensitiven Farbstoff Fura2/AM aufgenommen haben, zeigen eine grüne Fluoreszenz. B: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt eine rot fluoreszierende Zelle, die den dextrangekoppelten Farbstoff Tetramethylrhodamin bei der intravitalem Markierung im intakten Heuschreckengehirn aufgenommen hat. C: Überlagerung der Bilder A und B. D: Messung der relativen Kalziumkonzentration, die in den Bildausschnitten A-C mit 1 markierten Zelle. Aufgetragen ist der Quotient der Intensität des emittierten Lichtes der Wellenlängen 360/390 nm über die Zeit. Nach Applikation von 1 mM Muskarin zeigt die intravital markierte Zelle einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. 10 min nach dem Einwaschen von 10 μ M U-73122 ist die Reaktion der Zelle auf einen erneuten Muskarinpuls fast vollständig unterdrückt. 10 min nach dem Auswaschen von U-73122 reagiert die Zelle auf die Applikation mit einem linearen Anstieg ihrer relativen zytosolischen Kalziumkonzentration.

3.4.4.5 Aktivierung der Phospholipase C in intravital markierten Neuronen durch m-3M3FBS

2,4,6-trimethyl-N-(meta-3-trifluoromethyl-phenyl)-benzenesulfonamide ist eine synthetische Verbindung, welche die Phospholipase C in verschiedenen humanen Zelllinien direkt aktivieren kann (Bae et al. 2003). Die Spezifität dieser Reaktion konnte in verschiedenen Zelltypen von Vertebraten bestätigt werden. Untersuchungen mit m-3M3FBS an Invertebraten liegen bisher nicht vor.

In einem Experiment wurde untersucht, ob durch die direkte Stimulation der PLC mittels Applikation von 100 μM m-3M3FBS eine Kalziumreaktion in intravital markierten Zellen ausgelöst werden kann. Abbildung 3.51 zeigt die Reaktion einer intravital markierten Zelle auf die Applikation von m-3M3FBS.

Die Kalziumkonzentration dieser Zelle zeigt unabhängig zum Stimulus sowohl vor als auch nach der Applikation bereits Schwankungen der zytosolischen Kalziumkonzentration. Die Applikation von m-3M3FBS führt zu einem Anstieg der relativen Kalziumkonzentration um 18,3 %, jedoch kann aufgrund der generellen Konzentrationsschwankungen der Zelle nicht eindeutig gewährleistet werden, ob diese Reaktion tatsächlich auf den m-3M3FBS Stimulus zurückzuführen ist. Die in diesem Experiment verwendete Konzentration war doppelt so hoch, wie die maximale, an humanen Zelllinien von Bae et al. (2003) eingesetzten 50 μM .

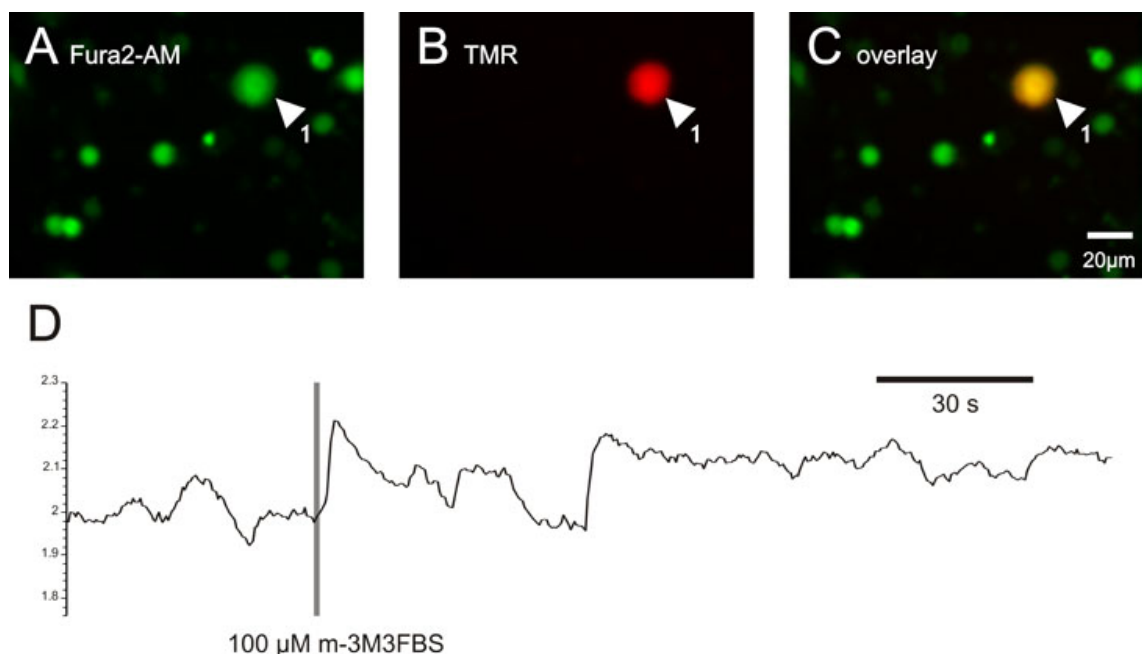


Abbildung 3.51: Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle. A: Übersichtsbild eines Kulturausschnitts. Zellen, die den kalziumsensitiven Farbstoff Fura2/AM aufgenommen haben, zeigen eine grüne Fluoreszenz. B: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt eine rot fluoreszierende Zelle, die den dextranekoppelten Farbstoff Tetramethylrhodamin bei der intravitale Markierung im intakten Heuschreckengehirn aufgenommen hat. C: Überlagerung der Bilder A und B. D: Messung der relativen Kalziumkonzentration der in den Bildausschnitten A-C mit 1 markierten Zelle. Aufgetragen ist der Quotient der Intensität des emittierten Lichtes der Wellenlängen 360/390 nm über die Zeit. Nach Applikation von 100 μM Muskarin zeigt die intravital markierte Zelle einen leichten Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration.

Eine klare Aussage über die Wirksamkeit von m-3M3FBS kann bei einem Experiment nicht getroffen werden. Die schwache Reaktion, bei relativ hoher Substanzkonzentration, zeigt in der Tendenz, dass die hier untersuchte PLC eine sehr schwache Spezifität zu der Substanz m-3M3FBS besitzt.

3.4.5 Patch-clamp Untersuchungen intravital markierter Neuronen mit positiver Reaktion auf Muskarinapplikation

Aufgrund der in Kapitel 3.3 beschriebenen elektrophysiologischen Untersuchungen konnten die intravital markierten Neurone aus dem Heuschreckengehirn in zwei Typen eingeteilt werden. Im Gegensatz zu Typ B exprimieren Neurone des Typ A einen kalziumabhängigen Kaliumkanal. 48% der untersuchten intravital markierten Neurone konnten Typ A und 52% Typ B zugeordnet werden. Bei den Messungen der zytosolischen Kalziumkonzentrationen intravital markierter Zellen konnte zwischen Neuronen unterschieden werden, die auf die Applikation von Muskarin mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration reagierten (54,2%) und solchen, die keine meßbare Reaktion auf einen Muskarinpuls zeigten (45,8%).

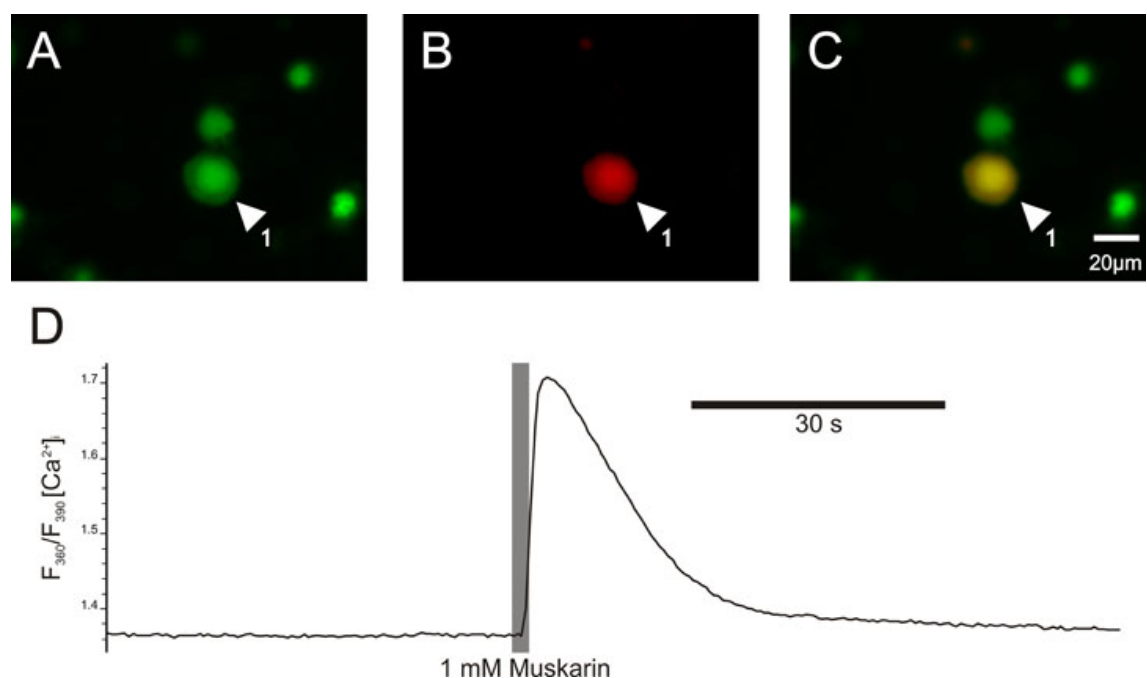


Abbildung 3.52: Messung der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration einer intravital markierten Zelle. A: Übersichtsbild eines Kulturausschnitts. Zellen, die den kalziumsensitiven Farbstoff Fura2/AM aufgenommen haben, zeigen eine grüne Fluoreszenz. B: Derselbe Bildausschnitt wie A zeigt eine rot fluoreszierende Zelle, die den dextrangekoppelten Farbstoff Tetramethylrhodamin bei der intravitalen Markierung im intakten Heuschreckengehirn aufgenommen hat. C: Überlagerung der Bilder A und B. D: Messung der relativen Kalziumkonzentration, der in den Bildausschnitten A-C mit 1 markierten Zelle. Aufgetragen ist der Quotient der Intensität des emittierten Lichtes der Wellenlängen 360/390 nm über die Zeit. Nach Applikation von 1 mM Muskarin reagiert die Zelle mit einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration um 13,3%.

Versuche, intravital markierte Zellen während der Applikation von Muskarin sowohl optisch als auch elektrophysiologisch abzuleiten, um eine eventuelle Korrelation zwischen den elektrophysiologischen Klassifizierungen und den optisch gemessenen Kalziumantworten der Zellen zu untersuchen, waren nicht erfolgreich. Es gelang jedoch in einem Fall, eine Intravital markierte Zelle unmittelbar nach ihrer Reaktion auf einen Muskarinpuls elektrophysiologisch abzuleiten.

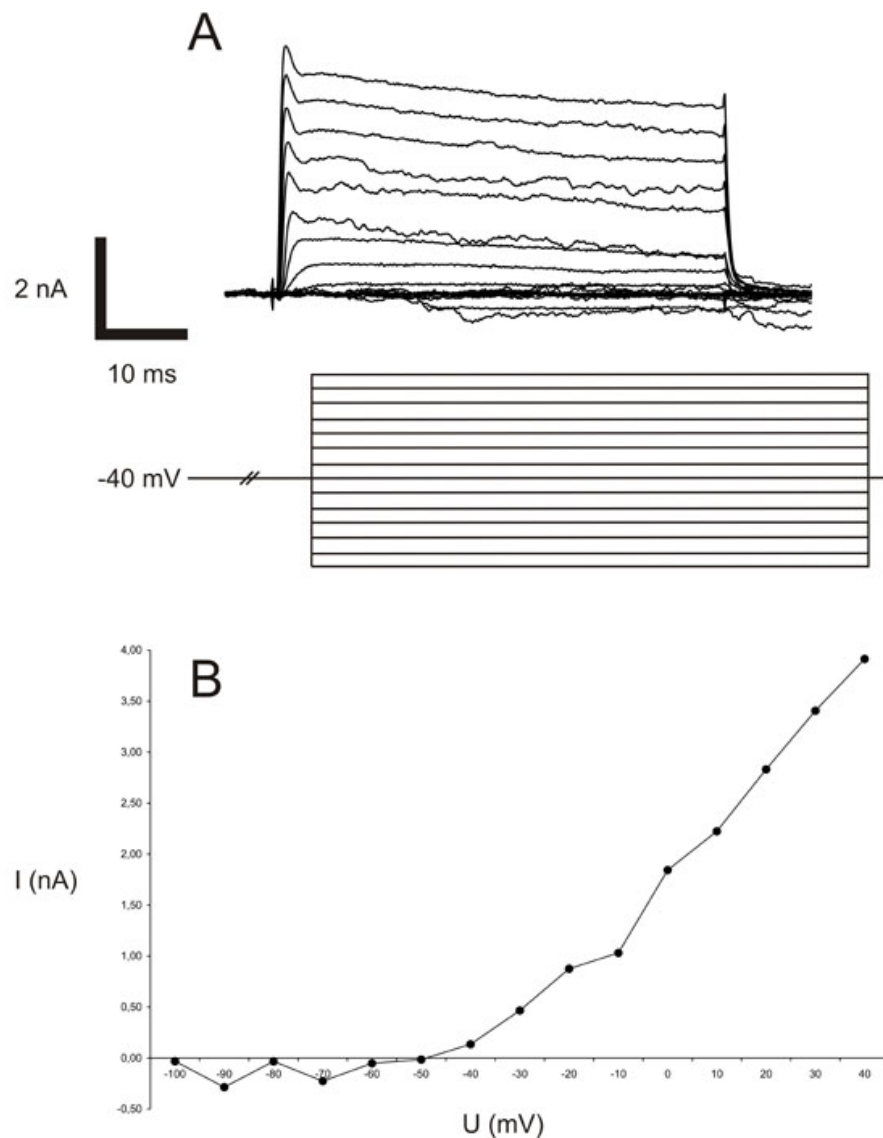


Abbildung 3.53: Auswärtsstrom und Strom/Spannungsrelation des in Abb. 3.52 unmittelbar zuvor optisch abgeleiteten intravital markierten Neurons in der Whole Cell-Konfiguration. Das Neuron wurde zunächst auf -40 mV geklemmt. Dem Vorpuls folgte eine schrittweise Erhöhung der Klemmspannung (10 mV Schritte) auf -100 mV bis 40 mV. Die Pulsdauer betrug 100 ms. A: Auswärtsstrom nach schrittweiser Depolarisation. B: Strom/Spannungsrelation des maximalen Auswärtsstroms bei Klemmspannungen von -100 bis 40 mV.

Das in Abbildung 3.52 dargestellte intravital markierte Neuron zeigte auf die Applikation von Muskarin eine Zunahme der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration um 13,3% bei einer Halbwertsbreite von 13,9s. Die anschließende Ableitung (Abb.3.53) in der Whole-Cell-Konfiguration wurde ebenfalls am Imagingsetup mit der Software Puls (Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz) bei aktivierter Leak Subtraktion durchgeführt.

Der Auswärtsstrom zeigt ab einer angelegten Spannung von -40 mV einen linearen Anstieg, was typisch ist für die Strom/Spannungsrelation eines K_{dr} . Der transiente Peakstrom zu Beginn der Ableitung, der als Kriterium für die Einteilung eines Neurons in eine der elektrophysiologisch charakterisierten Typen diene, war bei dieser Zelle schwach ausgeprägt. Weiterhin ist auffällig, dass auch bei der Messung an einem anderen Setup kein Einwärtsgerichteter Strom, bei einer intravital markierten Zelle in normaler Extrazellulärlösung, gemessen werden konnte.

