

**Experimentelle Untersuchungen zur  
embryonalen Entwicklung identifizierter  
Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems  
von *Drosophila melanogaster*:  
Zellstammbäume und Elektrogenese**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades

**"Doktor der Naturwissenschaften"**

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

vorgelegt von  
Hartmut Schmidt  
geb. in Korbach  
Mainz, 2000

Tag der mündlichen Prüfung:

31.10.2000

Bei etwas mehr Überlegung in der Wahl ihrer Beschäftigung würden wohl alle Menschen vor allem Studierende und Forscher, denn gewiß ist Natur und Schicksal des Menschen allen gleich interessant. In der Anhäufung von Eigentum für uns und unsere Nachkommen, (...), selbst im Erwerben von Ruhm sind wir sterblich; aber im Forschen nach Wahrheit sind wir unsterblich.

H.D. Thoreau

**Inhalt**

	<b><u>Seite</u></b>
<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>I. Einleitung</b>	3
<b>II. Material und Methoden</b>	9
II.1. Lösungen	9
II.1.1. Lösungen für DiI-Markierung, Antikörperfärbung und Zellkultur	9
II.1.2. Lösungen für die Elektrophysiologie	13
II.2. Geräte und Computer	14
II.3. Fliegenstämme und Haltung	17
II.4. Eiablage und Vorbereitung der Embryonen	19
II.5. Herstellung von Markierungs-, Transplantationskapillaren und Patch-Pipetten	20
II.6. Zellstammbaumanalyse mit DiI	22
II.6.1. Markierung einzelner neuroektodermaler Vorläufer mit DiI	22
II.6.2. <i>In vivo</i> Beobachtung und Identifikation der Neuroblasten	24
II.6.3. Fotokonversion von DiI	25
II.7. Zellkultur	27
II.8. Elektrophysiologie	28
II.8.1. <i>In vitro</i> Ableitungen	28
II.8.2. <i>In situ</i> Ableitungen	32
II.8.3. Isolation der ionischen Ströme und Datenauswertung	34
II.9. Immunohistochemie	39
II.9.1. Antikörperfärbungen	40
II.9.2. X-Gal Fräbungen	42
II.10. Dokumentation von morphologischen Präparaten und Zellkulturen	43

<b>III. Ergebnisse</b>	45
III.1. Zellstammbaumanalyse mit DiI	45
III.1.1. Identifikation von NBs <i>in vivo</i>	47
III.1.2. Embryonale Zellstammbäume der dNE NBs	48
III.1.3. NB 3-3 generierte u.a. das laterale Cluster von <i>even-skipped</i> exprimierenden Zellen	49
III.2. Entwicklung von Ionenströmen in ML-Neuronen	54
III.2.1. Ein Zellkultursystem für identifizierte ZNS Vorläufer	55
III.2.2. Identische Expression spannungsgesteuerter K <sup>+</sup> -Ströme unter den verschiedenen Kulturbedingungen	57
III.2.3. Die Expression spannungsgesteuerter Na <sup>+</sup> -Ströme korrelierte mit dem Vorhandensein von Neuritenkontakten	61
III.2.4. Neuritenverbindungen veränderten die Eigenschaften von spannungsgesteuerten Ca <sup>2+</sup> -Strömen	63
III.2.5. Neuritenkontakte beeinflussten ACh- und GABA-gesteuerte Ströme	66
III.2.6. Wurden an den Neuritenverbindungen Synapsen ausgebildet?	67
III.2.7. Ausblick: Spannungsgesteuerte K <sup>+</sup> -Ströme <i>in situ</i>	69
<b>IV. Diskussion</b>	73
IV.1. Zellstammbaumanalyse mit DiI	74
IV.1.1. Identifikation von NBs <i>in vivo</i>	74
IV.1.2. Zuordnung des lateralen Clusters von <i>even-skipped</i> exprimierenden Zellen zum NB 3-3 Stammbaum	75
IV.1.3. Zellstammbäume und Proliferationsmuster	76
IV.1.4. Gliazellen	77
IV.1.5. Räumliche Beziehungen	78
IV.1.6. Segmentspezifität	79
IV.1.7. Projektionsmuster	80
IV.1.8. Apoptose	80
IV.1.9. Variabilität	81
IV.2. Entwicklung von Ionenströmen in ML-Neuronen	81
IV.2.1. Ionenströme in kultivierten ML-Neuronen	82
IV.2.2. Neuritenkontakte beeinflussten die Expression vieler Ionenströme	86
IV.2.3. Validität der <i>in vitro</i> Ableitungen	90

---

	<u>Inhalt</u>
<b>V. Perspektiven</b>	91
<b>VI. Referenzen</b>	93
<b>VII. Anhang</b>	107
Häufig verwendete Abkürzungen	A
Abbildungsverzeichnis	B
Tabellenverzeichnis	C
Danksagung	D
Versicherung gem. § 3 Absatz 3d der Promotionsordnung	E
Persönliche Daten und tabellarischer Lebenslauf	F

## Zusammenfassung

Das ventrale Nervensystem (vNS) von *Drosophila melanogaster* entsteht aus zwei verschiedenen Populationen von Vorläufern, den mesektodermalen oder Mittellinien (ML)-Vorläufern und den neuroektodermalen Vorläufern oder Neuroblasten (NBs). Beide Populationen unterscheiden sich in vielen Aspekten, wie z.B. Genexpression, Teilungsverhalten und Zellstammbaum. Die ca. 30 NBs pro Hemisegment delaminieren als Einzelzellen aus dem Neuroektoderm und bilden ein invariantes subepidermales Muster in der neu entstandenen neuralen Zellschicht aus. Sie sind dort aufgrund ihrer Lage und der Expression spezifischer molekularer Marker individuell identifizierbar.

Um die Mechanismen zu verstehen, die zur Determination und Differenzierung von ZNS Zellen führen, ist es eine Grundvoraussetzung, die Zellstammbäume aller Vorläufer zu kennen. Unter Verwendung des lipophilen *in vivo* Fluoreszenzfarbstoffs DiI wurden in früheren Arbeiten die Zellstammbäume der ML-Vorläufer und von 17 NBs, die aus der ventralen Hälfte des Neuroektoderms stammten, beschrieben. In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Zellstammbäume von 13 NBs, die aus dem dorsalen Teil des Neuroektoderms delaminierten, beschrieben und 12 davon identifizierten Vorläufern zugeordnet. Darüber hinaus wurde ein bisher nicht beschriebener NB (NB 1-3) identifiziert und anhand morphologischer und molekularer Kriterien charakterisiert. Insgesamt produzierten die NBs ca. 120 Neurone und 22 bis 27 Gliazellen pro Hemineuomer, die in eine systematische Terminologie eingefügt wurden. Insgesamt besteht damit ein Neuomer des embryonalen vNS von *Drosophila* aus ca. 700 Neuronen (350 pro Hemineuomer) und 60 Gliazellen (30 pro Hemineuomer), die von NBs abstammen. Hinzu kommen ca. 12 ML-Neurone und 2 bis 4 ML-Glia pro Neuomer. Damit stammten die meisten Gliazellen im embryonalen vNS von *Drosophila* von NBs ab, die aus dem dorsalen Neuroektoderm hervorgingen. Zwei dieser NBs hatten ausschließlich gliale Nachkommen (NB 6-4A, GP) und fünf generierten sowohl Glia als auch Neurone (NBs 1-3, 2-5, 5-6, 6-4T, 7-4). Die übrigen sieben Zellstammbäume (NBs 2-4, 3-3, 3-5, 4-3, 4-4, 5-4, Klon y) waren rein neuronal. Es war ferner möglich, das bereits bekannte laterale Cluster von *even-skipped* exprimierenden Zellen (EL) dem Stammbaum von NB 3-3 zuzuordnen. Zusammen mit den zuvor beschriebenen Klonen sind damit mehr als 90% der thorakalen und abdominalen Zellstammbäume im embryonalen vNS von *Drosophila* bekannt. Darüber hinaus sind zuvor identifizierte Neurone und die meisten Gliazellen einem bestimmten Stammbaum zugeordnet und damit mit einer ontogenetischen Geschichte versehen. Dieser komplette Datensatz liefert eine Grundlage für die Interpretation mutanter Phänotypen und für zukünftige Untersuchungen über die Festlegung von Zellschicksalen und die Differenzierung von Zellen. Dies könnte dazu beitragen, das Verhältnis zwischen Herkunft der Zelle, Genexpression und Zellfunktion besser zu verstehen.

Die wesentliche Funktion neuronaler Zellen ist die Integration und Weiterleitung von elektrischen Signalen. Mithin ist die Ausbildung elektrischer Eigenschaften (Elektrogenese) ein wesentlicher Aspekt der neuronalen Entwicklung. Um dabei zelltypspezifische Unterschiede zu finden, ist die Arbeit an definierten Zellpopulationen eine zwingende Voraussetzung. Es wurde daher hier ein *in vitro* System verwendet, das die selektive Kultivierung identifizierter embryonaler Vorläufer unter verschiedenen Bedingungen erlaubt. Da die Zellstammbäume der ML-Vorläufer besonders einfach sind und die ML-Zellen zudem in vielen Aspekten von den neuroektodermalen Zellen verschieden sind (s.o.), wurden die ML-Neurone als erstes Modellsystem ausgewählt. Unter Verwendung der Patch-clamp Technik wurden die in dieser definierten Zellpopulation auftretenden Ionenströme detailliert beschrieben. ML-Neurone exprimierten zumindest zwei verschiedene Typen von spannungsgesteuerten  $K^+$ -Strömen ( $I_A$  und  $I_K$ ), einen spannungsabhängigen  $Na^+$ -Strom und zwei spannungsgesteuerte  $Ca_{(Ba)}^{2+}$ -Ströme. Darüber hinaus reagierten sie auf die Neurotransmitter ACh und GABA. Die meisten Ionenströme in den ML-Neuronen waren, trotz ihrer ontogenetischen Besonderheit, annähernd identisch mit denen, die in anderen *Drosophila*-Neuronen gefunden wurden. Ihnen fehlte allerdings eine anhaltende Komponente des  $Na^+$ -Stroms, und sie waren homogen in ihrer Aktivität. Selbst bei anhaltender elektrischer Stimulation generierten sie immer nur ein Aktionspotential. Sie sind daher möglicherweise spezifisch hinsichtlich ihrer Signalleitungseigenschaften. Interessanterweise zeigte sich durch Verwendung verschiedener Kulturbedingungen, daß die Expression der spannungsgesteuerten  $K^+$ -Kanäle weitgehend zellautonom erfolgte, während die Expression der anderen Ströme stark durch das Vorhandensein von Neuritenkontakten beeinflußt wurde. Vorläufige Untersuchungen lassen darauf schließen, daß der involvierte molekulare Mechanismus unabhängig von synaptischer Transmission ist. In einer Art "Ausblick" wurde schließlich die Validität von *in vitro* Ableitungen durch Analyse spannungsgesteuerter  $K^+$ -Ströme in einer neuen *in situ* Präparation geprüft, die verschiedene Bereiche des *Drosophila*-ZNS für elektrophysiologische Untersuchungen zugänglich macht. Damit ist ein experimentelles System etabliert, daß den direkten Vergleich von *in vitro* und *in situ* Daten an definierten Zellpopulationen ermöglichen sollte.

## I. Einleitung

Die zentralen Nervensysteme (ZNS) der verschiedenen Organismen gehören zu den komplexesten uns bekannten Organen. Sie erfüllen vielfältige Aufgaben, wie die Integration und Verarbeitung von Sinneswahrnehmungen und die Ausübung der motorischen Kontrolle. Darüber hinaus wird das ZNS mit höheren kognitiven Fähigkeiten in Verbindung gebracht. Das Studium seiner Entwicklung und Funktion gehört daher zu den faszinierendsten Aufgaben in den Biowissenschaften.

Aufgrund des hohen Komplexitätsgrades insbesondere von Wirbeltiernervensystemen hat es sich als sinnvoll erwiesen, auf einfache Modellsysteme zurückzugreifen. Ermöglicht wurde dies durch die Erkenntnis, daß alle uns bekannten Nervensysteme aus den gleichen zwei Populationen von Zellen aufgebaut sind: Neuronen und Gliazellen. Der Neuroanatom Ramón y Cajal zeigte zu Beginn dieses Jahrhunderts durch systematische Anwendung der von Camillo Golgi entwickelten Silberfärbung in vergleichenden Tierstudien, daß sich die Bestandteile des ZNS aus einzelnen Neuronen zusammensetzen (Cajal, 1937). Weitere experimentelle Unterstützung für die sog. "Neuronendoktrin" kam aus Zellkulturstudien, in denen gezeigt wurde, daß Dendriten und Axone mit dem Zellkörper verbunden sind und aus ihm herauswachsen. An der Spitze der Axone bilden sich Wachstumskegel aus und führen diese zu den Zielzellen (Harrison, 1935). Die unterschiedlichen phylogenetischen Komplexitätsgrade der Nervensysteme entstehen aus unterschiedlicher Anzahl und Organisation der Zellen. Erst das Netzwerk ermöglicht die komplexen Leistungen des Nervensystems, wobei die zentrale signalverarbeitende Einheit das Neuron ist ("zellulärer Konnektionismus"; u.a. Sherrington, 1961; zusammengefaßt u.a. in Albright et al., 2000).

Das Neuron erfüllt seine Aufgabe durch Integration und Weiterleitung elektrischer Signale. Das Konzept der "intrinsischen tierischen Elektrizität" wurde bereits 1791 von Luigi Galvani postuliert, konnte aber bis ins 19. Jahrhundert hinein nicht schlüssig bewiesen werden (als Überblick s.u.a. Piccolino, 1997). Die direkte Messung elektrischer Potentiale im Muskel durch Carlo Matteucci und die Arbeiten von Emil du Bois-Reymond und Hermann von Helmholtz führten dann Mitte des 19. Jahrhunderts zur Begründung der Elektrophysiologie als wissenschaftlichen Disziplin (Überblick u.a. Numberger und Draguhn, 1996). Die Entwicklung der Spannungsklemme (Voltage-clamp) durch S. Curtis und H. J. Cole Ende der dreißiger Jahre des 20. Jahrhunderts und deren konsequente Anwendung durch Bernard Katz, Alan Hodgkin und Andrew Huxley führten schließlich zu einer Reihe von Veröffentlichungen, die das Zustandekommen des Aktionspotentials auf Grundlage von Ionenströmen, die durch Proteinporen fließen, erklären konnten (Hodgkin und Katz, 1949; Hodgkin und Huxley, 1952 a-d, Hodgkin et al., 1952; Überblick u.a. Numberger und Draguhn, 1996). Bei der Signalübertragung von einem Neuron auf seine Zielzelle kommt es an den meisten Synapsen zu einer Übersetzung des elektrischen Signals in ein chemisches. Bereits 1921 war von Otto Loewi

gezeigt worden, daß der der Weiterleitung vom Vagusnerv auf den Herzmuskel zugrundeliegende synaptische Prozeß ein chemischer ist. Er identifizierte auch den ersten Neurotransmitter - Acetylcholin (Überblick z.B. Jessel und Kandel, 1993; Albright et al., 2000). Die jüngere Weiterentwicklung der Spannungsklemme durch Bert Sakmann und Erwin Neher (Patch-clamp Technik; Hamill et al., 1981) machte schließlich die Messung von Strömen durch einzelne Ionenkanäle und auch Messungen an sehr kleinen Neuronen, wie denen von Insekten, möglich (z.B. Byerly und Leung, 1988; Saito und Wu, 1991; Schäfer et al., 1994; Überblick z.B. Armstrong und Hille, 1998; Albright et al., 2000).

Die geordnete Verknüpfung der Neurone untereinander und mit anderen Zielzellen ist die ontogenetische Voraussetzung für die komplexen funktionellen Eigenschaften des ZNS. Grundlegende Mechanismen, die zu einem geordneten neuronalen Netzwerk führen, wurden am optischen System von Vertebraten postuliert (u.a. Stone, 1944; Sperry, 1959; Sperry, 1963; zusammengefaßt u.a. in Goodman und Shatz, 1993; Katz und Shatz, 1996; Albright et al., 2000) und später anhand einfacherer Modellsysteme untermauert und erweitert (zusammengefaßt u.a. in Goodman und Shatz, 1993; Albright et al., 2000). Dabei hatte sich auch gezeigt, daß ein geeigneter Modellorganismus möglichst vielen methodischen Ansätzen - morphologischen, genetischen, molekularen, elektrophysiologischen - zugänglich sein sollte.

Das genetische Netzwerk, das Aspekte der frühen Neurogenese, wie Bildung der Vorläufer, Zellschicksal, Ausbildung von Fasertrakten und präziser Konnektivität, kontrolliert, ist Gegenstand intensiver Untersuchungen in vielen Organismen (zusammengefaßt u.a. in Albright et al., 2000). Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gehört aufgrund der vorhandenen genetischen und molekularen Werkzeuge seit langem zu den bevorzugten Modellsystemen bei der Untersuchung der neuralen Entwicklung. Viele der beteiligten Gene wurden zunächst in *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* identifiziert und nachfolgend auch in Vertebraten gefunden. Dabei zeigte sich eine bemerkenswerte evolutionäre Konserviertheit in den genetischen Programmen, die die Neurogenese kontrollieren (als Überblick s.u.a. Bang and Goulding, 1996; Campos-Ortega, 1995; Goodman und Doe, 1993; Goodman und Shatz, 1993; Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Fuerstenberg et al., 1998).

In Insekten entsteht die komplexe dreidimensionale Struktur des ZNS aus einem zweidimensionalen Epithel (Neuroektoderm), in dem neurale Vorläufer (Neuroblasten (NBs) Wheeler, 1891, 1893) gemischt mit anderen ektodermalen Vorläufern, wie Epidermoblasten und Vorläufern des peripheren Nervensystems, vorliegen. Im Unterschied zu Vertebraten, wo sich das Neuralrohr durch Invagination eines geschlossenen Gewebeverbandes bildet (Überblick u.a. in Gilbert, 1994), beginnt die Neurogenese bei Insekten mit der Delamination der NBs als Einzelzellen. Diese bilden schließlich ein invariantes subepidermales Muster (Bate, 1976; Bate und Grunewald, 1981; Goodman et al., 1984; Doe und Goodman, 1985). Das ventrale Nervensystem (vNS) des *Drosophila*-Embryos entsteht aus zwei verschiedenen Populationen von Vorläufern: pro Segment ca. 60 neuroektodermalen Vorläufern (30 NBs pro Hemisegment) und ca. 8 mesektodermalen (Poulson, 1950) oder Mittellinien (ML)-Vorläufern

(Abb. 1). Die NBs können aufgrund ihrer Position in der neuralen Zellschicht, ihrem Genexpressionsmuster und der Zeit ihrer Delamination individuell identifiziert werden (Doe, 1992; Broadus et al., 1995; Bossing et al., 1996). Die ML-Vorläufer sind aufgrund ihrer besonderen Lage entlang der ventralen Mittellinie leicht erkennbar. Sie unterscheiden sich in vielen Aspekten, u.a. Genexpression, von den NBs (Doe, 1992; Nambu et al., 1990; Nambu et al., 1991; zusammengefaßt in Nambu et al., 1993). Aufgrund der detaillierten Kenntnis des zeitlich-räumlichen NB-Musters (Hartenstein und Campos-Ortega, 1984; Hartenstein et al., 1987), der Erstellung einer NB-Karte (Doe, 1992, Broadus et al., 1995) und der Verfügbarkeit von Farbstoffen (z.B. 1,1'-Diocetyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanidperchlorat (DiI), Meerrettichperoxidase (HRP)), die zur Aufschlüsselung von Zellstammbäumen geeignet sind, konnten die Nachkommen der ML-Vorläufer (Bossing und Technau, 1994) und von 17 von 30 NBs, die aus den ventralen Bereichen des Neuroektoderms stammten, identifiziert werden (Udolph et al., 1993; Bossing et al., 1996).

In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Zellstammbäume von 13 NBs, die aus dem dorsalen Teil des Neuroektoderms stammten, mittels der DiI-Markierungstechnik (Bossing und Technau, 1994) analysiert (Schmidt et al., 1997; Abb. 1). Es zeigte sich, daß die große Mehrheit der Gliazellen des embryonalen vNS (ca. 22 bis 27 von etwa 30 pro Hemineuromer) von diesen Vorläufern abstammt. Die Positionen der Gliazellen wurden mit den Beschreibungen in Ito et al. (1995) verglichen und die Zellen entsprechend benannt. Durch die Verwendung molekularer Marker war es möglich, das bereits bekannte laterale Cluster von *even-skipped* exprimierenden Zellen (EL; Patel et al., 1989) einem bestimmten NB zuzuordnen (NB 3-3). Darüber hinaus wurde ein neuer NB (NB 1-3) anhand morphologischer und molekularer Kriterien identifiziert und in eine schematische Darstellung der NB-Schicht integriert (Abb. 5). Zusammen mit den bereits beschriebenen NB-Zellstammbäumen (Bossing et al., 1996) und den ML-Nachkommen (Bossing und Technau, 1994) ist damit der größte Teil (> 90%) der Zellstammbäume im embryonalen vNS von *Drosophila* bekannt. Dieser hohe Grad an zellulärer Auflösung liefert eine Grundlage für weitere Untersuchungen über die Spezifizierung und Differenzierung von neuralen Zellen. Darüber hinaus sollte er die Untersuchung des Verhältnisses zwischen Zellstammbaum, also Historie der Zelle, Genexpression und Funktion ermöglichen.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt der neuronalen Entwicklung ist die Ausbildung adäquater elektrischer Eigenschaften. Unter Verwendung von Voltage-clamp Techniken (inklusive Patch-clamp) wurden spannungs- und ligandengesteuerte Ströme in einer Vielzahl von Organismen beschrieben (s.u.a. Hille, 1992). Entsprechende Charakterisierungen wurden für embryonale und larvale *Drosophila*-Neurone *in vitro* gemacht (z.B. Byerly and Leung, 1988; Saito and Wu, 1991, Albert and Lingle, 1993; Zhang et al., 1994; O'Dowd, 1995; Tsunoda and Salkoff, 1995a,b; Delgado et al., 1998, Lee and O'Dowd, 1999). Kürzlich wurde das zeitliche Auftreten verschiedener Ionenströme während der *Drosophila*-Embryogenese in dorsal im vNS gelegenen Neuronen *in situ* untersucht (Baines and Bate, 1998). Die Mehrzahl der neuronalen Ionenkanäle

wurde zuerst in *Drosophila* kloniert und viele Mutanten wurden erzeugt. So kodieren z.B. mindestens vier Gene für spannungsgesteuerte  $K^+$ -Kanäle: *Shaker* und *Shal* kodieren für inaktivierende A-Typ ähnliche Ströme und *Shab* und *Shaw* für langsam bzw. nicht inaktivierende, gleichrichterähnliche Ströme (z.B. Solc und Aldrich, 1988; Covarrubias et al., 1991; Tsunoda und Salkoff, 1995a,b). Diese vier bilden Unterfamilien der  $K_v$ -Genfamilie spannungsgesteuerter  $K^+$ -Kanäle, mit einem hohen Grad an phylogenetischer Konserviertheit, der von *Drosophila* über die Maus bis hin zum Menschen reicht (zusammengefaßt u.a. in Wei et al., 1990; Salkoff et al., 1992; Littleton und Ganetzky, 2000). Ein spannungsgesteuerter  $Na^+$ -Strom fließt durch das *para* Genprodukt (Germeraad et al., 1992), dessen Gensequenz homolog zu den porenbildenden  $Na^+$ -Kanal-Untereinheiten von Säugern ist (Überblick u.a. in Littleton und Ganetzky, 2000). *Dmca1A* und *Dmca1D* sind Kandidaten für spannungsgesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanäle (Zheng et al., 1995; Smith et al., 1996), mit Homologie zu den porenbildenden Untereinheiten von spannungsgesteuerten Vertebraten N- bzw. L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen (Littleton und Ganetzky, 2000; zur biophysikalischen und pharmakologischen Klassifizierung von Vertebraten  $Ca^{2+}$ -Kanäle s.u.a. Hille, 1992). Neben diesen exemplarisch aufgeführten Homologien für spannungsgesteuerte Ionenkanäle gibt es eine Vielzahl weiterer, u.a. für ligandengesteuerte Ionenkanäle und synaptische Proteine (Überblick u.a. in Budnik und Gramates, 1999; Littleton und Ganetzky, 2000). Trotz der deutlichen Unterschiede in der Komplexität und Organisation von Fliegen- und Säugetiernervensystemen sind die wesentlichen neuronalen Proteine, und damit möglicherweise die grundlegenden Mechanismen die sie steuern, bemerkenswert ähnlich. Aufgrund dieser evolutionären Konserviertheit ist *Drosophila* nicht nur ein Modellsystem, in dem die Entwicklung von Ionenströmen auf genetischem, molekularem und zellulärem Niveau studiert werden kann, sondern es ist darüber hinaus möglich, fundamentale neurobiologische Einsichten aus diesem einfachen Modellorganismus zu gewinnen.

Faktoren, die die Determination und Differenzierung neuraler Zellen beeinflussen, können entweder zellautonom exprimiert werden oder sie können extrinsischer Herkunft sein, z.B. aus der Interaktion mit anderen Zellen. Aufgrund der guten Kontrollierbarkeit der experimentellen Bedingungen sind Zellkultursysteme eine Möglichkeit, um diese Faktoren zu unterscheiden. So wurde z.B. in *Drosophila*-Zellkulturen gezeigt, daß bereits neuroektodermale Vorläufer die Fähigkeit haben, sich als NBs oder Epidermoblasten zu differenzieren (Lüer und Technau, 1992). Ferner wurde der Befund, daß Neurone in Zellkultur die ganze Bandbreite an Ionenströmen exprimieren können, als Hinweis auf einen hohen Grad an Zellautonomie während der Ausbildung elektrischer Eigenschaften (Elektrogenese) gewertet (z.B. O'Dowd, 1988; Ribera und Spitzer, 1990; Spitzer, 1994; Yao et al., 2000). Allerdings wurde u.a. in Vertebraten- Zellkulturen oder stabilen Zelllinien (wie Ratten-PC12-Zellen) gezeigt, daß die Expression oder Funktion von Ionenkanälen z.B. über das Membranpotential (z.B. Vallano et

al., 1996; Gault und Siegel, 1997; Mellor et al., 1998) oder Wachstumsfaktoren (z.B. Cameron et al., 1998; Fanger et al., 1997; Hilborn et al., 1998) beeinflußt werden kann.

Die meisten bislang verwendeten *in vitro* Systeme sind Massenzellkulturen, in denen die Identität individueller Zellen unbekannt blieb. Auch in *Drosophila* wurde bisher erst in zwei Arbeiten auf identifizierte Zellpopulationen fokussiert. In diesen wurden spannungsgesteuerte  $K^+$ -Ströme in Pilzkörperneuronen aus dissoziierten larvalen Gehirnen (Delgado et al., 1998) und Histamin gesteuerte  $Cl^-$ -Ströme in den großen monopolaren Zellen (LMC) des adulten optischen Systems (Hardie, 1989; Skingsley et al., 1995) beschrieben. Elektrophysiologische Ableitungen von definierten Zellpopulationen sind aber eine Grundvoraussetzung für die Identifizierung zelltypspezifischer Unterschiede im Verlauf der Elektrogenese. Daher wurde in der hier vorgelegten Arbeit zunächst eine Patch-clamp Apparatur aufgebaut (Abb. 2), die Methode etabliert und anschließend in einem *in vitro* System gearbeitet, das die selektive Kultivierung von identifizierten embryonalen Vorläuferzellen erlaubt (Abb. 3; Lüer und Technau, 1992; Schmidt et al., 2000).

Die Zellstammbaumanalyse hatte gezeigt, daß die Stammbäume der ML-Vorläufer besonders einfach aufgebaut sind. Insgesamt generieren die sieben bis acht ML-Vorläufer nur vier verschiedene Typen neuronaler Klone mit geringer Zellzahl (zwei bis acht; Bossing und Technau, 1994). Demgegenüber produzieren die 60 NBs pro Segment teilweise sehr große Stammbäume mit bis zu 30 Neuronen (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Die ML-Neurone sind damit nur eine sehr kleine Fraktion ( 2%) der Neurone im vNS von *Drosophila*. Aufgrund ihrer besonderen Charakteristika gehören die ML-Zellen zu den am besten untersuchten Zellen im *Drosophila*-ZNS (zum Überblick s.u.a. Nambu et al., 1993; Goodman und Doe, 1993; Goodman und Shatz, 1993; Tessier-Lavigne und Goodman, 1996). Die Entwicklung ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften blieb allerdings bisher unbekannt. In der hier vorgelegten Arbeit wurden unter Verwendung der Patch-clamp Technik Ganzzellströme in ML-Neuronen abgeleitet, die von selektiv aus frühen Gastrula Embryonen entnommenen und kultivierten ML-Vorläufern abstammten (Schmidt et al., 2000). Obwohl es sich hierbei immer noch um eine heterogene Gruppe von Zellen handelt (z.B. Interneurone und Motoneurone), sind die ML-Neurone klar verschieden von allen anderen *Drosophila*-ZNS-Zellen, inklusive den in Baines und Bate (1998) beschriebenen dorsalen Neuronen. Es zeigte sich, daß sie trotz ihrer von anderen Zellen verschiedenen embryonalen Herkunft ähnliche Ionenströme exprimierten wie andere *Drosophila*-Neurone *in vitro*. Sie zeigten zumindest zwei spannungsabhängige  $K^+$ -Ströme, einen spannungsgesteuerten  $Na^+$ -Strom und zwei spannungsgesteuerte  $Ca^{2+}$ -Ströme und sie reagierten auf die Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA). Die ML-Neurone waren homogen in ihren Signalleitungseigenschaften und generierten selbst bei anhaltender Stimulation immer nur ein Aktionspotential.

In dem hier verwendeten *in vitro* System konnten darüber hinaus die Zahl der Vorläufer und ihr Abstand zueinander genau kontrolliert werden. Dadurch war es möglich, die Ausbildung

von Neuritenverbindungen zwischen den Nachkommenklonen zu beeinflussen (Abb. 3). Interessanterweise ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein dieser Verbindungen und der funktionalen Expression spannungsabhängiger Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ströme sowie ACh und GABA gesteuerter Ströme. Demgegenüber schienen die Expression spannungsgesteuerter K<sup>+</sup>-Ströme und die Vitalität der Zellen unabhängig von Neuritenverbindungen zu sein. Bisherige Ergebnisse lassen vermuten, daß der zur funktionalen Expression einiger Ionenkanäle notwendige Mechanismus unabhängig von synaptischer Transmission ist.

In *in vitro* Systemen stellt sich immer die Frage, wie weit sie die Situation im intakten Gewebe widerspiegeln. Es wurde daher in Anlehnung an Baines und Bate (1998) als "Ausblick" eine *in situ* Präparation etabliert (Abb. 4) und ein vorläufiger Datensatz zu spannungsgesteuerten K<sup>+</sup>-Strömen in unidentifizierten Neuronen erstellt.

---

### Abb. 1 Anlagenkarte und DiI-Markierung

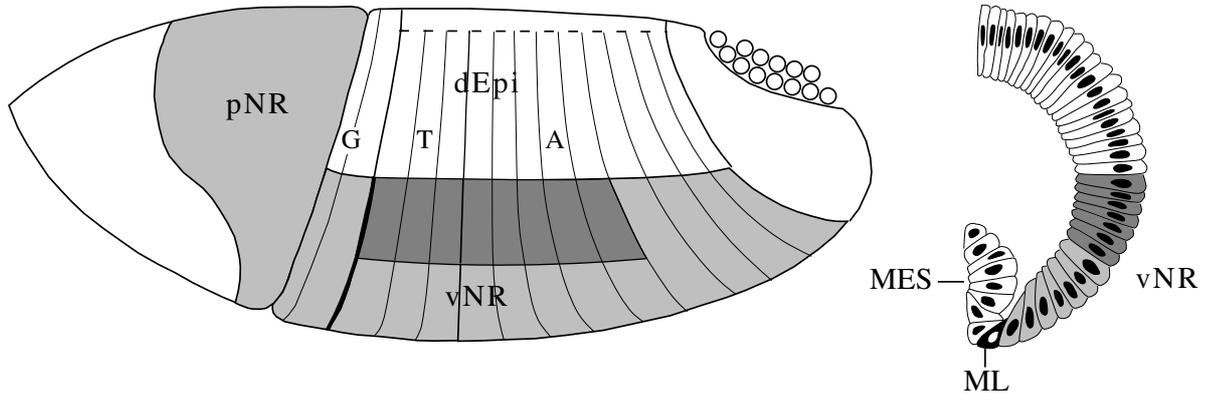
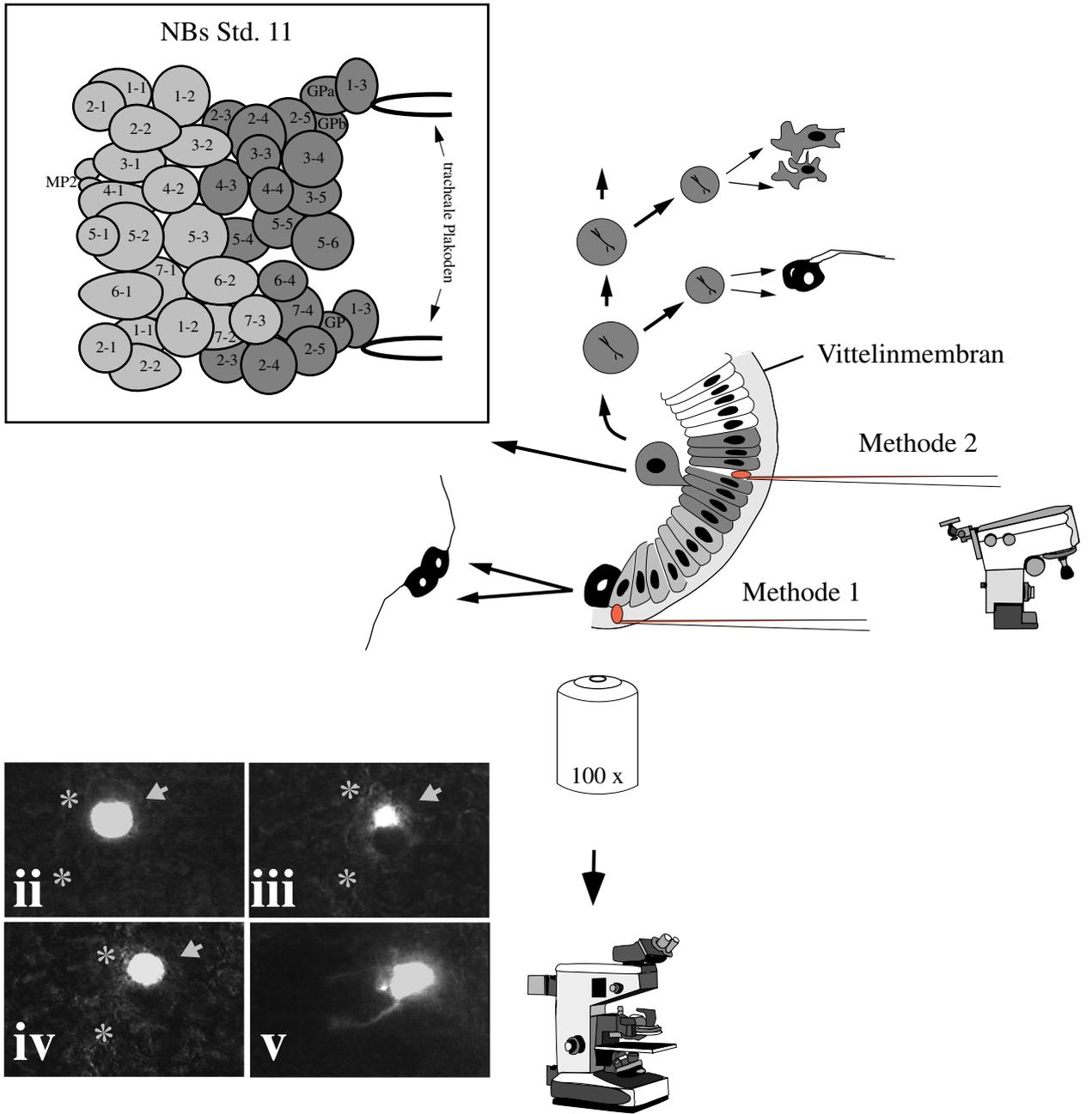
**A.** Schema eines *Drosophila melanogaster* Embryos zu Beginn der Gastrulation (Stadium (Std.) 6/7) in lateraler Ansicht (links; anterior links, dorsal oben) und im halben Querschnitt (rechts). Aus der in grau eingezeichneten procephalen und ventralen neurogenen Region (pNR und vNR) geht das larvale ZNS hervor. Die vNR erstreckt sich bis 50% des ventro-dorsalen Durchmessers (VD), was einer Entfernung von ca. 15 Zelldurchmessern zur Mittellinie (ML) entspricht. Die meisten DiI-Markierungen wurden in der dunkelgrau eingezeichneten Region gemacht, d.h. in den Segmentanlagen T1 bis A5 bei 25 bis 50% VD (ca. 8 bis 15 Zelldurchmesser zur ML). dEpi, dorsale epidermale Anlagen; MES, Mesoderm; G, T, A, gnathale, thorakale, abdominale Segmentanlagen (nach Technau und CamposOrtega, 1985).

**B. i.** Aus der vNR segregieren bis zum späten Std. 11 ca. 30 Neuroblasten (NBs) pro Hemisegment. Die NBs bilden eine subepidermale neurale Zellschicht aus sieben Reihen und sechs Spalten mit metamerer Wiederholung (Nebenbild im Kasten). Die späteren Segmentgrenzen lassen sich im Std. 11 an den invaginierenden trachealen Plakoden erkennen. Die meisten NBs teilen sich nach ihrer Delamination in einem Stammzellmodus in einen NB und einen Gangliennutterzelle (grau). Letztere teilt sich nur noch einmal und erzeugt so zwei Neurone und/oder Gliazellen (rechts). Im Unterschied dazu teilen sich ML-Vorläufer morphologisch symmetrisch (schwarz).

Vorläuferzellen in der frühen Gastrula ließen sich auf zwei Arten mit DiI markieren. Entweder wurde die Kapillare zwischen der Vitellinmembran und der Zelle plaziert (Methode 1; Bossing und Technau, 1994) oder sie wurde von lateral direkt zwischen die Zellen gestochen (Methode 2). Methode 1 wurde zur Markierung ventraler Vorläufer und Methode 2 zur Markierung lateraler Vorläufer verwendet. Bei Methode 2 rutschte die Kapillare i.d.R. zwischen die Zellen, ohne sie zu verletzen (s. Material und Methoden II.6.1.).

**ii-iv.** Markierung eines neuroektodermalen Vorläufers mit DiI und Delamination als NB (ventrale Ansicht, anterior oben, FITC-Anregung). Sterne kennzeichnen die ML. Der mit DiI markierte Vorläufer (ii, Pfeil; Fokus im Neuroektoderm) segregierte nach dorsal (iii, Fokus noch im Neuroektoderm) in die neurale Zellschicht (iv, Fokus in der neuralen Zellschicht).

**v.** Fluoreszenzaufnahme eines ausdifferenzierten NB1-2 Klons (Std. 16/17, FITC-Anregung).

**A****B**  
**i****Abb. 1**

## II. Material und Methoden

### II.1. Lösungen

#### II.1.1. Lösungen für DiI-Markierung, Antikörperfärbung und Zellkultur

Die Reihenfolge der Lösungen in diesem Abschnitt ist alphabetisch (d.h. wurde zur Herstellung einer Lösung eine andere mit verwendet, so findet man diese an der betreffenden alphabetischen Stelle).

##### Agarplatten für die Eiablage

Petrischalen (Ø 5 cm) wurden mit einer 2,5% Lösung von Agar-Agar (Roth) in handelsüblichem Apfelsaft ausgegossen und bei 4°C umgedreht aufbewahrt. Vor Verwendung wurden die Platten auf Raumtemperatur erwärmt.

##### Antikörper

Polyklonale Antikörper (AK, primärer und sekundärer AK) wurden mit fixierten Wildtyp (WT)-Embryonen aus über Nacht Eiablagen (verschiedene Stadien) präabsorbiert, was zu einer Verminderung der unspezifischen Bindungen und damit zu einer Reduktion der Hintergrundfärbung bei der tatsächlichen AK-Färbung führte. Die jeweiligen Verdünnungen wurden in PBT unter Zugabe von 20% fötalem Kalbserum und 0,02-0,1% Natriumacid ( $\text{NaN}_3$ , als 2% ige Stammlösung in PBT bei 4°C aufbewahrt) benutzt. Die gebrauchsfertig angesetzten AK-Lösungen wurden mit WT-Embryonen als Aliquots von 5-10 µl im Kühlschrank aufbewahrt und bei Bedarf die benötigte Menge nach kurzem Aufschütteln direkt entnommen.

Monoklonale AK wurden als Aliquots bei -20°C gelagert und die Verdünnungen jeweils direkt vor der Färbung frisch angesetzt (s. II.9.).

##### DAB in PP (DABP)

0,5 mg Diaminobenzidin (DAB, Sigma)/ml wurden unter ständigem Rühren in Phosphatpuffer (PP) gelöst. Die Lösung wurde als 0,5 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt. DABP wurde für die Antikörperfärbungen verwendet.

##### DAB in Tris-HCl (DABT)

2-3 mg DAB/ml wurden unter ständigem Rühren bei 40-50°C in Tris-HCl gelöst (Rührer) und als Aliquots von 1 ml bei -20°C aufbewahrt. DABT wurde zur Fotokonversion von DiI-Färbungen

benutzt (s.u.). Nach Gebrauch kann das DABT wieder eingefroren und erneut benutzt werden (insgesamt 2-3 mal). Lösungen von DAB in anderen Puffern, wie z.B. PP oder Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS), führen zu verlangsamer und körniger Photooxidation des DAB (Bossing, Diss., 1996).

### Detektionspuffer für die alkalische Phosphatasereaktion

Es wurde eine Lösung aus 41,5 ml deionisiertem Wasser, 1 ml 5M NaCl Lösung (0,1 M), 2,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> Lösung (50 mM), 5 ml Tris-HCl Puffer (pH 9,5; 0,1 M) und 0,05 ml Tween 20 hergestellt.

### DiI in Salatöl

1-1,5 mg/ml des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffs 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanidperchlorat (DiIC18(3), Molekular Probes (Bestell-Nr.: D282), [DiI]) wurden in kommerziellem Salatöl (keine spezielle Marke) in einem Thermoschüttler bei 65°C und verstärkter Rotation gelöst und die hellrote Lösung als 10 µl Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Das Salatöl wurde in 1 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Sofern die benutzten Volumina mit einer sterilen Pipette entnommen wurden, konnte man die Lösung bis zu 5 Tage nach dem Auftauen verwenden. Nach dieser Zeit war das Salatöl i.d.R. mikrobiell kontaminiert. Die gefrorenen Aliquots konnten bis zu 6 Monaten aufbewahrt werden. Der Verfall zeigte sich an einem raschen Ausbleichen der Fluoreszenz.

DiI kann sowohl im Fluoresceinbereich (FITC; Anregungswellenlänge 450 - 490 nm) als auch im Rhodaminbereich (Anregung bei 585 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden, wobei die Resonanzabsorbtion bei 585 nm erheblich stärker ist. Der Farbstoff ist bei Fluoresceinanregung äußerst photoresistent.

### Formaldehyd (FA) in gepufferter Salzlösung (PBS)

37% FA Stammlösung (Merck) wurde zur Fixierung von Embryonen in unterschiedlichen Verdünnungen mit PBS verwendet (s. Fotokonversion). Die Mischungen wurden entweder vorher frisch angesetzt oder, im Fall der Fixierung von Flat-Präparationen, in einem Falcon in größerer Menge angesetzt, bei Raumtemperatur aufbewahrt und bis zu einem Monat verwendet.

### Glutardialdehyd (GDA)

Die 25% GDA Stammlösung (Merck) wurde in unterschiedlichen Mischungen mit Heptan, FA und PBS zur Fixierung von Embryonen verwendet (s. Fotokonversion, Immunohistochemie). Die Mischungen wurden entweder vor Verwendung frisch angesetzt oder im Falle der 1:1 Mischung

aus GDA/Heptan in größerer Menge im Kühlschrank aufbewahrt, wobei die Heptanphase nach Verbrauch wieder aufgefüllt worden ist.

#### Kalbserum

Unverdünntes fötales Kalbserum (GIBCO) wurde in 1 ml Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und zum Blocken bei AK-Färbungen, bei der Fotokonversion und im Zellkulturmedium verwendet.

#### Klebergemisch

Zerkleinertes Tesapack-Klebeband wurde zusammen mit 150 ml Heptan in eine 500 ml Weithalsflasche gegeben und der Kleber über Nacht auf einem Rotationsschüttler von dem Klebeband abgelöst. Die Lösung wurde dann bei 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand zum Befestigen von dechorionisierten Embryonen auf Deckgläsern verwendet.

#### Nährmedium für die Fliegenzucht

200 g Maismehl, 140 g Melasse, 50 g Trockenhefe, 30 g Agar, 10 ml Propionsäure und eine Spatelspitze Nipagin wurden in 1 l Wasser gelöst.

#### Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Einfach konzentriertes PBS wurde durch Lösen von  $1,87\text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} + 0,43\text{ g K}_2\text{HPO}_4$  und  $7,2\text{ g NaCl}$  in 500 ml deionisiertem Wasser (pH 7-7,4) hergestellt. PBS wurde als 20-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### Phosphatpuffer (PP)

Der Phosphatpuffer (einfache Konzentration:  $7,1\text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} + 6,9\text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  / 500 ml deionisiertem Wasser) wurde als 10-fach konzentrierte Stammlösung bei Raumtemperatur gelagert.

#### Tritonhaltige phosphatgepufferte Salzlösung (PBT)

Auf 100 ml PBS wurden 0,75 ml 30% Tritonlösung (Sigma) gegeben (0,2% Triton).

#### Tris-HCl

Tris ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , Roth) wurde als 1M Stammlösung angesetzt und mit HCl auf verschiedene pH-Werte eingestellt.

### X-Gal Färbelösung

- 1) In 50 ml destilliertem Wasser wurden 165 mg  $K_3[FeCN_6]$  und 210 mg  $K_4[FeCN_6]$  gelöst.
- 2) In 50 ml destilliertem Wasser wurden 50 mg  $MgCl_2$  gelöst.
- 3) PBS pH 6,5.

Die Lösungen 1-3 wurden bei 4°C getrennt aufbewahrt, jeweils vor der Färbung in folgendem Verhältnis gemischt: 200 µl von Lösung 1, 100 µl von Lösung 2 und 690 µl von Lösung 3 und auf 65°C erwärmt. Dazu pipettierte man 10 ml einer ebenfalls vorher auf 65°C erwärmten Lösung von X-Gal in Dimethylsulfoxid (DMSO; 2 g X-Gal/ml DMSO; wurde als 10 µl Aliquots bei -20°C aufbewahrt) und vortexte das Ganze. Die Färbung geht am schnellsten, wenn man die noch warme Lösung auf die Präparate gibt.

### Sonstiges

50%, 70% Glycerin zum Entwässern und Einbetten von Flat-Präparationen  
Voletaf 10S Öl (Lehmann & Voss) zum Überschichten der Embryonen

### Zellkulturmedien

Schneiders-Insekten-Zellkulturmedium (1x Lösung; Gibco, Katalog-Nr. 21720) wurde mindestens drei Tage vor Verwendung mit 20% nicht hitzeinaktiviertem fötalem Kalbserum und 200ng/ml Insulin versetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für Wenigzellkulturen (s.u. II.7.) wurde das Medium anschließend für ein bis zwei Wochen mit Primärkulturzellen (Massenkultur) konditioniert (Lüer und Technau, 1992), zu 1 ml aliquotiert und bei Lagerung bei -20°C bis zu 6 Monaten verwendet. In einigen Fällen wurde auch nicht konditioniertes Medium verwendet, ohne daß dabei Unterschiede festgestellt wurden. Das Medium wurde in eine 1 ml Spritze gesogen und durch einen Sterifilter auf das Deckglas für die Kulturkammer gegeben.

Modifiziertes Schneiders-Medium wurde selbst hergestellt und enthielt die Aminosäuren und sonstigen Bestandteile des kommerziellen Schneiders-Medium aber die Konzentrationen an anorganischen Salzen entsprachen denen in "HamsF12/Dulbeccos modified Eagle high glucose Medium" (Irvine Scientific, Katalog-Nr. 9438). Dieses Medium hat insb. eine ca. 5-fach geringere Konzentration an  $K^+$ -Ionen (4 mM) und eine 4-fach geringere Konzentration an  $Ca^{2+}$ -Ionen (1 mM) als das kommerzielle Medium, dafür eine entsprechend erhöhte  $Na^+$ -Ionen Konzentration (120 mM). Das Medium wurde wie das kommerzielle mit Kalbserum und Insulin versetzt.

Die Osmolaritäten beider Medien waren etwa gleich ( 310 mOsm/kg  $H_2O$ ).

## II.1.2. Lösungen für die Elektrophysiologie

Soweit nichts anderes gesagt ist, stammten alle verwendeten Chemikalien von Sigma.

Tabelle 1. Extrazellulär Lösungen

Name der Lösung	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	BaCl <sub>2</sub>	Tris-X	Sucrose	Hepes	4-AP	TEA
Drosophila saline [DS]	130	6	5	5	0	0	10	10	0	0
DS 1	136	6	2	2	0	0	10	10	0	0
DS 2	80	56	5	5	0	0	10	10	0	0
0 Ca <sup>2+</sup> -DS	130	6	0	10	0	0	10	10	10	20
hoch K <sup>+</sup> -DS	86	50	5	5	0	0	10	10	0	0
Tris-DS [TDS]	0	6	0	10	0	130	10	10	0	0
Ca <sup>2+</sup> -TDS	0	6	5	5	0	130	10	10	0 oder 10	0 oder 20
Ba <sup>2+</sup> -TDS	0	6	0	5	50	85	10	10	10	20

Alle Werte sind in mM angegeben. Lösungsmittel war doppelt destilliertes H<sub>2</sub>O. Für 0 Ca<sup>2+</sup>-DS wurde der pH mit NaOH auf 7,1 bis 7,2 eingestellt, in den anderen Fällen mit HCl (Osmolarität 310 ± 5 mOsm/kg). Die Namen der Lösungen sind in Anlehnung an Byerly und Leung (1988). Sie wurden als 10 M Stammlösungen angesetzt und bei 4°C bis zu einem Jahr aufbewahrt. 4-Amino-Pyridin (4-AP; Fluka) und Tetraethylammonium (TEA; Fluka) wurden wegen der Fotosensitivität von 4-AP jeweils am Wochenanfang frisch zugesetzt und danach der pH erneut eingestellt. Die Osmolarität wurde nicht noch einmal überprüft. Danach konnten diese Lösungen für ca. 1 Woche verwendet werden, wenn sie vor Licht geschützt bei 4°C aufbewahrt wurden. Zur Separation der inaktivierenden und nicht inaktivierenden Komponenten des K<sup>+</sup>-Stroms wurde TDS mit verschiedenen Konzentrationen an Quinidin (10, 50, 70, 100 µM; Fluka) und 4-AP (5, 10, 20, 30 mM) versetzt und der pH erneut eingestellt. Die Quinidin enthaltenden Lösungen wurden ohne merklichen Wirkungsverlust bis zu 8 Wochen verwendet und bei 4°C aufbewahrt. Für die 4-AP enthaltenden Lösungen gelten obige Ausführungen. Die Osmolaritäten wurden nicht noch einmal überprüft. ACh, GABA (jeweils 1, 10, 50, 100, 500 µM) und  $\alpha$ -Bungarotoxin (5 µM) wurden jeweils in DS gelöst und bei Lagerung bei 4°C maximal eine Woche lang verwendet. Picrotoxin

(100  $\mu$ M) wurde ebenfalls in DS gelöst, aber bei Raumtemperatur in Dunkelheit gelagert und ebenfalls maximal eine Woche lang verwendet. Alle Lösungen wurden vor Verwendung auf Raumtempertur erwärmt.

Tabelle 2. Intrazelluläre Lösungen

Name der Lösung	KCl	KAsp	CsCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	ATP	GTP	EGTA	Hepes
Intra 1 [KCl]	146	0	0	1	0,5	0 oder 4	0 oder 0,5	5	10
Intra 2 [CsCl]	0	0	146	1	0,5	0 oder 4	0 oder 0,5	5	10
Intra 3 [KAsp]	0	146	0	1	0,5	0 oder 4	0 oder 0,5	5	10

Alle Angaben in mM. Lösungsmittel war doppelt destilliertes H<sub>2</sub>O. Bei Intra 2 wurde der pH mit CsOH auf 7,1 bis 7,2 eingestellt, ansonsten mit KOH (Osmolarität  $310 \pm 5$  mOsm/kg). Die Lösungen wurden zu 5 ml aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zu einem Jahr aufbewahrt. Der Inhalt eines aufgetauten Aliquots wurde in eine 5 ml Spritze gesogen und dann durch einen Sterifilter (Milipore) und eine unter Hitze ausgezogene Pipettenspitze von hinten in die Ableitpipette eingefüllt. Die aufgetaute Lösung wurde bis zu einer Woche verwendet. Adenosintriphosphat (ATP) und Guanosintriphosphat (GTP) wurden bei Messungen von ligandengesteuerten und synaptischen Strömen zugesetzt, um einer Amplitudenverringering bedingt durch die Auswaschung von sekundären Botenstoffen in der Ganzzellkonfiguration (rundown) entgegenzuwirken.

### 3 M KCl-Lösung

Zum Chlorieren der Ableitelektrode (Silber).

## **II.2. Geräte und Computerprogramme**

### Vorbereitung von Embryonen

Binokular: Wild M3B; Vergrößerung 10 bis 40x

### Bearbeitung von Kapillaren

Vertikales Pipettenziehgerät Sutter P30 (Sutter Instruments)

Kapillarschleifeanlage Bachofer Typ 462

DiI-Markierung, *in vivo* Beobachtung und Zellentnahme

Mikroskop: inverses Leitz Fluovert FU: Okulare: 12,5/20; Objektive: NPL Fluotar 10x, 25x, 40x, PL Fluotar 100x/1,32; Fluoreszenzfilter für Fluoreszein (FITC I3) und Rhodamin (N2); Quecksiber-Hochdrucklampen 50, 100 W;

Mikromanipulator: Leitz M (mechanisch)

Druckregulation: 5 ml Einwegspritze, Polyethylenschlauch

Dokumentation von morphologischen Präparaten und Zellkulturen

Mikroskope:

aufrechtes Axioplan (Zeiss): Nomarski Interferenzkontrast; Phasenkontrast; Okulare PI 10x/20; Objektive: Achrostigmat 10x, 20x, Planapochrom 63x, Plan Neofluar 100x; Optovar: 1,25, 1,6; Camera Lucida für Klonzeichnungen

aufrechtes Axiophot (Zeiss): Nomarski Interferenzkontrast ; Phasenkontrast; Okulare: PI 10x/25  
Objektive: Achrostigmat 5x, Plan Neofluar 20x, 63x, 100x, Optovar: 1.25, 1.6, 2.0, 2.5;  
Zusatzrüstung: Kamera (Progress 3012, Kontron Elektronik) zum direkten Einscannen in den Macintosh Power PC

Bildnachbearbeitung: Macintosh Power PC 9500 (80 MB RAM), Photoshop 4.0 und 5.0, Flachbrettscanner Scan Maker E6 (Microtek) mit Scan Wizard 3.1.1. Software, Illustrator 6.0 (Schemazeichnungen)

Datenspeicherung: Magneto-optical Disk (MOD 1,3 GB; Gigaburst); CD-Brenner Waitec WT 624.

Elektrophysiologie

Mikroskope:

Leitz Fluovert FU für *in vitro* Ableitungen (s.o.); Zusatzrüstung: Kameratubus mit 25x Okular und JVC TKS-350 schwarz-weiß CCD Kamera (2/3 Zoll Chip für Nachvergrößerung) Bildverarbeitungssystem C 2400-77 (Hamamatsu); schwarz-weiß Monitor; Thermoprinter Sony UP-850;

Olympus BX50WI für *in situ* Ableitungen: Nomarski Interferenzkontrast, Infrarot- und FITC-Filter; Okulare WH10/22; Optovar 1.0, 1.25, 1.6, 2.0; Objektive 10x Olympus UPlanFL, 60x Olympus LUMPlanFL/IR; Zusatzausrüstung: s.o., allerdings ohne Okular im Kameratubus

Vibrationskontrolle: schwingungsgedämpfter Tisch Isostation (Newport)

Farradaykäfig: Eigenkonstruktion

Lösungsapplikation (gravitationsgesteuert): Eigenbau bestehend aus 50 ml Spritzen, 3-Wege-Hähnen und Polyethylenschläuchen, die in einer Pipettenspitze zusammengeführt und am Mikromanipulator befestigt wurden (s. Abb. 2)

Mikromanipulatoren: MX-2 (mechanisch, für Lösungsapplikation), MHW-3 (hydraulisch, für Vorverstärker mit Patch-Pipette, beide Narashige)

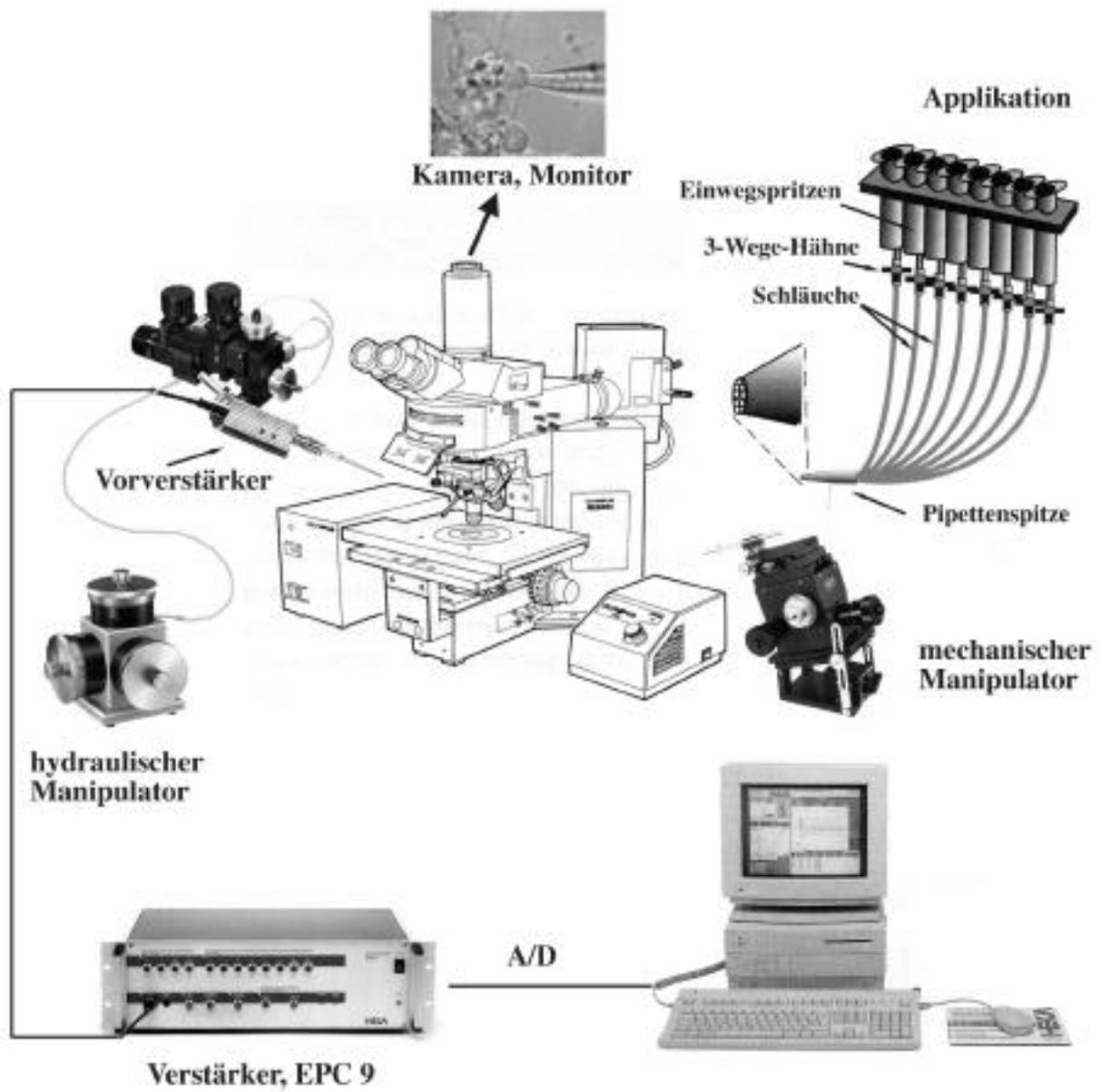
Verstärker: Patch-clamp Verstärker EPC 9 (Heka Electronics)

Datenaufnahme und Verarbeitung: Macintosh Quadra 700 (20 MB RAM), Macintosh Powerbook 5300cs (40 MB RAM); Zip-Laufwerk und Disketten (100 MB, Iomega); Pulse und Pulsefit (Heka); Igor Pro (Wave Metrics), Excel 5.0 (Microsoft)

---

### **Abb. 2 Patch-clamp Apparatur**

Die hier aufgebaute und verwendete Apparatur bestand entweder aus einem aufrechten Mikroskop (*in situ* Ableitungen) oder einem inversen Mikroskop (*in vitro* Ableitungen; nicht gezeigt). Am feststehenden Tisch des Mikroskops war der hydraulische Manipulator befestigt, der den Vorverstärker mit der Ableitpipette bewegt. Die abgeleiteten Signale wurden unter Verwendung eines EPC 9 Verstärkers aufgenommen, verstärkt, gefiltert und über den im Verstärker befindlichen analog-digital Wandler (A/D) in einen Macintosh Computer eingelesen. Die Applikation von Lösungen erfolgte über in einer Pipettenspitze zusammengeführte Polyethylenschläuche, die mit Einwegspritzen verbunden waren (gravitationsgetriebene Applikation). Die Pipettenspitze wurde mittels eines zweiten, mechanischen Manipulators bewegt. Alle Vorgänge wurden optisch unter Verwendung einer Kamera mit Zusatzvergrößerung am Monitor überwacht. Mikroskop und Mikromanipulatoren befanden sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch und waren von einem Farradaykäfig umgeben (nicht gezeigt).



**Abb.2**

Kapillaren

Borosilikatkapillarenmeterware:  $\phi_{\text{innen}} = 0,8 \text{ mm}$ ,  $\phi_{\text{außen}} = 1 \text{ mm}$  (Hilgenberg) für DiI-Markierung und Zellentnahme.

Borosilikatglas mit Filament:  $\phi_{\text{innen}} = 0,5 \text{ mm}$ ,  $\phi_{\text{außen}} = 1,5 \text{ mm}$ ,  $l = 10 \text{ cm}$  (Science Products) für elektrophysiologische Ableitungen.

Borosilikatglas ohne Filament:  $\phi_{\text{innen}} = 1 \text{ mm}$ ,  $\phi_{\text{außen}} = 1,5 \text{ mm}$ ,  $l = 8 \text{ cm}$  (Science Products) zum enzymatischen Entfernen des Neurilemms bei den *in situ* Ableitungen.

Kleingeräte

Objektträger, Deckgläser verschiedener Größen, Pasteur- und Eppendorfpipetten, typische Laborglasgeräte wie Flaschen (Schott), Pinzetten, Skalpell, Schere, Rasierklingen, Präparationsnadeln, Dreierblockschälchen, Plastilin, selbstklebende Buchfolie, Plexiglas-Rahmen zur Deckglasauflage oder als Ableitkammern (Spezialanfertigungen), Petrischalen verschiedener Größe, Wägeschälchen, PVC-Netz, Trichter, Kabel, Stecker, Silber-Silberchlorid-Pellets (Science Products) als Badelektrode, isolierte und nicht isolierte Silberdrähte, LötKolben, Multimeter.

**II.3. Fliegenstämme und Haltung**

Für die meisten DiI-Markierungen und elektrophysiologischen Ableitungen wurden Embryonen bzw. deren Zellen, von Wildtyp (WT) *Oregon R* Fliegen verwendet. Zur Identifizierung von Gliazellen wurden ferner Vorläuferzellen in Embryonen mit DiI markiert, in denen das mittels X-Gal-Färbung nachweisbare Reportergen *lacZ* über den *repo* Promotor aktiviert wurde (*repo-lacZ*; *repo<sup>2</sup>,P[lacZ]/TM3,S;P[hb-lacZ*; Karpen und Spradling, 1992). *repo* wird in allen Gliazellen im Bauchmark mit Ausnahme der Mittellinien (ML)-Glia exprimiert und ist für deren Differenzierung notwendig (Halter et al., 1995). Zur Identifizierung des Zellstammbaums der die sog. EL-Neurone enthält, wurden für die konfokale Mikroskopie Embryonen von *eagle-Gal4* Fliegen (*w/w;+/+;Mz360*; Dittrich et al., 1997) gekreuzt mit UAS-tau-GFP Fliegen (freundlicherweise von A. Brand (Cambridge, GB) zur Verfügung gestellt) mit multiplen P-Element-Insertionen im gesamten Genom verwendet (*w/w; Multi P[tau-GFP(w+)]*; freundlicherweise von O. Vef durch Verkreuzen der UAS-tau-GFP Fliegen mit TMS Fliegen (Lindsley und Zimm, 1992) als Transposasequelle hergestellt; die Transposaseaktivität wurde nach fünf Generationen eliminiert).

Um die Gal4-Aktivität zu erhöhen, wurden die Embryonen, die aus dieser Kreuzung hervorgingen, auf 29°C gehalten. Zur Identifizierung von Neuroblast (NB) 1-3 wurden Embryonen von 5953 Fliegen verwendet (*w/w; +/+; huckebein-lacZ*; freundlicherweise von C.Q. Doe (Urbana, Illinois) zur Verfügung gestellt). Um ML-Zellen in den Massenzellkulturen zu identifizieren und um in Wenigzellkulturen auf ML-spezifische Markerexpression zu testen, wurden Zellkulturen (s. II.7.) von *sim-Gal4* x UAS-GFP Embryonen hergestellt (*w/w;P[*sim-Gal4(w+)*];+/+ x +/+;P[UAS-GFP(w+)]+/+*; freundlicherweise von C. Klämbt (Köln) und A. Brand zur Verfügung gestellt). *sim* (*single minded*) wird in allen ML-Vorläufern und deren Nachkommen exprimiert (s. als Überblick u.a. Nambu et al., 1993). Um Mittellinien-Glia in der Zellkultur von ML-Neuronen zu unterscheiden, wurden anfänglich elektrophysiologische Untersuchungen auch in Kulturen durchgeführt, in denen GFP Fluoreszenz über den ML-Glia spezifischen Promotor des *slit* Gens (u.a. Rothberg et al., 1988, Sonnenfeld und Jacobs, 1994) getrieben wurde (*slit-Gal4 (w/w;P[*slit-Gal4(w+)*];+/+) x UAS-GFP (+/+;P[UAS-GFP(w+)]+/+)*; freundlicherweise von A. Brand und C. Klämbt zur Verfügung gestellt). Mit Ausnahme von *repo-lacZ* waren alle verwendeten P-Element Insertionsstämme homozygot lebensfähig. Um Hinweise auf die genetische Identität der K<sup>+</sup>-Ströme zu erhalten, wurden Ableitungen von ML-Zellen gemacht, die aus *Shaker*-Nullmutanten (*Sh<sup>14</sup>* identisch zu *Sh<sup>KS133</sup>*; Bloomington) und *Shaw*-defizienten (Df(2L)ed1;24A3-4 bis 24D3-4; Bloomington) Embryonen stammten. Das *Sh<sup>14</sup>*-Allel ist eine "Missense-Mutation" in der Kernregion des Kanals, aus der ein nicht funktionaler Kanal resultiert (Lichtinghagen et al., 1990). Die Fliegen sind homozygot lebensfähig, daher waren alle davon angefertigten Zellkulturen mutant. Für die *Shaw*-Defizienz ist in Tsunoda und Salkoff (1995b) gezeigt worden, daß sie den entsprechenden K<sup>+</sup>-Strom entfernt. Die Defizienz wurde mittels des Balancer-Chromosoms *CyOgreen* stabilisiert, was es erlaubte, den Genotyp eines Embryos und damit einer bestimmten Zellkultur in FITC-Fluoreszenzlicht zu bestimmen. Die Fluoreszenz war zwar erst in späten Embryonalstadien detektierbar (ab Stadium 15 nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997), was aber unproblematisch war, da sich die Embryonen nach Entnahme von ML-Vorläufern noch fast bis zum Larvenstadium entwickelten. Kultivierung von ML-Vorläufern defizient für *Shal* (Df(3L)kto2/*TM6Bblue*; 76B1-2 bis 76D5; Bloomington) und *Shab* (Df(2L)HR370, Dp(3;3)pdp7/*CyOgreen*; 63A1 bis 63B8-9; Bloomington) war nicht möglich, da diese aufgrund stark abnormaler Entwicklung der Embryonen nicht erkannt werden konnten. Für beide Defizienzen war zuvor gezeigt worden, daß sie die entsprechenden K<sup>+</sup>-Ströme in neuronalen Zellen in Massenkulturen entfernen (Tsunoda und Salkoff, 1995a).