Eine Einteilung dieser Einzelableitung in die elektrophysiologische Klassifizierung ist nicht möglich, da die Zelle die eindeutigen Kriterien der beiden elektrophysiologisch charakterisierten Typen nicht erfüllt. Die Strom/Spannungsrelation zeigt keine Evidenzen für einen kalziumabhängigen Kaliumkanal, jedoch wird auch kein prominenter transients Peak zu Beginn der angelegten Spannungen ausgebildet. Es kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob nur einer der beiden elektrophysiologisch charakterisierten Zelltypen auf einen Muskarinstimulus mit einer meßbaren Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration reagiert.

3.4.6 Oszillierende Schwankungen der Kalziumkonzentration in Primärzellkulturen

Neben einem Anstieg der relativen Kalziumkonzentration, als Reaktion auf die Applikation pharmakologischer Stimuli, konnten endogene oszillierende Schwankungen der Kalziumkonzentration in 3 der 225 nicht markierten Zellen beobachtet werden. Diese wellenartigen Oszillationen traten spontan auf und wurden nicht durch die Applikation von Muskarin beeinflusst.

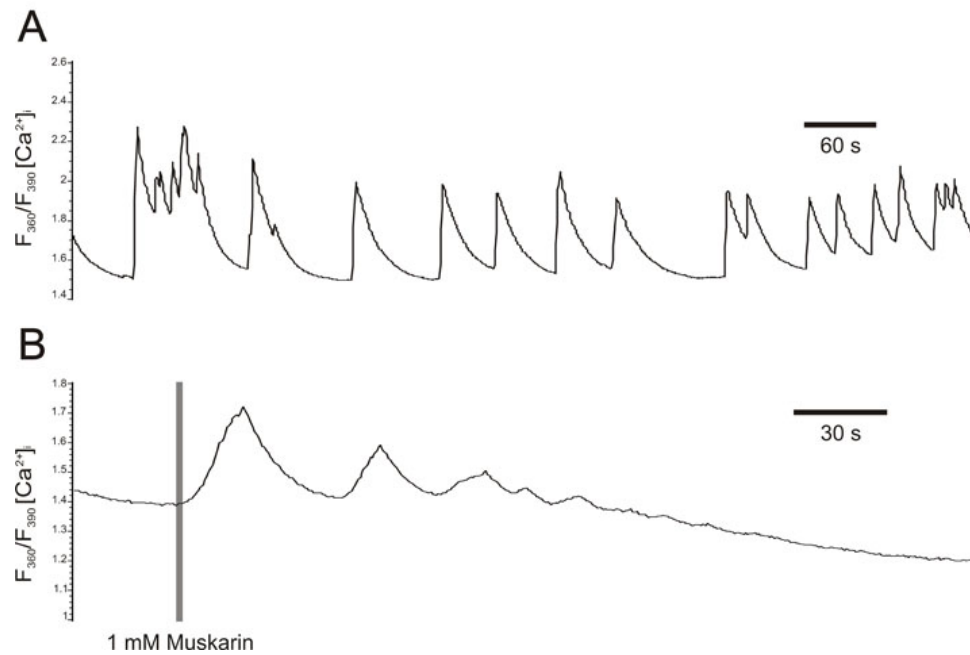


Abbildung 3.54: Messung der zytosolischen Kalziumkonzentrationsschwankungen primärzellkultivierter Zellen von *Ch. biguttulus*. A: Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration einer unbeeinflussten unmarkierten Zelle. Die abgebildete optische Ableitung zeigt eine spontane Oszillation der relativen Kalziumkonzentration. B: Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration einer unmarkierten Zelle, die auf einen Muskarinstimulus mit kleiner werdenden, langsam auslaufenden Schwankungen der zytosolischen Kalziumkonzentration reagiert.

In einem Fall reagierte eine der 27 nicht markierten Zellen, die auf die Applikation von Muskarin mit einem Anstieg ihrer relativen Kalziumkonzentration reagierten, mit einer wellenartigen, langsam auslaufenden Oszillation.

Diese Arten von Zellaktivität während optischer Ableitungen waren so selten, dass sie nicht systematisch untersucht wurden.

Abbildung 3.54 zeigt exemplarisch eine nicht markierte Zellen mit oszillierender zytosolischer Kalziumkonzentration (3.54 A) und ein nicht markiertes Neuron, das auf die Applikation von Muskarin mit einer kurzen, auslaufenden Oszillation reagierte (3.54 B).

4 Diskussion

Neben der generellen Charakterisierung der Primärkulturen von adulten Heuschrecken der Art *Ch. biguttulus* war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Etablierung einer Markierungsmethode für an der Gesangskontrolle beteiligte Neurone des Zentralkomplexes und die Einordnung der gefärbten Strukturen in den Kontext der bekannten anatomischen Strukturen des Protocerebrums. Dabei kamen histologische und immunzytochemische Methoden zur generellen Charakterisierung der Zellen zur Anwendung. Elektrophysiologische und optische Ableitmethoden dienten der detaillierten Analyse von primärkultivierten Neuronen, die den ins Gehirn injizierten vitalen Farbstoff enthielten.

4.1 Methodik der Coinjektion farbstoffgekoppelter Dextrane

Durch Kontrollexperimente konnte bereits in den Arbeiten von Heinrich et al. (1997) gezeigt werden, dass es sich bei der gesangsauslösenden Wirkung cholinergischer Agonisten um einen spezifischen pharmakologischen Effekt handelt. Die Methodik der Applikation von fluoreszenz- oder biotinkgekoppelten Dextranen zur Markierung einzelner Nervenzellen oder Neuronengruppen von Invertebraten kam bereits in früheren Arbeiten zur Anwendung. Farbstoffinjektionen in das auditorische Neuropil des Metathorakalganglions von *Locusta migratoria* zeigten, dass überwiegend Neurone angefärbt wurden, deren Postsynapsen im Injektionsgebiet lagen (Heinrich et al. 1998, Lakes-Harlan et al. 1998). Köbbert et al. (2000) beschreiben, dass der Transport von Dextranen überwiegend retrograd erfolgt. Die durch Dextraninjektionen gefärbten Strukturen konnten meist, anhand vorliegender Backfillfärbungen von Neuronengruppen oder morphologisch gut charakterisierte identifizierte Neurone, eindeutig bestimmten Neuronentypen zugeordnet werden (Heinrich et al. 1998, Lakes-Harlan et al. 1998, Schröter und Malun 2000). Die im Zentralkomplex verzweigenden, an der Gesangsauslösung beteiligten Neurone waren bisher nur über ihre Transmitter und die daran gekoppelten Signalwege charakterisiert worden. Eine direkte und eindeutige Zuordnung der dextranmarkierten Strukturen mit bezug auf ihre soezifische Funktion bei der Gesangskontrolle ist somit nicht möglich. Es konnte lediglich ein Vergleich des Färbemusters mit bekannten anatomischen Strukturen

durchgeführt werden, die im Hinblick auf andere Verhaltensleistungen untersucht und spezifisch markiert worden waren. Die Spezifität der angewendeten Färbemethode wird anhand der nachfolgenden histologischen und physiologischen Ergebnisse diskutiert.

4.1.1 Vergleich der Zellzahlen intravital markierter Neurone in Hirnschnitten und Zellkulturen

In den durch Tracerinjektionen in den Zentralkörper markierten Hirnen schwankte die Anzahl der intravital markierten Neurone zwischen 3 und 14 (3.2.2). Eine eindeutige Identifizierung der gefärbten Somata in den 50 μm Schnitten war jedoch nicht immer möglich. Die Zahl der intravital markierten Neurone in den Primärkulturen ist durch die physiologischen Untersuchungen mit durchschnittlich 3,2 pro Kulturschale (3.1.2) statistisch recht gut belegt. Der Gesamtverlust der Zellen bei dem Prozedere der Kulturnahme lässt sich nicht genau beziffern, da es keine genauen Angaben über die absolute Zellzahl des Heuschreckhirnes von *Ch. biguttulus* gibt. Deshalb können aus der Anzahl der markierten Neurone in Zellkulturen lediglich grobe Schätzungen auf die Gesamtzahl der markierten Zellen im intakten Gehirn gemacht werden. Laut Burrows (1996) liegt die Anzahl der Neurone im Heuschreckengehirn bei ca. 360.000. Bei durchschnittlich 90.000 Zellen (3.1.1) in den angelegten Primärkulturen verliert man also etwa $\frac{3}{4}$ der Hirnneurone im Zuge der Kulturnahme. Wenn man davon auszugehen, dass die Wahrscheinlichkeit, während der Dissoziation des Gehirns verloren zu gehen für alle Zellen gleich ist, könnte man das Verhältnis der intravital markierten Zellen in einer Zellkultur auf die zuvor im Gehirn markierten Neurone hochrechnen. Demnach müssten ungefähr 24 Neurone den dextrangekoppelten Farbstoff bei der Injektion ins Protocerebrum aufgenommen haben. Ungefähr 50% der optophysologisch abgeleiteten intravital markierten Neurone haben eine eindeutige Reaktion auf einen Muskarinstimulus gezeigt. Dies würde eine grob geschätzte Zahl von 12 Neuronen ergeben, die an dem über den muskarinischen Rezeptor vermittelten Gesangsverhalten beteiligt sind und durchschnittlich mit einer Dextraninjektion an einem effektiven Stimulationsort markiert wurden.

4.2 Zellkulturen

4.2.1 Nährmedien und ihr Einfluss auf die Primärzellkulturen

Bei Insektenzellkulturen sind heute drei Basisnährmedien in Gebrauch. Grace´s Medium war das erste Zellkulturmedium, dessen Zusammensetzung aus Aminosäuren und Zuckern für Insektenzellen optimiert wurde (Grace und Brozostowski 1966). Schneider´s Medium ist ein Medium, welches speziell für Zellkulturen von embryonalen Zellen aus *Drosophila* entwickelt wurde (Echalier und Ohanessian 1970). L-15 Leibovitz Zellkulturmedium ist ursprünglich für die diagnostische Virologie entwickelt worden, wird aber sehr häufig für Insektenzellkulturen verwendet (Leibovitz 1977). Diese Medien wurden in der Dissertation von Pfahlert (1996) getestet und das beste Wachstum von Neuronen der Heuschrecke *Locusta migratoria* wurde mit L-15 Leibovitz Medium und 5%igem Zusatz fötalem Kälberserums erreicht. Bei den für diese Arbeit angelegten Zellkulturen der Heuschrecke *Ch. biguttulus* wurde aufbauend auf dieses Ergebnis ebenfalls L-15 Leibovitz Medium mit einem 5%igem FCS Zusatz verwendet.

4.2.2 Überlebensrate der Zellen in Primärzellkulturen

Die in 3.1.1.1 durchgeführten Untersuchungen kommen mit drei unterschiedlichen Vitalitätsfärbemethoden zu dem Ergebnis, dass ca 40 % der kultivierten Zellen physiologisch intakt sind. Diese Zellen haben meist eine halbkugelförmige Gestalt, weisen im Durchlicht eine ausgeprägte Granulierung auf und zeigen eine den Kern vollständig umschließende anti-HRP Immunmarkierung. Das durch den Vitalitätsmarker Propidiumjodid mit 31 % eine geringere Zahl lebender Zellen ermittelt wurde, ist wahrscheinlich auf die unklare Unterscheidung zwischen schwach (=lebend) und stärker (=tot) gefärbten Zellen zurückzuführen. Da der Trypanblau- und der DAPI-Test nahezu gleiche Ergebnisse liefern, sind diese Methoden für eine klare Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen besser geeignet. Über die generelle Überlebensrate von Nervenzellen in Primärkulturen gibt es in der Literatur nur wenige konkrete Angaben, da zumeist nur spezifische Untersuchungen mit den Neuronen beschrieben werden, ohne den Zustand der Zellen zu charakterisieren. Die durch eine Trypanblaufärbung bestimmte Überlebensrate von Zellen des Meso- und Methathorakalganlions von *Locusta migratoria* lag am ersten Kulturtag bei 74 % (Kirchhof und Bicker 1992). Bei Hirnzellen von Bienen betrug die durch eine Ethidiumbromidfärbung ermittelte Anzahl der lebenden Zellen ein Tag nach der Plattierung durchschnittlich 50 % (Kreissl und Bicker 1992). Hier offenbarten sich jedoch erhebliche Unterschiede zwischen den Zellen unterschiedlicher Hirnregionen. So sank die Zahl lebender Kenyonzellen innerhalb der ersten 12 Tage von 62 auf 31 %, während

in der selben Zeit die Anzahl vitaler protocerebraler Zellen von 41 auf 7% zurückging. Die von Cayre et al. (1998) ermittelte Zahl lebender Kenyonzellen der Grille betrug am ersten Kulturtag ca. 45%. Die Lebensfähigkeit von primärkultivierten Neuronen zeigt scheinbar generell eine große art- und zellspezifische Variabilität. Die für *Ch. biguttulus* ermittelten Überlebensraten der kultivierten Hirnzellen liegen im Rahmen der in anderen Studien beobachteten Varianzen. Untersuchungen der Lebendzellzahlen über einen längeren Zeitraum haben gezeigt, dass die Zahl der lebenden Zellen in einer Kultur relativ konstant bleibt. Der überwiegende Teil der in Kulturen gefundenen toten Zellen starb also sehr wahrscheinlich durch den Stress der Kulturnahme, bei der die Zellen durch das Abreißen ihrer Neuriten einen Großteil ihres ursprünglichen Volumens verlieren. Dies hat zwar auf die durchgeführten physiologischen Experimente keinen Einfluss, da sie bereits am ersten Tag nach Kulturnahme durchgeführt wurden, muß jedoch für andere Telexperimente berücksichtigt werden.

4.2.3 Differenzierung zwischen Neuronen und Gliazellen

Bei dem in Material und Methoden beschriebenen Prozess der Anlage primärer Zellkulturen verliert man während der enzymatischen und mechanischen Dissoziation einen Teil der Hirnzellen. Der Anteil der verlorenen Zellen lässt sich schwer ermitteln, da die Schätzungen der absoluten Zellzahlen eines Heuschreckengehirns stark variieren. Kalkulationen gehen von ca. 360.000 Neuronen aus, wobei die Anzahl der kleinen Nervenzellen der Pilzkörper und der optischen Loben hierbei unterschätzt sein könnte (Burrows 1996). Zu der Anzahl der Gliazellen im Heuschreckengehirn gibt es keine verlässlichen Angaben. Schätzungen bei anderen Insektenarten unterscheiden sich in ihren Angaben so stark, dass daraus wenig Rückschlüsse über die Gliazellen im Heuschreckengehirn gewonnen werden können. Bei Grillen zum Beispiel geht man von einer Gliazellzahl aus, welche die der Neurone um das achtfache übersteigt (Gymer und Edwards 1967). Bei Bienen dagegen wurde das Verhältnis der Neurone zu Gliazellen auf ca. 10:1 geschätzt (Witthöft 1967).

Bei der Betrachtung der Zellkulturen im Durchlicht oder Reliefkontrast ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen nicht möglich. Optisch konnte man lediglich zwischen dem Grad der Granulierung unterscheiden. Loesel et al. (2006) beschreiben, dass mittels einer anti-HRP Immunmarkierung in Kombination mit einer DAPI Färbung zwischen Gliazellen und Neuronen differenziert werden kann. Der Antikörper gegen das pflanzliche Glykoprotein Meerrettichperoxidase markiert durch eine Kreuzreaktion 17 neuronspezifische Glykoproteine bei Insekten (Snow et al. 1987) und kann deshalb zu einer Identifizierung von Neuronen herangezogen werden (Kirchhof und Bicker 1992, Kreissl und Bicker 1992, Gascuel

et al. 1994). In Gascuel et al. (1991) werden Gliazellen in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Zellkulturen bei Bienen als große, stark abgeflachte Zellen beschrieben, die zumeist polypolare Verzweigungen ausbilden. Zellen mit dieser Morphologie konnten bei Kirchof und Bicker (1992) und Kreissl und Bicker (1992) auch im Phasenkontrast identifiziert werden. Eine anti-HRP Antikörperfärbung zeigte bei diesen Zellen eine schwache Reaktivität, die sich auf granuläre Einlagerungen im Zytoplasma beschränkte. Diese Färbung könnte auf Einlagerung von Glykogenen in Speichervesikeln zurückzuführen sein, wie sie von Wigglesworth (1960) und Hoyle (1986) für einige Gliazelltypen von Insekten beschrieben wurde.