Die verwendeten Stämme wurden in zylindrischen Plexiglasgefäßen, die mit einem Schaumgummistopfen verschlossen und zu 1/4 mit Nährmedium (s.o. II.1.) gefüllt waren, bei 18° oder 25°C gehalten. Einmal wöchentlich wurden Fliegen aus Gläsern mit Larven abgesammelt und eine Woche alte Fliegen auf frische Gläser gesetzt, wobei zusätzlich mit Trockenhefe angefüttert

wurde. Zur Eiablage wurden bis zu zwei Wochen alte Fliegen verwendet. Nach dieser Zeit wurden die Fliegen in Ethanol (70%) abgetötet.

## II.4. Eiablage und Vorbereitung der Embryonen

Das Protokoll folgt im wesentlichen den Beschreibungen in Prokop und Technau (1993). Zur Eiablage wurden die Fliegen (i.d.R. eine Woche alt) von den Zuchtgefäßen (s.o. II.3.) in Plexiglasgefäße mit Metallnetzboden (Luftzufuhr) überführt, diese dann mit einer vorher mit Trockenhefe bestreuten und auf Raumtemperatur erwärmten Apfelsaftagarplatte verschlossen und kopfüber in einen 25°C Brutschrank gestellt. Um möglichst viele, annähernd gleich alte Embryonen zu erhalten, wurden die Agarplatten nach jeweils 30-60 Minuten gewechselt (die Ausbeute für die erste Ablage konnte erhöht werden, indem man die Fliegen über Nacht auf den Ablagegefäßen beließ).

Die Agarplatten verblieben für weitere 2 h auf 25°C. Anschließend wurden ca. 40-100 der 2-3 h alten Embryonen (Blastodermstadien) mit einer Präpariernadel von der Platte auf ein Deckglas (22x22 mm) mit doppelseitigem Klebeband überführt. Das Deckglas lag dabei an beiden Seiten auf zwei vorher aus einer frischen Platte ausgeschnittenen Agarstreifen auf. Die Embryonen wurden mit der Präpariernadel auf dem doppelseitigen Klebeband vorsichtig hin- und hergerollt und so dechorionisiert. Der nur noch durch die Vitellinmembran geschützte Embryo haftete bei erneuter Berührung an der Präpariernadel und konnte so auf einen der beiden Agarstreifen überführt werden, wo er vor Austrocknung geschützt war. Insgesamt 20 (DiI-Markierung) oder 40-60 (Zellentnahme) dechorionisierte Embryonen wurden in einer oder mehreren Reihen so auf dem Agar orientiert, daß anterior nach oben und ventral zum Betrachter zeigte. Anschließend wurde der Agarstreifen mit einem Deckglas (22x22 mm) so weit wie möglich verkleinert. Danach wurde die Mitte eines vorher mit Heptanklebergemisch bestrichenen und gut getrockneten Deckglases (24x60 mm) auf die Embryonen gelegt und mit einer Präpariernadel wieder abgehoben. Die Embryonen klebten jetzt mit der Ventralseite auf diesem Deckglas. Zu hoher Druck beim Aufkleben führte dazu, daß die Embryonen bei der Gastrulation die ventrale Mittellinie nicht schließen konnten. Diese Fehlentwicklung trat mitunter auch punktuell auf und führte zum Fehlen der Kommissuren an den betreffenden Stellen im ausdifferenzierten Bauchmark.

Die Embryonen wurden nach dem Aufkleben mit einem aus selbstklebender Buchfolie ausgeschnittenen Rähmchen umgeben. Während dieser Zeit trockneten die nur von der Vitellinmembran geschützten Embryonen. Die Trocknung wurde fortgesetzt, bis sich unter dem Binokular (Vergrößerung 40x) leichte Falten in der Vitellinmembran zeigten. Die Trocknung ist

erforderlich, damit sich der Eiturgor vermindert und der Embryo nicht ausläuft, wenn man zum Markieren oder zur Zellentnahme mit der Kapillare in den Perivitellinraum eindringt. Zu starke Trocknung führte zu Fehlentwicklungen. Die Zeitspanne bis zum richtigen Trocknungsgrad war variabel, da sie von der Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit abhing. Die Trocknung wurde durch Überschichten der Embryonen mit einem den Gasaustausch zulassenden Öl (Voltalef 10 S Fluorocarbonöl) beendet.

Das Deckglas mit den Embryonen wurde schließlich mittels Voltaleföl auf einem Plexiglas-Rahmen (Spezialanfertigung) befestigt. Dieser ist so konzipiert, daß er das Fokussieren der Embryonen am inversen Mikroskop mit 100x bzw. 50x Ölimmersionsobjektiven erlaubt.

### **II.5. Herstellung von Markierungs-, Transplantationskapillaren und Patch-Pipetten**

Kapillaren zur Markierung mit DiI und zur Zellentnahme (Transplantationskapillaren) wurden aus Borosilikatkapillarenmeterware ( $\phi_{\text{innen}} = 0,8 \text{ mm}$ ,  $\phi_{\text{außen}} = 1 \text{ mm}$ ; Hilgenberg) hergestellt. Diese wurde zunächst mittels eines Glasschneiders in ca. 20 cm lange Stücke geschnitten, die dann mit den in Tabelle 3 aufgeführten Einstellungen auf dem Ziehgerät (Sutter P30) in zwei etwa gleich lange Stücke ausgezogen wurden. DiI-Kapillaren wurden anschließend unter einem Winkel von 25-27° auf einem Schleifgerät (Bachofer) unter optischer Kontrolle (Binokular 4x) angeschliffen. Die Schleifscheibe wurde dabei kontinuierlich mit deionisiertem Wasser befeuchtet. Um die Öffnung später beim DiI-Markieren orientieren zu können, wurde die dem Schliff abgewandte Seite mit einem Stift gekennzeichnet. Nach dem Schleifen wurde die Kapillare sofort mit destilliertem Wasser gespült. Zum Einsaugen und Auspressen des Wassers wurden eine Einwegspritze und ein Polyethylenschlauch verwendet. Anhand der Größe der beim Spülen aufsteigenden Luftblasen ist es möglich, die Größe der Kapillarenspitze zu beurteilen. Wenn diese die erforderliche Größe von ca. 1  $\mu\text{m}$  hat, sind im Wasser die Luftblasen bei guter Beleuchtung gerade noch erkennbar. Zusätzlich kann man die Kapillare in Aceton testen. Hier sollten wegen der größeren Oberflächenspannung keine Blasen mehr aufsteigen. Damit keine Spülreste in der Kapillare verblieben, wurde sie unter Druck aus der Spülflüssigkeit herausgenommen. Die Kapillaren können in einer Petrischale auf Knetgummi befestigt längere Zeit aufbewahrt werden, ohne daß die Spitzen verstopfen.

Transplantationskapillaren wurden nach dem Ausziehen mittels einer speziellen Vorrichtung am aufrechten Mikroskop (Zeiss Axiophot) bei einem Innendurchmesser von ca. 5  $\mu\text{m}$  für

Einzelzellentnahmen oder ca. 50  $\mu\text{m}$  für die Entnahme vieler Zellen abgebrochen und erstere dann unter einem Winkel von ca. 30° auf einen Spitzendurchmesser von ca. 10  $\mu\text{m}$  mit dem Schleifgerät aufgeschliffen. Die Größe des Spitzendurchmessers wurde am aufrechten Mikroskop mittels Meßokular überprüft. Die Kapillaren wurden dann mit Flußsäure gespült und wie die Di-Kapillaren gelagert. Sofern sie nach Zellentnahmen sorgfältig mit Flußsäure gespült werden, können sie mehrfach wiederverwendet werden.

Für elektrophysiologische Ableitungen wurde dickwandiges Borosilikatglas mit Filament ( $\phi_{\text{innen}} = 0,5 \text{ mm}$ ,  $\phi_{\text{außen}} = 1,5 \text{ mm}$ ,  $l = 10 \text{ cm}$ ; Science Products) verwendet. Sie wurden auf dem vertikalen Ziehgerät in zwei Stufen zu einem Widerstand von 5 bis 12 M $\Omega$  (in Intra 1 intrazellulär und DS extrazellulär) ausgezogen (Einstellungen s. Tabelle 1) und nicht hitzepoliert. Das zweistufige Ziehen wurde durch Verwendung eines Metallblocks mit justierbaren Schrauben (Patch-Block) ermöglicht. In der ersten Stufe wurde die Kapillare zunächst unter Verwendung des Patch-Blocks ca. 1 cm vorgezogen, dann unter Verwendung der anderen Seite des Blocks rejustiert, so daß der vorgezogene Teil wieder im Bereich des Heizfilaments zentriert wurde. Der Patch-Block wurde dann entfernt und die Pipette vollständig in zwei Hälften gezogen. Die entscheidenden Parameter sind dabei die Länge der ersten Stufe und die Hitze in der zweiten Stufe. Die Hitze der zweiten Stufe mußte je nach Raumtemperatur und Luftdruck innerhalb des angegebenen Bereichs variiert werden (Tab. 3), um die gewünschte Pipettengröße zu erhalten. Durch dieses Verfahren erhält man eine im Bereich der Spitze sehr schnell zulaufende Pipette, was für hohe Abdichtwiderstände zwischen Zellmembran und Pipettenglas (Seal) und geringe Serienwiderstände erforderlich ist (Penner, 1995; Numberger und Draguhn, 1996). Die Pipetten wurden jeweils vor den Ableitungen frisch gezogen und konnten ca. 1/2 Tag lang verwendet werden, bevor merkliche Verschlechterungen bei der Seal-Bildung eintraten.

Pipetten für die enzymatische Entfernung des Neurilemms vor den *in situ* Ableitungen wurden aus Borosilikatglas ohne Filament ( $\phi_{\text{innen}} = 1 \text{ mm}$ ,  $\phi_{\text{außen}} = 1,5 \text{ mm}$ ,  $l = 8 \text{ cm}$ ; Science Products) entsprechend hergestellt. Bei den Pipetten für die Neurilemm-Präparation war nur eine relativ große Öffnung (  $\approx 20 \mu\text{m}$ ) entscheidend, weshalb hier keine Anpassung der Hitze in der zweiten Stufe vorgenommen wurde.

Tabelle 3. Einstellungen am Ziehgerät Sutter P30

Verwendung der Kapillare	Einstellungen am Ziehgerät		
	Heat	Pull	Mikrometer (Lichtschanke)
DiI-Markierung	990	780	2,75
Flat-Präparation			
Zellentnahme	990	990	3,25
Neurilemm-Präparation (große Patch-Pipette)	1. Stufe	999	0
	2. Stufe	800	0
Patch-Pipette	1. Stufe	999	0
	2. Stufe	720-750	0

## II.6. Zellstammbaumanalyse mit DiI

Zur Markierung und *in vivo* Beobachtung wurde ein inverses Mikroskop (Leitz Fluovert FU) verwendet.

### II.6.1. Markierung einzelner neuroektodermaler Vorläuferzellen mit DiI

Während ein DiI-Aliquot auftaute, wurde die Kapillare mit der Öffnung der schrägen Spitze nach oben (Markierung auf der Kapillare) in den Halter am Mikromanipulator eingespannt und über einen Polyethylenschlauch mit einer 5 ml Spritze für die Druckkontrolle verbunden. Dann wurde unter optischer Kontrolle (10x Objektiv) der sichtbare Teil der Kapillare durch Aufsaugen eines auf einem Objektträger befindlichen DiI-Tropfens gefüllt. Anschließend wurde die Kapillare unter Verwendung des 20x Objektivs in Richtung x-Achse in die Mitte des Gesichtsfeldes gestellt, was gewährleistet, daß man sie beim späteren Wechsel auf das 100x Objektiv "wiederfand". Die Kapillare wurde dann mit dem Mikromanipulator angehoben und zurückgezogen, wobei nur die y-Richtung verändert wurde. Nachdem der Objektträger gegen den Plexiglas-Rahmen mit den Embryonen ausgetauscht worden war, wurden zunächst, nach optischer Kontrolle mit geringer Vergrößerung, bei der Vorbereitung beschädigte Embryonen von der Liste der zu markierenden gestrichen.

Die Markierungen erfolgten in Stadium 7 der Embryonalentwicklung (nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997), also etwa 10-20 min nach Beginn der Gastrulation (Stadium 6), die bei geringer Vergrößerung von ventral an der Mesoderminvagination und dem erscheinen der

Cephalfurche erkennbar ist. Der am weitesten entwickelte Embryo wurde ins Gesichtsfeld gebracht und dann auf das 100x Ölimmersionsobjektiv gewechselt. Dazu wurde der Rahmen mit den Embryonen kurz abgehoben, ohne dabei die Stellung des Kreuztisches zu verändern. Nachdem der entsprechende Embryo fokussiert war, wurden die Embryonen aus dem Gesichtsfeld auf die dem Mikromanipulator abgewandten Seite geschoben und mittels des Mikromanipulators die Kapillare in den Fokus gebracht. Nachdem der zu markierende Embryo wieder ins Gesichtsfeld gestellt worden war, wurde in der Kapillare hochgestiegenes Voltaleföl herausgedrückt und bis zu fünf Zellen im dorsalen Teil des Neuroektoderms (25 bis 50% ventro-dorsaler Durchmesser des Embryo entsprechend einer Entfernung von 8 bis 15 Zelldurchmessern von der Mittellinie; Abb.1) in einem Embryo markiert. Um eine Überlagerung der Klone zu verhindern, wurde in segmentalem Abstand markiert, was einer Distanz von 2-3 Zellen in anterior-posterior Richtung im Neuroektoderm entspricht. Die meisten Markierungen wurden in den Segmentanlagen T1 bis A5 gemacht.

In Abweichung von der in Bossing und Technau (1994) und Bossing et al. (1996) beschriebenen Methode, bei der die farbstoffgefüllte Kapillare zwischen der Vitellinmembran und den ventral gelegenen Vorläufern plaziert wurde (Methode 1 in Abb. 1), wurde die Kapillare hier direkt zwischen die lateral gelegenen Vorläufer geschoben (Schmidt et al., 1997); Methode 2 in Abb. 1). Dazu wurde auf eine Zelle fokussiert, deren Entfernung zur Mittellinie durch Abzählen in Zelldurchmessern ermittelt worden war, die Kapillare in den gleichen Fokus gebracht und durch Bewegen des Kreuztisches in den Embryo eingedrungen. Bei ausgeschaltetem Durchlicht wurde jetzt unter Fluoreszenzkontrolle (Fluoresceinbereich, 100 W Halogenlampe) durch leichten Druck auf die Spritze ein kleiner Tropfen der DiI-Salatöl-Lösung auf der Zellmembran abgesetzt. Der Kontakt des Tropfens mit der Zelle führte zur sofortigen Färbung der gesamten Zellmembran. Dies geschieht durch Integration und Diffusion des DiI. Intrazelluläre Membranen wurden erst langsam gefärbt. Der zurückbleibende Öltropfen klebte an der Zelle und konnte manchmal durch die Kapillarität, die entsteht, wenn man die Spritze vom Schlauch abzieht, wieder abgesaugt werden. Tropfen mit einem Durchmesser größer als  $1/2$  Zelldurchmesser führten während der weiteren Embryogenese zum Absterben oder zu einer Behinderung der Zelle. Kleine Tropfen behinderten die Zelle nicht und erlaubten ihr eine normale Entwicklung. Zu kleine Tropfen ergaben Markierungen, die später nicht erfolgreich fotokonvertiert werden konnten. Hatte der Tropfen nur mit einer Zelle Kontakt, so wurde nur diese gefärbt, eine weitere Diffusion unterblieb. Der Farbstoff wurde dann bei den Zellteilung nur auf deren Tochterzellen weitergegeben, was die Zellstammbaumanalyse ermöglichte. Da die Weitergabe des Farbstoffs über die Membrananteile erfolgt, die jede Tochterzelle von der Ausgangszelle erhält, dünnt sich dieser mit fortschreitender Teilungszahl immer mehr aus. Die Auswertung war jedoch am Ende der Embryogenese (Stadium 16/17) problemlos möglich.

Wurde eine Zelle verletzt, färbten sich sofort intrazelluläre Membranstrukturen, insbesondere die Kernmembran, was zu homogener Fluoreszenz der penetrierten Zelle führte. Demgegenüber hatten nicht penetrierte Zellen zunächst aufgrund der fehlenden Kernfärbung einen "Rand". Je nach Grad der Beschädigung starben penetrierte Zellen ab und wurden in den Perivitellinraum gedrückt oder ergaben normale Klone. Auf die Entwicklung des Embryos hatte das Absterben einer oder weniger Zellen keinen Einfluß.

## II.6.2. *In vivo* Beobachtung und Identifikation der Neuroblasten

Markierte Zellen in den Segmentanlagen T1 bis A2 konnten *in vivo* mittels Fluoreszenzanregung im Fluoreszeinbereich (FITC Filter, 100 W Halogenlampe) verfolgt werden, ohne die Zellen zu schädigen (vgl. auch Bossing et al., 1996). Für weiter posterior gelegene Markierungen war dies nicht möglich, da sie im Verlauf der Keimstreifverlängerung zu weit nach dorsal gelangten. Die markierten Embryonen wurden bis Ende Stadium 11 (Beginn der Keimstreifverkürzung) in Zeitabständen von 30-60 min beobachtet. In den Intervallen zwischen den Beobachtungen wurden die Embryonen in einer Feuchtekammer (Petrischale, ausgelegt mit befeuchtetem Toilettenpapier) im Brutschrank bei 25°C aufbewahrt.

Während der Beobachtung wurden ektodermale Teilungen und Segregationen von Neuroblasten (NBs) jeweils mit Zeitangabe notiert. Als interne zeitliche Referenz für die Zuordnung segregierender NBs zu den 5 Segregationswellen (S1-S5; Doe, 1992) diente die erste Teilung der Mittellinienzellen, die bei je nach Raumtemperatur 25-45 min nach Gastrulationsanfang stattfand (Mitte, Ende Stadium 8). Es wurde folgende Zuordnung vorgenommen (Bossing et al., 1996; Doe, 1992; Schmidt et al. 1997):

Tabelle 4: Zuordnung zu den Segregationswellen

Segregationswelle	Vollständige Delamination des NB in min nach Teilung der Mittellinie	Embryonalstadien
S1	30 min	8/9
S2	30-60 min	9/Anfang 10
S3	60-100 min	10
S4	100 min bis Beginn Stadium 11	10/Anfang 11
S5	später	Mitte/Ende 11

Die Identifikation der NBs erfolgte Mitte/Ende Stadium 11 (Beginn der Keimstreifverkürzung;) anhand der NB-Karten (Abb. 1, 5 und Doe, 1992) unter Verwendung der invaginierenden trachealen Plakoden (Segmentgrenzen), der parasegmentalen Furchen und des Abstands zur

Mittellinie als morphologischen Landmarken. Zusätzliche Kriterien waren der Zeitpunkt der Delamination, die relative Lage zu anderen NBs sowie die räumliche Anordnung und Zahl der Tochterzellen des markierten NB. Nach der Bestimmung der NBs wurden die Embryonen über Nacht in einer Feuchtekkammer bei 18°C aufbewahrt, was zu einer schadlosen Verlangsamung der Entwicklung führte, so daß am nächsten Tag eine Auswertung zum Ende der Embryonalentwicklung (Stadien 16/17) möglich war. Die unterschiedlichen Klontypen konnten dabei unter Verwendung eines Rhodamin Filtersatzes (maximaler Resonanzabsorptionsbereich von DiI) und einer 50 W Quecksilber-Hochdrucklampe (hohe Strahlungsintensität) am inversen Mikroskop bei großer Vergrößerung (50 oder 100x Objektiv) eindeutig identifiziert werden. Längere Bestrahlung unter diesen Bedingungen führte allerdings zu drastischen Intensitätsverlusten der Fluoreszenz innerhalb von 2 bis 3 Minuten. Da die Morphologie des Embryos *in vivo* weniger gut zu erkennen ist, wurden in vielen Fällen durch Fotokonversion hochauflösende Dauerpräparate hergestellt.

### II.6.3. Fotokonversion von DiI

Bei der Fotokonversion wurde durch lang andauernde Anregung der DiI-Fluoreszenz unter Verwendung eines Rhodaminfilters und einer 100 W Quecksilber-Hochdrucklampe (inverses Mikroskop, 50x Ölimmersionsobjektiv) in Tris-HCl gelöstes Diaminobenzidin (DAB) fotooxidiert. Das DAB bildete einen braunen, unlöslichen Niederschlag entlang der zuvor fluoreszenten Membranen und erlaubte so die detaillierte Darstellung von Zellmorphologien im fixierten Präparat. Das hier verwendete Protokoll ist detailliert in Schmidt et al. (1997) beschrieben und in Teilen gegenüber dem ursprünglichen Verfahren in Bossing und Technau (1994), Bossing et al. (1996) modifiziert.

Das die auf dem Deckglas aufgeklebten Embryonen bedeckende Voltaleföhl wurde mittels n-Heptan gewaschen. Nachdem die leicht flüchtigen Heptanreste verdampft waren, wurden die Embryonen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) überschichtet. Die zu konvertierenden Embryonen wurden dann mit einer ungeschliffenen DiI-Kapillare dorsal von posterior nach anterior durchstochen, aus der Vitellinmembran gezogen und wieder auf das Deckglas gedrückt. War die Kutikularisierung noch nicht zu weit fortgeschritten (bis Mitte Stadium 17), hafteten die Embryonen sofort am Deckglas und wurden beim Wegziehen der Kapillare dorsal aufgerissen. Nachdem der Darm und andere endodermale und mesodermale Organe entfernt waren, wurden die muskulösen Seiten der Embryos ebenfalls auf das Deckglas gedrückt, wo sie hafteten. Man erhielt so flache Präparate, die den dorsalen Blick auf das Zentralnervensystem (ZNS) eröffneten (Flat-Präparation). Anschließend wurden die Embryonen für sieben bis acht Minuten (min) in Formaldehyd (37%)/PBS (2:9) fixiert und fünfmal mit PBS gewaschen. Danach wurde jeder

Embryo mit der Kapillare auf ein frisches Deckglas, auf dem ein Tropfen PBS durch ein Rähmchen aus selbstklebender Buchfolie festgehalten wurde, transferiert und angedrückt. Die beste Adhäsion am Glas wurde jeweils mit frischen, unbehandelten Deckgläsern erzielt. Das PBS wurde dann gegen Kalbserum (100%) ausgetauscht und die Embryonen zur vollständigen Beendigung der Fixierung 1/2 h inkubiert. Anschließend wurde das meiste Kalbserum durch DABT ersetzt und die Embryonen einzeln, wie oben beschrieben, im Rhodaminbereich bestrahlt. Nach 5 bis 15 Minuten war die Fotooxidation des DAB i.d.R. abgeschlossen. Da längere Inkubation in DAB zu verstärktem Hintergrund führte, mußte jeder Embryo auf diese Weise einzeln bearbeitet und die Intensität der Färbung in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden.

---

### Abb. 3 Zellkulturen für die Elektrophysiologie

**A.** Die zu kultivierenden Zellen wurden unter optischer Kontrolle mittels einer Kapillare aus einem frühen Gastrulaembryo (Std. 6/7) herausgenommen, in einen Tropfen Kulturmedium auf ein Deckglas gesetzt und in einer Kammer, bestehend aus einem durchbohrten Objektträger und einem weiteren Objektträger als Deckel, verschlossen (s. Material und Methoden II.7.).

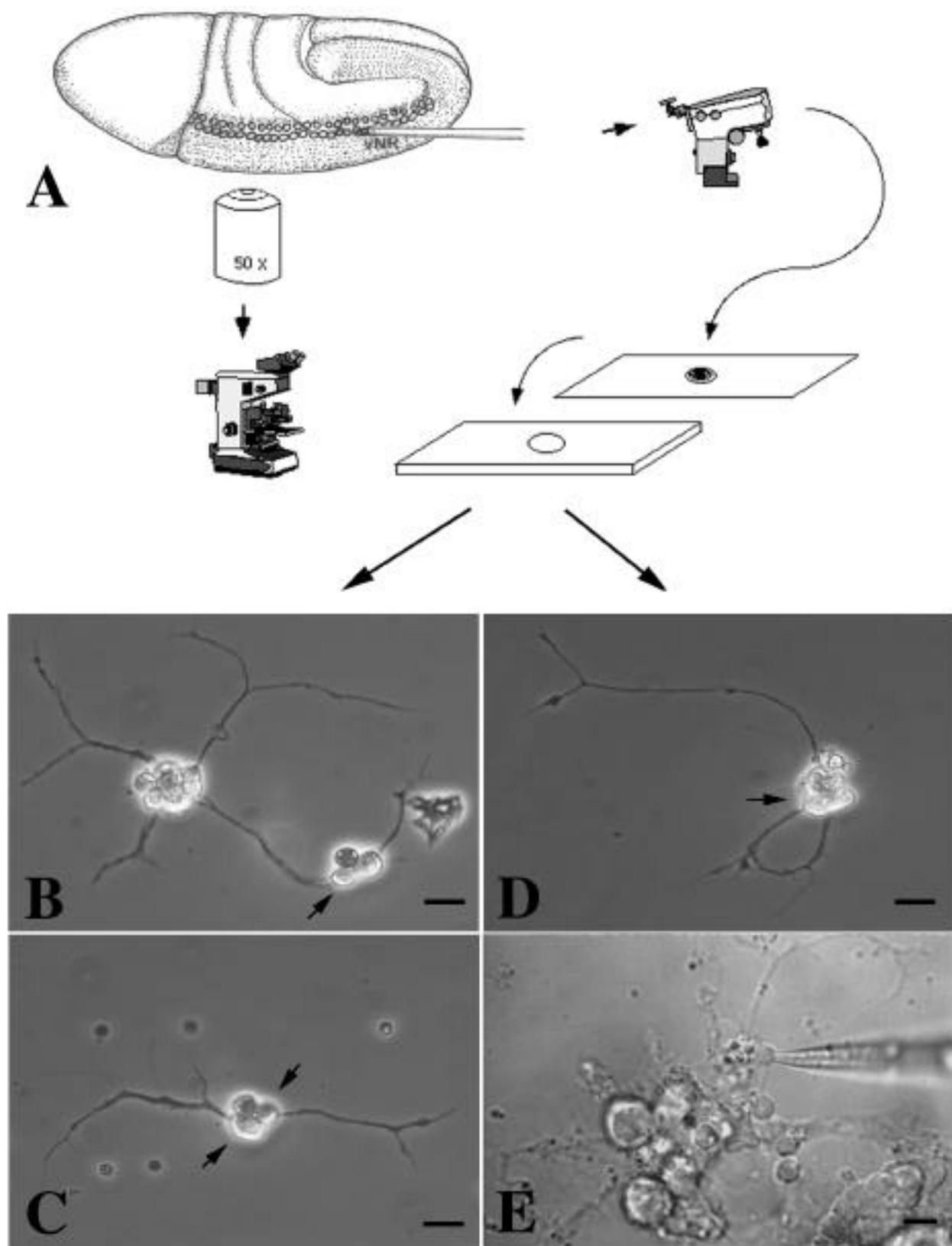
**B bis D** zeigen Phasenkontrastaufnahmen von Mittellinie (ML)-Klonen, **E** eine Nomarskiabbildung. Skalierung 10  $\mu\text{M}$ . Die schwarzen Pfeile zeigen Zellen, die typischerweise für elektrophysiologische Ableitungen benutzt wurden.

**B.** Vier bis fünf selektiv aus dem Embryo entfernte ML-Vorläufer wurden nahe beieinander in der Kulturkammer platziert, was die Ausbildung von Neuritenkontakten zwischen ihren Nachkommenzellen ermöglichte (Wenigzellkultur (WZK) mit Neuritenkontakten). Das linke Zellcluster stammt von zwei Vorläufern ab, das rechte von nur einem. In den meisten Fällen wurden radiale Projektionen beobachtet, was es anhand optischer Kriterien erlaubte, Neurone als mit hoher Wahrscheinlichkeit mit anderen verknüpft zu klassifizieren (Pfeil).

**C.** Wie B, nur daß die ML-Vorläufer an gegenüberliegenden Seiten der Kulturkammer abgesetzt wurden, was die Ausbildung von Neuritenkontakten zwischen ihren Nachkommenzellen verhinderte (WZK ohne Neuritenkontakte). Der Klon stammt von einem einzigen Vorläufer ab, und die Nachkommenzellen (Pfeile) haben höchstwahrscheinlich keine Neuritenkontakte zueinander (radiales Projektionsmuster).

**D.** In einigen Fällen wurden intraklonale Neuritenkontakte beobachtet. Die markierte Zelle wäre in einer Ableitung als Neuron in WZK mit Neuritenkontakt klassifiziert worden.

**E.** Als Kontrolle wurden die meisten Zellen von 2 bis 10 Embryonen, in denen die ML-Zellen durch GFP markiert waren (*simGal4* x UAS-GFP), entnommen und auf eine entsprechende Anzahl von Objektträgern verteilt (Embryonenkultur (EK)). In diesen Massenkulturen war es nur in Ausnahmefällen möglich zu entscheiden, ob eine ML-Zelle Neuritenverbindungen zu anderen Zellen hat oder nicht.



Das DABT wurde durch Waschen mit PBS entfernt und die Embryonen dann nochmals für 15 min in Formaldehyd/PBS fixiert. Nach Entfernen des Fixativs durch PBS wurden die Embryonen in 70% Glycerol auf einem Objektträger eingebettet und mit einem Deckglas bedeckt. Die Ränder wurden dann zum Schutz vor Verdunstung mit Nagellack versiegelt. Alternativ wurden die Embryonen nicht noch einmal fixiert, sondern immunohistochemisch behandelt (s.u.).

## II.7. Zellkultur

Die Zellkulturen wurden von Karin Lüer gemäß dem Protokoll in Lüer und Technau (1992) aus WT, *Sh<sup>14</sup>*, *Shaw*-defizienten, *sim*-Gal4 x UAS-GFP und *slit*-Gal4 x UAS-GFP Embryonen (s.o. II.3.) angefertigt, mit der Besonderheit, daß hier selektiv ML-Vorläufer kultiviert wurden. Nachdem 40-60 Embryonen wie oben beschrieben aufgezogen worden waren, wurden sie in Stadium 7 (frühe Gastrula) mittels einer geschliffenen Transplantationskapillare (Spitzen- $\varnothing$  10  $\mu$ m; s. Kapillaren) von posterior unter optischer Kontrolle (Leitz Fluovert FU) penetriert und mehrere ML-Vorläufer durch Anlegen eines leichten Unterdrucks über einen Polyethylenschlauch und eine Spritze in die Kapillare gesogen. Um ein Austrocknen der Zellen in der Kapillare zu vermeiden, wurde vor und hinter den Zellen etwas Voltalef<sup>®</sup> aufgesogen, was zudem die Sterilität erhöhte. Das Deckglas mit den Embryonen wurde dann auf dem Mikroskop gegen ein anderes mit einem Tropfen Zellkulturmedium (s.o. II.1.) ausgetauscht. Vier bis fünf der ML-Vorläufer wurden entweder dicht benachbart zueinander abgesetzt, was die Ausbildung von Kontakten zwischen den Neuriten von Tochterzellklonen begünstigte (Wenig-Zell-Kultur [WZK] mit Neuriten-Kontakt), oder an gegenüberliegenden Punkten des Tropfens ( $\varnothing$  1 cm), was die Ausbildung dieser Kontakte unmöglich machte (WZK ohne Neuriten-Kontakt). Bei der Terminologie ist zu beachten, daß sich "Kontakt" auf Neuriten-Kontakte bezieht und nicht auf Kontakte zwischen den Zell-Somata. Letztere bestehen innerhalb eines Klons unter allen beiden Kulturbedingungen (Abb. 3). Der Tropfen mit den Zellen wurde danach in einer aus zwei Deckgläsern (eines mit einer Bohrung in der Mitte,  $\varnothing$  = 1,4 cm, s.o. II.2.) bestehenden Kulturkammer mittels Vaseline verschlossen (Abb. 3A). Anschließend wurden Zellen des nächsten Embryos entsprechend präpariert. Die Zellen hefteten sich über Nacht gut an das Glas an und produzierten ausdifferenzierte Klone. Sie wurden bei 26°C in einem Inkubator für ein bis acht Tage gehalten, bevor sie für Experimente benutzt wurden.

Massenkulturen, bestehend aus den meisten Zellen eines Embryos, in denen die ML-Zellen mittels GFP markiert waren (*sim*-Gal4 x UAS-GFP), wurden auf ähnliche Weise hergestellt, außer daß mit einer größeren Kapillare (Spitzen- $\varnothing$  50  $\mu$ m) die meisten Zellen von zwei bis zehn

Embryonen entnommen und auf eine entsprechende Zahl von Kulturkammern verteilt wurden, so daß jede etwa die Zellen eines Embryos enthielt (Embryonen-Kulturen, EK). Dabei mußte durch mehrmaliges Spülen der Zellen mit Kulturmedium (Zellen aus der Kapillare in einen Tropfen Kulturmedium setzten, wieder aufnehmen und in einen frischen Tropfen setzten etc.) möglichst viel Dotter entfernt werden. Dieser hatte sich, möglicherweise aufgrund von Enzymaktivität, als für die Zellen schädlich erwiesen. Zum Testen des Modifizierten Kulturmediums (s.o. II.1.) wurden EK auch von WT Embryonen präpariert (z.T. von B. Küppers).

## II.8. Elektrophysiologie

### II.8.1. *In vitro* Ableitungen

Eine Kulturkammer mit Zellen wurde aus dem Brutschrank genommen und durch Drehen und vorsichtiges Abheben des Deckglases geöffnet. Dabei blieb das Deckglas, an dem die Zellen adhädierten, ausreichend mit Kulturmedium bedeckt, so daß die Zellen nicht vertrockneten. Das Deckglas wurde mit Vaseline so unter der Plexiglas-Ableitkammer befestigt, daß die Zellen etwa in der Mitte ihrer Öffnung zu liegen kamen. Anschließend wurde das restliche Kulturmedium durch zweimaliges Waschen mit extrazellulärer Ableitlösung auf NaCl Basis (DS, s.o. II.1.2.) entfernt und die Ableitkammer dann ca. 2 mm hoch mit DS aufgefüllt. Die Lösung auf den Zellen sollte möglichst sauber sein und keine Verunreinigungen mit Aminosäuren usw. enthalten, da diese die Ausbildung des hochohmigen Abdichtwiderstandes zwischen Patch-Pipette und Zellmembran (Seal), der unbedingte Voraussetzung für die Messung ist, verhindern können. Geringe Füllhöhen in der Ableitkammer führen zu einer Verkleinerung der Artefakte, die aufgrund der kapazitiven Eigenschaften der Patch-Pipette entstehen (Numberger und Draguhn, 1996, Penner, 1995). Die Ableitkammer mit den Zellen wurde auf dem Mikroskopisch (inverses Leitz Fluovert FU) befestigt und die Zellen anschließend bei geringer Vergrößerung in die Mitte des Gesichtsfeldes gestellt (10x, 25x Objektive). Danach wurde auf das 40x Objektiv gewechselt und die gewünschte Zelle über eine Kamera auf einen Monitor projiziert. Die dabei verwendete Zusatzausrüstung (s.o. II.2.) lieferte eine erhebliche Nachvergrößerung, so daß eine Endvergrößerung von ca. 3000x erreicht wurde. Dies ermöglichte es, bestimmte Bereiche auf der Zelle mit der Patch-Pipette gezielt anzufahren und den Vorgang optisch detailliert zu überwachen. Schließlich wurde die Badelektrode (Silber-Silberchlorid Pellet) in der Ableitflüssigkeit plaziert und die Spitzen für die gravitationsgetriebene Applikation von Testlösungen mittels des mechanischen Mikromanipulators entweder am Rand der Ableitkammer oder in die Nähe der Zelle gestellt. Eine abgeschnittene

Spritzennadel ( $\varnothing = 0.9$  mm), die über einen Polyethylenschlauch mit einer 20 ml Spritze verbunden war, wurde mittels Knetmasse so auf dem Mikroskopisch befestigt, daß sie in die Ableitkammer ragte, und ermöglichte das Absaugen von Lösungen aus der Kammer (Abb. 2).

Für Ableitungen von spannungsgesteuerten  $K^+$ -Strömen wurde anschließend eine auf einen Widerstand von 5 bis 12 M $\Omega$  ausgezogene, dickwandige Borosilikatpipette mit Filament (s.o.) mit einer Lösung auf KCl Basis (Intra 1, s.o. II.1.2.) gefüllt. Dazu wurde die Lösung aus einer 5 ml Einwegspritze durch einen 0,2  $\mu$ m Millipore-Filter und eine dünn ausgezogene Pipettenspitze von hinten in die Patch-Pipette eingefüllt. Das Filament sorgte dafür, daß die Lösung bis in die Spitze gelangte. In einigen Fällen wurde statt Intra 1 eine Intrazellulärlösung auf KAsp Basis (Intra 3, s.o. II.1.2.) verwendet, ohne daß dabei Unterschiede gegenüber den Ableitungen mit Intra 1 festgestellt wurden. Unterschiede wären zu erwarten gewesen, wenn zusätzlich zu den zu beobachtenden  $K^+$ -Strömen noch  $Cl^-$ -Leitfähigkeiten vorhanden gewesen wären. Allerdings führte die Verwendung von Intra 3 zu einer Verringerung des Störungsrauschens (Noise). Deshalb wurde Intra 3 in einigen Fällen nach Anreicherung mit ATP und GTP zur Ableitung von synaptischen Strömen verwendet. In den meisten Fällen wurden diese jedoch mit entsprechend angereicherter Intra 1 gemessen, da bei Verwendung von Intra 3 keine auswärtsgerichteten  $Cl^-$ -Ströme sichtbar wären. ATP und GTP wurden zugesetzt, um einer eventuellen Verminderung der Stromamplituden aufgrund der Auswaschung von sekundären Botenstoffen (rundown) in der Ganzzell-Meßkonfiguration entgegenzuwirken (u.a. Hille, 1992, Numberger und Draguhn, 1996). Für Ableitungen von spannungsgesteuerten Einwärtsströmen und ligandengesteuerten Strömen wurde KCl intrazellulär durch CsCl (Intra 2, s.o. II.1.2.) ersetzt. Intrazelluläres  $Cs^+$  blockiert  $K^+$ -Kanäle, was zur Isolation der Einwärtsströme ausgenutzt wurde (u.a. Hille, 1992). Ohne zusätzliche extrazelluläre Blocker war die Isolation allerdings häufig unvollständig. Einige anfängliche Ableitungen von ligandengesteuerten Strömen wurden mit Intra 1 durchgeführt, ohne daß sich hierbei Unterschiede gegenüber den späteren Ableitungen mit Intra 2 zeigten. Um einer Stromamplituden-Verringerung entgegenzuwirken, mußte bei der Messung von  $\gamma$ -Amino-Buttersäure (GABA) gesteuerten Strömen der Pipetten-Lösung wiederum ATP und GTP zugesetzt werden.

Ganzzell-Ableitungen mit der Patch-clamp Technik wurden in der Ganzzell-Konfiguration entsprechend den Ausführungen in Hamill et al. (1981) durchgeführt. Nachdem die elektrolytgefüllte Ableitpipette in den Halter am Vorverstärker (head stage) eingespannt worden war, wurde durch Blasen in eine Pipettenspitze, die über einen Polyethylenschlauch mit der Ableitpipette verbunden war, ein Überdruck angelegt und durch Schließen eines Drei-Wege-Hahns aufrechterhalten. Hierdurch wurde verhindert, daß eventuelle Verunreinigungen im Bad die Pipettenspitze verstopften. Die Ableitpipette wurde anschließend mittels der mechanischen Komponenten des hydraulischen Manipulators unter optischer Kontrolle (10x Objektiv) in die Nähe

der zuvor ausgesuchten Zelle bewegt. Dabei wurde beim Eintauchen in das Bad der biphasische, rechteckförmige Testpuls sichtbar (+5 bzw. -5 mV für die zweite Phase, 5 ms; Verstärkung 1 mV/pA). Dieser war so getriggert, daß sich auf dem von der Software (Pulse) simulierten Oszilloskop ein stehendes Bild ergab. Damit während der Messung das vorgegebene Kommandopotential auch tatsächlich an der Membran anlag, war es u.a. erforderlich, das jetzt entstandene Offset-Potential zu korrigieren ("nullen"). Dieses setzt sich aus zwei wesentlichen Quellen zusammen: unterschiedliche Polarisierung an den Silber/Silberchlorid Elektroden in den unterschiedlichen Elektrolyten (Elektrodenpotential) sowie dem Übergangspotential (liquid junction potential) zwischen den Elektrolyten selbst. Da letzteres nach der Seal-Bildung entfällt (die Pipettenlösung steht jetzt in Kontakt zum Zytoplasma und nicht mehr zur Badlösung), muß es vom Offset-Korrekturwert wieder abgezogen werden (Neher, 1995). Dies wurde bei entsprechender Eingabe während der Messung von Pulse automatisch gemacht. Da die Seal-Bildung stets in DS als Badlösung durchgeführt wurde, wurde nach Neher (1992) von einem Übergangspotential von 3 mV bei Verwendung von Intra 1, 2 und von 10 mV bei Verwendung von Intra 3 ausgegangen.

Zur Ausbildung des Seals wurde jetzt auf das 40x Objektiv gewechselt und der Vorgang unter Ausnutzung der Kamerazusatzvergrößerung am Monitor überwacht. Die Verstärkung wurde auf 5 mV/pA hochgesetzt, das Offset-Potential erneut korrigiert, der Testpuls zusätzlich mit einem akustischen Signal gekoppelt und die Ableitpipette unter Verwendung der Hydraulik des Manipulators vorsichtig auf dem Zellsoma aufgesetzt. Der Kontakt mit der Zellmembran wurde dabei an drei Faktoren erkannt: Aufgrund des Widerstandes, den die Zelle dem Stromfluß zwischen Ableit- und Badelektrode entgegensetzte, verringerte sich die Amplitude des Testpulses am Oszilloskop leicht. Gleichzeitig stieg die Tonhöhe am angekoppelten akustischen Signalgeber. Schließlich zeigte sich auf dem Monitor meist ein halbkreisförmiger Lichtreflex, der durch Eindellung der Zellmembran durch die aus der Pipette strömende Flüssigkeit entsteht. Durch Reduktion des Drucks auf der Ableitpipette (Öffnen des Drei-Wege-Hahns) wurde jetzt die Zellmembran angesogen und es bildete sich i.d.R. ohne Anlegen eines weiteren Unterdrucks spontan der hochohmige Abdichtwiderstand (Seal) aus. Die Qualität des Seals (sein Widerstand) wurde anhand der Anzeige auf dem Bildschirm und durch Umschalten zu hohen Verstärkungen (50 bis 100 mV/pA) ermittelt. Die Seal-Widerstände lagen typischerweise zwischen 8 und 11 G $\Omega$ . Nach Ausbildung des Seals wurden die schnellen kapazitiven Artefakte, die durch Umladung des nunmehr "geklemmten" Membranstücks entstehen, über die "Auto-C-fast" Kompensation am EPC 9 korrigiert, dieser in den "on cell" Modus umgeschaltet, die Verstärkung auf 20 mV/pA erhöht und die Haltespannung auf -60 mV eingestellt. Durch kontinuierliches und mäßiges Saugen wurde die Zelle dann zur Ganzzell-Konfiguration geöffnet, was am Auftreten großer kapazitiver Artefakte, nunmehr aus der Umladung der gesamten Zellmembran, erkannt wurde. Diese wurden über die "Auto-C-slow" Kompensation korrigiert, der Verstärker in den "whole cell" Modus geschaltet und

die Verstärkung i.d.R. auf 10 mV/pA reduziert. Die Eingangswiderstände der Zellen lagen typischerweise zwischen 1 und 1,5 G $\Omega$  und nur solche Zellen, bei denen der Eingangswiderstand  $\geq 1$  G $\Omega$  war, wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Um Fehler bei der Messung des Ruhemembranpotentials gering zu halten, die aus dem parallel zum Membranwiderstand liegenden Widerstand zwischen Pipette und Zellmembran (Shunt) resultieren, wurden solche Zellen, bei denen das Verhältnis zwischen Seal-Widerstand und Eingangswiderstand kleiner als 5:1 wurde, von der Auswertung ausgenommen. Aufeinanderfolgende Aktionen am Verstärker wurden mittels der Pulse-Software zu Makros zusammengefaßt. Die Verwendung von sog. "Zap"-Pulsen, dies sind kurze Spannungspulse zum Destabilisieren der Membran, hatte sich zum Herstellen der Ganzzell-Konfiguration als nicht sinnvoll erwiesen. Vielmehr führten sie häufig zum Verlust des Seals.

Die Signale wurden unter Verwendung des EPC 9 und Pulse mit 5 bis 20 mV/pA verstärkt, mit 2 bis 5 kHz (4-Pol Bessel) gefiltert und mit einer Digitalisierungsrate von 4 bis 40 kHz in einen Macintosh Computer aufgenommen. Abgeleitet wurde nur von Zellen, bei denen der Serienwiderstand unter 60 M $\Omega$  lag. Die Serienwiderstände wurden unter Verwendung von Pulse zu 70 bis 80% kompensiert, was bei typischen Stromamplituden von  $\leq 500$  pA zu einem Spannungsfehler von  $\leq 9$  mV führte. Für Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ströme wurden die Kommandospannungen bei der Auswertung entsprechend korrigiert. Leckströme wurden aus hyperpolarisierenden Spannungssprüngen unter  $-60$  mV, wo keine spannungsgesteuerten Leitfähigkeiten beobachtet wurden, ermittelt. Obwohl sie meist vernachlässigbar klein waren ( $\leq 1\%$  des Stroms), wurden sie bei der Auswertung routinemäßig subtrahiert. Die durch Pulse ermöglichte Subtraktion dieser Leckströme während der Messung (online; P/4) wurde nur für die graphische Präsentation einiger Ströme verwendet.

Die Spannungskontrolle bei den Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Strömen war nicht immer perfekt, was darauf hindeuten könnte, daß nicht unerhebliche Anteile dieser Kanäle in den Zellprojektionen lokalisiert waren (sog. "space clamp" Problem; s.u.a. Numberger und Draguhn, 1996; Penner, 1995). Für die quantitative Analyse wurden nur diejenigen Zellen berücksichtigt, in denen eine angemessene Spannungskontrolle erzielt wurde. Die Kontrolle wurde als angemessen betrachtet, wenn Ströme zu niedrigeren Kommandopotentialen nicht wesentlich gegenüber denen für höhere Spannungen verzögert waren ( $\leq 1$  ms) und die Zeit zum Erreichen der Maximalamplitude  $\leq 1$  ms war.

Aufgrund der diversen Testlösungen, die teilweise auch für die Zellen toxische Substanzen enthielten (s.u. II.8.3.), wurde nach erfolgreicher Messung jeweils ein neues Deckglas mit frischen Zellen verwendet.

## II.8.2. *In situ* Ableitungen

Nachdem ein Deckglas mit Vaseline unter der Ableitkammer befestigt worden war, wurden einige Embryonen mittels doppelseitigem Klebeband am Rand der Kammer befestigt und, wie oben beschrieben, unter optischer Kontrolle (Binokular; II.4.) mechanisch dechorionisiert. Ein kurz vor dem Schlüpfen befindlicher Embryo (spätes Stadium 17; erkennbar an luftgefüllten Tracheen und kontraktile Schlupfbewegungen) wurde dann mit der Präpariernadel an den Rand des Deckglases überführt und mit DS überschichtet. Anschließend wurde er mit feinen Dumont-Pinzetten anterior und posterior ergriffen und in zwei Hälften geteilt. Dabei "fiel" i.d.R. das ZNS frei heraus. Nachdem es mittels einer DiI-Kapillare vorsichtig von anhängenden Darmresten und Speicheldrüsen befreit worden war, wurde das ZNS mit der Kapillare in die Mitte des Deckglases transferiert und dort durch leichtes Andrücken zur Adhäsion gebracht. Dabei konnte wahlweise die dorsale oder die ventrale Seite des ZNS zum Betrachter zeigen. Meist wurde auf unbehandelten Deckgläsern eine ausreichende Adhäsion erreicht. Die Präparationsreste wurden durch zweimaliges Spülen mit DS entfernt und die Ableitkammer dann ca. 5 mm hoch mit DS gefüllt. Die gegenüber II.8.1. größere Füllhöhe war erforderlich, da die *in situ* Ableitungen am aufrechten Mikroskop (Olympus) mit Wasserimmersionsobjektiven gemacht wurden.

---

### Abb. 4 *In situ* Präparation für die Elektrophysiologie

Gezeigt ist die dorsale Ansicht eines zuvor aus einem kurz vor dem Schlüpfen befindlichen Embryo (spätes Std. 17) herauspräparierten ZNS (s. Material und Methoden II.8.2.). Der Doppelpfeil gibt die Orientierung der anterior-posterior Achse an: anterior oben rechts. Skalierung 20 µm.

**A.** Eine mit 1% Protease in DS gefüllte patch-Pipette mit einem großen Spitzendurchmesser ( 20 µm; vgl. Material und Methoden II.5.) ist mit dem Bauchmark in Kontakt gebracht worden und ein Teil des Neurilemms ist eingesogen (Pfeilspitze). Dieser Teil des Neurilemms wurde für ca. 2 min zur enzymatischen Verdauung in der Pipette gehalten und danach durch Wechsel von Über- und Unterdruck auf der Pipette aufgerissen.

**B.** In denen vom Neurilemm befreiten Neuromeren waren Zellkörper und Neuropil (NP) klar erkennbar und lagen frei zugänglich für die Ableitpipette. Allerdings wurde häufig - wie auch hier gezeigt - die charakteristische Lagebeziehung zwischen Zellen zerstört, so daß die Identifizierung individueller Zellen ohne zusätzliche Markerexpression nicht möglich war.

**C.** Eine Zelle im Bereich der dorsalen Mittellinie des Bauchmarks ist "angepatcht" worden (Pfeilspitze).

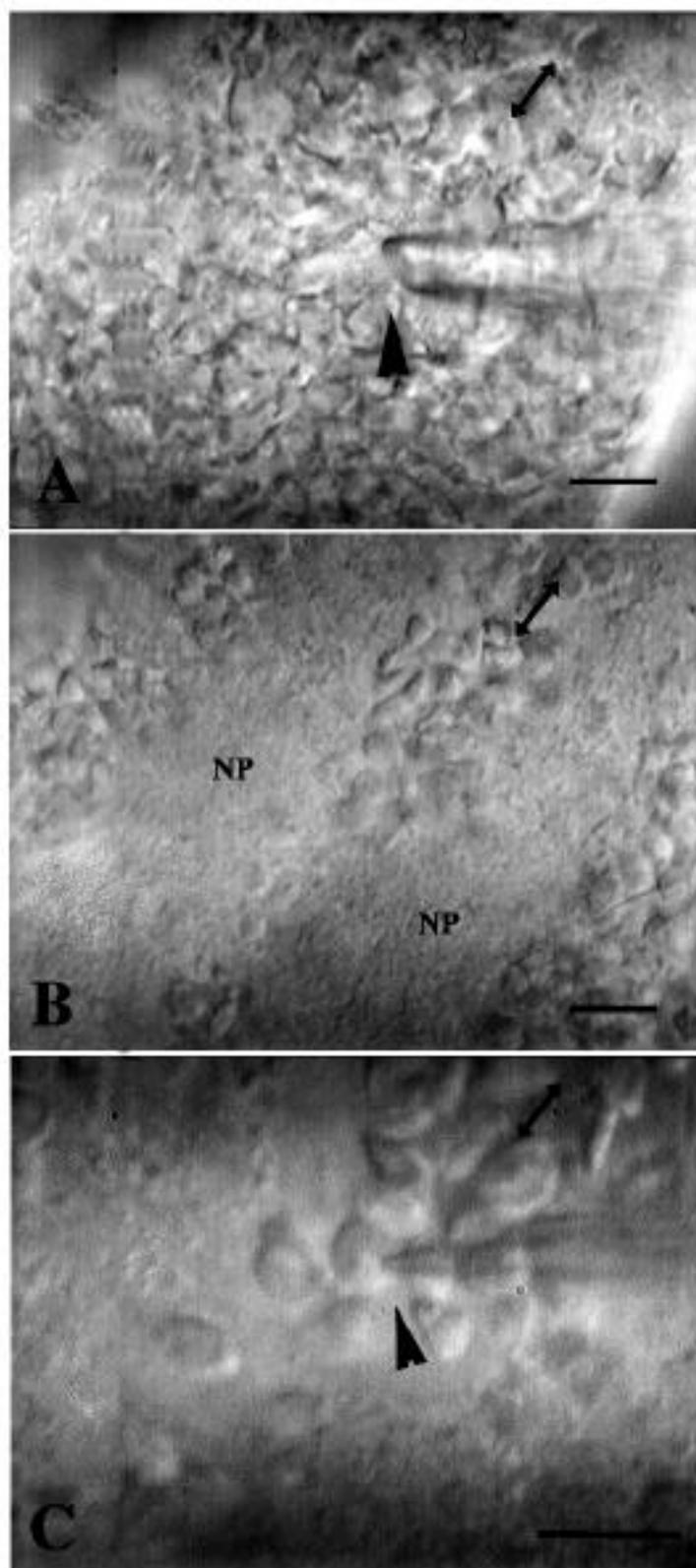


Abb.4

Die weitere Präparation erfolgte in Anlehnung an die in Baines und Bate (1998) beschriebene Methode. Nachdem die Ableitkammer auf dem Mikroskopisch befestigt und das ZNS bei kleiner Vergrößerung (10x Objektiv) in die Mitte des Gesichtsfeldes gestellt worden war, wurden die Badelektrode sowie die Applikations- und Absaugspitzen entsprechend II.8.1. positioniert. Eine große Patch-Pipette aus Borosilikatglas ohne Filament (Spitzen- $\phi$  20  $\mu$ m) wurde mit 1% Protease Typ 14 (Sigma) in DS gefüllt. Wegen des fehlenden Filaments wurde zunächst die Spitze durch Eintauchen in die Lösung 1 - 2 mm hoch gefüllt (Kapillarität) und die Pipette dann um weitere 3-5 mm von hinten (s. II.8.1.) aufgefüllt. Etwaige Luftblasen wurden entfernt, indem mit dem Finger gegen die Pipette geklopft wurde. Die Pipette wurde im Halter am hydraulischen Manipulator (head stage) eingespannt und leichter Überdruck auf die Spitze gegeben. Sie wurde unter optischer Kontrolle (10x Objektiv, 2.0 Optovar, Monitor, Endvergrößerung nach Kamera ca. 750x) mit abdominalen Bereichen des Bauchmarks in Kontakt gebracht (vgl. zur Prozedur II.8.1.). Durch Reduktion des Überdrucks und leichtes Saugen wurde dann ein Teil des das ZNS einhüllenden Neurilemms in die Pipette gesogen und für ca. 2 min zur enzymatischen Verdauung darin gehalten (Abb. 4A). Danach wurde durch vorsichtiges Saugen und Pusten ein Loch in das Neurilemm gerissen, so daß die Zellen in ein bis zwei Neuromeren frei und für die Ableitelektrode zugänglich lagen (Abb. 4B,C). Bei der Präparation wurde häufig die charakteristische Lage von Zellen verändert, so daß die Identifizierung individueller Zellen ohne zusätzliche Markerexpression nicht möglich war. Gelegentlich wurden Zellen geschädigt, die sich dann aus dem Gewebeverband lösten. Von diesen konnte i.d.R. nicht mehr abgeleitet werden.

Die Pipette mit der Enzymlösung wurde durch eine mit Intra 1 gefüllte Ableitpipette ausgetauscht und das Bad vor deren Eintauchen unter Verwendung der gravitationsgetriebenen Applikation zwei mal mit DS gespült. Die Ableitpipette wurde mittels des hydraulischen Manipulators unter Kontrolle mit dem 10x Objektiv in die Nähe der gewünschten ZNS-Region gebracht. Anschließend wurde auf das 60x Wasserimmersionsobjektiv gewechselt und die Pipette in die Nähe der gewünschten Zelle gebracht. Die Seal-Bildung wurde entsprechend den Ausführungen in II.8.1. unter optischer Überwachung am Monitor (2.0 Optovar, Endvergrößerung nach Kamera ca. 4500x) durchgeführt. Durch Justieren des Überdrucks auf der Pipette konnten Seals auf Zellen, die bis zu drei Zellschichten tief im Bauchmark lagen, erreicht werden. Die Seal-Widerstände lagen i.d.R. zwischen 6 und 10 G $\Omega$ , also etwas niedriger als *in vitro*. Im Unterschied zu Zellen *in vitro* (II.8.1.) wurde die Ganzzell-Konfiguration hier meist durch eine Kombination aus Unterdruck auf der Pipette und kurzen "Zap"-Pulsen (Amplitude 650 bis 900 mV, Dauer 900 ms) erreicht. Die Eingangswiderstände der Zellen lagen i.d.R. zwischen 1 und 3 G $\Omega$  und damit höher als bei den ML-Neuronen *in vitro*. Für die Ermittlung des Ruhemembranpotentials wurden nur Zellen berücksichtigt, bei denen das Verhältnis zwischen Seal- und Eingangswiderstand nicht schlechter

als 5:1 war, wodurch der aus dem Shunt-Widerstand resultierende Fehler in den passiven Membranen möglichst gering gehalten wurde. Hinsichtlich der Serienwiderstände und dem weiteren Vorgehen gelten die Ausführungen in II.8.1. sinngemäß. Nach erfolgreicher Messung wurde ein frisches Präparat verwendet.

### II.8.3. Isolation der ionischen Ströme und Datenauswertung

Zur Isolation von verschiedenen ionischen Strömen wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Badlösungen benutzt (Tabelle 1; Pipettenlösungen s.o. II.8.1.). Die Standardringerlösung DS wurde für die Seal-Bildung und zur Ableitung von Acetylcholin (ACh)- und GABA-gesteuerten Strömen verwendet. Um einen Einfluß hoher extrazellulärer  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen auszuschließen, wurden synaptische Ströme sowohl mit DS als auch mit einer Badlösung mit geringerer  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Konzentration (DS 1) gemessen. Für spannungsgesteuerte  $Na^+$ - Ströme wurde extrazelluläres  $Ca^{2+}$  durch  $Mg^{2+}$  ersetzt (0  $Ca^{2+}$ -DS) und für die Analyse von spannungsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Strömen wurden hohe Konzentrationen an extrazellulärem  $Ba^{2+}$  eingesetzt (Ba-TDS).  $Ba^{2+}$  ist durch viele  $Ca^{2+}$ -Kanäle - wie auch die hier gefundenen - wesentlich permeabler als  $Ca^{2+}$  selbst (Hille, 1992), führte dadurch zur Vergrößerung des Stroms und ermöglichte seine Analyse. Neben der durch die Verwendung von intrazellulärem  $Cs^+$  verursachten Blockade von  $K^+$ -Strömen wurden für die Ableitung der Einwärtsströme den jeweiligen Badlösungen noch 10 mM 4-AP und 20 mM TEA zur extrazellulären Blockade der  $K^+$ -Ströme zugesetzt (II.1.2.). Für die Messung von  $K^+$ -Strömen wurde extrazelluläres  $Na^+$  durch Tris-X ersetzt und entweder  $Ca^{2+}$  im Bad belassen ( $Ca^{2+}$ -TDS) oder auch entfernt (TDS), ohne daß in den Ableitungen Unterschiede zwischen den beiden Lösungen offensichtlich gewesen wären. Dies spricht dafür, daß entweder keine oder nur sehr kleine  $Ca^{2+}$  aktivierten  $K^+$ -Leitfähigkeiten vorhanden waren (Hille, 1992). Die inaktivierende und die nicht inaktivierende Komponente des  $K^+$ -Stroms wurden entweder durch Zugabe von Quinidin oder 4-AP in verschiedenen Konzentration zur Badlösung (II.2.1.) pharmakologisch oder durch depolarisierende Präpulse elektrophysiologisch separiert.

Die sog. "Steady State" Inaktivierung der spannungsgesteuerten  $K^+$ -Kanäle wurde aus den maximalen Stromamplituden ermittelt, die durch einen Testpuls auf 0 oder 50 mV im Anschluß an größer werdende depolarisierende Präpulse (1s) ausgelöst wurden. Dabei wurden durch die unterschiedlichen Präpulse verschieden große Teile des Stroms inaktiviert, so daß man während des Testpulses nur noch die bis dahin nicht inaktivierten Anteile sah. Trägt man deren Maximalamplituden gegen das jeweilige Präpuls-Potential auf, erhält man eine für den jeweiligen Kanal und seinen funktionalen Zustand charakteristische Strom-Spannungs-Beziehung (IV-Kurve). Um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Zellen herzustellen, wurden die Werte jeweils

hinsichtlich des größten Wertes normiert. Die Aktivierung aller spannungsgesteuerten Kanäle ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) wurde, ausgehend von einem Haltepotential von  $-100$  mV, aus den Stromantworten auf größer werdende depolarisierende Kommandospannungen ermittelt. Für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme wurden dann die normierten Maximalamplituden gegen die jeweilige Kommandospannung aufgetragen. Die  $\text{K}^+$ -Ströme wurden nach Ohm in Leitfähigkeiten umgerechnet (Formel 1) und diese dann nach Normierung gegen die Kommandospannungen aufgetragen. Dabei wurde nach Nernst (Formel 2) ein Umkehrpotential von  $-80$  mV zugrunde gelegt. Bei der Berechnung wurde von einer extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration von  $146$  mM und einer intrazellulären von  $6$  mM ausgegangen. Die intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration wurde mit der in der Ableitpipette gleichgesetzt, was gerechtfertigt erschien, da die Zellen nach dem Öffnen in die Ganzzell-Konfiguration vollständig equilibriert werden und das Pipetten-Volumen in guter Näherung gegenüber dem Zytoplasma unendlich groß ist. Durch die Umrechnung auf Leitfähigkeiten werden Effekte eliminiert, die ausschließlich aus der Erhöhung der treibenden elektromotorischen Kraft auf das jeweilige Ion durch Erhöhung der Kommandospannung resultieren. Das Umkehrpotential des  $\text{K}^+$ -Stroms wurde in Deaktivierungs-IV-Kurven (sog. tail-current Protokolle; Daten nicht gezeigt) zu  $-65$  bis  $-75$  mV experimentell bestimmt. Da diese Messungen jedoch nur an wenigen Zellen mit zufriedenstellender Qualität durchgeführt werden konnten ( $n = 4$ ), wurde, wie in vielen Arbeiten an Insektenzellen üblich (z.B. Schäfer et al., 1994; Tsunoda und Salkoff, 1995a,b; Hevers und Hardie, 1995), von dem kalkulierten Wert von  $-80$  mV ausgegangen. Für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme konnte eine Umrechnung auf Leitfähigkeiten nicht durchgeführt werden, da extrazelluläres  $\text{Ba}^{2+}$  als permeables Ion verwendet wurde, sich mithin kein Umkehrpotential für  $\text{Ca}^{2+}$  ermitteln ließ. Für den  $\text{Na}^+$ -Strom wurde die Umrechnung nicht durchgeführt, da nur ein Strom auftrat. Hinsichtlich der verwendeten Protokolle und Umrechnungen vgl. u.a. Halliwell et al. (1994, Hille (1992), Ogden und Stanfield (1994), Sontheimer (1995), Standen et al. (1994).

$$(1) \text{ Ohmsches Gesetz} \quad V - V_{\text{rev}} = R \cdot I \quad G = 1/R$$

wobei  $V$  die Kommandospannung,  $V_{\text{rev}}$  das Umkehrpotential,  $R$  der Widerstand,  $I$  der Strom und  $G$  die Leitfähigkeit ist. Für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ströme wurde die Kommandospannung zuvor hinsichtlich des aus dem verbleibenden Serienwiderstandes resultierenden Spannungsfehlers korrigiert (s.o. II.8.1.).

(2) Nernst-Gleichung  $E_K = (R \cdot T / F) \cdot \ln([K_a] / [K_i])$

wobei  $E_K$  das  $K^+$ -Gleichgewichtspotential, R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur, F die Faraday Konstante,  $[K_a]$  die  $K^+$ -Konzentration außen und  $[K_i]$  die  $K^+$ -Konzentration innen sind. Bei Raumtemperatur gilt:  $R \cdot T / F \approx 25 \text{ mV}$ .

Die normierten IV-Kurven für die  $K^+$ -Ströme wurden mit einer Boltzmann-Verteilung gefittet:

(3)  $I / I_{\max}$  oder  $g / g_{\max} = 1 / [1 + \exp(V_{1/2} - V) / S]$

wobei  $V_{1/2}$  die halbmaximale Inaktivierung/Aktivierung und S die Steigung der Spannungsabhängigkeit sind. Allgemein gibt eine solche Verteilung die Wahrscheinlichkeit an, mit der man ein Teilchen (hier den Ionenkanal) in einem von zwei möglichen Energiezuständen (hier offen oder geschlossen) finden kann (Hille, 1992).

Für die Inaktivierung von  $K^+$ -Kontrollströmen und den nicht inaktivierenden Teil des Stroms wurden bessere Anpassungen an die Daten mit einer Summe aus zwei Boltzmann-Verteilungen erhalten:

(4)  $I / I_{\max} = a / [1 + \exp(V_{1/2} - V) / S] + b / [1 + \exp(V_{1/2} - V) / S]$ .

Die Verteilung der Maximalamplituden des  $Ca^{2+}$ -Stroms entlang der Kommandospannungen wurde mit einer Gauß-Verteilung gefittet:

(5)  $f(x) = (1 / \sigma \sqrt{2\pi}) \exp(-((x - \mu)^2 / 2 \sigma^2))$

wobei  $x = \mu$  der Mittelwert und  $\sigma$  die Standardabweichung sind.

Zeitkonstanten für die Inaktivierung der  $Ca^{2+}$ -Ströme mit Anfangsamplitude  $a_0$  in Abhängigkeit von der Zeit ( $I(t)$ ) wurden mit folgender Gleichung gefittet:

(6)  $I(t) = a_0 + a_1 \exp(-t / \tau)$

ACh- und GABA-gesteuerte Ströme wurden ausgelöst, indem 100  $\mu\text{M}$  ACh oder GABA (Sigma) gelöst in DS unter Verwendung der gravitationsgetriebenen Applikation auf die untersuchte Zelle gegeben wurden. Um einen schnellen Anstieg der Transmitterkonzentration im Bereich der

Zelle zu erreichen, wurden die Applikationsspitzen maximal 10  $\mu\text{m}$  (ca. 2 Zelldurchmesser) von der Zelle entfernt plziert. Bei der Auswertung wurden nur solche Zellen berücksichtigt, bei denen sich ein schneller Anstieg des Stroms zeigte. Während der Transmitterapplikation wurde die Zelle auf einer Kommandospannung von -60 mV geklemmt. Als Kontrolle wurde jeweils vor der Transmitterapplikation DS alleine appliziert, ohne daß dabei eine Veränderung auf der Stromspur zu sehen war. Ungefähre Dosis-Wirkungs-Kurven wurden durch Verwendung von 5 verschiedenen Transmitterkonzentrationen (in  $\mu\text{M}$ : 1, 10, 50, 100, 500) für jeden der beiden Transmitter erstellt und mit der Hill-Gleichung gefitted:

$$(7) \quad y = 1/[1+(x/EC_{50})^n]$$

wo  $y$  der normierte Maximalstrom,  $x$  die Transmitterkonzentration mit  $EC_{50}$  als der Konzentration, die eine halbmaximale Stromantwort hervorruft, und  $n$  der Hill-Koeffizient, der die Steigung der Kurve festlegt, sind.

Die Umkehrpotentiale der ligandengesteuerten Ströme wurden durch Erhöhung der Kommandospannungen in 10 mV Inkrementen bestimmt, wobei zwischen zwei Transmitterapplikationen jeweils für 2 min mit DS gewaschen wurde.

Zur pharmakologischen Untersuchung des von ACh ausgelösten Stroms wurde zunächst als Kontrolle 100  $\mu\text{M}$  ACh appliziert. Anschließend wurde 5  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Bungarotoxin (Sigma) gelöst in DS als pharmakologischer Blocker zum Bad hinzugegeben (Endkonzentration ca. 2,5  $\mu\text{M}$ ) und für 15 min inkubiert, bevor ACh erneut appliziert wurde. Nachfolgend wurde für 5 min mit DS gewaschen und dann erneut ACh appliziert. Zur pharmakologischen Blockade des durch GABA hervorgerufenen Stroms wurden nach Auslösung eines Kontrollstroms 100  $\mu\text{M}$  Picrotoxin (Sigma) und 100  $\mu\text{M}$  GABA, beide in DS gelöst, co-appliziert. Anschließend wurde für 5 min mit DS gewaschen und dann erneut GABA allein appliziert.

Alle Fits wurden unter Verwendung von Algorithmen für kleinste quadratische Abweichungen mit Igor Pro (Wave Metrics; Formeln 3-5,7) oder Pulsefit (Heka; Formel 6) durchgeführt.