Die Darstellung von Gliazellen bei Loesel et al. (2006) begründet sich auf dem Fehlen einer anti-HRP Immunmarkierung. Abgeleitet von dieser Definition werteten Loesel et al. (2006) geringes perinucleares Zytoplasma und monopolare Fortsätze als weitere Charakteristika für Gliazellen, da der überwiegende Anteil der Zellen mit fehlender anti-HRP Immunmarkierung diese Merkmale aufwies. Dies widerspricht den Beschreibungen von Gliazellen aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Gascuel et al. 1991), doch es könnte sich hier um Eigenschaften verschiedener Gliazelltypen von Insekten handeln (Edenfeld et al. 2005). Ich halte die Merkmale von Loesel et al. (2006) bezüglich des geringen perinuclearen Zytoplasmas und der monopolaren Fortsätze für einen Zirkelschluss.

Zellen, die der in Gascuel et al. (1991) beschriebenen Morphologie entsprechen, wurden in den angelegten Primärkulturen von *Ch. biguttulus* nicht gefunden. Zwar könnten die Gliazellen von *Ch. biguttulus* vielleicht nicht den Kriterien von Gascuel et al. (1991) entsprechen, doch wahrscheinlicher ist, dass die Zahl der Gliazellen in den Kulturen äußerst gering war. Snow et al. (1987) beschreiben, dass ein Großteil der anti-HRP Antigene ebenfalls durch Concanavalin A gebunden werden. Da die Beschichtung der Deckgläschen durch ConA erfolgte, können Gliazellen wahrscheinlich schlechter am Deckgläschen haften als Neurone und könnten beim Auffüllen der Kulturschälchen mit Medium leichter weggespült werden. Angaben zu eventuellen Beschichtungen der Kulturschälchen werden in den oben zitierten Arbeiten nicht gemacht. Die Doppelmarkierung eines Hirnschnittes mit anti-HRP und DAPI (3.2.1) zeigte, dass Zellen die lediglich eine DAPI Färbung aufwiesen und nach Loesel et al. (2006) wahrscheinlich Gliazellen sind, überwiegend in der Peripherie lokalisiert waren. Diese Zellen könnten bereits während des Prozesses der Kulturnahme, bei der enzymatischen Andauung der Hirnhirnhülle, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit verloren gehen. Kirchof und Bicker (1992) beschreiben weiterhin, dass die geringe Prozentzahl der Gliazellen erhöht werden konnte, wenn die Dissoziierung der Zellen, anders als in 2.3.2 beschrieben, direkt in der Zellkulturschale erfolgte. Dass Gliazellen in diesen Zellkulturen nicht so lebensfähig waren wie Neurone und bereits innerhalb einer Woche starben, dürfte auf die Anzahl der Gliazellen in den Primärkulturen

nach einem Tag nur einen unbedeutenden Einfluss haben.

Einige der in 3.1.1 beschriebenen Zellen zeigten dennoch eine anti-HRP Immunmarkierung, die sich wie bei Kirchhof und Bicker (1992) und Kreissl und Bicker (1992) auf kleine Fragmente im Zytosol beschränkte. Bei den wenigen Zellen, bei denen diese Immunmarkierung auftrat, könnte es sich um Gliazellen handeln, auch wenn die übrigen von Gascuel et al. (1991) beschriebenen Kriterien für Gliazellen in Zellkulturen auf diese Zellen nicht zutrafen. Das Kriterium des geringen perinuclearen Zytoplasmas ist nach meiner Ansicht nicht hinreichend für die Definition von Gliazellen. Tote bzw. sterbende Zellen haben generell einen dünnen oder gar keinen Zytoplasmaring um den Kern. Die Plasmamembran sterbender Neurone könnte die HRP-Antigene bereits verloren haben. Auch bei vielen Zellen mit positiver anti-HRP Immunmarkierung nimmt der Nucleus den Großteil des Somas ein. Die Ursache hierfür könnte in der Methode der Dissoziation liegen, bei der die Zelle durch den Abriss ihrer Fortsätze wahrscheinlich einen großen Teil ihres ursprünglichen Volumens verliert. Die Anzahl der Gliazellen in den angelegten Primärkulturen von *Ch. biguttulus* müsste aus den oben genannten Gründen eher gering sein.

4.2.4 Immunzytochemie in Primärzellkulturen

Der monoklonale Antikörper gegen eine für Gliazellen spezifische Homeodomäne zeigte bei den Primärkulturen und bei Hirnschnitten von *Ch. biguttulus* keine Färbung, obwohl die parallel dazu durchgeführte Färbung an Hirnschnitten von *Drosophila melanogaster* erfolgreich war. Das von diesem Antikörper detektierte Antigen wird von den Gliazellen in *Ch. biguttulus* somit nicht exprimiert. Halter et al. (1995) konnten jedoch an Embryos von *Schistocerca gregaria* spezifische Markierungen von Gliazellen durchführen. Insofern ist es verwunderlich, dass der Antikörper bei *Ch. biguttulus* zu keiner Markierungen Gliazellen führte, weil andere Antikörper, die erfolgreich an Geweben von *Locusta migratoria* oder *Schistocerca gregaria* eingesetzt wurden in der Regel auch spezifische Färbungen bei *Ch. biguttulus* zeigten.

Die Antikörpermarkierungen gegen das synapsenassoziierte Protein SAP-47 zeigten in Primärkulturen mit einer gleichmäßigen Färbung des Somas und sämtlicher Fortsätze ein ganz anderes Färbemuster als die auf Neuropilregionen beschränkte Färbung von Hirnschnitten. Auch die Antikörperfärbungen an Primärzellkulturen aus *Locusta migratoria* von Pfahlert (1996) gegen Neurotransmitter wie Glutamat und GABA lieferten verwirrende Ergebnisse. Die Addition der Glutamat- und GABA-immunreaktiven Zellen ergab in dieser Studie über 100 %, obwohl davon auszugehen ist, dass ein Neuron nicht zwei unterschiedliche schnelle Transmitter ausschütten kann. Solche Befunde machen die Interpretation von Antikörperfärbungen in Zellkulturen generell schwierig. Nach Möglichkeit sollten die für Wholemounts oder

Schnittpräparate etablierten Protokolle für immunhistochemische Untersuchungen an Zellkulturen angepasst werden und die gewonnen Erkenntnisse unbedingt durch Kontrollfärbungen an intakten Geweben belegt werden, um ihre Aussagekraft zu stützen. Anti-HRP wird, wie in 4.2.3 beschrieben, häufig zur Identifizierung von Neuronen in Zellkulturen verwendet und lieferte vergleichbare Ergebnisse bei immunhistochemischen Färbungen an Hirnschnitten (siehe 3.2.1) bei vielen verschiedenen Insektenarten. Die an Zellkulturen durchgeführten Färbungen können somit als spezifisch angesehen werden. Zur Abschätzung der Spezifität der Färbungen können auch andere Parameter herangezogen werden. In dieser Arbeit lag zum Beispiel der Anteil anti-mAChR positiv markierter Zellen in den Primärkulturen bei 22%. Im Vergleich dazu reagierten 19,4% der 273 optisch abgeleiteten Zellen mit einem durch Muskarin stimulierten Anstieg ihrer zytosolischen Kalziumkonzentration von über 10%. Hier führen also zwei unterschiedliche Registrierungsmethoden zu sehr ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Anzahl von Zellen, die den mAChR exprimieren, was als deutliches Indiz dafür angesehen werden kann, dass der Antikörper gegen mAChR in Zellkulturen mit dem verwendeten Färbeprotokoll spezifische Ergebnisse liefert.

4.3 Hirnschnitte

4.3.1 Einordnung intravital markierter Neurone in die Anatomie des Zentralkomplexes

Der Zentralkomplex umfasst eine im Protocerebrum lokalisierte Gruppe miteinander verbundener Neuropile. Er setzt sich aus der oberen und unteren Division des Zentralkörpers, der Protocerebralen Brücke und den paarigen Noduli zusammen (Homberg 1991). Die obere Division besteht aus vier Schichten und, abhängig von der Nomenklatur, acht bis sechzehn Kolumnen. Die untere Division zeigt in ihrem Aufbau die selbe Struktur, ist jedoch in sechs Schichten unterteilt. Die Architektur der Neurone, die den Zentralkomplex innervieren ist durch immunzytochemische Untersuchungen zur Verteilung vieler Neurotransmitter und Neuropeptide ermittelt worden (Homberg 2002). Die in Schichten und Kolumnen organisierte Gliederung basiert auf den zwei wichtigsten Klassen von Interneuronen des Zentralkörpers. Sogenannte Tangentialneurone bilden feine Verzweigungen innerhalb einer oder mehrerer Schichten der Untereinheiten des Zentralkörpers. Kolumnäre Neurone innervieren einzelne Kolumnen derselben oder verschiedener Schichten (Homberg 1991, Müller et al. 1997, Vitzthum et al. 2002). Die Somata der Tangentialneurone sind hauptsächlich im inferioren lateralen oder inferioren medianen Protocerebrum lokalisiert. Wenige Somata konnten auch in der Pars Intercerebralis detektiert werden.

Die Somata der kolumnären Neurone liegen dagegen ausschließlich in der Pars Intercerebralis.

Die unter 3.2.2 beschriebenen Ergebnisse der Injektionen biotinkgekoppelter Dextrane in den Zentralkomplex markierten bis auf eine Ausnahme (Abb. 3.24C) ausschließlich Somata in der Pars Intercerebralis bei denen es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um kolumnäre Neurone handelte. Auch der Faserverlauf der dextranmarkierten Neurone zeigt deutliche Parallelen zu den Immunfärbungen kolumnärer Neurone gegen das Peptid Locustatachykinin I und II (Abb. 4.1) von Vitzthum und Homberg (1998).

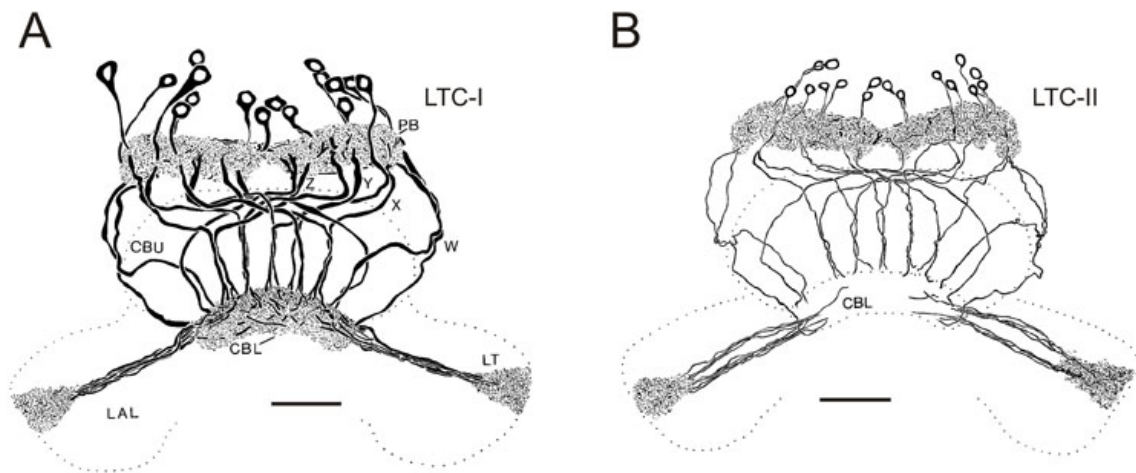


Abbildung 4.1: Rekonstruktion von Locustatachykinin I und -II immunreaktiven Neuronen. Die Somata beider Neuronengruppen liegen in der Pars Intercerebralis. Ihre Fasern ziehen in die Protocerebrale Brücke (PB). A: Neuriten ziehen von der PB durch die w-, x-, y- und z-Bündel in die untere Division des Zentralkörpers (CBL). Terminale Verzweigungen liegen in der lateralen Triangel (LT) des lateralen Akzessorischen Lobus. B: LTC-II Neurone senden feine Fasern über die w-, x-, y-, und z-Bündel in die untere Division des Zentralkörpers. Verzweigungen dieser Neurone in der CBL konnten aufgrund von Überlagerungen der Immunreaktivität nicht klar identifiziert werden. Axonale Terminalien sind auf die LT der lateralen Akzessorischen Loben begrenzt. Maßstab 100 µm. (verändert aus Vitzthum und Homberg 1998)

Neben dem kolumnären Verlauf der Neuriten intravital markierter Neurone in der oberen Division des Zentralkörpers wurden in einigen Hirnpräparaten Fasern gefärbt, die lateral an den Grenzen der oberen Division entlang ziehen (Abb. 3.21, 3.24). Dies ist typisch für den Verlauf der ebenfalls Locustatachykinin exprimierenden w-Bündel. Auch das Kreuzen der Fasern im protocerebralen Chiasma ist in verschiedenen Färbungen zu erkennen (Abb. 3.20, 3.22, 3.23). Der Verlauf eines Neuriten in einen der lateralen Akzessorischen Loben konnte in Abb. 3.24 einmal beobachtet werden. Ebenso die feine Verästelung einer Faser in der unteren Division des Zentralkörpers (Abb. 3.23). Ein markiertes Neuron konnte nie vollständig rekonstruiert werden. Die Färbungen in der unteren Division des Zentralkörpers oder den lateralen akzessorischen Loben selten zu beobachten waren, ist wahrscheinlich auf die vorwiegend retrograde Ausbreitung des Dextrans in den Neuronen zurückzuführen. Die deutlichen Somafärbungen deuten drauf hin, dass der Farbstoff im Soma akkumuliert. Vitzthum und Homberg (1998) konnten im posterioren Bereich

der Pars Intercerebralis auffällig große Somata anfärben. Abb. 3.20 zeigt ebenfalls ein sehr großes Soma, welches durch das injizierte Dextran deutlich markiert wurde. Auch die Lage der drei Somatagruppen der immunreaktiven Locustatachykinin I und II Neurone innerhalb der Pars Intercerebralis zeigt deutliche Analogien mit den Positionen der dextranmarkierten Somata.

Müller et al. (1997) haben mittels Golgifärbungen und intrazelluläre Luzifer Yellow Injektionen Neurone, die die untere Division des Zentralkörpers innervieren, anhand ihrer anatomischen Struktur klassifiziert. Neurone, deren Anatomie den Locustatachykinin I und II immunopositiven Neuronen ähneln, werden von Müller als CL1 Typen beschrieben. Aufgrund der strukturellen Merkmale der Neuropile der CL1 Neurone vermuten Müller et al. (1997), dass ihre Eingangsstrukturen in der unteren Division des Zentralkörpers liegen. Perlenschnurförmige Endigungen in der lateralen Triangel der lateralen Akzesorischen Loben lassen auf Ausgangsstrukturen der CL1 Neurone schließen. Strukturellen Merkmale der Tangentialneurone belegen, dass sie präsynaptische Endigungen in der unteren Division des Zentralkomplexes ausbilden. Die Kolumnären Neurone sind mit großer Wahrscheinlichkeit die Ausgangsneurone des Zentralkomplexes und werden von den Tangentialneuronen innerviert. Dass die Eingangsstrukturen der Tangentialneurone in lateralen Akzesorischen Loben und den Noduli lokalisiert sind und das injizierte Dextran fasst ausschließlich von kolumnären Neuronen aufgenommen wurde, deckt sich mit den Ergebnissen von Heinrich et al. (1998), bei denen das in das thorakale auditorische Neuropil von *Locusta migratoria* injizierte Dextran überwiegend Postsynapsen aufgenommen wurde. Weiterhin sind die kolumnären Neurone die einzigen anti-mAChR immunpositiven Neurone des Zentralkomplexes (Hoffmann et al. 2007). Die einzigen bisher individuell identifizierten, an der der Gesangskontrolle beteiligten Hirnneurone sind die von Hedwig in verschiedenen Heuschreckenarten beschriebenen Kommandoneurone (Hedwig 1994; 1995, Hedwig und Heinrich 1997). Diese zeigen zwar keine Verzweigungen im Zentralkörper, doch konnten dendritische Strukturen posterior dorsal des Zentralkörpers lokalisiert werden. Es ist gut möglich, dass diese dendritischen Verzweigungen bis in die lateralen Akzesorischen Loben reichen und eventuell direkt postsynaptisch zu den kolumnären Outputneuronen liegen könnten.