Zur Untersuchung möglicher funktionaler synaptischer Kontakte wurde DS, bei der 50 mM NaCl durch KCl ersetzt worden waren (DS 2, Tabelle 1), mittels einer zweiten Patch-Pipette, die anstelle der Applikationsspitzen der gravitationsgetriebenen Einrichtung in den mechanischen Manipulator eingespannt worden war, unter optischer Kontrolle fokal auf mögliche präsynaptische Zellen appliziert. Hohe Konzentrationen an extrazellulären  $\text{K}^+$ -Ionen führen zur Verschiebung von

$E_k$  (s. Formel 2) und damit zur Depolarisation der Zelle. Dies war zuvor durch direkte Applikation auf Zellen, von denen abgeleitet wurde, verifiziert worden. Zur Druckregulation diente eine 5 ml Einwegspritze, die über einen Polyethylenschlauch mit der Applikationspipette verbunden war. Während der Applikation wurde die präsumtive postsynaptische Zelle auf einer Kommandospannung von  $-75$  mV gehalten und die Stromspur für 20 s mit einer Digitalisierungsrate von 40 kHz aufgenommen. Während der Aufnahme wurden diese Daten mit 5 kHz und bei der späteren Auswertung meist mit 2 kHz gefiltert.

Die Stromdichten aller untersuchten Ströme wurden ermittelt, indem die maximalen Stromamplituden auf die nach den "C-slow" Einstellungen am Verstärker abgeschätzten Zellkapazitäten normiert wurden (pA/pF).

Mittelwerte (MW) wurden unter Verwendung eines doppelseitigen Student T-Tests mit maximaler Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von 1 auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht (Microsoft Excel 5.0). Dabei wurde das übliche Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zugrundegelegt. MW wurden im gesamten Text mit Standardabweichung ( $\pm$  SD) angegeben. Da viele der Testlösungen Substanzen enthielten, die für die Zellen schädlich sind, wurde pro Zellkulturkammer i.d.R. nur von einer Zelle abgeleitet.

## II.9. Immunohistochemie

Liste der verwendeten Antikörper

### 1. Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Epitop	Herkunft
-β-Gal (polyklonal, Kaninchen)	1:1000-1:5000	β-Galactosidase	Dianova
-Gsbp (monoklonal, Ratte)	1:4 bis 1:5	Gooseberry- proximal Protein	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Holmgren (North-western University, Evanston, Illinois, USA) Zhang et al., 1994
4 3 ( -Repo) (polyklonal, Kaninchen)	1:200	Repo Protein	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Halter (MRC Cambridge, England) Halter et al., 1995
-Eve (monoklonal, Maus) (polyklonal, Kaninchen)	1:1 bis 1:3 1:1000 bis 1:5000	Even-Skipped Protein	freundlicherweise von B. Chia (Singapore) und M. Frasch zur Verfügung gestellt
-Syn (monoklonal, Maus)	1:10	Synapsin Protein	freundlicherweise von E. Buchner (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt (Klagges et al., 1996)
-HRP (polyklonal, Kaninchen)	1:20	Horsereadish Peroxidase Protein; neuronale Oberflächenproteine	Dako (Jan und Jan, 1982)

2) Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Epitop	Herkunft
-Maus Rhodamin oder Biotin (polyklonal, Ziege)	1:200	Maus IgG	Dianova
-Kaninchen Phosphatase oder Biotin (polyklonal, Ziege)	1:200	Kaninchen IgG	Dianova
-Ratte Phosphatase oder Biotin (polyklonal, Ziege)	1:200	Ratten IgG	Dianova

Polyklonale AK wurden als präabsorbierte Lösungen in 70% Glycerin/PBT im Kühlschrank gelagert. Bei monoklonalen AK wurde die Verdünnung direkt vor der Verwendung frisch angesetzt. Die Verdünnungen erfolgten in PBT unter Zugabe von 20% Kalbserum und 0,02%  $\text{NaN}_3$  (s.o. II.1.).

**II.9.1. Antikörperfärbungen**

Antikörper (AK)-Färbungen von Flat-Präparationen wurden gemäß den Ausführungen in Bossing et al. (1996) durchgeführt. Sollten Zellen in zuvor fotokonvertierten DiI-Klonen zusätzlich mit AK gefärbt werden, so war es erforderlich, die Fotokonversion nicht zu intensiv zu machen, da das DAB-Präzipitat auf den Zellmembranen das Eindringen des AK zu erschweren schien. Darüber hinaus erfolgte die Inkubation aller AK bei 4°C, da nur dann die Durchlässigkeit fotokonvertierter Membranen ausreichend ist (Bossing, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus wurden alle zum Fixieren und Waschen verwendeten Lösungen möglichst kalt gehalten. Trotz dieses Vorgehens mußten meist mehrere Anläufe unternommen werden, bevor eine solche Doppelfärbung gelang.

Fotokonvertierte Embryonen oder solche, bei denen das ZNS (Stadium 16/17) oder die Neuroblastenschicht (Stadium 11) entsprechend frei präpariert, fixiert und mit fötalem Kalbserum geblockt worden war (s.o. II.6.3.), wurden mit einer DiI- bzw. Präparations-Kapillare vom Deckglas abgehoben und in ein Dreierblockschälchen mit PBT überführt. Anschließend wurde das PBT gegen den primären AK ausgetauscht und dieser über Nacht bei 4°C inkubiert. Unabhängig von der Herkunft (gleiche oder verschiedene Spezies) konnten bei Doppelfärbungen die ersten AK zusammen inkubiert werden. Nach Entfernen des überschüssigen ersten AK durch Waschen mit

PBT (5x kurz, 10 min inkubieren, 4x kurz) wurden die sekundären AK ebenfalls über Nacht bei 4°C inkubiert. Der ungebundene Teil wurde durch entsprechende Waschschrirte mit PBT entfernt.

Bei Verwendung von Phosphatase gekoppelten sekundären AK wurde anschließend durch mehrmalige Zugabe von Detektionspuffer für die alkalische Phosphatase (1x kurz, 1x 10 min) ein alkalisches Milieu hergestellt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation in 300 µl einer Lösung aus NBT/Detektionspuffer (4 µl Nitrobluetetrazolium [NBT, Boehringer, Mannheim] auf 1 ml Detektionspuffer). Die eigentliche Färbung wurde durch Zufügen von 0,6 µl X-Phosphat (Boehringer, Mannheim) aktiviert. Die Färbung konnte im Hellen erfolgen und mußte ständig auf ihre Intensität überprüft werden. Sie wurde durch Waschen mit PBT beendet.

Biotin-konjugierte, sekundäre AK wurden unter Verwendung des Elite ABC-Kit von Vectastain verstärkt und durch eine DAB Reaktion nachgewiesen. 300 µl PBT wurden mit je 4 µl A und B gemischt und für 10 bis 30 min präinkubiert. Anschließend wurden die Embryonen für 30 bis 90 min in der Lösung inkubiert und diese dann durch mehrmaliges Waschen mit PBT entfernt. Die Peroxidase wurde dann durch Zugabe einer Lösung von 0,5 mg DAB in PP und 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen. Bei Doppelfärbungen wurde die zweite DAB-Färbung durch 10 min Vorinkubation mit 0,06% NiCl<sub>2</sub> in PBT (8 µl 8% NiCl<sub>2</sub>/ml PBT) in ein schwarzes Präzipitat umgewandelt (Nickelverstärkung).

Danach wurden die Präparate, um eine Beschädigungen beim Einbetten zu vermeiden, 10 min in 3,7% FA in PBS nachfixiert, mit PBS oder PBT gewaschen und wie unter II.6.3. beschrieben in Glycerol/PBS eingebettet.

Ganzkörper-Präparate (whole mounts) wurden gemäß den Ausführungen in Halter et al. (1995) gefärbt. Ein Eppendorffcap wurde mit 400 µl Heptan, 300 µl PBS und 100 µl 37% FA (Fixierlösung) gefüllt, gevortext und die Trennung der zwei Phasen abgewartet. Von der Agarplatte wurden die Hefe und die toten Fliegen entfernt, diese dann mit 15% Chlorbleichlauge (Natriumhypochlorit, NaHClO<sub>4</sub>) übergossen und so lange auf dem Schüttler rotiert, bis die meisten Embryonen dechorionisiert oben aufschwammen. Die Embryonen wurden mit reichlich deionisiertem Wasser in einen Trichter eingespült, dessen Hals mit einem PVC-Netz verschlossen war. Das Netz wurde von dem Trichter gelöst, von unten mit Toilettenpapier abgetupft und die Embryonen dann unter dem Binokular mit einem Skalpell in das Eppendorffcap mit der Fixierlösung überführt und für 20 min bei mäßiger Rotation auf dem Schüttler inkubiert. Die Embryonen sammelten sich dabei an der Phasengrenze. Die Fixierung wurde durch Absaugen der unteren wässrigen Phase und Auffüllen des Caps mit ca. 600 µl 100% Methanol beendet. Durch heftiges

Vortexen wurden die Embryonen dann devitellinisiert und sanken nach unten, während die Vitellinhüllen nach oben stiegen. Die Flüssigkeit wurde abgezogen, die Embryonen 2x mit Methanol und 3x mit PBT gewaschen und anschließend für 1h auf dem Schüttler in Kalbserum geblockt. Danach wurden primäre und sekundäre AK wie oben beschrieben inkubiert. Statt einer Inkubation über Nacht wurde z.T. für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach erfolgreicher Färbung wurden Embryonen der gewünschten Stadien i.d.R. aufpräpariert und das ZNS oder die NB-Schicht freigelegt (s.o. II.6.3. Flat-Präparation). Anschließend wurden sie wie oben beschrieben eingebettet.

Zellkulturen wurden entsprechend dem Protokoll in Halter et al. (1995) mit -HRP auf neuronale Proteine und mit -Synapsin auf präsynaptische Strukturen untersucht. Die Zellen wurden für 5 min in 10% Formaldehyd in PBS fixiert, 5x mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 10% fötalem Kalbserum in PBS geblockt. Primärer und sekundärer AK (entweder Biotin konjugiert oder Rhodamin gekoppelt) wurden jeweils über Nacht bei 37°C inkubiert. Folgenden AK Färbungen elektrophysiologischen Ableitungen, wurden die Zellen in der Ableitkammer fixiert, wobei die Spitze der Ableitelektrode erst nach Abschluß der Fixierung abgebrochen wurde. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben weiter behandelt. Um die Spezifität der Färbungen zu prüfen, wurden Co-Kulturen aus ML-Zellen und mesodermalen Zellen gefärbt. Dabei zeigte sich positive -HRP bzw. -Synapsin Immunoreaktivität nur auf den ML-Neuronen, nicht jedoch auf den mesodermalen Zellen.

### II.9.2. X-Gal Färbung

Bei *repo*-Embryonen wurde zur Unterscheidung der Mutanten von heterozygoten Tieren und homozygoten Balancertieren nach der Fotokonversion und vor einer etwaigen AK Färbung eine X-Gal Färbung durchgeführt. Die Präparate wurden hierzu in Dreierblockschälchen in PBS überführt und das PBS dann gegen die vorher frisch angesetzte und noch warme Färbelösung ausgetauscht. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, wobei die Zeit bis zur Färbung äußerst variabel war. Das vorher farblose X-Gal wird dabei in den Zellen mit  $\beta$ -Galactosidase-Expression von dem Enzym umgesetzt und ergibt eine blaue, kernständige Färbung. Die Färbung war in allen Fällen spätestens nach Inkubation über Nacht ausreichend.

Da auch heterozygote *repo* Embryonen  $\beta$ -Galactosidase-Expression in Gliazellen haben, konnte neben der AK Färbung gegen -Galactosidase auch die X-Gal-Färbung zur Doppelfärbung fotokonvertierter Gliazellen verwendet werden. Hierzu durfte die Braunfärbung der Membranen

von der Fotokonversion nicht zu intensiv sein, da sie ansonsten die kernständige X-Gal-Färbung überdeckte.

## **II.10. Dokumentation von morphologischen Präparaten und Zellkulturen**

Verschiedene Fokusebenen ausgewählter Klone wurden vom Mikroskop (Axiophot, Zeiss) unter Verwendung der Kontron-Kamera direkt in den Computer (Macintosh Power PC 9500) eingelesen. Die Fokusebenen des dreidimensionalen Präparats wurden dann unter Verwendung von Photoshop in einer Ebene montiert. Hintergrundfarbe und Belichtung wurden angepaßt. Skizzen von Klonen wurden per Camera Lucida am aufrechten Mikroskop (Axioplan, Zeiss) angefertigt, mit dem Flachbettscanner in den Computer eingelesen und mit Illustrator 6.0 nachbearbeitet. Konfokale Aufnahmen wurden unter Verwendung eines Leica TCS4D Mikroskops gemacht.

### III. Ergebnisse

#### III.1. Zellstammbaumanalyse mit DiI

In *Drosophila melanogaster* beginnt die Entwicklung des embryonalen Bauchmarks mit der während der Embryonalstadien 8 bis 11 (nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) stattfindenden, Delamination einer stereotypen Population von Vorläufern (Neuroblasten (NBs)) aus dem Neuroektoderm. Die Delaminationsperiode wurde in fünf Intervalle (S1 bis S5) unterteilt (Doe, 1992). Die S1 bis S3 NBs bilden zunächst drei longitudinale Spalten aus, deren NBs als medial, intermediär und lateral bezeichnet wurden (Hartenstein und CamposOrtega, 1984). Anschließend segregieren die S4 und S5 NBs, wobei die klare dreispaltige Anordnung aufgegeben wird. Die Zellstammbäume der medialen und intermediären NBs waren Gegenstand einer früheren Arbeit (Bossing et al., 1996). Sie delaminierten aus den ventralen Bereichen des Neuroektoderms (ca. 1 bis 12 Zelldurchmesser zur ventralen Mittellinie (ML)). In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Zellstammbäume der NBs analysiert, die aus den dorsalen Bereichen des Neuroektoderms stammten (ca. 8 bis 15 Zelldurchmesser zur ML). Zur Unterscheidung von den zuvor beschriebenen ventralen neuroektodermalen (vNE) NBs, werden sie nachfolgend als dorsale neuroektodermale (dNE) NBs bezeichnet. Neurone werden gemäß Bossing et al. (1996) (s. Tab. 5) und Gliazellen gemäß Ito et al. (1995), (s. Tab. 6) bezeichnet.

**Tabelle 5. Nomenklatur von Neuronen**

1. Symbol	"X-X"	NB, von dem der Klon abstammt
2. Symbol	"M" vs "I"	Motoneuron versus Interneuron
3. Symbol	"i" vs "c"	ipsilaterale versus kontralaterale axonale Projektion
4. Symbol	"a" vs "p"	anteriore versus posteriore Kommissur
5. Symbol	"s" vs "ar" vs "pr"	motoneuronale Projektion, die sich entlang des segmentalen Nervs (s) oder der anterioren (ar) oder posterioren Wurzel (pr) des intersegmentalen Nervs erstreckt
6. Symbol	Zahlen	Neurone, die durch weitere Kriterien identifiziert sind

Die Nomenklatur entspricht Bossing et al. (1996) und ist dort detailliert beschrieben. Die Verwendung der Symbole wird minimal gehalten, d.h. bestünde z.B. ein Klon nur aus kontralateral durch die gleiche Kommissur projizierenden Interneuronen, so würden diese lediglich als "X-XI" bezeichnet, ohne die Kommissur näher zu spezifizieren.

**Tabelle 6. Nomenklatur von Gliazellen**

Gliasubtyp	individuelle Zellen	
SPG subperineurial glia	MD-SPG LD-SPG DL-SPG VL-SPG LV-SPG MV-SPG	mediale dorsale SPG laterale dorsale SPG dorsale laterale SPG ventrale laterale SPG laterale ventrale SPG mediale ventrale SPG
CG channel glia	D-CG V-CG	dorsale CG ventrale CG
CBG cell body glia	MM-CBG M-CBG VL-CBG L-CBG	medialmost CBG (VUM support cell) mediale CBG ventrale laterale CBG laterale CBG
ISNG intersegmental nerve root glia	M-ISNG L-ISNG	mediale ISNG (segment boundary cell) laterale ISNG
SNG segmental nerve root glia	M-SNG L-SNG	mediale SNG laterale SNG
IG interface glia (longitudinal glia)	D-IG L-IG V-IG	dorsale IG laterale IG ventrale IG
PG peripheral glia		

Es ist lediglich die Nomenklatur für die in dieser Arbeit identifizierten Gliazellen aufgeführt. Die komplette Glianomenklatur ist in Ito et al. (1995) zu finden. Ältere Namen von Gliazellen (z.B. Goodman und Doe, 1993) sind in Klammern angegeben.

**Tabelle 7.**

Die Spalten zeigen die verschiedenen, nach ihrer Zuordnung benannten Klontypen und wie oft sie den verschiedenen NBs zugeordnet wurden. Die Reihen zeigen, mit welcher Häufigkeit ein bestimmter Klontyp während der *in vivo* Beobachtung bei einer gegebenen NB-Diagnose erhalten wurde. Hervorgehoben sind die Stammbäume, die am häufigsten für den jeweiligen NB erhalten wurden (hinsichtlich des neu identifizierten NB 1-3 vgl. Diskussion). *R*, Verlässlichkeit der NB-Identifikation (relative Häufigkeit mit der ein bestimmter Zellstammbaum bei einer gegebenen NB-Bestimmung erhalten wurde). *F*, Häufigkeit der Korrelation eines Klontyps mit der zugewiesenen NB-Identität. Hinsichtlich NBs 2-3, 3-4, 5-5 s. Text.

**Tabelle 7. Zuordnung der Zellstammbäume zu individuellen NBs**

<b>Klon/ NB</b>	<b>1-3</b>	<b>2-3</b>	<b>2-4</b>	<b>2-5</b>	<b>3-3</b>	<b>3-4</b>	<b>3-5</b>	<b>4-3</b>	<b>4-4</b>	<b>5-4</b>	<b>5-5</b>	<b>5-6</b>	<b>6-4</b>	<b>7-4</b>	<b>GP</b>	<b>R</b>
<b>1-3</b>	3															100%
<b>2-3</b>			3		1											
<b>2-4</b>			6	2	4											50%
<b>2-5</b>	1			27			1					1				90%
<b>3-3</b>			2		7			1								70%
<b>3-4</b>			1	1	1		1					2				
<b>3-5</b>				1	1		22					4				79%
<b>4-3</b>								6		5						55%
<b>4-4</b>			2		1			1	12							71%
<b>5-4</b>								3		11			2			69%
<b>5-5</b>																
<b>5-6</b>					1		1					8				80%
<b>6-4</b>													13			100%
<b>7-4</b>	1													11		92%
<b>GP</b>	4			1											5	50%
<b>F</b>	33%		43%	84%	44%		88%	55%	100%	69%		53%	87%	100%	100%	

### III.1.1. Identifikation von NBs *in vivo*

Eine wesentliche Voraussetzung für die Zuordnung eines Zellstammbaums zu einer bestimmten Vorläuferzelle war die Identifikation des mit DiI markierten NB im lebenden Embryo. Für diese Zuordnung wurden die in Material und Methoden (II.6.2.; s. auch Abb. 5) genannten Kriterien verwendet. In der neuralen Zellschicht findet intensive Proliferation statt, was dazu führte, daß unmarkierte NBs häufig schlecht zu erkennen waren. Daher war es schwierig, den markierten NB in das Muster von unmarkierten Vorläufern einzuordnen. Die spät segregierenden NBs (S4, S5) störten die klare dreispaltige Anordnung der frühen NBs. Es wurden ferner NB-Bewegungen beobachtet, die zu Lageverschiebungen führten (s. auch Bossing et al., 1996). Obwohl NBs typischerweise während einer bestimmten Segregationswelle (S1 bis S5, Doe, 1992, Tab. 4) delaminierten, wurde eine gewisse Variabilität in den Segregationszeiten gefunden (Tab. 8), was sich mit den Ergebnissen für die vNE NBs deckt (Bossing et al., 1996). Es war daher nicht immer möglich, die NBs mit absoluter Sicherheit zu identifizieren.

Die Verlässlichkeit der *in vivo* Identifikation wird durch die Häufigkeit widerspiegelt, mit der ein gegebener Stammbaum für eine bestimmte NB-Bestimmung erhalten wurde. Die Verlässlichkeit variierte zwischen 50 und 100% ( $R$  in Tab. 7). Ferner wurde die Häufigkeit, mit der ein bestimmter Zellstammbaumtyp mit der zugeordneten NB-Identität korrelierte, berücksichtigt ( $F$  in Tab. 7). Die Korrelation  $F$  lag zwischen 33 und 100%. Sooft wie möglich wurde versucht, die NB-Bestimmung durch zusätzliche Antikörper (AK)-Färbungen und durch Vergleich der Bestimmung mit zuvor veröffentlichten Daten zu untermauern. Der Zellstammbaum, der NB 5-6 zugeordnet wurde, zeigte positive  $\beta$ -Gooseberry-proximal ( $\beta$ -Gsb-p) Immunoreaktivität (Buenzow und Holmgarten, 1995; Abb. 6A), die Nachkommen von NB 7-4 lagen im *engrailed* Streifen (Broadus et al., 1995; Daten nicht gezeigt), die den NBs 2-4 und 3-3 zugeordneten Stammbäume exprimierten *eagle* Immunoreaktivität (Dittrich et al., 1997; Abb. 8A), der die MM-CBG (VUM support glia) enthaltende Stammbaum wurde NB 6-4 (z.B. Goodman und Doe, 1993) und die longitudinale Glia wurde dem Gliavorläufer GP zugeordnet (Jacobs et al., 1989).

Für die NBs X, 2-3, 3-4 und 5-5 konnte kein Zellstammbaum gefunden werden. Außerdem wurden 4 Fälle eines Klons gefunden, der keinem bestimmten NB zugeordnet werden konnte, und deshalb Klon  $\gamma$  genannt wurde.

Ein neuer NB (NB 1-3) wurde identifiziert. Er lag im Std. 11 an der Segmentgrenze, nahe den trachealen Plakoden (Abb. 5, 7A) und generierte Neurone und Gliazellen, unter denen auch periphere Glia (PG) waren. Sein nächster Nachbar ist der bereits beschriebene GP, der die longitudinale Glia produziert (Jacobs et al., 1989) und daher nicht identisch mit NB 1-3 sein kann. In Stadium 11 Embryonen eines *huckebein-lacZ* Stammes (5953; Broadus et al., 1995), doppelt gefärbt mit  $\beta$ -Gal und  $\beta$ -Repo AK, wurde ein zusätzlicher, *hkb-lacZ* exprimierender

Vorläufer in der nach den *in vivo* Beobachtungen für NB 1-3 vorhergesagten Position gefunden (Abb. 6Ai). Darüber hinaus exprimierten durchschnittlich 2 PG pro Hemisegment *hkb-lacZ* (Abb. 6Aii) und da der einzige andere NB, zu dessen Stammbaum PG gehören (NB 2-5), zu keiner Zeit *hkb-lacZ* exprimierte, ist es wahrscheinlich, daß diese PG von NB 1-3 abstammen.

### III.1.2. Embryonale Zellstammbäume der dNE NBs

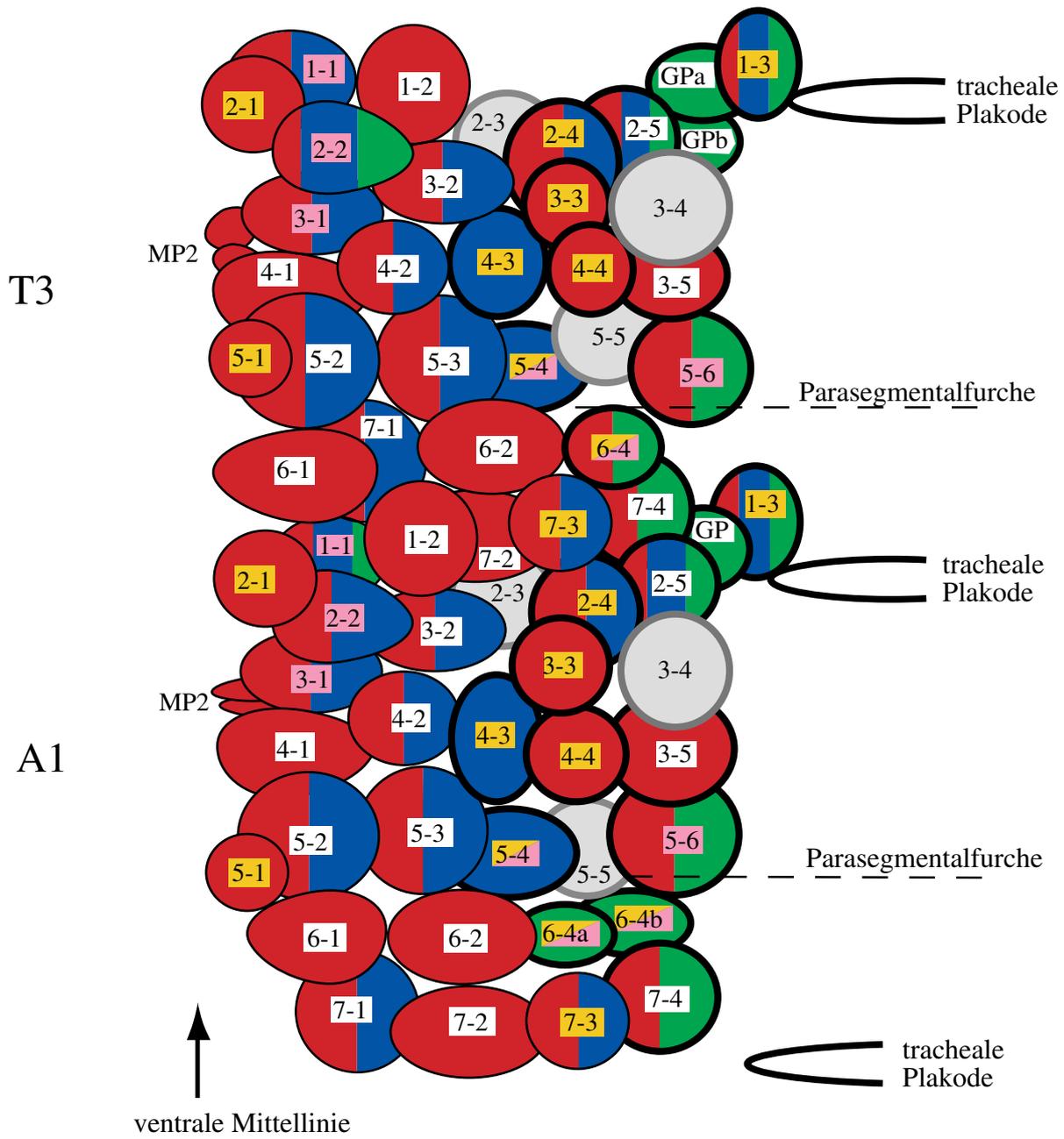
Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Daten im wesentlichen in Form von Tabellen, Fotografien und Schemazeichnungen, jeweils mit erweiterten Abbildungstexten gezeigt (Tab. 4-9, Abb. 5-8). Teilaspekte der Ergebnisse werden dann im Verlauf der Diskussion (s. IV.1.) mitbehandelt.

Drei der dNE NB Zellstammbäume (NBs 3-3, 3-5, 4-4) hatten im spätembryonalen vNS rein interneuronale Projektionen, zwei (NBs 5-4, 4-3) schienen nur aus Motoneuronen zu bestehen und zwei (NB 2-4, Klon  $\gamma$ ) hatten motoneuronale und interneuronale Neurite. Fünf NBs waren Neuroglioblasten, entweder mit interneuronalen und glialen Nachkommen (NBs 5-6, 7-4, 6-4T) oder interneuronalen, motoneuronalen und glialen Nachkommen (NBs 2-5, 1-3). Zwei Zellstammbäume bestanden nur aus Gliazellen (GP, NB 6-4A; Abb. 5, Tab. 9). Insgesamt produzierten die dNE NBs durchschnittlich 120 Neurone und 22 bis 27 zentrale sowie sechs bis neun periphere Gliazellen (PG) pro Hemineuromer.

---

#### Abb. 5 Neuroblastenkarte

Schematische Darstellung der Anordnung und typischen Morphologie von Neuroblasten (NBs), wie sie etwa im späten Std. 11 beobachtet wurde (nach Bossing et al. (1996); Schmidt et al. (1997)). Um häufig beobachtete Variabilitäten in Form und Lage bestimmter NBs (z.B. NB 6-4, GP) hervorzuheben und um Segmentspezifitäten zu berücksichtigen, sind das thorakale Hemineuromer T3 und das abdominale Hemineuromer A1 gezeigt. Die Ansicht ist von ventral, anterior ist oben. Die späteren Segmentgrenzen sind durch die in diesem Embryonalstadium invaginierenden trachealen Plakoden gekennzeichnet. Die glialen Vorläufer NB 6-4A (A, abdominal) teilten sich morphologisch nahezu symmetrisch (6-4a, 6-4b; GPa, GPb). Der neu entdeckte NB1-3 ist in die Karte integriert. Der Farbcode kennzeichnet die verschiedenen Arten von Nachkommenzellen eines NBs (z.B. Motoneurone, Interneurone, Glia). Da den NBs 2-3, 3-4 und 5-5 kein Stammbaum zugeordnet werden konnte, sind sie grau. Die NBs, die aus dem dorsalen Teil des Neuroektoderms stammten, sind fett umrandet. Die anderen sind in Bossing et al. (1996) beschrieben.



- Neurone, interneuronale Projektionen
- Neurone, motoneuronale Projektionen
- Gliazellen
- Teilung vor Segregation
- Segmentspezifische Nachkommenschaft

Abb. 5

Gliazellen wurden aufgrund morphologischer Kriterien und/oder der Expression gliaspezifischer Marker ( -Repo AK Färbung oder X-Gal Färbung in heterozygoten *repo*<sup>2</sup> Embryonen) identifiziert. Anschließend wurden ihre Positionen mit den in Ito et al. (1995) beschriebenen verglichen und sie wurden entsprechend benannt. Die beiden SNGs konnten nicht voneinander unterschieden werden. Auch war die Unterscheidung zwischen der L- und der VL-CBG sowie die Differenzierung zwischen VL- und DL-SPG nicht möglich. Trotz dieser Identifikationsprobleme wurde eine gewisse Variabilität in der glialen Zusammensetzung einiger Klone gefunden, wobei bestimmte Gliazellen in diesen Klonen immer vorhanden waren, während andere optional auftraten. Es wurde deshalb zwischen konsistenten und variablen Gliazellen unterschieden (Tab. 9; Schmidt et al., 1997). Die hier beschriebene PG umfaßt auch die Exit Glia (Klämbt und Goodman, 1991), da diese in späten Embryonalstadien aus dem vNS auswanderte und sich dann, wie die PG, entlang des segmentalen Nervs erstreckte (Abb. 7).

Die meisten Neurone lagen in Clustern. Daher war es nicht möglich, jede Projektion einem bestimmten Neuron zuzuordnen. Viele Faszikel erschienen am Ende der Embryogenese noch relativ dünn und einige angenommene Motoprojektionen schienen ihre Muskeln noch nicht erreicht zu haben. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß sich einige Neurone erst postembryonal differenzieren. Dementsprechend wurde zusätzliches starkes axonales und dendritisches Wachstum zwischen dem frühen Std. 17 und dem Einsetzen der Schlupfbewegungen im späten Std. 17 beobachtet (Daten nicht gezeigt).

### **III.1.3. NB 3-3 generierte u.a. das laterale Cluster von *even-skipped* exprimierenden Zellen**

Gemäß den Ausführungen in Higashijima et al. (1996) sollte das laterale Cluster von *even-skipped* (*eve*) exprimierenden Zellen (EL; Patel et al., 1989) entweder von NB 2-4 oder von NB 3-3 produziert werden. Hier wurden daher fotokonvertierte Klone beider NBs mit einem - Eve AK doppelt gefärbt (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, daß der Stammbaum, der NB 3-3 zugeordnet worden war ( $R = 70\%$ ,  $F = 44\%$ ; Tab. 7), die EL enthielt. Um diese Zuordnung zu bestätigen, wurden Embryonen von Mz 360 (*eagle*-Gal4; Dittrich et al, 1997) Fliegen, die mit UAS-tau-GFP Fliegen verkreuzt worden waren, mit einem Rhodamin gekoppelten -Eve AK doppelt gefärbt. *eagle* wird nur in den NBs 2-4, 3-3, 6-4 und 7-3 sowie deren Nachkommen exprimiert (Higashijima et al., 1996; Dittrich et al, 1997). Es zeigte sich, daß die EL in dem Zellstammbaum enthalten waren, der demjenigen glich, der NB 3-3 zugeordnet worden war.

Die Zahl der EL Neurone war in abdominalen Segmenten höher (durchschnittlich 9 Zellen) als in thorakalen (durchschnittlich 5 Zellen), obwohl die Gesamtzahl von Zellen im NB 3-3 Stammbaum in Thorax und Abdomen gleich war (Tab. 9).

**Tabelle 8. *In vivo* beobachtete Segregationszeiten individueller NBs**

S/ NB	S1	S1/2	S2	S2/3	S3	S3/4	S4	S4/5	S5
2-5	27	2							
3-5	17	1							
5-6	13	2	1			1			
7-4	8								
6-4			3	1	7	2			
GP					1	1			
1-3					1	1			
2-4						1	2	5	2
3-3	1				1	3	2	2	1
4-4						4	3	2	1
5-4						2	5	3	2
2-3									
3-4									
4-3						2	2	2	1
5-5									

Für die Zuordnung der NBs zu den fünf Segregationswellen (S1 bis S5, Doe, 1992) wurde die erste Teilung der Mittellinienzellen (ML-Zellen, ca. 40 min nach Beginn der Gastrulation) als interne zeitliche Referenz benutzt. Als S1 wurden Delaminationen bis 30 min nach Teilung der ML-Zellen gewertet, als S2 Delaminationen zwischen 30 und 60 min, als S3 Delaminationen von 60 bis 100 min, als S4 Delaminationen zwischen 60 min und Std. 11 und als S5 spätere Delaminationen (entspricht Doe, 1992, Bossing et al., 1996, Schmidt et al., 1997; vgl. Tab. 4). Zeiten, zu denen Delaminationen am häufigsten vorkamen, sind hervorgehoben.

**Tabelle 9. Zusammensetzung der Zellstammbäume**

Die Zellstammbäume sind in der Reihenfolge der Segregation der NBs aufgeführt (s. Tab. 8). Die Nomenklatur der Neurone ist gemäß Bossing et al. (1996), die der Gliazellen nach Ito et al. (1995) (s. Tab. 5, 6). In allen Stammbäumen mit variablen glialen Elementen waren i.d.R. mehr als eine dieser Zellen vorhanden (s. Diskussion). D, Distanz des neuroektodermalen Vorläufers zu den Zellen der ventralen Mittellinie in Zelldurchmessern; der Abzählfehler wurde mit  $\pm$  eine Zelle geschätzt. n, in Klammern ist die Gesamtzahl der beobachteten Fälle angegeben, ohne Klammer die Zahl der Klone, die für die Ermittlung der Zellzahlen herangezogen worden sind. A oder T, abdominal oder thorakal.