4.3.2 Anti-mAChR Immunzytochemie an intravital markierten Neuronen

Die Spezifität des verwendeten Antikörpers gegen den muskarinischen Acetylcholin Rezeptor wurde erstmals von Blake et al. (1993) bei *Drosophila melanogaster* nachgewiesen. Das detektierte Antigen ist der C-Terminus der Rezeptordomäne, deren Sequenz eine starke Homologie zu einer Sequenz der m1, m3 und m5 Vertebraten-

subtypen aufweist. Pharmakologische Untersuchungen an als *DroM1* bezeichneten, heterolog exprimierten Rezeptoren von *Drosophila* in Oocyten von *Xenopus laevis* zeigten ein mit m1 und m3 Subtypen vergleichbares pharmakologisches Profil (Blake et al. 1993). Bei Vertebraten aktivieren die Subtypen m1, m3 und m5 hauptsächlich die Phospholipase C, wobei die pharmakologischen Untersuchungen überwiegend an heterolog exprimierten Rezeptoren in unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt wurden und der aktivierte Effektormechanismus von dem jeweiligen Zelltyp abhängig sein kann (Hulme et al. 1990). Der bei den immunzytochemischen Untersuchungen in Zellkulturen und an Hirnschnitten verwendete Antikörper detektiert also einen muskarinergen Rezeptorsubtyp, der mit großer Wahrscheinlichkeit einen über die PLC gekoppelten Signalweg aktiviert. Hoffmann et al. (2007) zeigten, dass der für *Drosophila* spezifische Antikörper auch bei *Ch. biguttulus* ein Protein ähnlicher Größe markiert. Bisher konnte bei *Drosophila* und generell bei Insekten nur dieser eine Typ von mAChR kloniert werden. Pharmakologische Untersuchungen an verschiedenen Insektenarten belegen jedoch die Präsenz unterschiedlicher Typen von mACh Rezeptoren, die außer mit dem PLC-Signalweg auch mit anderen intrazellulären Signalwegen, wie dem Adenylatzyklase-Weg gekoppelt sein können. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass Muskarinrezeptoren, die über andere Effektormechanismen wirken von dem auch in dieser Arbeit verwendeten *DroM1* Antikörper nicht markiert werden.

Die Antikörperfärbung gegen den mAChR zeigt weder in der Pars Intercerebralis noch im inferioren medianen Protocerebrum immunmarkierte Somata. Dies repräsentiert im Gegensatz zu den angefärbten Somata in den Primärzellkulturen (Abb. 3.14) wahrscheinlich den physiologischen Zustand, denn mACh Rezeptoren sind überwiegend in Neuropilregionen zu erwarten. Dass muskarinische Acetylcholin Rezeptoren in den Primärkulturen auch auf den Somata der Neurone exprimiert werden, ist sicherlich artifiziell und wahrscheinlich eine Folge des Verlustes sämtlicher Fortsätze, in welche die gebildeten Rezeptoren normalerweise transportiert werden würden. Auch wenn keine Somata in Hirnschnitten (Abb. 3.24C) angefärbt wurden, deutet der Verlauf der Fasern eindeutig auf eine Immunmarkierung kolumnärer Neurone hin.

Bei der intravitalem Injektion des dextrangekoppelten Fabstoffes in ein dichtes Neuropilgebiet ist eigentlich zu erwarten, dass sehr viele Neurone mit dem injizierten Farbstoff in Kontakt geraten und diesen aufnehmen. Die Überlagerung intravital markierter Neurone mit einer mAChR Immunmarkierung zeigte zwar eine deutliche Colokalisation beider Färbungen, jedoch wiesen viele der gefärbten Neuriten lediglich eine der beiden Markierungen auf. Dies bedeutet sowohl, dass nicht alle mAChR immunpositiv gefärbten Fasern den dextrangekoppelten Fabstoff aufgenommen haben als auch, dass Neuriten intravital markiert wurden die keinen mAChR tragen. Auch

wenn der mACh Rezeptor zwar eindeutig mit dem Gesangsverhalten gekoppelt ist, kann man nicht daraus schließen, dass der mACh Rezeptor auch ausschließlich mit diesem Verhalten verknüpft ist. Weiterhin ist auch nicht davon auszugehen, dass auch sämtliche mit diesem Verhalten assoziierten Neurone durch die intravitale Farbstoffinjektion markiert werden. Die von Köbbert et al. (2000) beschriebene Transportrichtung von Dextran und das Verhältnis der gefärbten Somata der Pars Intercerebralis im Vergleich zu den unvollständig markierten Faserstrukturen deutet darauf hin, dass sich der Farbstoff im Soma der Neurone akkumuliert. Es ist nicht auszuschließen, dass einige der mAChR immunmarkierten Fasern den Farbstoff vielleicht aufgenommen haben, die Färbung in den Neuriten jedoch nicht mehr sichtbar ist. Eine Colokalisation der beiden Färbungen auf der Ebene der Somata ist wegen der fehlenden Rezeptorfärbung nicht möglich. Einige Fasern zeigen jedoch eine eindeutige Dextranmarkierung ohne eine immunpositive Färbung gegen mAChR. Wenzel et al. (2002) zeigte, dass Gesangsverhalten über zwei unterschiedliche mAChR gekoppelte Second Messenger Signalwege ausgelöst werden kann. Es konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, in welchen Zentralkomplexneuronen die beiden muskarinisch aktivierten Signalwege exprimiert werden. Sollten die beiden Signalwege von unterschiedlichen Rezeptorsubtypen in verschiedenen Zellen aktiviert werden, so ist es wahrscheinlich, dass der Rezeptortyp, der die Erregung über die Adenylatzyklase vermittelt, nicht durch den verwendeten Antikörper detektiert wird. Der dextran-gekoppelte Farbstoff könnte somit von diesen, an der Erregungsbildung beteiligten Zellen aufgenommen worden sein ohne eine Colokalisation mit der mAChR Immunmarkierung zu zeigen. Da der dextran-gekoppelte Farbstoff jedoch auch sehr leicht von verletzten Neuriten aufgenommen wird (Köbbert et al. 2000) und vermutlich auch Neurone mit anderen lokomotionsassoziierten Funktionen ihren synaptischen Input im selben Neuropilbereich erhalten, ist auch eine Fehlmarkierung von Neuronen, die nicht an der Gesangskontrolle beteiligt sind möglich.

Insgesamt erscheint die Methode der intravitralen Coapplikation eines dextran-gekoppelten Farbstoffes einen Ort, an dem zuvor mit Muskarin Gesang ausgelöst werden konnte, eine durchaus effektive Herangehensweise, um die pharmakologisch stimulierten Neurone vorzuselektieren. Intravital markierte Neurone lassen sich zuverlässig in den Primärkulturen wiederfinden und die Ergebnisse der Kalziumimagingexperimente zeigen, dass ca. 54% aller Intravital markierten Neurone eine durch Muskarin stimulierte Reaktion zeigen. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein zuvor markiertes Neuron auf die Applikation von Muskarin reagiert ist signifikant höher als bei unmarkierten Zellen. Hierauf lassen sich weitere Untersuchungen an dem System, zum Beispiel die weitere Entschlüsselung der Signalwege oder die Untersuchung anderer beteiligter Transmittersysteme aufbauen.

4.4 Elektrophysiologische Untersuchungen intravital markierter Neurone

Die elektrophysiologische Charakterisierung intravital markierter Neurone in primären Zellkulturen von *Ch. biguttulus* erfolgte mittels Patch-Clamp Messungen in der Whole-Cell-Konfiguration. Die in 3.3 zusammengefassten Ergebnisse wurden überwiegend aus Voltage-Clamp Ableitungen gewonnen. Da die Zellen auf das Umschalten in den Current-Clamp Modus sehr empfindlich reagierten, wurden Current-Clamp Ableitungen lediglich zur Ermittlung des Ruhemembranpotentials kurz nach Etablierung der Whole-Cell-Konfiguration genutzt. Das so bestimmte Ruhemembranpotential der intravital markierten Neurone lag bei durchschnittlich $-44,5$ mV und deckt sich mit dem von Pfahlert (1996) ermittelten durchschnittlichen Ruhemembranpotential von primärkultivierten Neuronen der Thorakalganglien von *Locusta migratoria*. Dort betrug das durchschnittliche Ruhemembranpotential für Interneurone $-43,5$ mV. Das ermittelte Ruhemembranpotential von Motorneuronen lag am ersten Kulturtag bei $-41,5$ mV, nahm aber mit fortlaufendem Alter der Kultur ab. Die in 3.3 dargestellte mittlere Membrankapazität der Zellen wurde aus dem Serienwiderstand und der Kompensation der kapazitiven Transienten berechnet. Diese Berechnung kann fehlerbehaftet sein, da die Kompensation manuell erfolgte und innerhalb einer Ableitung starken Schwankungen unterlag. Auch hatte sich später ein Fehler in der Kalibrierung dieser Kompensationsmechanismen herausgestellt. Dieser war jedoch durch das Meßsystem bedingt und dürfte keinerlei Einfluss auf die starke Varianz der gemessenen Zellkapazitäten haben. Die wenigen Ableitungen, die an einer anderen Messapparatur durchgeführt wurden und bei denen die Zellkapazität kontinuierlich während der Messung vom Meßsystem aufgezeichnet wurde, zeigten ebenfalls eine große Standardabweichung.

4.4.1 Auswärts gerichtete Stöme

Aufgrund von Unterschieden der Ströme intravital markierter Neurone aus Primärkulturen von *Ch. biguttulus* wurden die abgeleiteten Neurone im Ergebnisteil 3.3 in zwei Klassen unterteilt. Als Kriterium zur Unterteilung der beiden Neuronenklassen wurde eine deutliche Abweichung in der Strom/Spannungsrelation des Auswärtstroms bei hohen Klemmspannungen herangezogen. Es konnten zusätzlich signifikante Unterschiede in der Gesamtstromstärke des Auswärtstroms und in dem Verhältnis von transientem zu persistierendem Strom festgestellt werden.

Der gemessene Auswärtstrom von Neuronen des Typs B konnte in Komponenten zerlegt werden, die wahrscheinlich von Kaliumkanälen des Typs K_{dr} und K_A getragen werden. Die genaue Charakterisierung dieser Kanäle anhand ihres pharmakolo-

gischen Profils war aufgrund methodischer Probleme nicht möglich. Der Auswärtsstrom zeigte bei fast allen Ableitungen schon in den ersten Minuten einen starken Rundown (Abb. 3.37). Schäfer et al. (1994) beschreiben ebenfalls einen schnellen Rundown des K_{dr} und postulieren, dass die Ursache hierfür vielleicht in einem K^+ -Kanal Subtyp begründet liegt, der intrazelluläre Komponenten benötigt, die durch den Austausch des Zytosols mit der Pippettenlösung ausgewaschen werden. Dies ist mit elektrophysiologischen Methoden jedoch generell schwer zu verifizieren und anhand der geringen Datenmenge dieser Arbeit viel zu spekulativ und müsste durch Perforated Patch Clamp Ableitungen untersucht werden.

Der Auswärtsstrom der Neurone des Typs B wird ebenfalls sehr wahrscheinlich von Kaliumkanälen des Typs K_{dr} und K_A getragen, zeigt jedoch wie in Abb. 3.35B gut ersichtlich, ab einer angelegten Spannung von -20 mV einen N-förmigen Verlauf der Strom/Spannungsrelation. Diese Form ist typisch für die Strom/Spannungskurve eines kalziumabhängigen Kaliumkanals und wurde erstmals von Heyer und Lux (1976) bei Schrittmacherneuronen von *Helix pomatia* beschrieben. Singh und Wu (1989) beschreiben zwei Typen kalziumaktivierter Kaliumkanäle im Muskel von *Drosophila*. Durch spezifische Antagonisten können die beiden Typen kalziumaktivierter Kaliumkanäle eindeutig unterschieden werden. Der schnelle transiente kalziumaktivierte Strom I_{CF} kann durch ein Peptid des Skorpiongiftes (Charybdotoxin) und der langsam inaktivierende Strom I_{CS} durch eine Komponente des Bienengiftes (Apamin) geblockt werden. Eine genaue Differenzierung zwischen diesen Kanaltypen durch das Einwaschen selektiver Blocker war aufgrund der in 3.3.3 beschriebenen Problematik der relativ instabilen Whole-Cell-Konfiguration bei meinen Untersuchungen nicht möglich. Ein kalziumaktivierter Kaliumkanal wurde ebenfalls von Schäfer et al. (1994) in Kenyonzellen der Honigbiene beschrieben, doch auch hier war eine eindeutige Zuordnung des kalziumaktivierten Stroms zu einem bestimmten Kanaltyp nicht möglich, weil der charakteristische N-förmige Verlauf der Stromspannungskurve bereits wenige Minuten nach Etablierung der Whole-Cell-Konfiguration verschwand. Blockexperimente mit Charybdotoxin lieferten hier keine eindeutigen Ergebnisse, da scheinbar auch K_{dr} Kanäle durch das Toxin blockiert wurden.

Die in den intravital markierten Neuronen aus dem Gehirn *Chorthippus biguttulus* detektierten Kaliumkanaltypen konnten in primärkultivierten Hirnneuronen verschiedener Insektenpezies nachgewiesen werden (Wegener et al. (1992) bei *Locusta*, Zufall et al. (1991) bei *Manduca sexta*, Grünewald (2002) bei *Apis mellifera*, Cayre et al. (1998) bei Grillen und Wright und Zhong (1995) bei *Drosophila*). Unterschiedliche Neuronentypen exprimieren unterschiedliche Kombinationen von Kaliumkanälen (Beadle 2006). So exprimieren Projektionsneurone des Antennallobus der Biene zwar K_{dr} - und einen Typ kalziumaktivierter Kaliumkanäle, jedoch keine K_A -Kanäle (Grünewald 2002). Die meisten Erkenntnisse über Hirnneurone von Insekten wur-

den an den Kenyonzellen der Pilzkörper gewonnen. Dies ist zum einen bedingt durch ihre Funktion in den neuralen Prozessen von Lernen und Gedächtnis, zum anderen Aufgrund ihrer durch die Anatomie der Pilzkörper bedingten relativ leichten Isolierbarkeit. Es liegen jedoch zum Teil widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der von Kenyonzellen exprimierten Kaliumkanäle vor. Die von Schäfer et al. (1994) elektrophysiologisch charakterisierten Kenyonzellen der Biene exprimieren die selben Kaliumkanäle, die auch in meiner Arbeit in intravital markierten Neuronen des Typs A gefunden wurden. Die Arbeiten von Pelz et al. (1999), Grünewald (2002) und Wüstenberg et al. (2004) an Bienen belegen lediglich die Expression von K_{dr} und K_A Kanälen in Kenyonzellen. Diese Diskrepanz der an Kenyonzellen von Bienen durchgeführten Untersuchungen könnte durch unterschiedliche Kulturbedingungen oder durch unterschiedliches Alter der verwendeten Puppenstadien begründet sein. Die Ergebnisse von Schäfer et al. (1994) waren in Folgeexperimenten teilweise nicht mehr reproduzierbar (persönliche Korrespondenz mit B. Grünewald). Auch in *Drosophila* wurden nur K_{dr} und K_A Kanäle in den selben Neuronen detektiert (Wright und Zhong 1995). Die von Cayre et al. (1998) untersuchten Neurone der Pilzkörper von Grillen exprimierten kalziumabhängige Kaliumkanäle und K_{dr} , jedoch zeigten die geringen transienten Auswärtsströme vom Typ I_A , im Gegensatz zu den Kenyonzellen der Honigbiene, keine Sensitivität zu dem selektiven K_A Blocker Quinidine. Somit scheint der I_A der Kenyonzellen bei Grillen von einem anderen Kanaltyp getragen zu werden als bei Bienen.