**Tabelle 9. Zusammensetzung der Zellstammbäume**

NB	Neurone	Gliazellen		Epidermis-Subklon	PNS-Subklon	n	D [Zell-Ø]
		konsistent	variabel				
<b>2-5 Abb.6</b>	13 bis 18 Neurone im dors. und dorsolat. Kortex (2-5Ic, 2-5Ii, 2-5M), 1 Neuron dorsomed. (2-5Ic1)	2 PG	-----	-----	-----	(59) 33	13 bis 15
<b>3-5 Abb.6</b>	19 bis 24 Neurone im dors. und dorsolat. Kortex (3-5Ic, 3-5Ii)	-----	-----	-----	-----	(43) 27	13 bis 15
<b>5-6T Abb.6</b>	10 bis 14 Neurone im dors. und dorsolat. Kortex (5-6Ica, 5-6Icp, 5-6Ii)	2 V-SPG, 1 L-SPG (VL- oder DL-SPG)	1 D-SPG, 1 CBG	-----	-----	(20) 14	13 bis 15
<b>5-6A Abb.6</b>	3 bis 5 Neurone im dors. und dorsolat. Kortex (5-6Ica, 5-6Icp, 5-6Ii)	1 V-SPG (MV- oder LV-SPG), 1 L-SPG (VL- oder DL-SPG)	1 D-SPG, 1 CBG, 1 SNC oder ISNG	-----	-----	(18) 13	13 bis 15
<b>7-4 Abb.6</b>	8 bis 12 Neurone im dorsolat. Kortex (7-4Ic, 7-4Ii)	2 CG (D-CG und/oder V-CG), 1 L-SPG (VL-oder DL-SPG)	1 bis 2 CBG, 1 SNG, 1 D-SPG	-----	-----	(20) 13	12 bis 14
<b>6-4T Abb.7</b>	4 bis 6 Neurone im dorsolat. Kortex (6-4Ic, 6-4Ii)	2 MM-CBG, 1 M-CBG	-----	optional 4 bis 6 Zellen	-----	(22) 17	11 bis 13
<b>6-4A Abb.7</b>	-----	2 CBG (MM-CBG, M-CBG)	-----	optional 4 bis 6 Zellen	-----	(11) 9	11 bis 13
<b>GP Abb.7</b>	-----	7 bis 9 IG	-----	-----	-----	(9) 5	10 bis 17
<b>1-3 Abb.7</b>	2 bis 3 Neurone im dorsolat. Kortex (1-3Mar, 1-3Ms, 1-3I)	4 bis 6 PG, 1 bis 2 ISNG	1 SNG, 1 bis 2 D-SPG 1 bis 2 CBG	obligatorisch 3 bis 5 Zellen	-----	(28) 25	11 bis 15
<b>2-4T Abb.8</b>	8 bis 12 Neurone im dors. Kortex (2-4M, 2-4M1+2, 2-4I)	-----	-----	obligatorisch 3 bis 5 Zellen	-----	(19) 16	10 bis 12
<b>2-4A Abb.8</b>	7 bis 8 Neurone im dors. Kortex (2-4M, 2-4M1+2, 2-4I)	-----	-----	4 bis 6 Zellen	-----	(8) 8	10 bis 12
<b>3-3 Abb.8</b>	10 bis 13 Neurone im ventrolat. Kortex (3-3Ic, 3-3Ii), enthält die <b>EL</b>	-----	-----	obligatorisch 4 bis 6 Zellen	-----	(39) 31	12 bis 14
<b>4-4 Abb.8</b>	8 bis 11 Neurone im ventromed. Kortex (4-4I)	-----	-----	obligatorisch 4 bis 5 Zellen	in 18 Fällen	(23) 15	10 bis 12
<b>5-4T Abb.8</b>	5 bis 9 Neurone im dorsolat. Kortex (5-4M), 1 Neuron dorsomed. (5-4M1)	-----	-----	obligatorisch 4 bis 5 Zellen	-----	(15) 8	10 bis 12
<b>5-4A Abb.8</b>	3 bis 4 Neurone im dorsolat. Kortex (5-4M), 1 Neuron dorsomed. (5-4M1)	-----	-----	obligatorisch	-----	(15) 8	10 bis 12
<b>4-3 Abb.8</b>	8 bis 13 Neurone im ventrolat. bis dorsolat. Kortex (4-3M)	-----	-----	obligatorisch 4 bis 7 Zellen	in 9 Fällen	(15) 9	10 bis 12
<b>y Abb.8</b>	6 bis 9 Neurone im dorsolat. Kortex (yIc, yIi, yM)	-----	-----	4 bis 5 Zellen	-----	(4) 4	9 bis 12

**Abb. 6 Zellstammbäume von S1 Neuroblasten**

Fotografien (A) und Schemazeichnungen (B) von spätembryonalen Zellstammbäumen von S1 NBs in einer dorsalen Ansicht (nach Schmidt et al. (1997). Anterior ist links. Hinsichtlich der Nomenklatur von Neuronen und Gliazellen vgl. Tab. 5 und 6. In B sind die Kortexregionen des Bauchmarks hellgrau, das Neuropil weiß und der mediale Dorsoventralkanal, der die Segmentgrenzen markiert, als helle Ovale gezeichnet. Zellkörper von Neuronen sind rot, ihre Projektionen dunkelgrau. Projektionen, die einem identifizierten Neuron zugeordnet werden konnten, sind hellrot (z.B. 5-3Ica1). Gliazellen sind in verschiedenen Grüntönen, die ihre dorso-ventrale Lage anzeigen, gezeigt: blaugrün, dorsal; dunkelgrün, mediodorsal; mittelgrün, medioventral; hellgrün, ventral; dunkles blaugrün, periphere Glia (PG). Um ein vollständiges Bild der spätembryonalen Zellstammbäume zu erhalten, wurden für die Schemazeichnungen jeweils viele Einzelpräparate berücksichtigt.

**NB 2-5.** Der Zellstammbaum bestand aus 13 bis 18 Neuronen im dorsalen und dorsolateralen Kortex, die kontralateral über die anteriore Kommissur und ipsilateral projizierten. Das 2-5Ic1 Neuron lag in allen Fällen medial. Die interneuronalen Projektionen erstreckten sich häufig über mehr als ein Segment nach anterior. Zumindest ein Neuron ist ein Motoneuron (2-5M), dessen Projektion durch die posteriore Wurzel des Intersegmentalnervs verläuft. Endplatten wurden im späten Std. 17 nicht beobachtet. Darüber hinaus enthielt der Stammbaum zwei periphere Gliazellen (PG).

**NB 3-5.** Der Klon bestand aus 19 bis 24 Interneuronen im dorsalen und dorsolateralen Kortex, die ihre Neuriten nach kontralateral über die anteriore Kommissur und ipsilateral erstreckten. Beide Projektionen konnten sich über mehr als ein Segment nach anterior erstrecken.

**NB 5-3.** Der Zellstammbaum ist in Bossing et al. (1996) beschrieben. Da eine bisher nicht beschriebene Motoprojektion entdeckt wurde (5-3M), ist er hier gezeigt. Die Motoprojektion verlief durch den segmentalen Nerv. Endplatten wurden nicht gefunden.

**NB 5-6T.** Der thorakale Zellstammbaum bestand aus 10 bis 14 Interneuronen im dorsalen und dorsolateralen Kortex mit kontralateralen und ipsilateralen Projektionen. Hinzu kamen drei bis fünf Gliazellen, wobei die zwei V-SPGs und die L-SPG in allen Fällen beobachtet wurden (konsistente gliale Elemente; vgl. Diskussion), während die CBG und die D-SPG nicht immer vorhanden waren (variable gliale Elemente). Der Stammbaum konnte mit -Gooseberry proximal (-Gsb-p) Antikörper doppelt gefärbt werden.

**NB 5-6A.** Der abdominale Zellstammbaum bestand aus drei bis fünf Interneuronen und den konsistenten Gliazellen V-SPG (MV- oder LV-SPG). Die anderen Glia waren variabel.

**NB 7-4.** Der Zellstammbaum bestand aus 8 bis 12 Interneuronen im dorsolateralen Kortex mit kontralateralen Projektionen über die posteriore Kommissur. Die beiden CGs und die L-SPG waren konsistente gliale Elemente, während die anderen variabel auftraten.

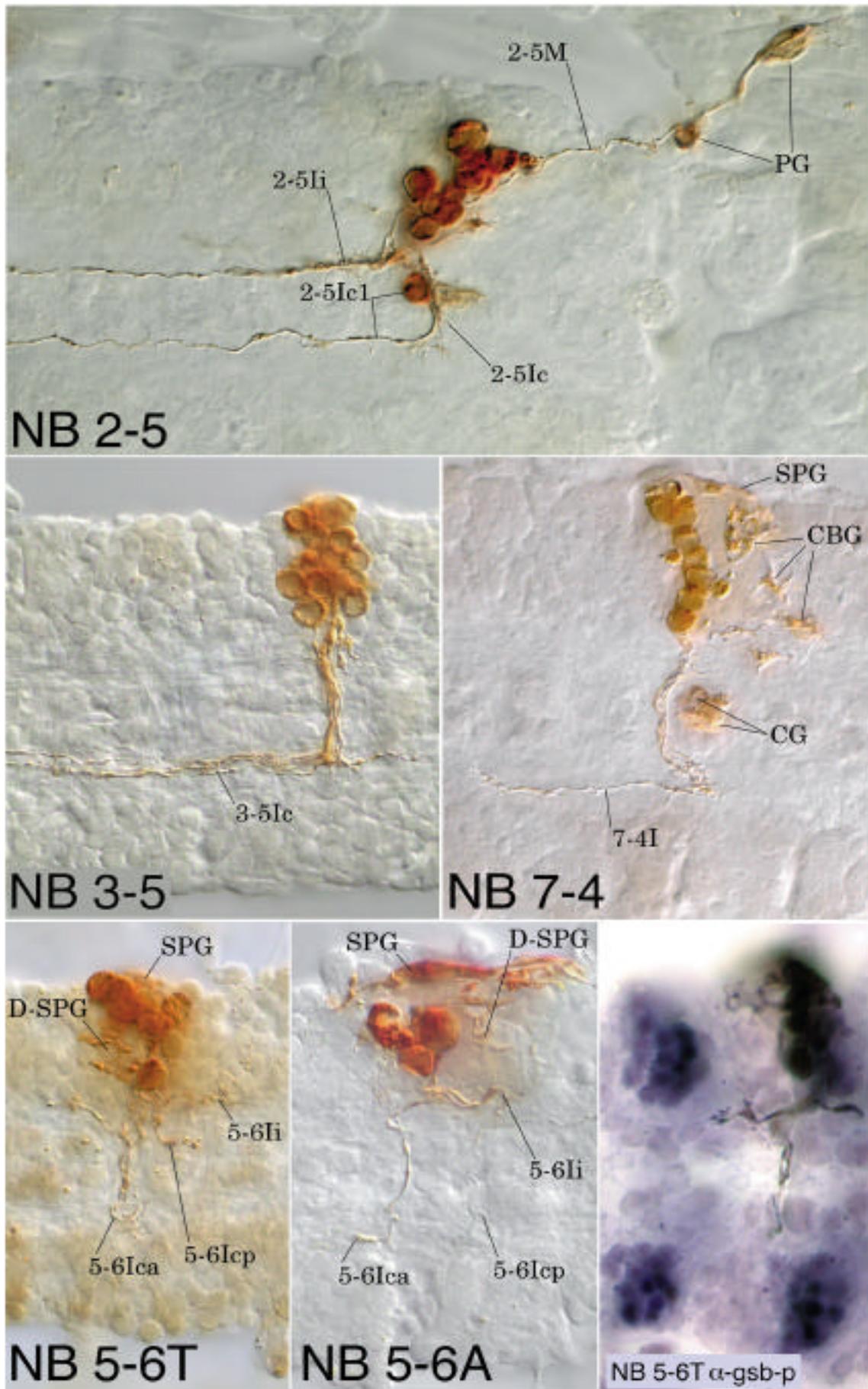
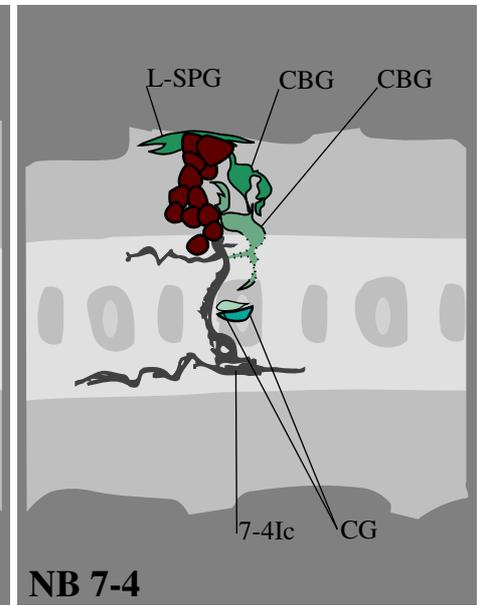
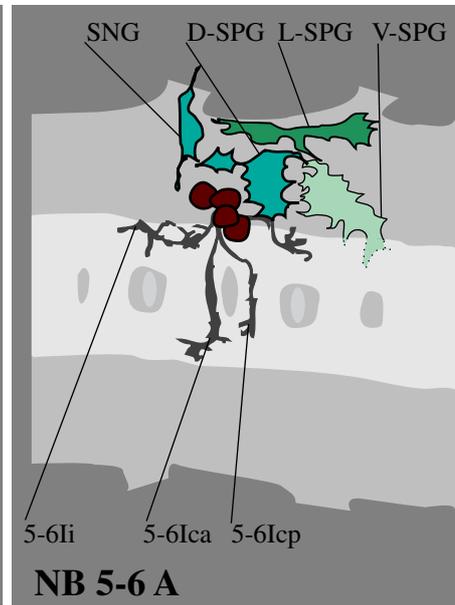
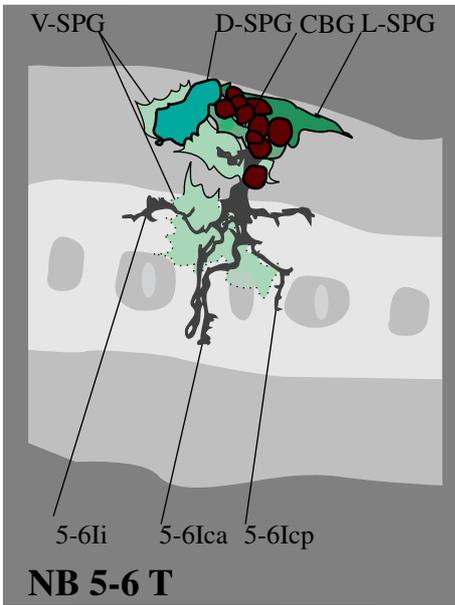
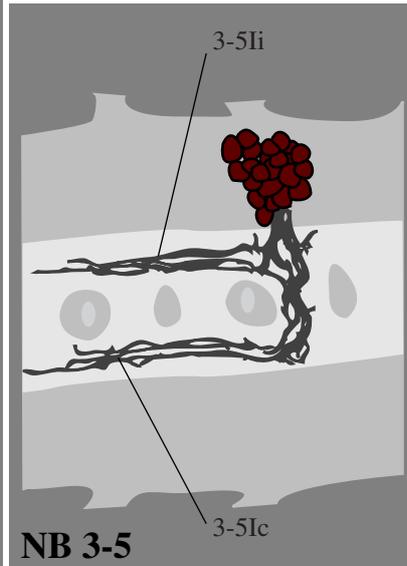
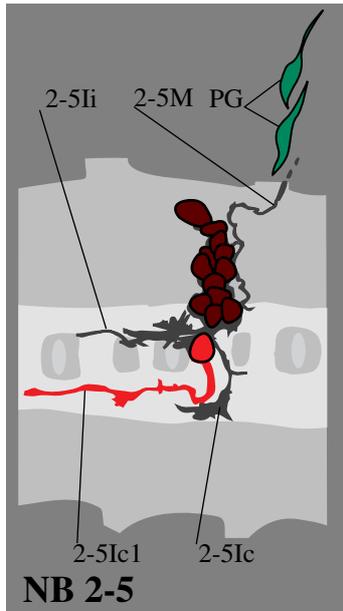


Abb. 6A



**Abb. 6B**

### Abb. 7 Zellstammbäume von S3 Neuroblasten

Fotografien (A) und Schemazeichnungen (B) von spätembryonalen Zellstammbäumen von S3 NBs in einer dorsalen Ansicht (nach Schmidt et al. (1997)). Mit Ausnahme von 4Ai, wo anterior oben ist, ist anterior links. Hinsichtlich der Nomenklatur von Neuronen und Gliazellen vgl. Tab. 5 und 6. Bezüglich der Farbcodierung in B vgl. den Text zu Abb. 6.

**NB 1-3.** Der Zellstammbaum bestand aus zwei bis drei Neuronen im dorsolateralen Kortex. Die Motoneurone projizierten kontralateral über die anteriore Kommissur und durch den segmentalen Nerv (1-3Ms) bzw. die anteriore Wurzel des intersegmentalen Nervs (1-3Mar) aus dem ZNS heraus. Letztere Projektion bildete endplattenähnliche Strukturen auf einem Muskel der ventral oblique (VO) Gruppe, vermutlich VO1 (Nomenklatur der somatischen Muskulatur nach Bate (1993)). Für die andere wurden keine Endplatten beobachtet. Darüber hinaus enthielt der Stammbaum 7 bis 10 Gliazellen. Die PG und die ISNG wurden in allen Fällen beobachtet (konsistente gliale Elemente). (**Ai**) NB 1-3 lag Mitte/Ende Std. 11 etwas lateral und anterior zu NB 2-5 und exprimierte *huckebein-lacZ* (braun). Der GP und die Tochterzellen von NB 7-4 exprimierten zu diesem Zeitpunkt *repo* (schwarz). Anterior ist oben; ML, Mittellinie; TP, tracheale Plakoden. (**Aii**) Zwei bis drei periphere Gliazellen (PG, gelb, weiße Pfeilspitzen) pro Hemisegment exprimierten im späten Std. 16 *huckebein* (grün) und *repo* (rot).

**NB 6-4T.** Der thorakale Zellstammbaum bestand aus vier bis sechs Neuronen im dorsolateralen Kortex, die ipsilateral und kontralateral durch die posteriore Kommissur projizierten. In allen Fällen wurden zwei MM-CBG beobachtet.

**NB 6-4A.** Der abdominale Stammbaum war rein glial. Beide Gliazellen wurden in allen Fällen beobachtet.

**GP.** Der Zellstammbaum setzte sich aus sieben bis neun longitudinalen bzw. interface Gliazellen (IG) zusammen.

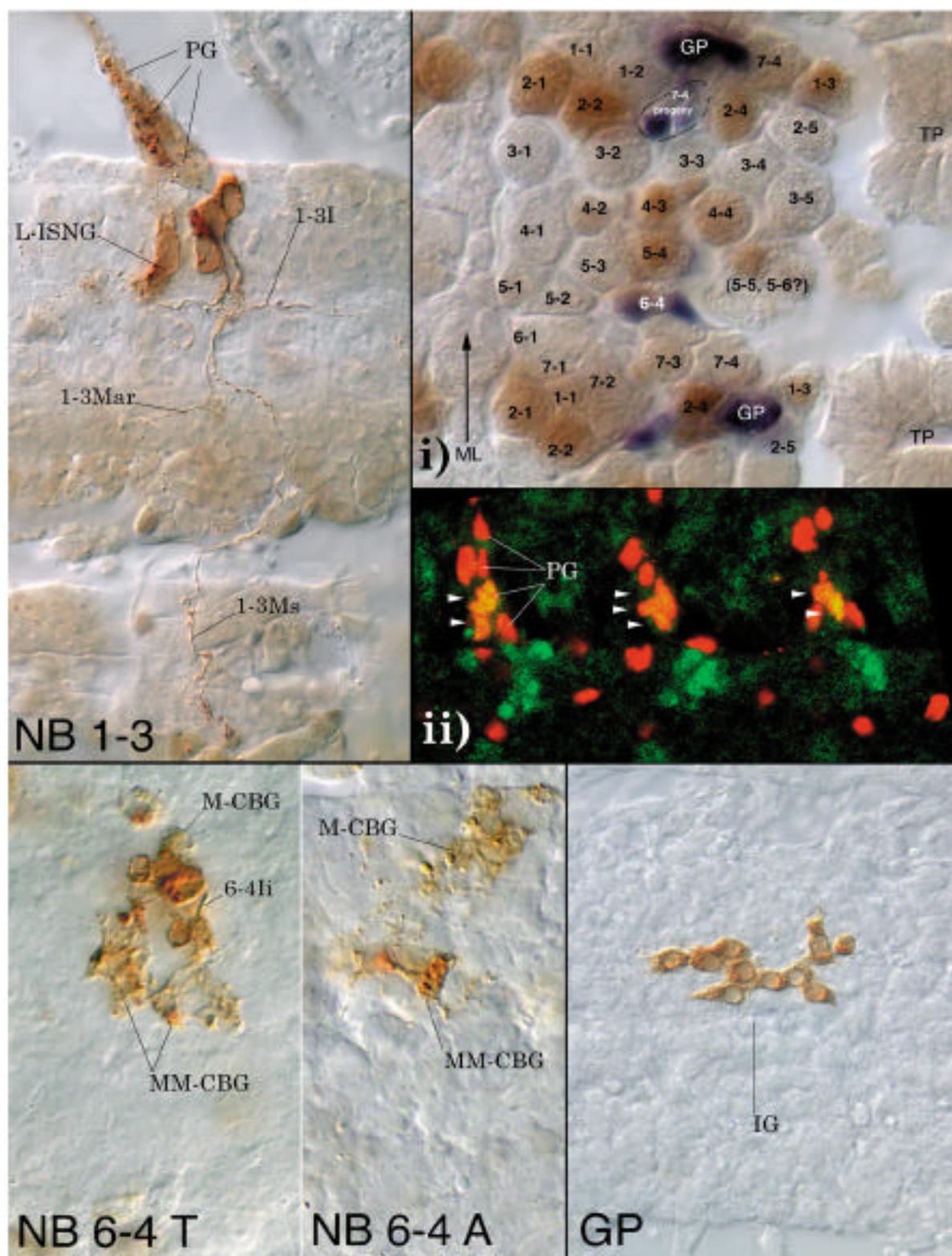
---

### Abb. 8 Zellstammbäume von S4 und S5 Neuroblasten

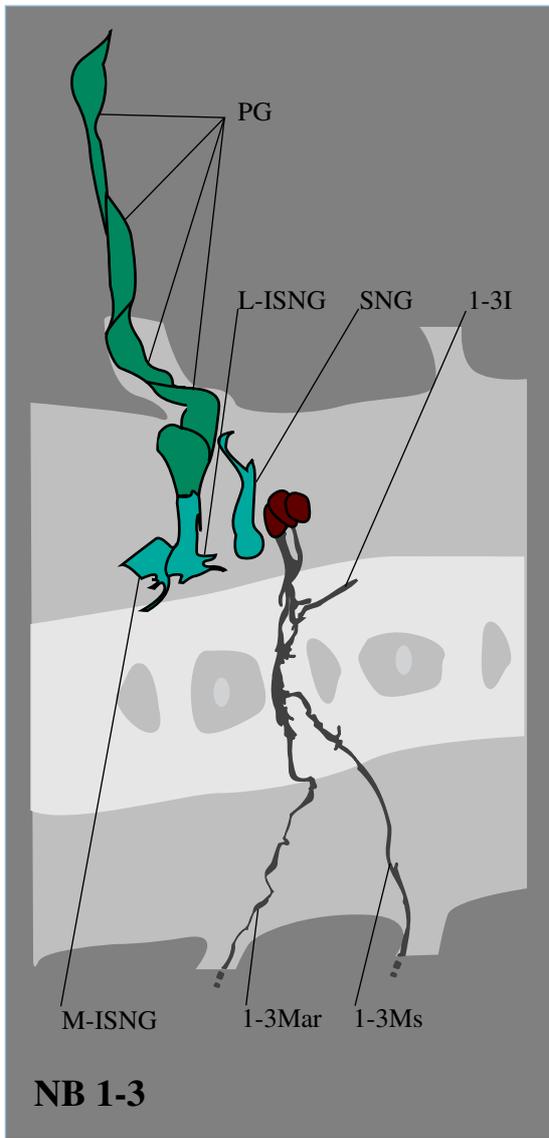
Fotografien (A) und Schemazeichnungen (B) von spätembryonalen Zellstammbäumen von S4 und S5 NBs und Klon  $\gamma$  in einer dorsalen Ansicht (nach Schmidt et al. (1997)). Anterior ist links. Hinsichtlich der Nomenklatur von Neuronen und Gliazellen vgl. Tab. 5 und 6. Bezüglich der Farbcodierung in B vgl. den Text zu Abb. 6.

**NB 2-4T.** Der thorakale Zellstammbaum bestand aus 8 bis 12 Neuronen im dorsalen Kortex, die ipsilateral und kontralateral durch die anteriore Kommissur projizierten. Die kontralateralen Neurite gehörten zu Motoneuronen (2-4M1; 2-4M2) und verließen das Bauchmark durch die anteriore Wurzel des intersegmentalen Nervs (vgl. auch Ai). Endplatten wurden nicht gefunden.

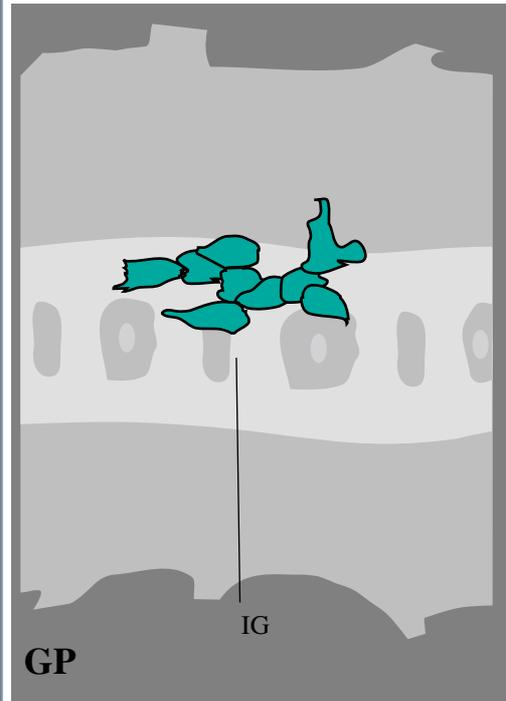
**NB 2-4A.** Der abdominale Stammbaum bestand aus 7 bis 8 Neuronen im dorsalen Kortex, von denen zwei bis drei immer medial lagen. Die Projektionen erstreckten sich ipsilateral und kontralateral durch die anteriore Kommissur, wo sie das Bauchmark durch die anteriore Wurzel des intersegmentalen Nervs verließen. Endplatten wurden nicht beobachtet.



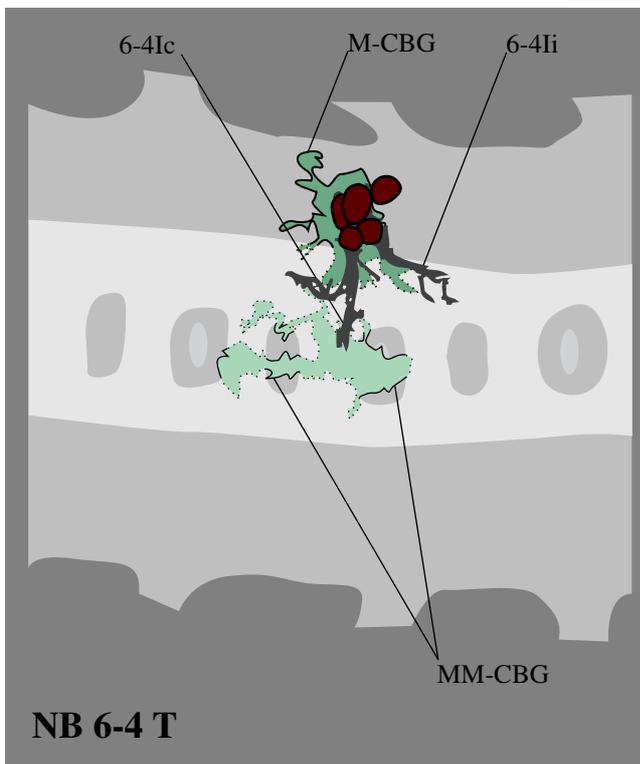
**Abb. 7A**



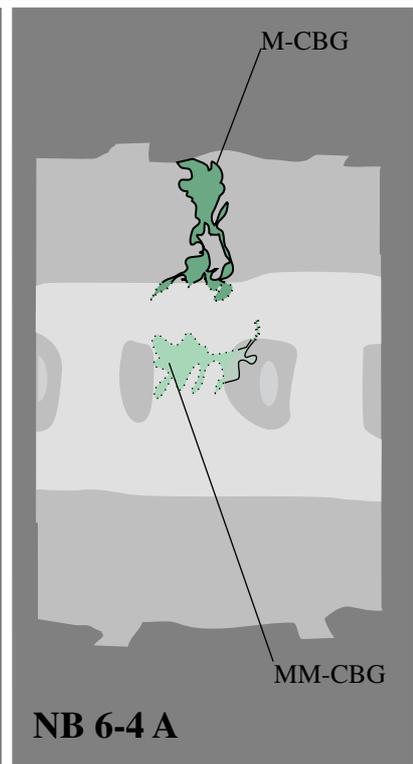
**NB 1-3**



**GP**



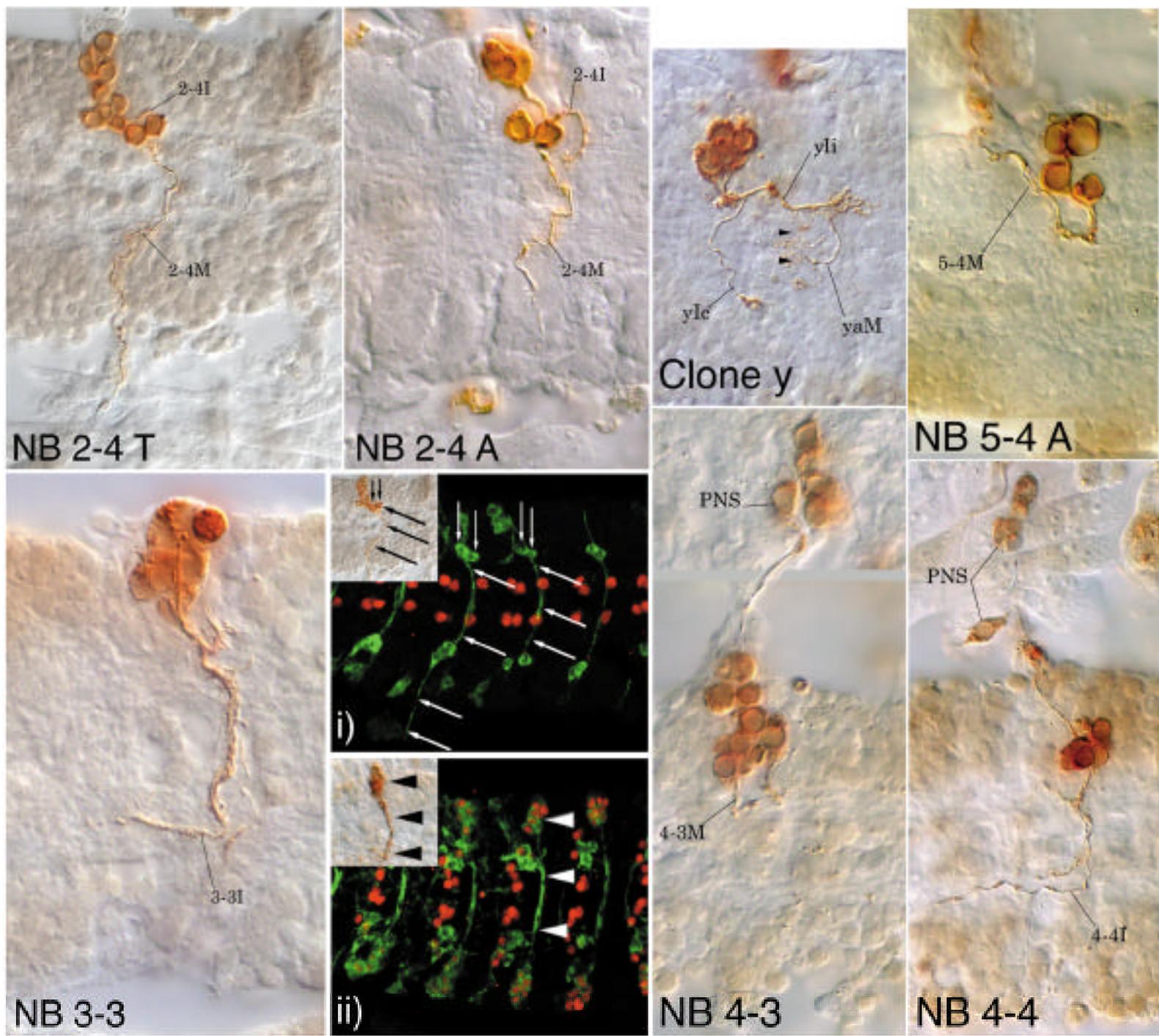
**NB 6-4 T**

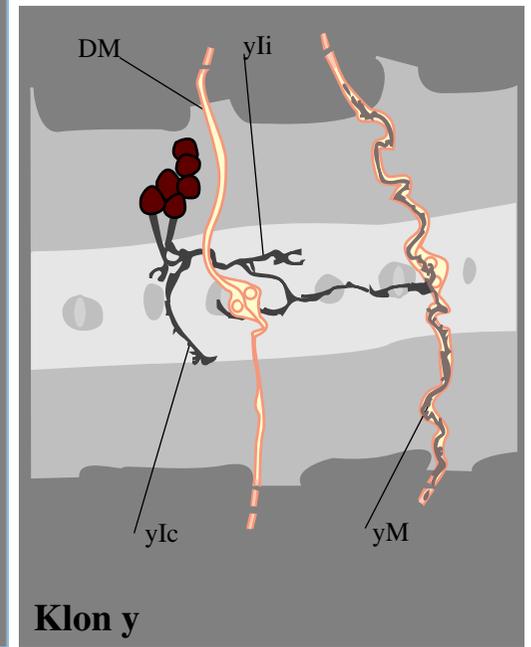
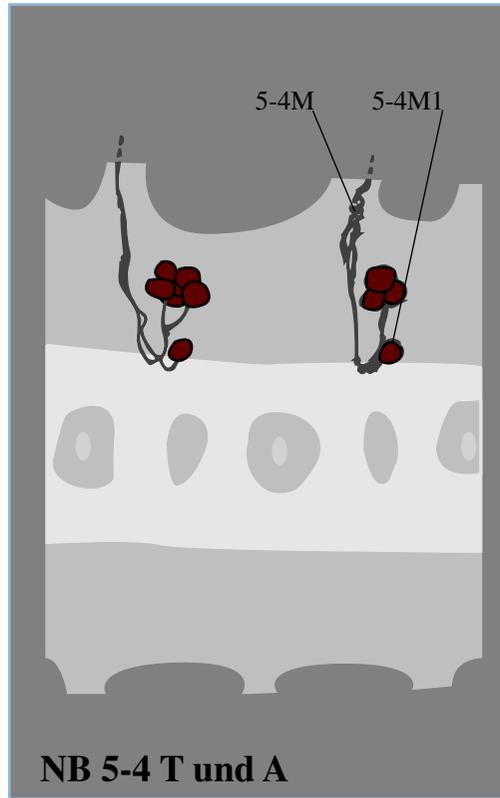
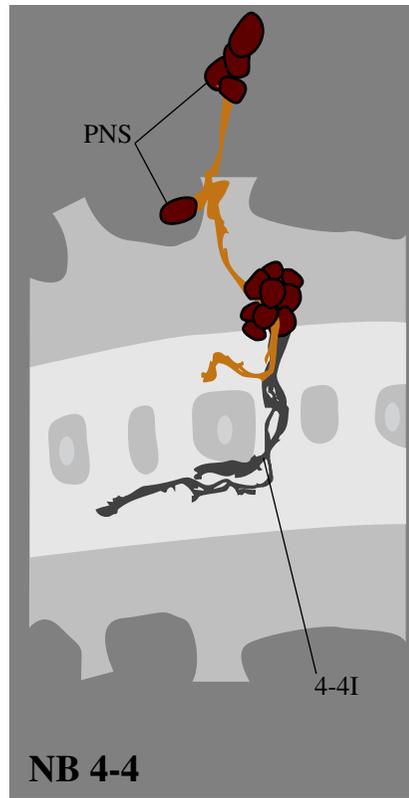
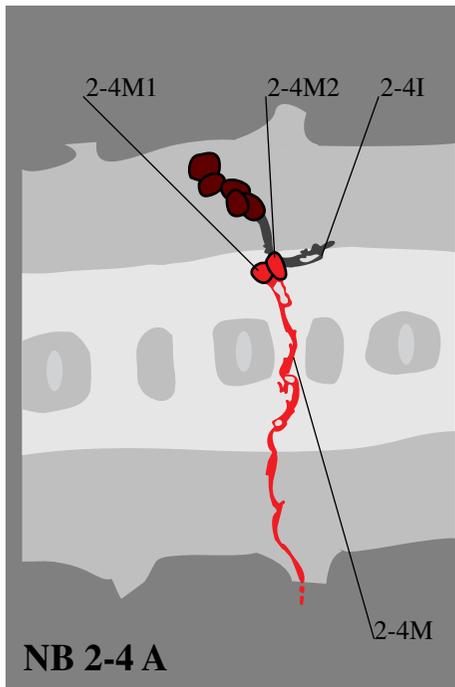
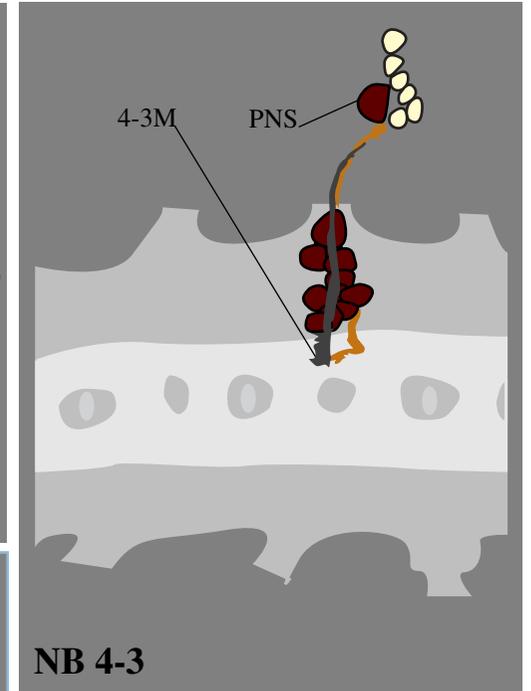
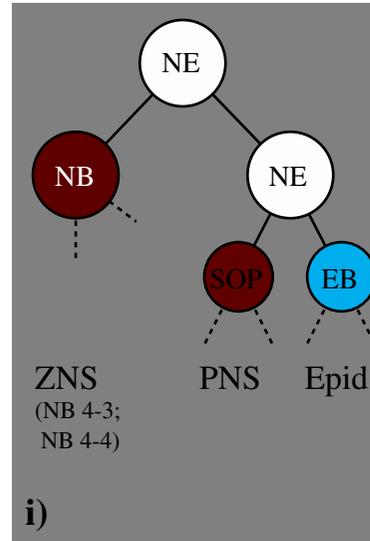
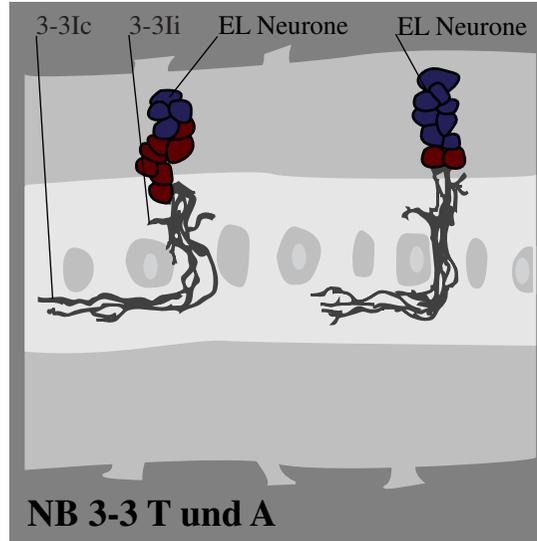
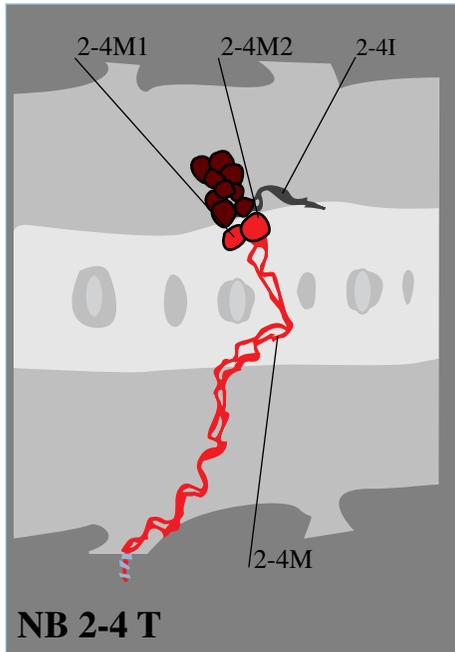


**NB 6-4 A**

**Abb. 7B**

Abb. 8A





**Abb. 8B**

**NB 3-3.** Der Klon bestand aus 10 bis 13 Interneuronen im ventrolateralen Kortex. Sie projizierten ipsilateral und kontralateral durch die anteriore Kommissur. Der Zellstammbaum enthielt das laterale Cluster von Even-Skipped exprimierenden Neuronen (EL, blaue Farbe in 5B). Obwohl die Zellzahl des Klons in abdominalen und thorakalen Segmenten gleich war, war das EL-Cluster im Thorax kleiner (ca. 5 Zellen) als im Abdomen (ca. 9 Zellen). (Ai) Konfokale Abbildung (dorsale Ansicht) des NB 2-4 Stammbaums in Std. 17 Embryonen von *eagle-Gal4 x UAS-tau-GFP* Fliegen (grün; weiße Pfeile). Die kontralateralen Motoprojektionen und die beiden medial gelegenen Zellsomata sind klar erkennbar. Rot, -Even-Skipped (-Eve) Antikörperfärbung. Der Zellstammbaum enthält das laterale Cluster von *eve* exprimierenden Zellen (EL) nicht. (Aii) Eine ventralere Fokusebene des gleichen Präparats zeigt, daß der Stammbaum der NB 3-3 zugeordnet wurde und ebenfalls *eagle* exprimiert (grün; weiße Pfeilspitzen), die EL enthält (gelb/rot).

**NB 4-3.** Der ZNS-Subklon bestand aus 8 bis 13 Neuronen und erstreckte sich vom ventrolateralen bis in den dorsolateralen Kortex. Die einzige Projektion war eine Motoprojektion, die das Bauchmark durch den segmentalen Nerv verließ. Endplatten wurden nicht beobachtet. Zusätzlich zu einem epidermalen Subklon wurde in vielen Fällen noch ein sensorischer Subklon (PNS) beobachtet. In B ist ein sensorisches Neuron mit Projektion orange gezeichnet. Die weißen Zellen sind weitere Zellen des sensorischen Organs, die nicht zum Stammbaum gehören sowie der epidermale Subklon des Stammbaums.

**NB 4-4.** Der Zellstammbaum bestand aus 8 bis 11 Zellen im ventralen und ventrolateralen ZNS-Kortex. Die Neurone projizierten kontralateral durch die anteriore Kommissur. Neben einem epidermalen Subklon (nicht gezeigt) wurde in vielen Fällen ein sensorischer Subklon beobachtet (orange in B).

**Bi.** Hypothese für das Teilungsmuster der neuroektodermalen Vorläufer (NE) von NB 4-3 und 4-4. Nachdem der NE den NB erzeugt hat, teilt er sich in einen sensorischen Organ Vorläufer (SOP) und einen Epidermoblasten (EB). Diese Vorläufer generieren dann die Subklone in ZNS, PNS und Epidermis (Epid.).

**NB 5-4T.** Der thorakale Zellstammbaum setzte sich aus 5 bis 9 Neuronen im dorsolateralen Kortex zusammen. Die einzige Projektion war eine Motoprojektion, die durch den segmentalen Nerv in die Peripherie verlief. In allen Fällen war ein Neuron vom Klon nach medial abgesetzt (5-4M1). Strukturen mit Endplattenmorphologie wurden im Bereich der Muskeln LT4 und DT1 beobachtet.

**NB 5-4A.** Der abdominale Zellstammbaum glich dem thorakalen, enthielt aber nur 3 bis 4 Neurone.

**Klon y.** Der Zellstammbaum konnte keinem bestimmten NB zugeordnet werden. Er bestand aus 6 bis 9 Neuronen im dorsolateralen Kortex. Eine motoneuronale Projektion verließ das ZNS im Bereich der dorsalen Mittellinie des Neuomers und zog danach zur nächst posterior gelegenen mesodermalen dorsomedialen (DM) Zelle (hellorange in B). Dort bifurkierte die Projektion und verlief eingehüllt von der DM Zelle durch den transversen Nerv zum "Segment Border Muskel" (SBM) oder zu VT1. Die Interneurone projizierten ipsilateral und kontralateral durch die posteriore Kommissur. Ein anderer Ast trennte sich in der anterioren Kommissur des nach posterior folgenden Segments von der Motoprojektion und zog nach anterior zum dorso-ventral-Kanal.

### III.2. Entwicklung von Ionenströmen in ML-Neuronen

Durch die Zellstammbaumanalyse mit Dil (Bossing und Technau, 1994, Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997) ist ein hoher Grad an zellulärer Auflösung im embryonalen Bauchmark von *Drosophila* geschaffen worden. Dies ist eine Grundvoraussetzung zum Studium von Entwicklung und Funktion identifizierter Zellpopulationen. Da die Vorläufer der ventralen Mittellinie bereits im Neuroektoderm ohne die Expression zusätzlicher Marker eindeutig identifizierbar sind und weil es sich gezeigt hatte, daß ihre Zellstammbäume besonders überschaubar sind (Bossing und Technau, 1994), wurde, wie zu Beginn der Zellstammbaumanalyse, die Mittellinie (ML) als erstes Modellsystem zur Untersuchung der Entwicklung elektrischer Eigenschaften (Elektrogenese) gewählt. Vorliegend wurden unter Verwendung der Patch-clamp Technik (Hamill et al., 1981) spannungs- und ligandengesteuerte Ionenströme in ausdifferenzierten ML-Neuronen und mögliche Faktoren, die zu deren Expression notwendig sind, *in vitro* analysiert. Im Hinblick auf geplante Untersuchungen zur Elektrogenese von identifizierten Zelltypen im intakten embryonalen ZNS wurden testweise spannungsgesteuerte  $K^+$ -Ströme in einer in Anlehnung an Baines und Bate (1998) entwickelten *in situ* Präparation untersucht. Alle nachfolgend angegebenen Werte sind, soweit nichts anderes gesagt wird, Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD).

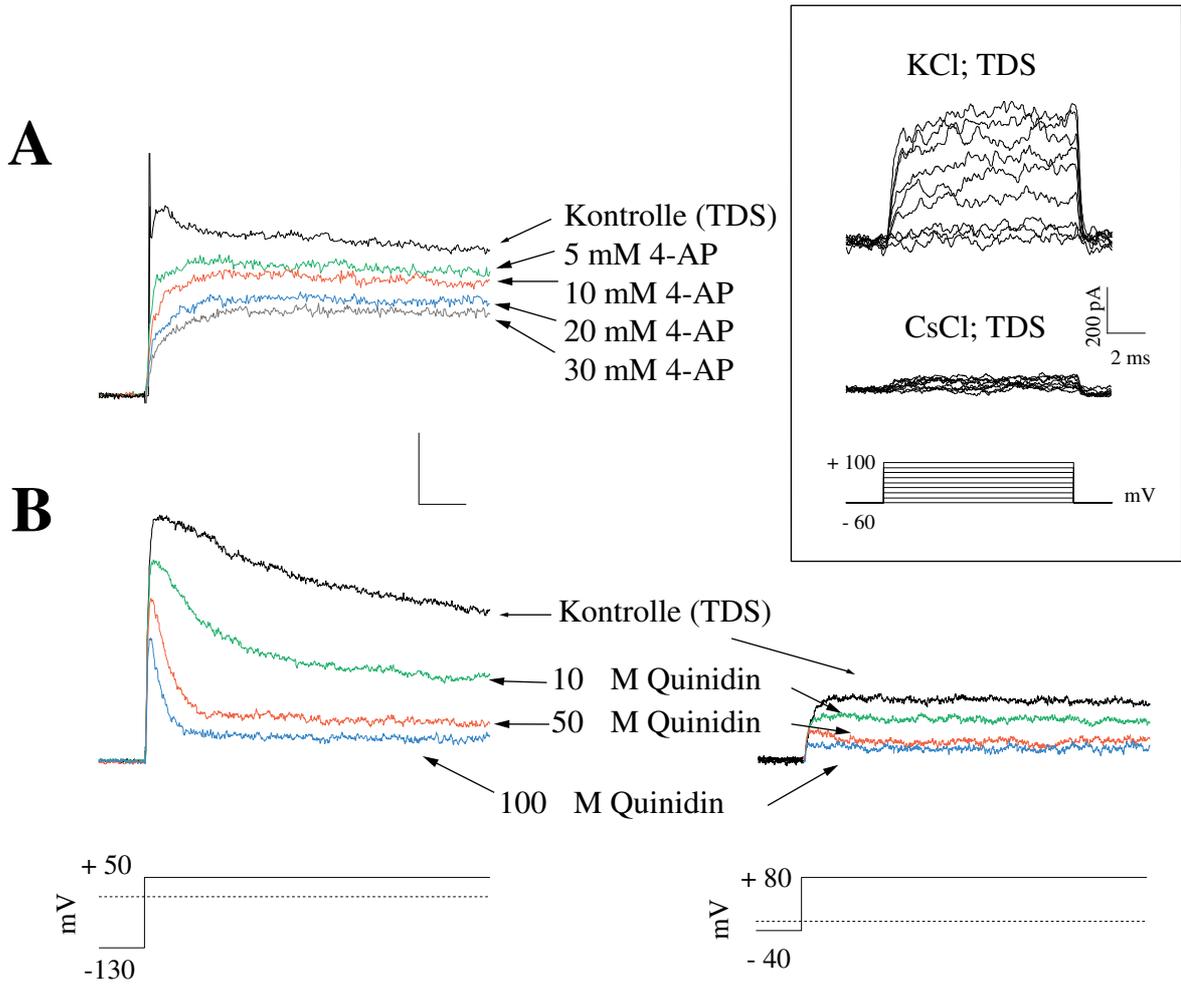
---

#### Abb. 9 Der Auswärtsstrom wurde von $K^+$ getragen

Der Ausschnitt oben rechts (Kasten) zeigt, daß der spannungsgesteuerte Auswärtsstrom, der mit TDS-Badlösung und einer Pipettenlösung auf KCl Basis (Intra 1; vgl. Material und Methoden II.1.2.) in ML-Neuronen beobachtet wurde, durch Austausch von intrazellulärem KCl durch CsCl (Intra 3) während der gleichen Ableitung nahezu vollständig blockiert wurde ( $n = 5$ ; Leckströme wurden online subtrahiert). Für diese Messungen wurde die Spitze der Ableitpipette ca. 1 mm hoch mit Intra 1 gefüllt und dann mit Intra 3 überschichtet.

**A.** Eine schnell aktivierende und inaktivierende Komponente des Auswärtsstroms ( $I_A$ ), ausgelöst durch einen depolarisierenden Testpuls auf +50 mV (300 ms) nach einer Hyperpolarisierung von -130 mV (1s), konnte durch Zusetzen von verschiedenen Konzentrationen von 4-Aminopyridin (4-AP) zur Badlösung stark gehemmt werden ( $n = 11$ ). Eine langsam aktivierende und nicht inaktivierende Komponente blieb selbst in Anwesenheit von 30 mM extrazellulärem 4-AP noch erhalten ( $I_K$ ; s. auch Abb. 12). Die Spitze am Anfang der Stromkurven ist ein kapazitives Artefakt.

**B.** Die nicht inaktivierende Komponente ( $I_K$ ) wurde durch extrazelluläres Quinidin stark gehemmt (links). Zurück blieb eine schnell aktivierende und inaktivierende Komponente ( $I_A$ ;  $n = 10$ ). Darüber hinaus wurde  $I_A$  durch einen depolarisierenden Präpuls von -40 mV eliminiert (rechts). In diesen Protokollen wurde  $I_K$  durch 50 bis 100  $\mu$ M extrazellulärem Quinidin nahezu vollständig blockiert.



**Abb. 9**

### III.2.1. Ein Zellkultursystem für identifizierte ZNS Vorläufer

Um zelltypspezifische Unterschiede in der Elektrogenese zu untersuchen, wurde ein *in vitro* System verwendet, das die selektive Kultivierung identifizierter Vorläuferzellen ermöglicht (Schmidt et al., 2000). Die Kulturen wurden von K. Lür hergestellt. ZNS ML-Vorläufer wurden selektiv aus gastrulierenden Embryonen (Std. 7; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) herausgenommen und unter verschiedenen Kulturbedingungen aufgezogen (Abb. 3 und Material und Methoden II.7.). Wurden die Vorläufer eng benachbart zueinander in der Kulturkammer plaziert, so bildeten sich Neuritenverbindungen zwischen den Nachkommenklonen aus (Wenigzellkultur (WZK) mit Neuritenkontakten; Abb. 3B). Die Ausbildung solcher Kontakte konnte verhindert werden, indem die ML-Vorläufer in einiger Entfernung zueinander in der Kulturkammer plaziert wurden (WZK ohne Neuritenkontakte, Abb. 3C). Unter beiden Kulturbedingungen traten gelegentlich Neuritenverbindungen zwischen den Nachkommenzellen eines Vorläufers auf (intraklonale Neuritenkontakte, Abb. 3D). Zellen mit solchen Kontakten wurden als WZK mit Neuritenkontakten klassifiziert.

Die meisten ML-Vorläufer generierten Klone, die aus zwei bis vier Zellen bestanden, was vergleichbar mit der *in vivo* Situation ist (Bossing und Technau, 1994). Die Klone erschienen nach 20 h *in vitro* morphologisch differenziert und konnten für mindestens acht Tage in Kultur gehalten werden, ohne das Medium zu wechseln. Alle Hauptneurite und viele morphologische Kontakte waren bereits am *in vitro* Tag 1 (IVT 1) ausgebildet. Allerdings traten bis IVT 3 noch zusätzliche Verästelungen auf. Nach IVT 3 blieb die Morphologie konstant oder es wurden sogar Neuritenäste wieder zurückgezogen. In beiden WZK projizierten die Neurone präferentiell radial (s. Abb. 3). Dies ermöglichte es in vielen Fällen, allein auf Grundlage des lichtmikroskopischen Bildes bestimmte Neurite mit hoher Wahrscheinlichkeit bestimmten Neuronen zuzuordnen. Allerdings wurden auch faszikulierte Projektionen beobachtet, wo eine solche Zuordnung nicht möglich war. Die ML-Zellen in WZK exprimierten das ML-spezifische Gen *single minded* (*sim*-Gal4 x UAS-GFP, als Überblick s. u.a. Nambu et al. (1993)), Nachkommenzellen mit glialer Morphologie zeigten ML-gliaspezifische Markerexpression (*slit*-Gal4 x UAS-GFP) und Nachkommenzellen mit neuronaler Morphologie zeigten positive Immunoreaktivität hinsichtlich des neuronenspezifischen Oberflächenmoleküls HRP (Jan und Jan, 1982). Beurteilt nach Zellmorphologie und Markerexpression traten rein neuronale, rein gliale und, im Unterschied zur *in vivo* Situation, auch gemischte Klone auf (Lür und Technau, unveröffentlichte Daten). In einigen Fällen wurden auch einzellige Klone beobachtet, was auf Zelltod oder die Differenzierung des Vorläufers ohne Teilung schließen lassen könnte.

Um den möglichen Einfluß von diffusiblen Faktoren mit großer Reichweite während der Elektrogenese zu berücksichtigen, wurden Massenzellkulturen hergestellt, die aus den meisten Zellen eines Embryos bestanden, in dem die ML-Zellen über GFP-Expression (*sim*-Gal4 x UAS-GFP) markiert waren (Embryonenkultur (EK), Abb. 3E). Auf Grundlage der o.g. Kriterien wurden keine offensichtlichen Unterschiede hinsichtlich der morphologischen und

zeitlichen Differenzierung von Zellen in WZK und EK festgestellt. Allerdings konnte in EK in den meisten Fällen nicht zwischen ML-Neuronen mit und ohne Neuritenkontakten zu anderen Zellen unterschieden werden.

Elektrophysiologische Untersuchungen wurden ausschließlich an ML-Neuronen durchgeführt. Ein hoher Widerstand zwischen Patch-Pipette und Zellmembran (Seal) bildete sich unabhängig von den Kulturbedingungen i.d.R. leicht aus. Durch Anlegen eines mäßigen Unterdrucks konnte die Zellmembran unter der Pipette aufgerissen und die Ganzzell-Konfiguration hergestellt werden (vgl. Material und Methoden II.8.1.). Die Ruhemembranpotentiale lagen zwischen -20 und -40 mV ( $-29 \pm 10$  mV;  $n = 42$ ). Die Zellkapazitäten lagen üblicherweise zwischen 3 und 10 pF ( $6,7 \pm 3,5$  pF;  $n = 86$ ), konnten aber in Ausnahmefällen 20 pF erreichen, was möglicherweise auf elektrische Koppelung benachbarter Zellen hindeuten könnte. Die Stromdichten waren am IVT 1 unter allen drei Kulturbedingungen meistens sehr gering und stiegen bis IVT 3. Ab dann blieben sie konstant. Daher wurden die meisten Ableitungen zwischen IVT 3 und IVT 8 gemacht.

---

### **Abb. 10 Ähnliche Heterogenität von $K^+$ -Auswärtsströmen unter verschiedenen Kulturbedingungen**

Die Ströme wurden in extrazellulärem TDS mit Intra 1 in der Pipette abgeleitet (s. Material und Methoden II.1.2.). Gezeigt sind Stromkurven, die durch eine Depolarisierung auf +50 mV (300 ms) nach einer Hyperpolarisierung auf -130 mV (1s) in ML-Neuronen ausgelöst wurden. Unter allen drei Kulturbedingungen (vgl. Abb. 2) wurden ähnliche Unterschiede in der Erscheinung der spannungsgesteuerten Auswärtsströme beobachtet. Auf Grundlage qualitativer Kriterien könnten diese in vier Gruppen fallen, die sich hinsichtlich der Inaktivierung des makroskopischen Stroms unterscheiden. In Neuronen der Gruppe 1 inaktivierte der Strom langsam während des 300 ms Testpulses. Bei Gruppe 2 Neuronen war die Inaktivierung schneller und bei Gruppe 4 Neuronen sehr schnell. In diesen drei Gruppen schien die inaktivierende Komponente dominant zu sein, während in Gruppe 3 Neuronen die inaktivierende Komponente klein zu sein schien. Die Skalierung gilt für alle Stromkurven. Die anfänglichen Spitzen in den Stromkurven der Gruppe 3 sind kapazitive Artefakte.

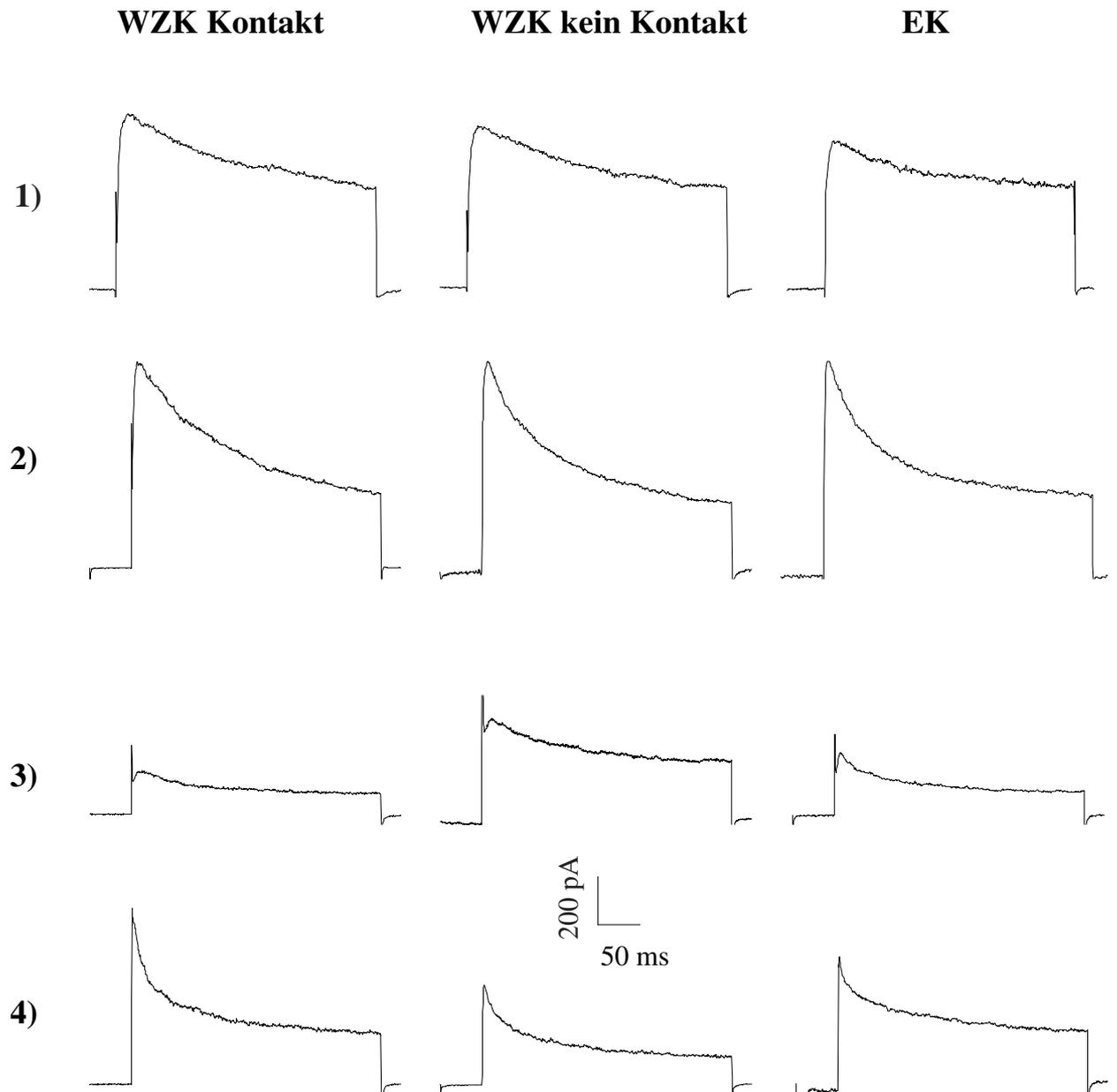


Abb. 10

### III.2.2. Identische Expression spannungsgesteuerter $K^+$ -Ströme unter den verschiedenen *in vitro* Bedingungen

Als erster Schritt zur Untersuchung der Entwicklung von Ionenströmen in ML-Neuronen wurden spannungsgesteuerte Auswärtsströme analysiert. Dazu wurden extrazelluläres  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  durch Tris-X ersetzt (TDS) und eine Pipettenlösung auf KCl-Basis (Intra 1; s. Material und Methoden II.1.2.) verwendet. Die unter diesen Bedingungen abgeleiteten Auswärtsströme wurden stark durch die  $K^+$ -Kanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP) und Quinidin gehemmt und waren nahezu verschwunden, wenn KCl in der Ableitpipette durch CsCl ersetzt wurde (Abb. 9). Dies weist darauf hin, daß die beobachteten Auswärtsströme von  $K^+$  getragen wurden (Hille, 1992).

Am IVT 1 waren die durch Depolarisation ausgelösten  $K^+$ -Ströme typischerweise sehr klein, aktivierten langsam und inaktivierten während des Testpulses von 300 ms nahezu nicht (gleichrichter-ähnlicher Strom,  $I_K$ ). Ab IVT 2 kam ein zweiter, schneller aktivierender und inaktivierender Strom ( $I_A$ ) hinzu. Dieser wurde spätestens ab IVT 3 der dominante Strom. In den meisten Fällen hatte  $I_A$  zumindest in Aktivierungsprotokollen noch eine anhaltende Komponente, die typischerweise genauso groß oder größer war als  $I_K$  und diesen überlagerte. Um die genetische Identität dieser Ströme zu untersuchen, wurden ML-Neurone aus *Shaker*-Nullmutanten und *Shaw*-defizienten Embryonen präpariert. In beiden Mutanten waren  $I_A$  und  $I_K$  vorhanden (Abb. 13), was es nahe legt, daß  $I_A$  von *Shal* und  $I_K$  von *Shab* kodiert wird, welches die beiden anderen in *Drosophila* bekannten Gene für inaktivierende bzw. gleichrichter-ähnliche  $K^+$ -Ströme sind (Tsunoda und Salkoff, 1995a). Es wurde versucht, diese Annahme durch Kultivierung von *Shal*- und *Shab*-defizienten ML-Vorläufern zu beweisen. Da aber frühe Gastrula Embryonen dieser Stämme sehr stark deformiert waren, konnten die ML-Vorläufer in ihnen nicht zweifelsfrei erkannt und daher nicht selektiv entnommen werden.

Nach IVT 2 zeigten ML-Neurone, die in WZK mit und ohne Neuritenkontakte oder in EK gewachsen waren, Heterogenität in der Inaktivierung des makroskopischen Auswärtsstroms, ohne daß dabei eine Korrelation mit den Kulturbedingungen, dem Alter der Kulturen oder der Größe der Klone erkennbar gewesen wäre (Abb. 10). Um zu verifizieren, daß die  $K^+$ -Ströme unter den verschiedenen *in vitro* Bedingungen tatsächlich identisch exprimiert wurden, wurden  $I_A$  und  $I_K$  sowohl pharmakologisch als auch elektrophysiologisch separiert (Abb. 11) und ihre Spannungsabhängigkeiten für Inaktivierung und Aktivierung analysiert (Abb. 12; Tab. 10). Diese Analyse zeigte, obwohl hier von einer definierten Zellpopulation abgeleitet wurde, immer noch eine deutliche Heterogenität in den Werten für die halbmaximale Aktivierung und Inaktivierung ( $V_{1/2}$ ) von  $I_A$  (Abb. 12C). Dabei wurde keine offensichtliche Beziehung mit der Größe der Klone oder dem Alter der Kulturen festgestellt. Darüber hinaus wurde unter allen drei Kulturbedingungen ein sehr ähnlicher Wertebereich abgedeckt und die Mittelwerte für  $V_{1/2}$  von  $I_A$  waren in den verschiedenen Zellkulturen nahezu identisch (Abb. 12A,B; Tab. 10).

### **Abb. 11 ML-Neurone exprimieren inaktivierende und gleichrichterähnliche $K^+$ -Ströme**

In den meisten ML-Neuronen der drei unterschiedlichen *in vitro* Präparationen waren in TDS-Badlösung mit intrazellulärem KCl (Intra 1; s. Material und Methoden II.1.2.) zumindest zwei unterschiedliche  $K^+$ -Ströme vorhanden: ein inaktivierender ( $I_A$ ) und ein nicht inaktivierender, gleichrichter-ähnlicher ( $I_K$ ) Strom.  $I_K$  war i.d.R. sehr klein und  $I_A$  der dominante Strom (beachte unterschiedliche Skalierungen).

**A und B.** Separation von  $I_A$  und  $I_K$ . Alle Ableitungen in A (Inaktivierung) und B (Aktivierung) wurden jeweils von der gleichen Zelle gemacht.