Die Kombination verschiedener Kaliumkanäle scheint also nicht nur vom generellen Neuronentyp abhängig zu sein, sondern unterscheidet sich, wie am Beispiel der Kenyonzellen beschrieben, auch zwischen verschiedenen Insektenarten und Entwicklungsstadien. Patch-Clamp Untersuchungen von protocerebralen Zellen der Heuschrecke liegen als Vergleich zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht vor. Elektrophysiologische Untersuchungen mit der Patch Clamp Technik an Heuschrecken wurden bisher überwiegend an thorakalen Neuronen und antennalen Rezeptorzellen durchgeführt (Laurent 1991, Heidel und Pflüger 2006, Wegener et al. 1992). Festzuhalten bleibt, dass die intravital markierten Neurone unterschiedliche Kaliumkanalpopulationen aufweisen. Ob diese Unterschiede mit verschiedenen Funktionen im Gesangsverhalten assoziiert sind oder ihre Ursache in einer eventuellen Fehlmarkierung haben lässt sich nicht eindeutig feststellen. Eine intravital markierte Zelle während der Applikation von Muskarin gleichzeitig elektrophysiologisch und optisch abzuleiten, war nicht erfolgreich. Somit können die elektrophysiologischen Erkenntnisse bezüglich der exprimierten Kaliumkanäle nicht eindeutig mit den Ergebnissen der Kalziumimaging Experimente verknüpft werden. Die Detektion der Kaliumkanaltypen K_{dr} , K_A und K_{Ca} in einem Zelltyp (wie bei Neuronen des Typ A) ist jedoch ungewöhnlich und könnte auf eine funktionelle Be-

sonderheit dieser Zellen hinweisen.

4.4.2 Einwärts gerichtete Ströme

Einwärts gerichtete Ströme in intravital markierten Neuronen konnten lediglich bei einer Ableitung nach der Zugabe von Tetraethylammonium beobachtet werden. Um auswärtsgerichtete Ströme in Kenyonzellen der Biene zu blocken, wurden 20 mM TEA der Extrazellulärlösung zugegeben und zusätzlich das Kalium in der Pipettenlösung gegen Cäsium ausgetauscht (Grünwald 2002). Schäfer et al. (1994) konnten durch Einwaschen von 20 mM TEA eine 60 %ige Reduktion des persistierenden Auswärtsstroms der Kenyonzellen von Bienen feststellen. Auch Byerly und Leung (1988) beobachteten bei embryonalen Neuronen von *Drosophila* nach dem Einwaschen von 10 mM TEA eine Reduktion der persistierenden Komponente des Auswärtsstroms. Die gemessene maximale Amplitude der in Abbildung 3.31 dargestellten Ableitung liegt mit 7,26 nA im Vergleich zu den gemittelten Stromstärken der in anderen Präparationen abgeleiteten Neurone (Abb. 3.28) sehr hoch. Da die persistierende Komponente des Auswärtsstroms einen großen Teil des Gesamtauswärtsstroms trägt, ist es unwahrscheinlich, dass diese Komponente durch TEA geblockt wurde. Die Zelle zeigt jedoch, im Gegensatz zu den übrigen Ableitungen intravital markierter Neurone, so gut wie keine transiente Komponente in ihrem Auswärtsstrom. Das Blocken der transienten Komponente des Auswärtsstroms stände jedoch im Widerspruch, zu den an anderen Insekten gewonnen Erkenntnissen. Die von Cayre et al. (1998) untersuchten Kenyonzellen der Grillen zeigten beispielsweise erst nach Einwaschen hoher Konzentrationen TEA (100 mM) überhaupt eine transiente Komponente ihres Auswärtsstroms. Anhand eines einzigen Experimentes lässt sich jedoch keine klare Aussage bezüglich der geblockten Komponenten des Auswärtsstroms treffen. Für einen vollständigen Block des kaliumgetragenen Stroms bei Feldheuschrecken reicht jedoch die Zugabe von TEA allein nicht aus. Heidel und Pflüger (2006) zeigten, dass die Blockierung des kaliumgetragenen Stroms der DUM-Neurone von *Schistocerca gregaria* erst mit einer speziell angepassten Bad- und Pipettenlösung möglich war.

Schäfer et al. (1994) und Cayre et al. (1998) beschreiben das Phänomen, dass einwärts gerichtete Ströme erst nach dem partiellen oder vollständigen Block der Auswärtsströme detektiert werden können. Aufgrund der schnellen Inaktivierung und der Strom/Spannungsrelation des Einwärtsstroms handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich um einen von Na^+ -Ionen getragenen Strom. Absolute Sicherheit wäre erst nach erfolgreichem Block mit Tetrodotoxin gewährleistet. Nahezu alle Untersuchten Hirnneurone von Insekten zeigten einen langsam inaktivierenden, von Ca^{2+} -Ionen getragenen Einwärtsstrom (Beadle 2006). Evidenzen für einen solchen Strom wurden in den Ableitungen intravital markierter Neurone nicht gefunden. Dies ist wahr-

scheinlich nicht auf das Fehlen von Kalziumkanälen zurückzuführen, sondern auf die Maskierung langsam inaktivierender, einwärtsgerichteter Ströme durch ausgeprägte Auswärtsströme. Der gemessene mittlere Auswärtsstrom intravital markierter Neurone von *Ch. biguttulus* war im Vergleich zu anderen untersuchten Hirnneuronen von Insekten relativ hoch (Abb.3.29). Da die Neurone der Thorakalganglien von Locusten ebenfalls sehr prominente Auswärtsströme zeigen (Laurent 1991, Heidel und Pflüger 2006), könnte dies ein für Heuschrecken neurone typisches Merkmal sein.

4.4.3 Nikotinische Acetylcholin-Kanäle

Heinrich et al. (1997) konnten zeigen, dass Injektionen von Acetylcholin und cholinergem Agonisten in den Zentralkomplex von *Omocestus viridulus* Sequenzen der natürlichen Gesangsmuster auslösen können. Sowohl der nikotinische, als auch der muskarinische Acetylcholinrezeptor sind also an der Kontrolle des Gesangsverhaltens der Feldheuschrecken beteiligt. Das in 3.3.3 dargestellte Experiment belegt einen über nikotinische Acetylcholinrezeptoren vermittelten Einwärtsstrom in einem intravital markierten Neuron. Diese Beobachtung fügt sich gut in die theoretischen Erwartungen ein, aber methodische Probleme ließen die Reproduktion dieses Ergebnisses am eigenen Setup nicht zu. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind in Insektenneuronen vieler Spezies und in unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen worden (u. a. bei Kenyonzellen von Grillen (Cayre et al. 1999) und Bienen (Wüstenberg et al. 2004), bei larvalen Neuronen von *Drosophila*, *Musca* und *Schistocerca* (Albert und Lingle 1993) und bei Neuronen des Thorakalganglions von *Locusta* (Tareilus et al. 1990, Benson 1992). Selbst wenn die Anzahl der von mir durchgeführten Experimente eine repräsentative Aussage ermöglichen würde, könnte die zuverlässige Detektion eines nAChR den Zelltyp der intravital markierten Neurone nicht eindeutig von anderen Zellen abgrenzen, da nikotinische Rezeptoren von einer in großen Zahl von Hirnneuronen in Insekten exprimiert werden. Ein Beleg für die Beteiligung der intravital markierten Neurone am Gesangsverhalten durch den alleinigen Nachweis der Expression von nAChR ist also nicht möglich.

4.5 Optophysiological Messungen zytosolischer Kalziumkonzentrationen

Mit Hilfe optischer Ableitungen an primärkultivierten Hirnneuronen von *Ch. biguttulus* konnte ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration, nach Applikation von Muskarin, nachgewiesen werden. Neurone, die eine Intravitalmarkierung aufwiesen zeigten dabei signifikant häufiger einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkon-

zentration, als unmarkierte Zellen. Insgesamt zeigten 19,4% aller optisch abgeleiteten Zellen (n=273) eine deutliche Reaktion auf einen Muskarinstimulus; 54,2% der markierten Neurone (n=26) und 12% der Unmarkierten (n=27). Die Menge der Zellen, die insgesamt eine Reaktion auf einen Muskarinstimulus zeigten, deckt sich gut mit den Immunzytochemischen Untersuchungen, bei denen durchschnittlich 22% der Zellen eine anti-mAChR Immunmarkierung aufwiesen. Dass alle intravital markierten Zellen in den immunhistochemischen Untersuchungen in Zellkulturen auch eine positive Rezeptorfärbung zeigten ist mit großer Wahrscheinlichkeit in der geringen Anzahl der erfolgreich durchgeführten Doppelmarkierungen begründet (n=3). Die physiologische Reaktion von 54,2% der 26 untersuchten intravital markierten Neurone ist sicherlich aussagekräftiger. Auch die Ergebnisse der Doppelfärbungen an Hirnschnitten belegen, dass vermutlich nicht alle intravital markierten Zellen den vom Antikörper detektierten Rezeptor aufweisen. 45,8% aller intravital markierten Neurone zeigten keinen deutlichen Konzentrationsanstieg ihres zytosolischen Kalziums. Cordova et al. (2003) untersuchten in ihrer Arbeit einen in S2-Zellen (eine nicht-neurale *Drosophila* Zelllinie) stabil exprimierten *DroM1* Rezeptor. Sie beobachteten, dass einige der optisch abgeleiteten Zellen keine Reaktion auf die Stimuli verschiedener muskarinerg Agonisten zeigten. Die Ursache hierfür ist unklar, wird aber von Cordova et al. (2003) auf entleerte Kalziumspeicher der Zellen zurückgeführt, da diese ebenfalls keine Reaktion auf die Applikation von Thapsigargin zeigten. Leider machen Cordova et al. (2003) keine genauen Angaben zur Anzahl der nicht auf Muskarin reagierenden Zellen. Ein Stimulus löst also selbst in einem homogenen System, wie einer etablierten Zelllinie nicht immer zuverlässig eine Reaktion aus. Die Ergebnisse der Doppelfärbungen an Hirnschnitten belegen, dass einige der intravital markierten Neurone keine muskarinischen Rezeptoren exprimieren und daher nicht direkt an der durch Muskarinjektion vermittelten Stimulation des Gesanges beteiligt waren. Vermutlich setzt sich die Gesamtzahl der markierten Neurone, die keine Reaktion auf einen Muskarinstimulus zeigten aus Zellen zusammen, die zwar den mACh-Rezeptor exprimierten, aber aus ungeklärten physiologischen Ursachen kein Kalzium ins Zytosol freisetzen und aus Neuronen, die keine mAChR besitzen und bei der Tracerinjektion fehlmakriert wurden. Ebenfalls könnte das in 4.3.2 diskutierte Argument bezüglich der Spezifität des Antikörpers ein Grund für die nichtreaktivität der Zellen sein, denn wenn Teile der intravital markierten Neurone ihre Erregung über den Adenylatzyklase Second Messenger Signalweg vermitteln, könnte dies Aufgrund der fehlenden Kalziumreaktion nicht experimentell erfasst werden. Wenzel et al. (2002) konnten nachweisen, dass sowohl der Adenylatzyklase Signalweg als auch der Phospholipase C Signalweg die durch Muskarin ausgelöste Erregung vermitteln. Um die Art der Kopplung der beiden Effektormechanismen mit optophysiological Registrierungsmethoden endgültig zu klären, müsste man Produkte des Adenylatzyklase Signalweges direkt oder indirekt nachweisen können.

Als Messgrößen für den Vergleich der Reaktionen kultivierter Neurone auf kalziumfreisetzende Stimuli wurden die maximale Amplitude der relativen zytosolischen Kalziumkonzentration und die Halbwertsbreite der Reaktionsdauer gewählt. Abb. 3.42 zeigt, dass das logarithmische Bestimmtheitsmaß von Amplitude und Reaktionsdauer gering ist. Es besteht also kein direkter und eindeutiger Zusammenhang zwischen der Amplitude und der Dauer eines Signals. Die Funktionelle Charakterisierung des *DroM1* Rezeptors in *Drosophila* S2 Zellen (Millar et al. 1995) zeigte ebenfalls Unterschiede in den Amplituden und der Dauer der Kalziumtransienten, die jedoch nicht systematisch ausgewertet wurden. Cordova et al. (2003) beobachteten in S2-DM1 Zellen drei verschiedene Reaktionen auf die Applikation des muskarinischen Agonisten Carbamylcholine. Manche Zellen reagierten mit einem Kalziumtransienten, der nach wenigen Minuten wieder auf die Ausgangskonzentration absank. Andere Zellen zeigten eine zweiphasige Antwort, bei der der initiale Peak entweder die Steigung änderte oder aber nach bereits wieder absinkender Konzentration einen zweiten Peak ausbildete. Cordova et al. (2003) vermuten, dass dies auf mindestens zwei getrennte Phasen der Kalziumantwort zurückzuführen ist, von denen der beginnende transiente Anstieg mit großer Sicherheit durch das Kalzium interner Speicher getragen wird. Cordova et al. (2003) machen ebenfalls keine Angaben über den zeitlichen Verlauf der stimulierten Kalziumreaktionen. Eine Abgrenzung von zwei Phasen der Kalziumreaktion intravital markierter und unmarkierter Neurone war in den von mir durchgeführten optischen Ableitungen nicht zu erkennen. Generell wiesen mAChR vermittelte Kalziumreaktionen in anderen Arbeiten eine deutlichere Variabilität in ihrer Form auf (Millar et al. 1995, Carrol und Peralta 1998, Cordova et al. 2003). Die referierten Untersuchungen wurden an etablierten Zelllinien durchgeführt, in denen generell einheitlichere Bedingungen zu erwarten sind, als in den dissoziierten Neuronen einer Primärkultur. Unterschiede in der Qualität des physiologischen Zustands der in dieser Arbeit untersuchten Neurone zeigten sich unter anderem darin, dass einige der optisch abgeleiteten Zellen noch nach über einer Stunde eine relativ gleichförmige Reaktion auf Muskarinstimuli zeigten, während bei anderen Zellen bereits nach einigen Minuten keine Reaktion mehr auf einen erneuten Stimulus registriert werden konnte. Kalzium kann in einer Zelle vielfältige Reaktionen hervorrufen. Ein intrazellulärer Kalziumanstieg führt unter anderem zu einer Depolarisation des Membranpotentials (Carrol und Peralta 1998). Es ist durchaus denkbar, dass der durch einen Muskarinstimulus initiierte Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration weitere Reaktionen nach sich zieht, die zusätzlichen Einfluss auf den Kalziumpegel der Zelle haben können. Dies könnte einen linearen, oder logarithmischen Zusammenhang zwischen der registrierten Amplitude und der gemessenen Dauer der Reaktion maskieren.

Carrol und Peralta (1998) untersuchten unter anderem die Dosisabhängigkeit der durch Carbachol aktivierten Kalziumreaktionen an mit m3 mAChR transfizierten Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen). Auch hier zeigten sich, wie bei Cordova et al. (2003) postuliert, zwei Phasen der Kalziumantwort, die keinen linearen Zusammenhang zwischen der applizierten Carbacholkonzentration und der registrierten Signalantwort zeigten. Die größte Amplitude und Signaldauer wurde mit moderaten Carbacholkonzentrationen erreicht. Auch die in 3.4.3 gemessenen Unterschiede bei Stimuli unterschiedlicher Muskarinkonzentrationen zeigten einen konträren Zusammenhang zwischen Amplitude und Signaldauer. Während sich im Vergleich zur Applikation von 10 μM die Amplitude bei einem 1 mM Stimulus verdoppelte, halbierte sich die Halbwertsbreite des Kalziumantwort. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass einige regulatorische Mechanismen erst durch höhere Kalziumkonzentrationen aktiviert werden. Carrol und Peralta (1998) zeigten an CHO-Zellen, dass höhere Konzentrationen des applizierten Carbachol membranständige Ca^{2+} -ATPase aktivieren und dadurch indirekt zu einem Absinken der zytosolischen Kalziumkonzentration beitragen. Die regulatorischen Mechanismen der Kalziumhomöostase sind jedoch nicht vollkommen geklärt (Berridge 1998).

Dass die Kalziumreaktionen am Soma der Neurone gemessen wurden, spiegelt sicherlich einen artifiziellen physiologischen Zustand wider, denn die PLC aktivierenden Typen der mAChR bei Insekten wurden in den Postsynapsen gefunden. Speziell bei muskarinisch induzierten Reaktionen haben Arbeiten an verschiedenen Zelllinien gezeigt, dass die ausgelösten Effektormechanismen von dem exprimierten G-Protein des jeweiligen Zelltyps abhängig sind (Hulme et al. 1990). Wenn man berücksichtigt, dass Untersuchungen an isolierten Somata in Zellkulturen generell einen etwas verzerrten physiologischen Zustand reflektieren, kann in diesem untersuchten System davon ausgegangen werden, dass die gemessenen Reaktionen eher den ursprünglichen physiologischen Zustand der Neurone wiedergeben, als Arbeiten an heterolog exprimierten Rezeptoren in Zelllinien. Aber auch in den primärkultivierten Hirnneuronen könnten die mit der Kulturnahme verbundenen Änderungen des Genexpressionsmusters das Vorhandensein und die Funktionalität von Elementen intrazellulärer Signalkaskaden verändern haben.

4.5.1 Beteiligung regulatorischer Mechanismen am muskarinerg vermittelten Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration

In 3.4.4 wurde der Einfluss verschiedener Mechanismen auf die durch muskarinische Acetylcholinrezeptoren vermittelte Kalziumreaktion untersucht. Die dabei betrachteten regulatorischen Mechanismen und ihr Einfluss auf den Konzentrationsanstieg des zytosolischen Kalziums werden nun folgend diskutiert.

4.5.1.1 Ryanodinrezeptoren

Ryanodinrezeptoren konnten in den Photorezeptorzellen von Bienen und Fliegen nachgewiesen werden (Baumann 2000). Bei *Drosophila* (Xuehong et al. 2000) und bei der Baumwolleule *Heliothis virescens* (Puentea et al. Insect Biochem & Mol Biol) konnte der Ryanodinrezeptor bereits kloniert werden. Untersuchungen von Xuehong et al. (2000) an heterolog in CHO-Zellen exprimierten Rezeptoren zeigten, dass zur Aktivierung des Ryanodinrezeptors zytosolisches Kalzium notwendig ist, der Rezeptor jedoch von hohen zytosolischen Konzentrationen inhibiert wird. Die von E. Lehmberg und Cassida (1994) gezeigte Homologie zwischen dem Ryanodinrezeptor von Vertebraten und Insekten bestätigten vergleichende Studien von Xuehong et al. (2000). Hua (1994) konnte nachweisen, dass Koffein auf die selbe Weise die Sensitivität der Ryanodinrezeptoren erhöht wie das Second Messenger Signalmolekül cADP-Ribose. In Skelettmuskeln von Vertebraten kann Koffein die Ausschüttung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum auslösen (Su und Hasselbach 1983). In einigen Zellen konnte nach der Applikation des Ryanodinrezeptoragonisten Koffein ein leichter Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration beobachtet werden. Diese Zellen zeigten jedoch keine Reaktion auf einen Muskarinstimulus. Die nach einem Koffeinstimulus beobachteten Reaktionen waren nicht nur von kleinerer Amplitude und kürzerer Dauer sondern zeigten auch einen langsameren Anstieg und bildeten kein Plateau aus. Es kann somit als sehr sicher angenommen werden, dass der Ryanodinrezeptor für die zytosolische nach einem Muskarinstimulus keine primäre Rolle spielt.

4.5.1.2 Spannungs- und konzentrationsabhängige Kalziumkanäle

Um den Beitrag von extrazellulärem Kalzium auf die durch Muskarin stimulierte Kalziumantwort zu untersuchen, wurden einige Experimente in kalziumfreier Extrazellulärlösung durchgeführt. Eine durch Muskarin induzierte Kalziumreaktion konnte auch in kalziumfreier Extrazellulärlösung ausgelöst werden. Der Beitrag

extrazellulären Kalziums ist für einen zytosolischen Anstieg der Kalziumkonzentration nach einem Muskarinstimulus also nicht grundlegend notwendig. Es konnten auch keine signifikanten Unterschiede der Signaldauer und der maximalen Kalziumkonzentration zwischen den an verschiedenen Zellen durchgeführten Messungen in normaler und kalziumfreier Extrazellulärlösung festgestellt werden. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den von Carrol und Peralta (1998) und Cordova et al. (2003) an heterolog exprimierten mACh-Rezeptortypen in CHO- bzw S2-Zellen gewonnenen Erkenntnissen. Hier zeigten die Messungen in kalziumfreiem Ringer eine Reduktion in der Amplitude und der Dauer des Signals. Die in dieser Arbeit gemessenen Kalziumantworten konnten nicht in zwei unterschiedlich Phasen unterteilt werden. Somit könnte die hier untersuchte Kalziumreaktion auf einem anderen Mechanismus beruhen als der Carrol und Peralta (1998) und Cordova et al. (2003) beschriebene. Ein Einfluss des extrazellulären Kalzium auf die muskarinerg stimulierte Reaktion kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da ein Vergleich einer muskarinerg induzierten Reaktion einer selben Zelle in normalem und kalziumfreiem Ringer nicht erbracht werden konnte. Sollte die extrazelluläre Kalziumkonzentration die Reaktion auf einen Muskarinstimulus, beispielsweise durch die Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle beeinflussen, so wäre dieser Effekt jedoch lediglich additiv und keine notwendige Bedingung für eine Reaktion, die zunächst durch Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern erfolgt.

4.5.1.3 IP₃-Rezeptoren und Phospholipase C

Um einen Einfluss des Phospholipase C Second-Messenger-Signalwegs auf die gemessenen Kalziumreaktionen zu untersuchen, wurden Blocker eingesetzt, die entweder an der PLC direkt oder aber am IP₃-Rezeptor ansetzten. Diese Blockexperimente führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Das Einwaschen des IP₃ Agonisten 2-APB führte zu einem stärkeren Anstieg der durch Muskarin stimulierten zytosolischen Kalziumreaktion als vor der Zugabe des Pharmakons. Zusätzlich war die Kalziumhomöostase gestört, was sich durch eine Oszillation der Ausgangskonzentration des Kalziums bemerkbar machte. Die Ursache für eine Störung der Kalziumhomöostase könnte in einer Kreuzreaktion des 2-APB begründet liegen, denn (Peppiatt et al. 2003) konnten eine inhibitorische Wirkung auf Kalziumpumpen und Kalziumkanäle nachweisen. Cordova et al. (2003) konnten jedoch bei einem heterolog in S2-Zellen exprimierten *DroM1* Rezeptor durch Einwaschen von 2-APB in dreißigfach höherer Konzentration als die in dieser Arbeit verwendete die Reaktion auf einen Carbamylcholinstimulus größtenteils inhibieren. Das von Bae et al. (2003) zur Aktivierung der PLC in humanen Zelllinien verwendete m-3M3FBS löste leider keine eindeutigen Reaktionen in den primärkultivierten Neuronen von *Ch. biguttulus* aus. Durch das Einwaschen der PLC-Blocker Neomycin und U-73122 konnte in Hirnzellen von

Ch. biguttulus die Kalziumreaktion auf einen Muskarinstimulus vollständig geblockt werden. Die Zellen schienen jedoch durch das Einwirken der PLC-hemmenden Pharmaka geschädigt worden zu sein, denn nach dem Auswaschen der Pharmaka zeigten die untersuchten Zellen nur noch eine verminderte Reaktivität auf einen erneuten Muskarinstimulus. Wenzel et al. (2002) konnten eine Beteiligung der PLC durch Blockexperimente mit Neomycin und U-73122 an dem gesangsauslösenden Verhalten in Feldheuschrecken nachweisen. Die Wirkung der Blocker ließ jedoch etwa 10 min nach Applikation nach und erneute Muskarinpulse lösten wieder Gesangsverhalten mit gleicher Dauer wie vor der Injektion des Hemmstoffs aus. Die isolierten Somata in den Primärkulturen konnten sich nach der Einwirkung sowohl von Neomycin als auch von U-73122 nicht wieder erholen. Dies könnte darin begründet liegen, dass bei Injektionen in das Protocerebrum bei Wenzel et al. (2002) lediglich die Neuriten des Neuropils dem kurzzeitig in erhöhter Konzentration einwirkenden Hemmstoff ausgesetzt waren, während in den Untersuchungen an Primärkulturen das gesamte Neuron länger von der erhöhten Konzentration der Hemmstoffe erfasst wurde. Da eine Beteiligung der PLC an einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration nach bisherigen Erkenntnissen nur über die Aktivierung der IP_3 -Rezeptoren begründet werden kann und das Blocken der PLC mit zwei unterschiedlich wirkenden Pharmaka die Kalziumreaktion unterbinden konnte, lassen diese Experimente an der Aussagekraft des IP_3 -Rezeptor Blockexperimentes zweifeln. Eine Beteiligung der PLC an der durch Muskarin induzierten Kalziumantwort ist sehr wahrscheinlich. Ebenso, dass die durch Muskarin vermittelte Erregung im intakten Tier über einen durch IP_3 -Rezeptoren vermittelten Kalziumanstieg erfolgt. Wenzel et al. (2002) hatten in ihrer Arbeit die Beteiligung des PLC Signalweges an dem muskarin induzierten Gesangsverhalten nachgewiesen, konnten jedoch nicht ermitteln welcher der beiden möglichen Singnalkaskaden die Erregung letztendlich vermittelt, weil Blockexperimente des DAG- und IP_3 -Signalweges keine einheitlichen Ergebnisse brachten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die bei Wenzel et al. (2002) offen gebliebene Frage bezüglich des erregungsvermittelnden Zweiges des PLC-Signalweges weiter geklärt werden. Zwar ist anhand der gewonnenen Erkenntnisse eine Beteiligung der DAG-Signalweges nicht ausgeschlossen, der IP_3 Signalweg führt jedoch zu einer messbaren Kalziumreaktion bei isolierten intravital markierten Neuronen.

4.6 Resumee

In den Primärkulturen von *Chorthippus biguttulus* konnten durchschnittlich 3 intravital markierte Neurone wiedergefunden werden. Groben Hochrechnungen zur Folge müssten ca. 24 Neurone den dextrangekoppelten Farbstoff bei der Applikation des Tracers in die Region, in der zuvor zuverlässig Gesang ausgelöst werden konnte, aufgenommen haben. 54% der intravital markierten Neurone reagierten auf die Applikation von Muskarin mit einem Anstieg ihres zytosolischen Kalziums und waren somit mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt an dem zuvor durch Muskarin ausgelösten Gesangsverhalten beteiligt. Insgesamt bietet die Coapplikation eines dextrangekoppelten Tracers also eine gute Methode um relativ selektiv Neurone des Protocerebrums, die an einem pharmakologisch ausgelösten Verhalten beteiligt sind, zu markieren. Mit anderen Markierungsmethoden, wie beispielsweise der elektrophoretischen Applikation von Luzifer Yellow würden sicherlich weniger Neurone gefärbt. Es wäre jedoch nicht mehr die selektive Aufnahme des Farbstoffes über postsynaptische Strukturen gewährleistet und damit keine Korrelation mit einer pharmakologischen Wirkung auf die angefärbten Neurone herzustellen. Doch auch mit der hier vorgestellten Methode lassen sich viele Fragen bezüglich der Erregungsvermittlung der muskarinischen Rezeptoren untersuchen. Mit entsprechend sensitiven Farbstoffen kann auch in gleicher Weise die Beteiligung anderer Transmittersysteme an der Gesangskontrolle, wie beispielsweise Dopamin oder Proktolin auf zellulärer Ebene aufgeklärt werden. Auch bei der Untersuchung anderer Systeme könnte die dextrangekoppelte Tracerapplikation eine erfolgreiche Selektierung und damit detailliertere Untersuchungen beteiligter Neurone ermöglichen, sofern die Lage der synaptischen Eingangsstrukturen der Neurone des zu untersuchenden Systems bekannt ist und als Zielgebiet für die Tracerinjektion genutzt werden kann.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die pharmakologische Gesangsauslösung durch Muskarininjektionen in das Protocerebrum von *Ch. biguttulus* mit der Coapplikation eines neuronalen Tracers kombiniert, um potentiell an der Gesangkontrolle beteiligte Neurone einer selektiven Charakterisierung in Primärzellkulturen zugänglich zu machen. Immunzytochemische Kontrollen sowohl *in situ* an Hirnschnitten als auch an primärkultivierten Neuronen in Zellkulturen sollten die Selektivität dieser Färbemethode stützen. Histologische Untersuchungen an Hirnschnitten dienen der Lokalisation intravital markierter Neurone und ihrer Einordnung in identifizierte Neuronenklassen des Protocerebrums. Die intravital markierten Neurone wurden in Zellkulturen durch Anwendung elektro- und optophysiologischer Methoden weitergehend charakterisiert.

- Histologische Untersuchungen an Hirnschnitten ergaben, dass durch die Coinjektion eines dextranekoppelten Tracers in die Hirnregion, in der zuvor durch Muskarin Gesangsverhalten ausgelöst werden konnte, fast ausschließlich kolumnäre Zentralkomplexneurone gefärbt wurden. Anti-mAChR Immunmarkierungen an Hirnschnitten färbten ebenfalls nur kolumnäre Neurone im Zentralkomplex an. Es gelang der Nachweis colokalistierter Dextranfärbung und anti-mACh Rezeptor Immunmarkierung in kolumnären Neuronen des Zentralkomplexes.
- Durchschnittlich sind 40 % primärkultivierter Hirneurone von *Ch. biguttulus* nach dem Prozedere der Kulturnahme in einem vitalen Zustand. Es gab keine eindeutigen Hinweise für die Präsenz von Gliazellen in den Primärzellkulturen.
- Anti-mAChR Immunmarkierungen wurden erfolgreich an Primärzellkulturen durchgeführt. Durchschnittlich zeigten 22 % der primärkultivierten Neurone eine positive Immunreaktion. Dextranmarkierte Neurone konnten in Primärzellkulturen detektiert und eine Colokalisation mit der anti-mAChR Immunmarkierung nachgewiesen werden.

- Neurone, die den intravital injizierten dextrangekoppelten Farbstoff aufnehmen, konnten aufgrund von Unterschieden in der Strom/Spannungsrelation ihrer Auswärtsströme in zwei Typen klassifiziert werden. Bei Neuronen des Typ A konnte ein im Vergleich signifikant höherer Gesamtauswärtsstrom, basierend auf drei verschiedenen Kaliumkanaltypen (K_{dr} , K_A und K_{Ca}), nachgewiesen werden. Die Neuronen des Typ B zeigten eine signifikant höhere K_A Komponente in ihrem Auswärtsstrom, jedoch keinen K_{Ca} getragenen Strom.
- Auf die Applikation von Muskarin reagierten 19,4% der primärkultivierten Neurone mit einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. Der Anteil intravital markierter Neurone, die auf einen Muskarinstimulus mit einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration reagierten, lag mit 54,2% signifikant höher. Jede zweite markierte Zelle, die in der Zellkultur auf die Applikation von Muskarin reagierte, wurde wahrscheinlich auch direkt bei der Gesangsauslösung durch Muskarin stimuliert.
- Für einen Konzentrationsanstieg des zytosolischen Kalziums in intravital markierten Neuronen nach einem Muskarinstimulus wird Kalzium aus intrazellulären Speichern benötigt. Die Beteiligung des Ryanodinrezeptors am Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration konnte ausgeschlossen werden. Die Aktivität der Phospholipase C ist essentiell für die Kalziumreaktion nach einem Muskarinstimulus und lässt auf eine über IP_3 vermittelte Erregung des *in vivo* durch Muskarin ausgelösten Gesangsverhaltens schließen.

Die Methode der Coapplikation dextrangekoppelter Tracer in die Hirnregion, in der zuvor durch Muskarin Gesang ausgelöst werden konnte, eignet sich, um die an der Gesangsauslösung beteiligten Neurone für eine weiterführende physiologische Charakterisierung vorzuselektieren. Die Kalziumreaktion der intravital markierten Neurone nach einem Muskarinstimulus bietet auf der Ebene der Zellkultur eine zusätzliche Kontrollmöglichkeit, um die Assoziation der *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse mit dem Gesangsverhalten zu gewährleisten, um die *in vivo* gewonnenen Einblicke zu ergänzen.

Literaturverzeichnis

- Abdallah, E.A., Eldefrawi, M.E. und Eldefrawi, A.T.: Pharmacologic characterization of muscarinic receptors of insect brains. In: *Arch Insect Biochem Physiol*, Band 17:S. 107–118, 1991.
- Albert, J.L. und Lingle, C.J.: Activation of nicotinic acetylcholine receptors on cultured *Drosophila* and other insect neurones. In: *J Physiol*, Band 463:S. 605–630, 1993.
- Aydar, E. und Beadle, D.J.: The pharmacological profile of GABA receptors on cultured insect neurones. In: *J Insect Physiol*, Band 45:S. 213–219, 1998.
- Bae, Y.S., Lee, T.G., J.C.Park, Hur, J.H., Kim, Y., Heo, K., Kwak, J.Y., Suh, P.G. und Ryu, S.H.: Identification of a compound that directly stimulates phospholipase c activity. In: *Mol Pharmacol*, Band 63:S. 1043–1050, 2003.
- Barbara, G.S., Zube, C., Rybak, J., Gauthier, M. und Grünewald, B.: Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. In: *J Comp Physiol A*, Band 191:S. 823–836, 2005.
- Baumann, O.: Distribution of ryanodine receptor Ca^{2+} channels in insect photoreceptor cells. In: *J Comp Neurol*, Band 421:S. 347–336, 2000.
- Beadle, D.J.: Insect neuronal cultures: an experimental vehicle for studies of physiology, pharmacology and cell interactions. In: *Invert Neurosci*, Band 6(3):S. 95–103, 2006.
- Beadle, D.J., Horseman, G., Pichon, Y., Amar, M. und Shimahara, T.: Acetylcholine-activated ion channels in embryonic cockroach neurons growing in culture. In: *J Exp Biol*, Band 142:S. 337–355, 1989.
- Benkenstein, C., Schmidt, M. und Gewecke, M.: Voltage-activated whole-cell K^+ currents in lamina cells of the desert locust *Schistocerca gregaria*. In: *J Exp Biol*, Band 202:S. 1939–1951, 1999.
- Benson, J.A.: Electrophysiological pharmacology of the nicotinic and muscarinic cholinergic responses of isolated neuronal somata from locust thoracic ganglia. In: *J Exp Biol*, Band 170:S. 203–233, 1992.

- Berridge, J.M.: Neuronal calcium signaling. In: *Neuron*, Band 21:S. 13–26, 1998.
- Bilmen, J.G. und Michelangeli, F.: Inhibition of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by 2-aminoethoxydiphenylborate. In: *Cellular Signalling*, Band 14:S. 955–960, 2002.
- Blake, A.D., Anthony, N.M., Chen, H.H., Harrison, J.B., Nathanson, N.M. und Sattelle, D.B.: *Drosophila* nervous system muscarinic acetylcholine receptor: Transient functional expression and localization by immunocytochemistry. In: *Mol Pharmacol*, Band 44:S. 716–724, 1993.
- Bolte, S. und Cordelières, F.P.: A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. In: *Journal of Microscopy*, Band 224:S. 213–232, 2006.
- Breer, H., Kleene, F. und Hinz, G.: Molecular forms and subunit structure of the acetylcholine receptor in the central nervous system of insects. In: *J Neurosci*, Band 5(12):S. 3386–3392, 1981.
- Burrows, M.: The neurobiology of an insect brain. In: *Oxford University Press, Oxford New York Tokio ISBN-10 0198523440*, 1996.
- Byerly, L. und Leung, H.: Ionic currents of *Drosophila* neurons in embryonic cultures. In: *J Neurosci*, Band 8(11):S. 4379–4393, 1988.
- Campbell, G., Göring, H., Lin, T., Spana, E., Andersson, S., Doe, C.Q. und Tomlinson, A.: Rk2, a glial-specific homeodomain protein required for embryonic nerve cord condensation and viability in *Drosophila*. In: *Development*, Band 120:S. 2957–2966, 1994.
- Carrol, R.C. und Peralta, E.G.: The m3 muscarinic acetylcholine receptor differentially regulates calcium influx and release through modulation of monovalent cation channels. In: *EMBO J*, Band 11:S. 3036–3044, 1998.
- Cayre, M., Buckingham, S.D., Strambi, A., Strambi, C. und Sattelle, D.B.: Adult insect mushroom body neurons in primary culture: cell morphology and characterization of potassium channels. In: *Cell Tissue Res*, Band 291:S. 537–547, 1998.
- Cayre, M., Buckingham, S.D., Yagodin, S. und Sattelle, D.B.: Cultured insect mushroom body neurons express functional receptors for acetylcholine, GABA, glutamate, octopamine, and dopamine. In: *J Neurophysiol*, Band 81:S. 1–14, 1999.
- Chen, J.S. und Levi-Montalcini, R.: Long term cultures of dissociated nerve cells from the embryonic nervous system of the cockroach, *Periplaneta americana*. In: *Arch Ital Biol*, Band 108:S. 503–537, 1970.

- Cordova, D., Delpech, V.R., Sattelle, D.B. und Rauh, J.J.: Spatiotemporal calcium signaling in a drosophila melanogaster cell line stably expressing a drosophila muscarinic acetylcholine receptor. In: *Invert Neurosci*, Band 5:S. 19–28, 2003.
- Devaud, J.M., Quenet, B., Gascuel, J. und Masson, C.: A morphometric classification of pupal honeybee antennal lobe neurones in culture. In: *Neuroreport*, Band 21:S. 545–556, 1995.
- Echalier, G. und Ohanessian, A.: In vitrol culture of *Drosophila melanogaster* embryonic cells. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, Band 6(3):S. 162–172, 1970.
- Edenfeld, G., Stork, T. und Klambt, C.: Neuron-glia interaction in the insect nervous system. In: *Curr Opin Neurobiol*, Band 15(1):S. 34–39, 2005.
- E.Lehmberg und Cassida, J.E.: Similarity of insect and mammalian ryanodine binding sites. In: *Pestic Biochem Physiol*, Band 48:S. 145–152, 1994.
- Elsner, N.: Neuroethology of sound production in gomphocerine grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) I. song patterns and stridulatory movements. In: *J Comp Physiol A*, Band 88:S. 67–102, 1974.
- Enyedi, P., Fredholm, B.B., Lundberg, J.M. und Anggard, A.: Carbachol potentiates the cyclic amp-stimulating effect of vip in cat submandibular gland. In: *Eur J Pharmacol*, Band 79:S. 139–143, 1982.
- Faber, A.: Laut- und Gebärdensprache bei Insekten: Othoptera (Geradflügler). In: *Mittl Mus Naturk Stuttgart*, 1953.
- Felder, C.C., Kanterman, R.Y., Ma, A.L. und Axelrod, J.: A transfected ml muscarinic acetylcholine receptor stimulates adenylate cyclase via phosphatidylinositol hydrolysis. In: *J Biol Chem*, Band 264(34):S. 20356–20362, 1995.
- Fritsch: Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. In: *J Neurosci Methods*, Band 50:S. 95–103, 1993.
- Fritsch, B. und Wilms, C.: Dextran amines in neuronal tracing. In: *Trends Neurosci*, Band 12(9):S. 333–5,340–1, 1990.
- Gascuel, J., Masson, C. und Beadle, D.J.: The morphology and ultrastructure of antennal lobe cells from pupal honeybees (*Apis mellifera*) growing in culture. In: *Tissue Cell*, Band 23:S. 547–559, 1991.
- Gascuel, J., Masson, C., Bermudez, I. und Beadle, D.J.: Morphological analysis of honeybee antennal cells growing in primary cultures. In: *Tissue Cell*, Band 26:S. 551–558, 1994.

- Giles, D.P., Joy, R.T. und Usherwood, P.N.: Growth of isolated locust neurones in culture. In: *J Physiol*, Band 276:S. 74P, 1978.
- Giles, D.P. und Usherwood, P.N.: Locust nymphal neurones in culture: A new technique for studying the physiology and pharmacology of insect central neurons. In: *Comp Biochem Physiol C*, Band 80(1):S. 53–59, 1985.
- Glover, J.C., Petursdottir, G. und Jansen, J.K.: Fluorescent dextran-amines used as axonal tracers in the nervous system of the chicken embryo. In: *J Neurosci Methods*, Band 18(3):S. 243–254, 1986.
- Grace, T.D.C. und Brozostowski, H.W.: Analysis of the amino acids and sugars in an insect cell culture medium during cell growth. In: *Journal of Insect Physiology*, Band 12:S. 625–633, 1966.
- Gramoll, S. und Elsner, N.: Activity of metathoracic interneurons during stridulation in the acridid grasshopper *Omocestus viridulus*. In: *J Comp Physiol*, Band 263:S. 593–606, 1987.
- Grünewald, B.: Differential expression of voltage-sensitive K⁺ and Ca²⁺ currents in neurons of the honeybee olfactory pathway. In: *J Exp Biol*, Band 206:S. 117–129, 2002.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R.Y.: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. In: *J Biol Chem*, Band 260(6):S. 3440–3450, 1985.
- Gymer, A. und Edwards, J.S.: The development of the insect nervous system. I. an analysis of postembryonic growth in the terminal ganglion of *Acheta domesticus*. In: *J Morphol*, Band 123:S. 191–198, 1967.
- Halter, D.A., Urban2, J., Rickert, C., Ner, S.S., Ito, K., Travers, A.A. und Technau, G.M.: The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. In: *Development*, Band 121(2):S. 317–32, 1995.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, B., Sakmann und Sigworth, F.J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. In: *Pflügers Arch*, Band 391:S. 85–100, 1981.
- Hanesch, U., Fischbach, K.F. und Heisenberg, M.: Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. In: *Cell Tissue Res*, Band 257:S. 343–366, 1989.

- Hannan, F. und Hall, L.M.: Muscarinic acetylcholine receptors in invertebrates: Comparisons with homologous receptors from vertebrates. In: *In: Y Pichon (Ed.), Comparative Molecular Neurobiology. Birkhäuser, Basel*, S. 98–145, 1993.
- Hayashi, J.H. und Hildebrandt, J.G.: Insect olfactory neurons in vitro: Morphological and physiological characterization of cells from the developing antennal lobes of *Manduca sexta*. In: *J Neurosci*, Band 10(3):S. 848–859, 1990.
- Hedwig, B.: On the control of stridulation in the acridid grasshopper *Omocestus viridulus* L. I. Interneurons involved in rhythm generation and bilateral coordination. In: *J Comp Physiol A*, Band 171:S. 117–128, 1992a.
- Hedwig, B.: On the control of stridulation in the acridid grasshopper *Omocestus viridulus* L. II. Shaping of hindleg movements by spiking and non-spiking interneurons. In: *J Comp Physiol A*, Band 171:S. 129–140, 1992b.
- Hedwig, B.: A cephalo-thoracic command system controls stridulation in the acridid grasshopper *Omocestus viridulus*, L. In: *J Neurophysiol*, Band 72:S. 2015–2025, 1994.
- Hedwig, B.: Control of grasshopper stridulation by descending brain neurons. In: *Dtsch Zool Ges*, Band 88(2):S. 181–190, 1995.
- Hedwig, B. und Heinrich, R.: Identified descending brain neurons control different motor patterns in an acridid grasshopper. In: *J Comp Physiol A*, Band 180:S. 285–294, 1997.
- Heidel, E. und Pflüger, H.J.: Ion currents and spiking properties of identified subtypes of locust octopaminergic dorsal unpaired median neurons. In: *Eur J Neurosci*, Band 23:S. 1189–1206, 2006.
- Heiligenberg, W.: The neural basis of behavior: A neuroethological view. In: *Annu Rev Neurosci*, Band 14:S. 247–267, 1991.
- Heinrich, R. und Elsner, N.: Central nervous control of hindleg coordination in stridulating grasshoppers. In: *J Comp Physiol A*, Band 180:S. 257–269, 1997.
- Heinrich, R., Hedwig, B. und Elsner, N.: Cholinergic activation of stridulatory behaviour in grasshopper *Omocestus viridulus* L. In: *J Exp Biol*, Band 200:S. 1327–1337, 1997.
- Heinrich, R., Jacobs, K. und Lakes-Harlan, R.: Tracing of a neuronal network in the locust by pressure injection of markers into a synaptic neuropil. In: *J Neurosci Methods*, Band 80:S. 81–89, 1998.

- Heinrich, R., Wenzel, B. und Elsner, N.: Pharmacological brain stimulation releases elaborate stridulatory behaviour in gomphocerine grasshoppers – conclusions for the organization of the central nervous system. In: *J Comp Physiol A*, Band 187:S. 155–169, 2001.
- Heyer, C.B. und Lux, H.D.: Control of the delayed outward potassium currents in bursting pace-maker neurones of the snail, *Helix pomatia*. In: *J Physiol*, Band 262:S. 349–382, 1976.
- Hoffmann, K., Wirmer, A., Kunst, M. und Heinrich, R.: Muscarinic excitation in grasshopper song control circuits is limited by acetylcholinesterase activity. In: *Zool Sci*, Band in press, 2007.
- Homberg, U.: Neuroarchitecture of the central complex in the brain of the locust *Schistocerca gregaria* and *S. americana* as revealed by serotonin immunocytochemistry. In: *J Comp Neurol*, Band 303:S. 245–254, 1991.
- Homberg, U.: Neurotransmitters and neuropeptides in the brain of the locust. In: *Microsc Res Tech*, Band 56:S. 189–209, 2002.
- Homberg, U., Vitzthum, H., Müller, M. und Binkle, U.: Immunocytochemistry of gaba in the central complex of the locust *Schistocerca gregaria*: Identification of immunoreactive neurons and colocalization with neuropeptides. In: *J Comp Biol*, Band 409:S. 495–507, 1999.
- Hoyle, G.: Glia cell of insect ganglion. In: *J Com Neurol*, Band 246:S. 85–103, 1986.
- Hua, S.Y.: Cyclic adp-ribose modulates Ca^{2+} release channels for activation by physiological Ca^{2+} entry in bullfrog sympathetic neurons. In: *Neuron*, Band 12:S. 1073–1079, 1994.
- Huber, F.: The role of the central nervous system in orthoptera during the coordination and control of stridulation. In: *In: RG Busnel (Ed.), Acoustic behaviour of animals. Elsevier, Amsterdam, London, New York*, S. 440–480, 1964.
- Hulme, E.C., Birdsall, N.J.M. und Buckley, N.J.: Muscanic receptor subtypes. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, Band 30:S. 633–73, 1990.
- Ilius, M., Wolf, R. und Heisenberg, M.: The central complex of *Drosophila melanogaster* is involved in flight control: studies on mutants and mosaics of the gene ellipsoid body open. In: *J Neurogenet*, Band 9(3):S. 189–206, 1994.
- Jacobs, W.: Verhaltensbiologischen Studien an Feldheuschrecken. In: *Beiheft I zur Z Tierpsychol*, Band 10:S. 1–228, 1953.

- Jan, L.Y. und Jan, Y.N.: Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. In: *Proc Natl Acad Sci*, Band 79:S. 2700–2704, 1982.
- Kandel, E.R., Klein, M., Castellucci, V.F., Schacher, S. und Goelet, P.: Some principles emerging from the studies of short- and long-term memory. In: *Neurosci Res*, Band 3:S. 498–520, 1986.
- Köbbert, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J.L., Mey, J. und Thanos, S.: Current concepts in neuroanatomical tracing. In: *Neurobiology*, Band 62:S. 327–351, 2000.
- Kirchhof, B. und Bicker, G.: Growth properties of larval and adult locust neurons in primary cell culture. In: *J Comp Neurol*, Band 21:S. 545–556, 1992.
- Kreissl, S. und Bicker, G.: Dissociated neurons of the pupal honeybee brain in cell culture. In: *Journal of Neurocytology*, Band 21:S. 545–556, 1992.
- Lakes-Harlan, R., Jacobs, K. und Heinrich, R.: Identification of auditory interneurons in situ and in vitro by tracer injection into an afferent neuropil of *Locusta migratoria*. In: *Naturwissenschaften*, Band 85:S. 240–243, 1998.
- Laurent, G.: Evidence for voltage-activated outward currents in the neuropilar membrane of locust nonspiking local interneurons. In: *J Neurosci*, Band 11(6):S. 1713–1726, 1991.
- Lees, G., Beadle, D.J., Botham, R.P. und Kelly, J.S.: Excitable properties of insect neurones in culture: A developmental study. In: *J Insect Physiol*, Band 31:S. 135–143, 1985.
- Leibovitz, A.: Preparation of medium L-15. In: *Methods in Cell Science*, Band 3(2):S. 557–559, 1977.
- Loesel, R., Weigel, S. und Bräunig, P.: A simple fluorescent double staining method for distinguishing neuronal and glial cells in the insect central nervous system in situ and in culture. In: *J Neurosci Methods*, Band 155(2):S. 202–206, 2006.
- Martone, M. E., Alba, S.A., Edelman, V.M., Airey, J.A. und Ellisman, M.H.: Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in rat neostriatum. In: *Brain Res*, Band 756:S. 9–21, 1997.
- Martone, M.E., Zhang, Y., Simpliciano, V.M., Carragger, B.O. und Ellisman, M.H.: Three-dimensional visualization of the smooth endoplasmic reticulum in purkinje cell dendrites. In: *J Neurosci*, Band 13:S. 4636–4646, 1993.

- Mercer, A.G., Hayashi, J.H. und Hildebrand, J.G.: Modulatory effects of 5-hydroxytryptamine on voltage-activated currents in cultured antennal lobe neurons of the sphinx moth *Manduca sexta*. In: *J Exp Biol*, Band 198:S. 613–627, 1995.
- Millar, N.S., Baylis, H.A., Reaper, C., Bunting, R., Mason, W.T. und Sattelle, D.B.: Functional expression of a cloned *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor in a *Drosophila* stable cell line. In: *J Exp Biol*, Band 198:S. 1843–1850, 1995.
- Müller, M., Homberg, U. und Kühn, A.: Neuroarchitecture of the lower division of the central body in the brain of the locust (*Schistocerca gregaria*). In: *Cell Tissue Res*, Band 288:S. 159–176, 1997.
- Nathanson, N.M.: Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. In: *Ann rev Neurosci*, Band 10:S. 195–236, 1989.
- Ocker, W.G. und Hedwig, B.: Interneurons involved in stridulatory pattern generation in the grasshopper *Chorthippus mollis* (charp.). In: *J Exp Biol*, Band 199:S. 653–662, 1996.
- Olianas, M.C. und Onali, P.: Properties of muscarinic-stimulated adenylate cyclase activity in rat olfactory bulb. In: *J Neurochem*, Band 58(5):S. 1723–1729, 1992.
- Onai, T., FitzGerald, M.G., Arakawa, S., Gocayne, J.D., Urquhart, D.A., Hall, L. M., Fraser, C. M., McCombie, W. R. und Venter, J. C.: Cloning, sequence analysis and chromosome localization of a *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor. In: *FEBS Lett*, Band 225:S. 219–225, 1989.
- Pelz, C., Jander, J., Rosenboom, H., Hammer, M. und Menzel, R.: I_a in kenyon cells of the mushroom body of honeybees resembles shaker currents: Kinetics, modulation by K^+ , and simulation. In: *J Neurophysiol*, Band 81:S. 1749–1759, 1999.
- Peppiatt, C.M., Collins, T.J., Mackenzie, L., Conway, S.J., Holmes, A.B., Bootman, M.D., Berridge, M.J., Seo, J.T. und Roderick, H.L.: 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. In: *Cell Calcium*, Band 34(1):S. 97–108, 2003.
- Pfahlert, C.: Entwicklung eines *in vitro* Systems für verschiedene Neuronenklassen von *Locusta migratoria* und Untersuchungen zur Wirkung neurotropher Faktoren. In: *Dissertation*, 1996.

- Pfahlert, C. und Lakes-Harlan, R.: Responses of insect neurones to neurotrophic factors in vitro. In: *Naturwissenschaften*, Band 84:S. 163–165, 1997.
- Puentea, E., Suner, M., Evans, A.D., McCaffery, A.R. und Windass, J.D.: Identification of a polymorphic ryanodine receptor gene from *Heliothis virescens* (lepidoptera: Noctuidae). In: *2000*, Band 30(4):S. 335–347, Insect Biochem & Mol Biol.
- Reichmuth, C., Becker, S., Benz, M., Debel, K., Reisch, D., Heimbeck, G., Hofbauer, A., Klagges, B., Pflugfelder, G.O. und Buchner, E.: The sap47 gene of *Drosophila melanogaster* codes for a novel conserved neuronal protein associated with synaptic terminals. In: *Mol Brain Res*, Band 32:S. 45–54, 1995.
- Reischig, T., Petri, B. und Stengl, M.: Pigment-dispersing hormone (PDH)-immunoreactive neurons form a direct coupling pathway between the bilaterally symmetric circadian pacemakers of the cockroach *Leucophaea maderae*. In: *Cell Tissue Res*, Band 318:S. 553–564, 2004.
- Reischig, T. und Stengl, M.: Optic lobe commissures in a three-dimensional brain model of the cockroach *Leucophaea maderae*: A search for the circadian coupling pathways. In: *J Comp Neurol*, Band 443:S. 388–400, 2002.
- Ronacher, B.: Stridulation of acridid grasshoppers after hemisection of thoracic ganglia: evidence for hemiganglionic oscillators. In: *J Comp Physiol A*, Band 164:S. 723–736, 1989.
- Ronacher, B.: Contribution of abdominal commissures in the bilateral coordination of the hindlegs during stridulation in the grasshopper *Chorthippus dorsatus*. In: *J Comp Physiol A*, Band 169:S. 191–200, 1991.
- Sachs, L.: Angewandte Statistik. In: *11. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York ISBN-10 34540405550*, 2004.
- Schäfer, S., Rosenboom, H. und Menzel, R.: Ionic currents of kenyon cells from the mushroom body of the honeybee. In: *J Neurosci*, Band 14(8):S. 4600–4612, 1994.
- Schäffer, S. und Lakes-Harlan, R.: Embryonic development of the central projection of auditory afferents (*Schistocerca gregaria*, orthoptera, insecta). In: *J Neurobiol*, Band 46(2):S. 97–112, 2000.
- Schröter, U. und Malun, D.: Formation of antennal lobe and mushroom body neuropils during metamorphosis in the honeybee, *apis mellifera*. In: *J Comp Neurol*, Band 422:S. 229–245, 2000.

- Seymour-Laurent, K.J. und Barish, M.E.: Inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptor distributions and patterns of acetylcholine-induced and caffeine-induced calcium release in cultured mouse hippocampal neurons. In: *J Neurosci*, Band 15:S. 2592–2608, 1995.
- Shapiro, R.A., Wakimoto, B.T., Subers, E.M. und Nathanson, N.M.: Characterization and functional expression in mammalian cells of genomic and cDNA clones encoding a *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor. In: *Proc Natl Acad Sci*, Band 86:S. 9039–9043, 1989.
- Singh, S. und Wu, C.F.: Complete separation of four potassium currents in drosophila. In: *Neuron*, Band 2:S. 119–127, 1989.
- Snow, P.M., Patel, N.H., Harrelson, A.L. und Goodman, C.S.: Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in *Drosophila* and grasshopper embryos. In: *J Neurosci*, Band 7(12):S. 4137–4144, 1987.
- Strauss, R. und Heisenberg, M.: A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. In: *J Neurosci*, Band 13:S. 1852–1861, 1993.
- Straussfeld: Atlas of an insect brain. In: *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York ISBN-10 3540073434*, 1976.
- Su, J.Y. und Hasselbach, Wilhelm: Caffeine-induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. In: *Pflügers Arch*, Band 400(1):S. 14–21, 1983.
- Tareilus, E., Hanke, W. und Breer, H.: Neuronal acetylcholine receptor channels from insects: a comparative electrophysiological study. In: *J Comp Physiol A*, Band 167:S. 521–526, 1990.
- Tsien, R.Y.: Fluorescent probes of cell signaling. In: *Ann Rev Neurosci*, Band 12:S. 227–53, 1989.
- Vitzthum, H. und Homberg, U.: Immunocytochemical demonstration of locustatachykinin-related peptides in the central complex of the locust brain. In: *J Comp Neurol*, Band 390:S. 455–469, 1998.
- Vitzthum, H., Müller, M. und Homberg, U.: Neurons of the central complex of the *Locust Schistocerca gregaria* are sensitive to polarized light. In: *J Neurosci*, Band 22(3):S. 1114–1125, 2002.
- Wegener, J.W., Tareilus, E. und Breer, H.: Characterization of calcium-dependent potassium channels in antennal receptor neurons of *Locusta migratoria*. In: *J Insect Physiol*, Band 38(4):S. 237–248, 1992.

- Wenzel, B., Elsner, N. und Heinrich, R.: mAChRs in the grasshopper brain mediate excitation by activation of the ac/pka and the plc second-messenger pathways. In: *J Neurophysiol*, Band 87:S. 876–888, 2002.
- Wigglesworth, V.B.: The nutrition of the central nervous system in the cockroach *Periplaneta americana*. In: *J exp Biol*, Band 37:S. 500–512, 1960.
- Witthöft, W.: Absolute Anzahl und Verteilung der Zellen im hirn der Honigbiene. In: *Z morphol Tiere*, Band 61:S. 160–184, 1967.
- Wright, N.J.D. und Zhong, Y.: Characterization of K⁺ currents and the camp-dependent modulation in cultured drosophila mushroom body neurons identified by *lacZ* expression. In: *J Neurosci*, Band 15(2):S. 1025–1034, 1995.
- Wüstenberg, D. und Grünewald, B.: Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*. In: *J Comp Physiol A*, Band 190:S. 807–821, 2004.
- Wüstenberg, D.G., Boytcheva, M., Grünewald, B., Byrne, J.H., Menzel, R. und Baxter, D.A.: Current and voltage-clamp recordings and computer simulations of kenyon cells in the honeybee. In: *J Neurophysiol*, Band 92:S. 2589–2603, 2004.
- Wu, C.F., Suzuki, N. und Poo, M.M.: Dissociated neurons from normal and mutant *Drosophila* larval central nervous system in cell culture. In: *J Neurosci*, Band 3:S. 1888–1899, 1981.
- Xiong, W.C., Okano, H., Patel, N.H., Blendy, J.A. und Montell, C.: *repo* encodes a glial-specific homeo domain protein reqmred in the *Drosophila* nervous system. In: *Gens and Development*, Band 8:S. 981–994, 1994.
- Xuehong, X., Manjunatha, B.B., Miyuki, N., Hiroshi, T. und Jianjie, M.: Molecular cloning of cDNA encoding a *Drosophila* ryanodine receptor and functional studies of the carboxyl-terminal calcium release channel. In: *J Biophys*, Band 78:S. 1270–1281, 2000.
- Zufall, F., Stengl, M., Franke, C., Hildebrand, J.G. und H. H. Hatt: Ionic currents of cultured olfactory neurons from antennae of *Manduca sexta*. In: *J Neurosci*, Band 11:S. 956–965, 1991.

Anhang

Rezepturen der verwendeten Lösungen in alphabetischer Folge

Extrazellulärlösung (ES1)

150 mM NaCl
5 mM KCl
5 mM CaCl₂
2 mM MgCl₂
10 mM Hepes

in H₂O lösen; pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen und Osmolarität mit Saccharose auf 360 mosmol angleichen

Heuschreckenringer (Clemens und May 1974)

140 mM NaCl
10 mM KCl
4 mM NaH₂PO₄*2H₂O
5 mM Na₂HPO₄
2 mM CaCl₂*2H₂O

in H₂O lösen; pH-Wert mit NaOH oder HCl auf 7,2 einstellen

Phosphatpuffersaline (PBS)

154 mM NaCl
100 mM Na₂HPO₄
17 mM NaH₂PO₄

in H₂O lösen; pH-Wert mit NaOH oder HCl auf 7,2 einstellen

Pipettenlösung (PS1)

10 mM	NaCl
180 mM	KCl
0,1 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂
2 mM	Mg-ATP
10 mM	Hepes
1 mM	EGTA

in H₂O lösen; pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen und Osmolarität mit Saccharose auf 370 mosmol angleichen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei **Prof. Ralf Heinrich** für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Betreuung, seine unendliche Geduld und seinen unermüdlichen Korrekturereifer bedanken.

Bei **Prof. Andreas Stumpner** bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Besonderer Dank gilt **Priv. Doz. Dr. Swen Hülsmann** und **Dr. Kai Haertel** für ihre Einweisungen in Technik der Ionenmessung und die Bereitstellung eines Kalzium-Imaging Setups.

Bei **Dr. Manuel Gebauer** möchte ich für seine Einführung in die Methode der Patch-Clamp Technik und bei **Prof. Bernd Grünewald** für die tiefen Einblicke in die Kunst der Elektrophysiologie bedanken.

Michael Kunst danke ich für seine Hilfe bei der Histologie und vor allem für die Einsichten in den Aufbau des Zentralkomplexes.

Bei **Daniela Gocht** bedanke ich mich für die Bereitstellung einiger ihrer Zellkulturdaten und bei **Annemarie Berninches y Chamizo** für ihre immunzytochemischen Arbeiten an der Zellkultur.

Den Technischen Assistenten **Magret, Matthias, Steffie** und **Patricia** danke ich für die Tierpflege und ihre Hilfe im Labor.

Bei allen übrigen aktuellen und ehemaligen **Mitgliedern der Abteilung Neurobiologie** bedanke ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre, zahllose Frühstücksseminare und die ständige Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen.

Angela Dann und **Janine Lillotte** gilt mein Dank für ihre emsige Korrekturhilfe und **Carsten Willems** für seine Einführung in die fortgeschrittene Textverarbeitung.

Lebenslauf

- 02.05.1976** geboren als erstes Kind von Brigit Heck (geb. Lethen) und Harald Heck in Mönchengladbach
- 1982 - 1986** Besuch der Grundschule Pahlkestrasse in Rheydt
- 1986 - 1995** Besuch des Hugo-Junkers-Gymnasiums in Rheydt
- 1995** Abitur
- 1995 - 1996** Zivildienst im Ortsverein Odenkirchen der Arbeiterwohlfahrt Mönchengladbach
- 1996** Beginn des Diplomstudiengangs Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
- 2002 - 2003** Beginn der Diplomarbeit am Johann-Friedrich-Blumenbach Institut für Zoologie & Anthropologie der Georg-August-Universität Göttingen
- 2003** Studienabschluß (Dipl. Biol.)
- 2004** Beginn der Promotion am Johann-Friedrich-Blumenbach Institut für Zoologie & Anthropologie der Georg-August-Universität Göttingen