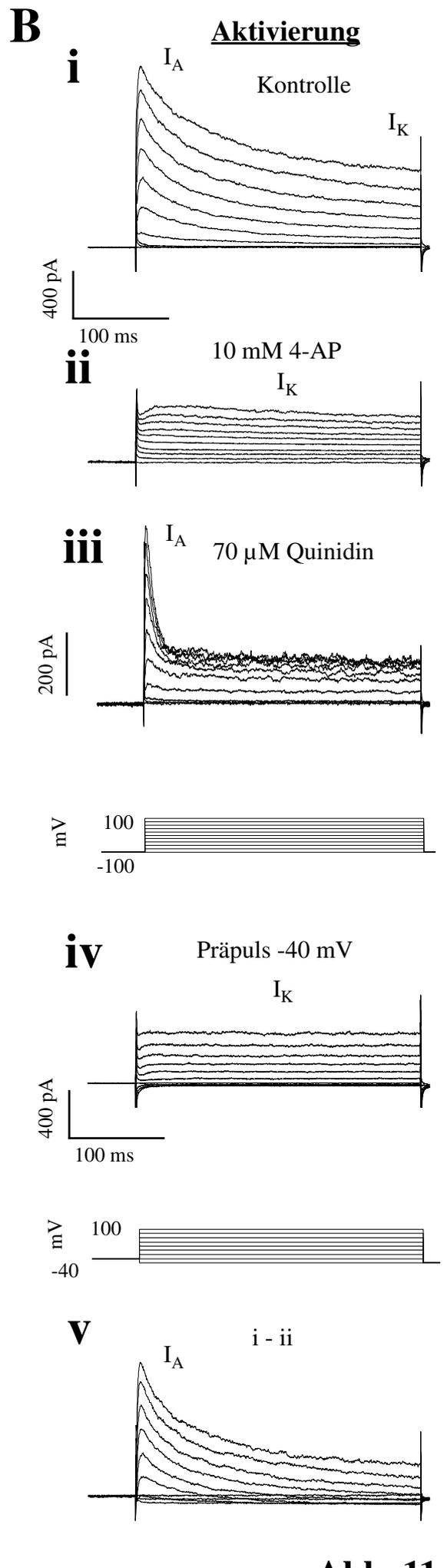
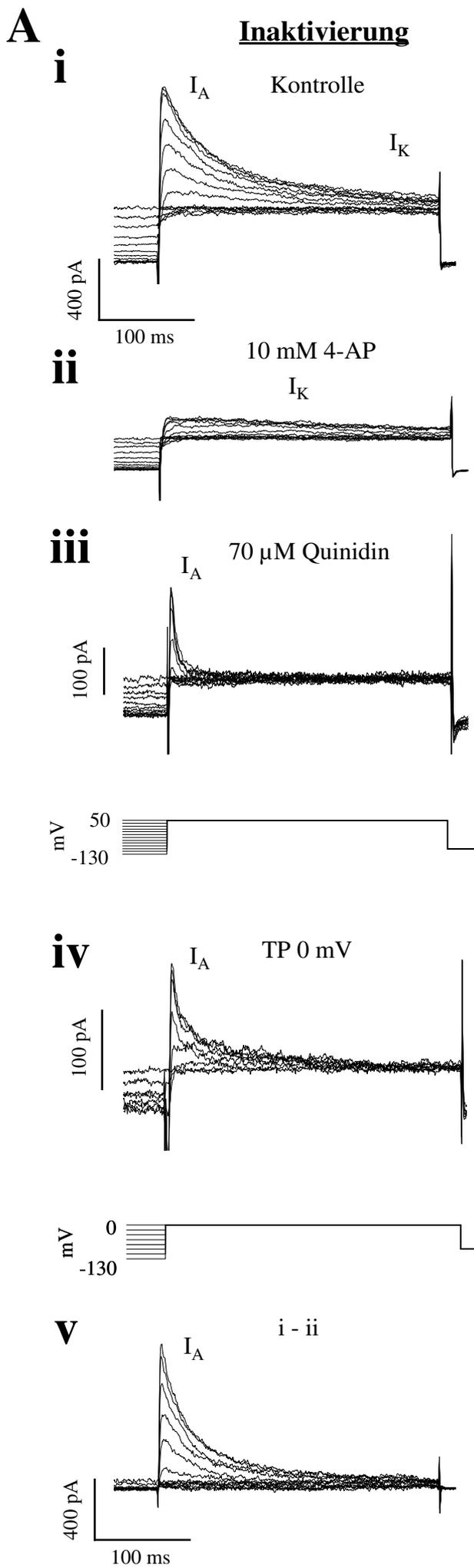
**i.** Ganzzell-Ströme in Abwesenheit von pharmakologischen Blockern (TDS, Kontrolle). In Inaktivierungsprotokollen folgte ein Testpuls auf +50 mV (300 ms) Präpulsen von -130 bis +50 mV (10 mV Inkremente, 1s). In Aktivierungsprotokollen wurde die Kommandospannung nach einer Hyperpolarisierung von -100 mV (1s) in 20 mV Inkrementen bis +100 mV (je 300 ms) erhöht (Protokolle unter iii gezeigt).

**ii.**  $I_A$  wurde durch Applikation von 10 mM extrazellulärem 4-AP blockiert. Zurück blieb ein langsam aktivierender und nahezu nicht inaktivierender  $K^+$ -Strom ( $I_K$ ).

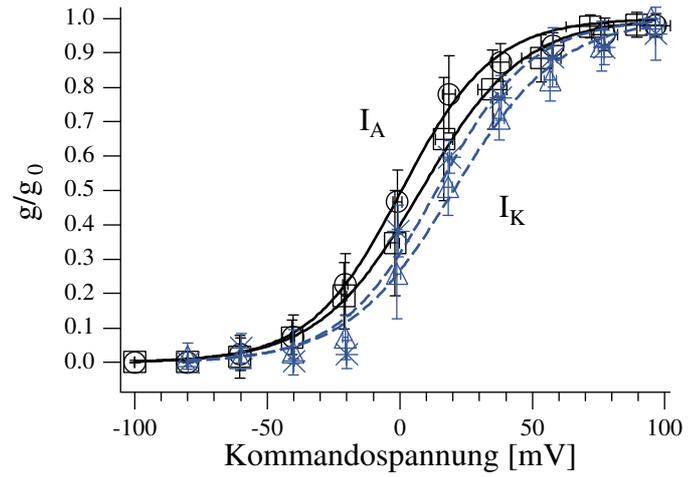
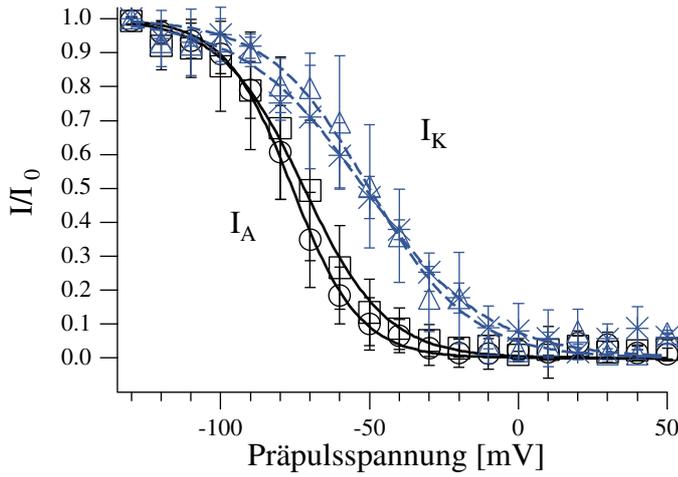
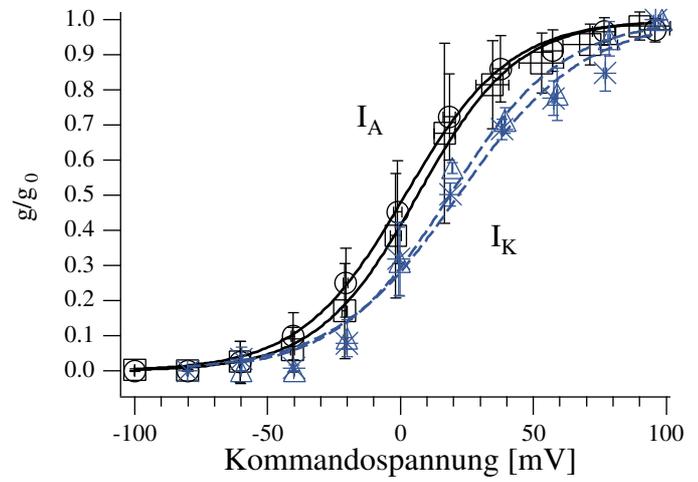
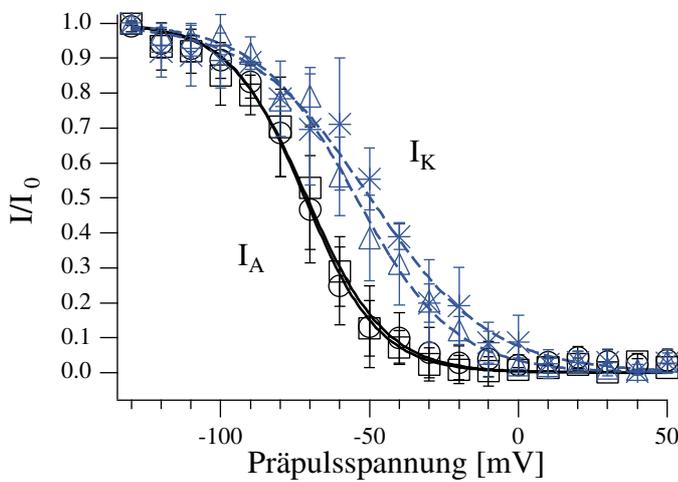
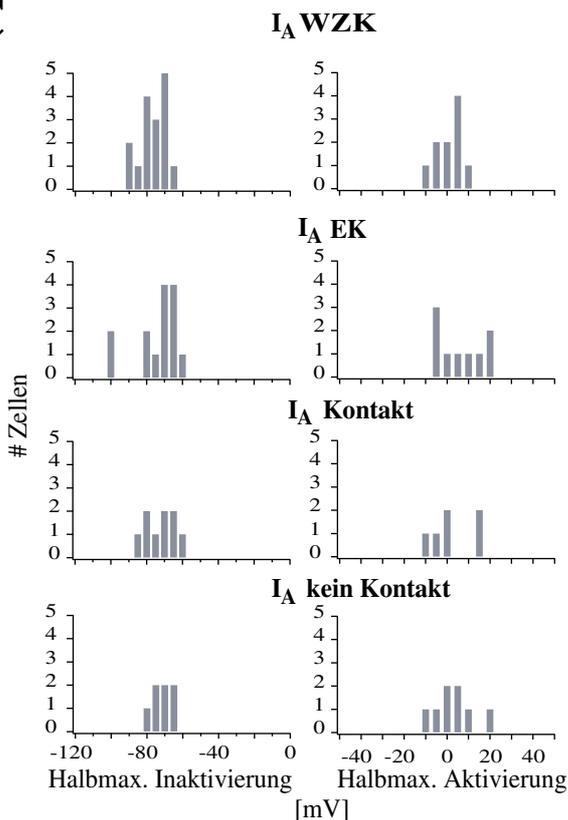
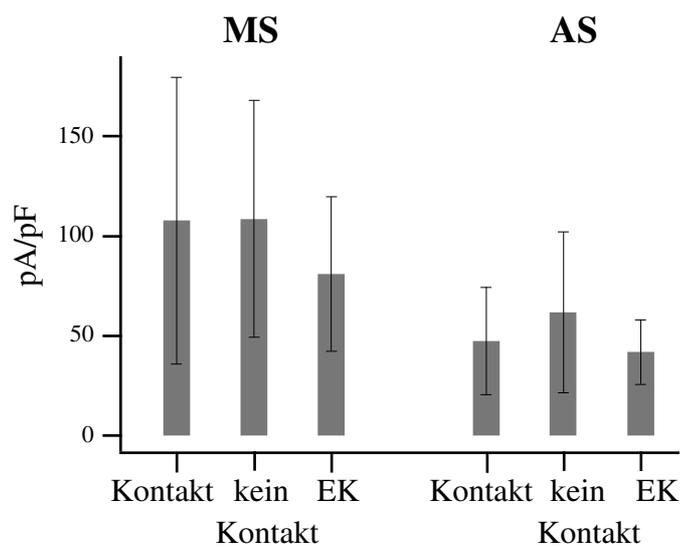
**iii.** Durch Zugabe von 70  $\mu$ M Quinidin zur Badlösung wurde  $I_K$  blockiert. Zurück blieb der schnell aktivierende und inaktivierende  $I_A$  und in Aktivierungsprotokollen zusätzlich eine anhaltende Komponente.

**iv.** Elektrophysiologische Separation von  $I_A$  und  $I_K$ . Da  $I_A$  bei stärker negativen Potentialen aktivierte als  $I_K$  und prominenter war als dieser, konnte er in Inaktivierungsprotokollen durch einen Testpuls auf nur 0 mV isoliert werden. Andererseits inaktivierte  $I_A$  bei stärker hyperpolarisierten Potentialen und daher konnte  $I_K$  in Aktivierungsprotokollen durch einen depolarisierenden Präpuls von -40 mV (1s) isoliert werden (vgl. auch Abb. 13).

**v.** Subtraktion von  $I_K$  (ii und bei Aktivierung auch iv) von den Kontrollströmen (i) ergab einen schnell inaktivierenden Strom, der dem Quinidin-insensitiven Strom (iii) und demjenigen, der durch einen Testpuls auf nur 0 mV (iv) ausgelöst wurde, ähnelte. Die schnellere Inaktivierung des Stroms in iii ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß Quinidin nur geöffnete Kanäle blockiert. Damit sieht man die Blockade des Kanals und nicht seine Inaktivierung. Zusätzlich zu der inaktivierenden Komponente von  $I_A$  ergab sich in Aktivierungsprotokollen bei der Subtraktion noch eine nicht inaktivierende Komponente, die typischerweise genauso groß oder größer als  $I_K$  war.



**Abb. 11**

**A****WZK vs EK****B****Kontakt vs kein Kontakt****C****D****Kaliumstrom-Dichte****Abb. 12**

**Tabelle 10.** Spannungsabhängigkeit des K<sup>+</sup>-Stroms in Wildtyp ML-Neuronen

	Inaktivierung						Aktivierung					
	I <sub>A</sub>			I <sub>K</sub>			I <sub>A</sub>			I <sub>K</sub>		
	V <sub>1/2</sub> [mV]	s [mV/e]	n	V <sub>1/2</sub> [mV]	s [mV/e]	n	V <sub>1/2</sub> [mV]	s [mV/e]	n	V <sub>1/2</sub> [mV]	s [mV/e]	n
<b>WZK</b>	-74,9 ± 4,8	-10,1 ± 2,5	15	-49,7 ± 7,8	-15,3 ± 6,7	5	0,1 ± 5,6	14,5 ± 5	10	18,8 ± 7	18,8 ± 5,1	9
<b>EK</b>	-72,2 ± 8	-12 ± 3,9	13	-52,1 ± 5,7	-20,5 ± 3,3	4	6,7 ± 9,6	17,2 ± 6	9	14,2 ± 2,6	18,2 ± 3,9	4
<b>Kontakt +</b>	-71,1 ± 5,2	-12,6 ± 4,4	7	-53,8 ± 6,1	-16,1 ± 3,6	4	5,9 ± 13	15,8 ± 5	6	18,5 ± 2,6	21,2 ± 2,3	2
<b>Kontakt -</b>	-71,8 ± 9,7	-11,2 ± 2,8	7	-52,6 ± 5,7	-19,4 ± 7,7	4	2,4 ± 8,7	18,3 ± 4,1	8	21,7 ± 5,6	23,2 ± 2,3	2

Für die Inaktivierungsdaten von I<sub>K</sub> wurden die besten Fits mit einer Summe aus zwei Boltzmann-Verteilungen erhalten (Material und Methoden II.8.3.). Da die Parameter der ersten Verteilung ähnliche Werte hatten wie I<sub>A</sub>, sind nur die Parameter der zweiten Komponente gezeigt, wobei davon ausgegangen wird, daß diese I<sub>K</sub> repräsentiert. In allen anderen Fällen wurden die besten Fits mit einer einzigen Boltzmann-Gleichung erhalten. V<sub>1/2</sub> ist die halbmaximale Inaktivierung bzw. Aktivierung, s die Steigung der Spannungsabhängigkeit. WZK, Wenigzellkultur; EK, Embryonenkultur; Kontakt +, Neurone mit Neuritenkontakten; Kontakt -, Neurone ohne Neuritenkontakte. Alle Daten sind als MW ± SD gezeigt. Selbst die V<sub>1/2</sub>-Werte der Aktivierung von I<sub>A</sub> und I<sub>K</sub> in WZK und in EK sind nicht signifikant voneinander verschieden (I<sub>A</sub>: p = 0,15; I<sub>K</sub>: p = 0,18; T-Test).

---

**Abb. 12 Spannungsabhängigkeit und Stromdichten von K<sup>+</sup>-Strömen unter den verschiedenen Zellkulturbedingungen**

**A.** Vergleich der Strom-Spannungsbeziehungen des K<sup>+</sup>-Stroms zwischen ML-Neuronen in Wenigzellkultur (WZK) und Embryonenkultur (EK). Die Maximalamplituden der Ströme, die wie in Abb. 11 dargestellt gemessen wurden, wurden hinsichtlich des Serienwiderstandes korrigiert, der lineare Leckstrom subtrahiert, die Ströme oder die Leitfähigkeiten normiert und gegen das Präpulspotential (Inaktivierung, links) oder die Kommandospannung (Aktivierung, rechts) aufgetragen (vgl. Material und Methoden II.8.3.). Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD), gefittet mit Boltzmann-Verteilungen. Für I<sub>A</sub> wurden die besten Fit- Ergebnisse mit einer einzigen Boltzmann-Gleichung erzielt (schwarz), während I<sub>K</sub> am besten mit einer Summe aus zwei Gleichungen zu fitten war (blau), was eine unvollständige Separation von der nicht inaktivierenden Komponente von I<sub>A</sub> andeuten könnte. Innerhalb des Fehlerbereichs waren die Strom-Spannungsbeziehungen von I<sub>A</sub> bzw. I<sub>K</sub> unter den verschiedenen *in vitro* Bedingungen identisch, wobei I<sub>A</sub> jeweils die hyperpolarisiertere Spannungsabhängigkeit hatte (Werte s. Tab. 10; WZK: I<sub>A</sub> Kreise, I<sub>K</sub> Dreiecke; EK: I<sub>A</sub> Quadrate, I<sub>K</sub> Sterne).

**B.** Vergleich der K<sup>+</sup>-Strom-Spannungsbeziehungen zwischen ML-Neuronen mit Neuritenverbindungen zu anderen Zellen und solchen ohne diese Kontakte. Zur Erstellung der Graphiken vgl. A. Wiederum zeigten I<sub>A</sub> (schwarz) bzw. I<sub>K</sub> (blau) nahezu identische Spannungsabhängigkeiten unter den verschiedenen Zellkulturbedingungen (s. Tab. 10; ohne Neuritenkontakte: I<sub>A</sub> Kreise, I<sub>K</sub> Dreiecke; mit Neuritenkontakten: I<sub>A</sub> Quadrate, I<sub>K</sub> Sterne).

**C.** Verteilung der halbmaximalen Inaktivierungs- und Aktivierungswerte von I<sub>A</sub> unter den verschiedenen Kulturbedingungen (für MW s. Tab. 10). Obwohl von einer definierten Zellpopulation abgeleitet wurde, war unter allen drei *in vitro* Bedingungen eine deutliche Heterogenität zu beobachten. Diese hatte keine offensichtliche Beziehung zur Größe der Klone oder zum Alter der Kulturen.

**D.** Die K<sup>+</sup>-Stromdichten waren sowohl für den Maximalstrom (MS), als auch für den anhaltenden Strom (AS) unter allen drei Kulturbedingungen nahezu identisch. Die Ströme, die während eines Testpulses auf +50 mV (300 ms) nach einem Präpuls von -130 mV (1s) ausgelöst wurden (Badlösung TDS, Pipettenlösung Intra 1), wurden auf die Zellkapazitäten normiert (vgl. Material und Methoden II.8.3.). ML-Neurone in WZK mit Neuritenkontakten hatten MS von  $107,8 \pm 71,8$  pA/pF und AS von  $47,5 \pm 27$  pA/pF (n = 13). ML-Neurone in WZK ohne diese Kontakte hatten MS von  $108,7 \pm 59,4$  pA/pF und AS von  $61,8 \pm 40,3$  pA/pF (n = 10). In EK waren die Stromdichten für den MS  $81,2 \pm 38,7$  pA/pF und für die AS  $42 \pm 16,2$  pA/pF (n = 11; jeweils MW ± SD). Da die Stromdichten in Abwesenheit von pharmakologischen Blockern ermittelt wurden, setzt sich AS aus I<sub>K</sub> und der anhaltenden Komponente von I<sub>A</sub> zusammen.

---

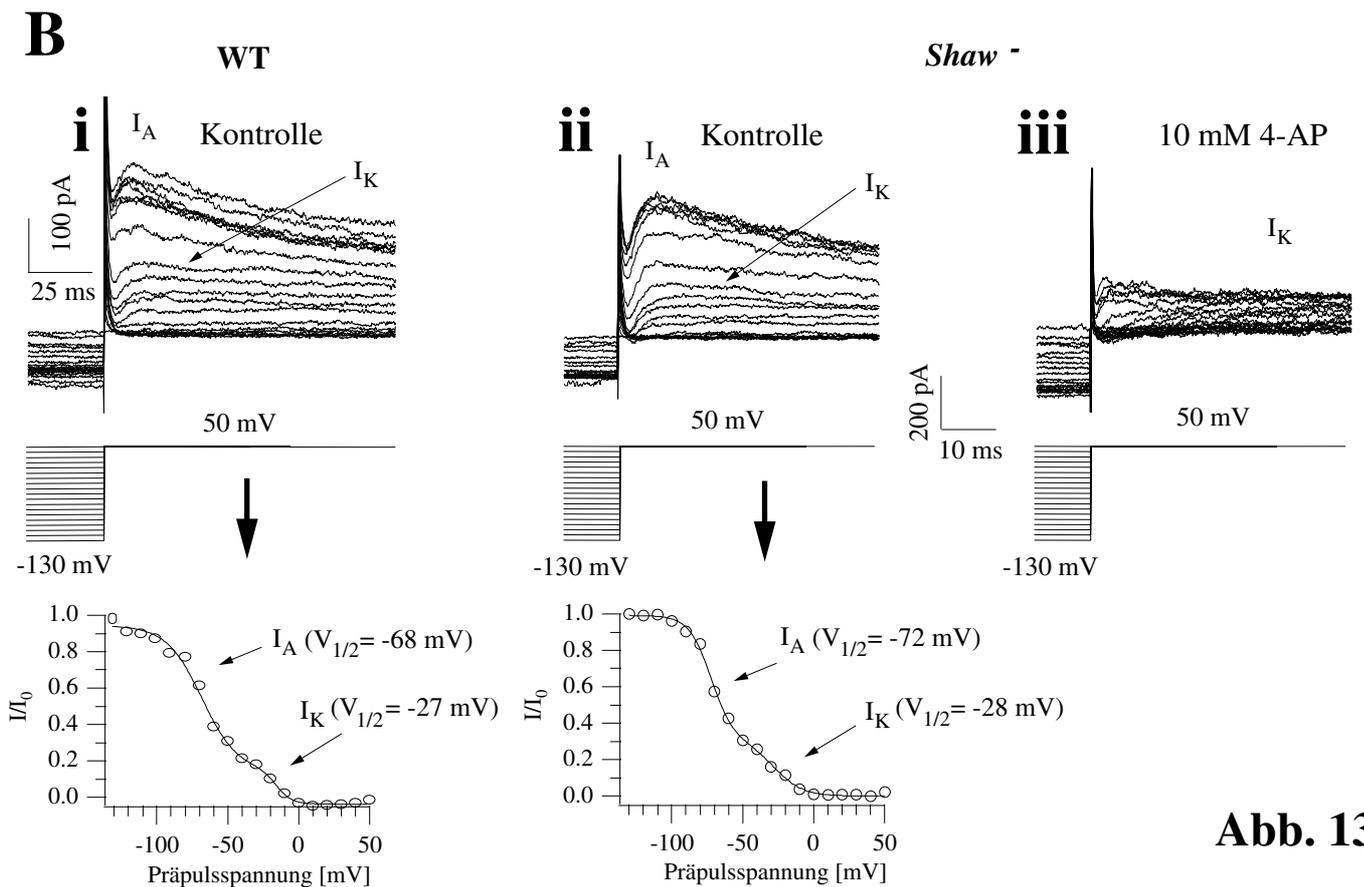
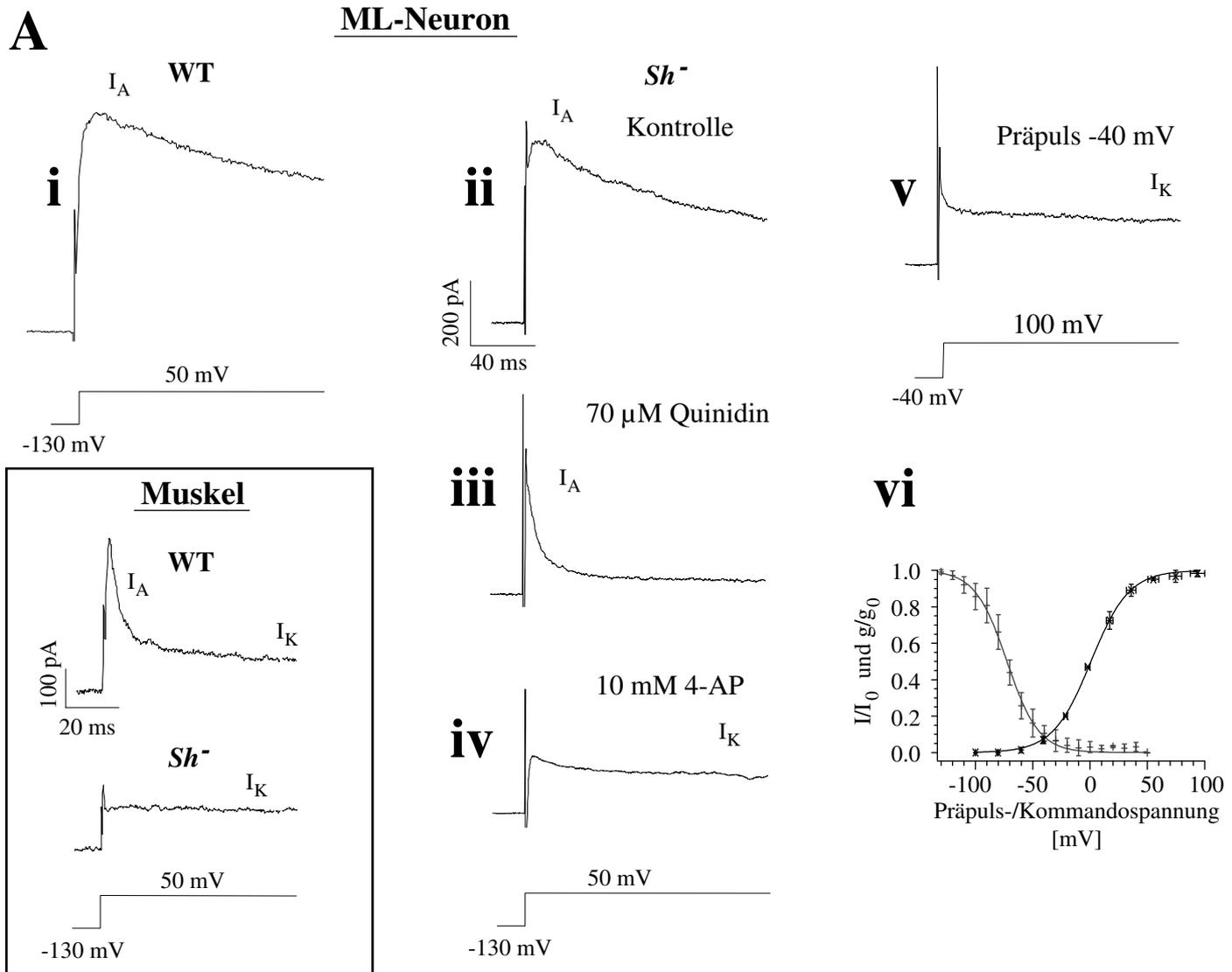
$I_K$  blieb sehr klein ( $\approx 50$  pA bei einer Kommandospannung von 50 mV) und wurde selbst in Anwesenheit von 4-AP i.d.R. stark durch die anhaltende Komponente von  $I_A$  überlagert. Daher konnte  $I_K$  nur in wenigen Fällen analysiert werden. In diesen Fällen wurden keine Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit zwischen den verschiedenen *in vitro* Konditionen festgestellt (Abb. 12A,B; Tab. 10). Zusätzlich zu den Spannungsabhängigkeiten wurden noch die Stromdichten (Stromamplituden bei einem Testpuls auf +50 mV, ausgehend von einem Haltepotential von -130 mV, normiert auf die Zellkapazitäten) für den Maximalstrom und den anhaltenden Strom untersucht. Wiederum wurden unter allen drei Kulturbedingungen sehr ähnliche Werte gefunden (Abb. 12D).

---

### Abb. 13 $K^+$ -Kanal Mutanten

**A.** Spannungsgesteuerte Auswärtsströme in Wildtyp (WT) und *Shaker*-Nullmutaten (*Sh*<sup>-</sup>). Der Ausschnitt (Kasten) zeigt, daß ein schnell aktivierender und inaktivierender Teil des Auswärtsstroms ( $I_A$ ), der im WT-Muskel *in situ* (Flat-Präparation; Badlösung TDS; Pipettenlösung Intra 1; s. Material und Methoden) vorhanden war, in *Sh*<sup>-</sup> fehlte ( $n = 4$ ). Der in kultivierten WT-ML-Neuronen (**i**) in TDS Badlösung mit der Pipettenlösung auf KCl Basis (Intra 1) beobachtete inaktivierende Anteil des Auswärtsstroms ( $I_A$ ) war auch in *Sh*<sup>-</sup> ML-Neuronen *in vitro* vorhanden (**ii**;  $n = 16$ ).  $I_A$  in *Sh*<sup>-</sup> war insensitiv gegen 70  $\mu$ M Quinidin (**iii**), wurde aber durch 10 mM 4-AP stark gehemmt (**iv**). Die Ströme wurden jeweils während eines 300 ms Testpulses auf +50 mV aufgenommen, der einem 1s Präpuls von -130 mV folgte. Darüber hinaus konnte  $I_A$  durch einen depolarisierenden Präpuls von -40 mV (1s) eliminiert werden (**v**). Die Strom-Spannungsbeziehungen für die Inaktivierung und Aktivierung von  $I_A$  in *Sh*<sup>-</sup> wurden wie in Abb. 12 beschrieben ermittelt (**vi**; Inaktivierung (grau):  $V_{1/2} = -72,5 \pm 4,5$  mV,  $S = -13,8 \pm 2,9$  mV/e ( $n = 5$ ); Aktivierung (schwarz):  $V_{1/2} = 0,8 \pm 1,7$  mV,  $S = 16,3 \pm 0,3$  mV/e ( $n = 2$ ); jeweils MW  $\pm$  SD; WT Daten s. Tab. 10).

**B.** Spannungsgesteuerte Auswärtsströme in kultivierten WT und *Shaw*-defizienten (*Shaw*<sup>-</sup>) ML-Neuronen in Inaktivierungsprotokollen ( $n = 2$ ; zum Protokoll vgl. Text zu Abb. 11). Der im WT in TDS mit Intra 1 beobachtete Auswärtsstrom (Kontrolle) setzte sich aus einer inaktivierenden und einer nicht inaktivierenden Komponente ( $I_A$  und  $I_K$ ) zusammen (**i** oben; vgl. auch Abb. 11). Die Spitzen am Anfang sind kapazitive Artefakte. Dementsprechend zeigte die Strom-Spannungsbeziehung (unten) einen doppelt sigmoidalen Verlauf und die besten Fit-Ergebnisse wurden mit einer Summe aus zwei Boltzmann-Gleichungen erzielt (s. Material und Methoden II.8.3.). Die halbmaximale Inaktivierung ( $V_{1/2}$ ) der ersten Komponente entspricht der für den isolierten  $I_A$  (s. Tab. 10). Daher repräsentiert die zweite Komponente wahrscheinlich  $I_K$ . In *Shaw*<sup>-</sup> zeigte sich ein entsprechender Kontrollstrom mit ähnlichen Parametern in der Strom-Spannungsbeziehung (**ii**). Die inaktivierende Komponente dieses Stroms wurde stark durch 10 mM 4-AP inhibiert (**iii**). Zurück blieb ein langsam aktivierender und nahezu nicht inaktivierender Strom, vergleichbar mit  $I_K$  im WT (s. Abb. 11). Aufgrund seiner geringen Größe und der wenigen Fälle konnte die Spannungsabhängigkeit des Stroms nicht ermittelt werden.



**Abb. 13**

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß hinsichtlich der verwendeten Kriterien keine Unterschiede in den spannungsgesteuerten  $K^+$ -Strömen gefunden wurden. Selbst ML-Vorläufer, die unter den sehr interaktionsarmen Bedingungen in WZK ohne Neuritenkontakte aufgewachsen waren, generierten Neurone, die gleiche  $K^+$ -Ströme exprimierten wie Zellen, die in EK gehalten worden waren. Diese Daten legen einen hohen Grad an Zellautonomie in der Expression von spannungsgesteuerten  $K^+$ -Strömen nahe.

### III.2.3. Die Expression spannungsgesteuerter $Na^+$ -Ströme korrelierte mit dem Vorhandensein von Neuritenkontakten

In Abwesenheit von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  und intrazellulärem  $K^+$  (0  $Ca^{2+}$ -DS und CsCl Pipettenlösung (Intra 2); s. Material und Methoden II.1.2.) konnte ab IVT 3 in ML-Neuronen durch Depolarisation (ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV) ein schnell aktivierender und inaktivierender Strom ausgelöst werden. Dieser Strom war auch in Anwesenheit von intrazellulärem  $K^+$  (Intra 1 Pipettenlösung) als eine schnelle, einwärtsgerichtete Komponente, die von dem  $K^+$ -Auswärtsstrom gefolgt wurde, erkennbar. Der Strom war verschwunden, wenn extrazelluläres  $Na^+$  durch Tris-X ersetzt wurde ( $Ca^{2+}$ -TDS mit 4-AP und TEA; Daten nicht gezeigt). Da er aber in Abwesenheit von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  und intrazellulärem  $K^+$  vorhanden war, wurde er höchst wahrscheinlich von  $Na^+$  getragen ( $I_{Na}$ ).

$I_{Na}$  war an IVT 1 kaum detektierbar (Abb. 14A). Nach IVT 2 aktivierte er bei Kommandospannungen positiver als -30 mV und erreichte sein Maximum bei -11 mV (Abb. 14B). In allen Fällen inaktivierte er sehr schnell. Eine anhaltende  $I_{Na}$  Komponente, ähnlich der zuvor für Subpopulationen von *Drosophila*-Neuronen in Massenkultur beschriebenen (Saito und Wu, 1991; O'Dowd, 1995), wurde in ML-Neuronen nicht gefunden. Die Umkehrung des Stroms konnte nicht beobachtet werden. Nur ML-Neurone mit  $I_{Na}$  waren in der Lage Aktionspotentiale (APs) zu generieren, wenn sie in der Strom-Klemme (current clamp) in DS Badlösung mit intrazellulärem KCl elektrisch stimuliert wurden (9/12; Abb. 14C). In allen neun Fällen wurde selbst bei anhaltender Stimulation (100 ms) nur ein einziges AP ausgelöst, was vergleichbar mit einmal feuernenden *Drosophila*-Neuronen in Massenzellkultur ist (O'Dowd, 1995). In Abwesenheit von  $I_{Na}$  konnten keine APs ausgelöst werden ( $n = 35$ ). Keines der im current clamp untersuchten ML-Neurone war spontan aktiv ( $n > 50$ ).

Interessanterweise wurde  $I_{Na}$  in 78% ( $n = 59$ ) der ML-Neurone gefunden, die in WZK mit Neuritenkontakten aufgewachsen waren, aber nur in 15% ( $n = 52$ ) von Neuronen in WZK ohne diese Kontakte. Diese Statistik enthält auch Ableitungen mit der Pipettenlösung auf KCl-Basis. Bei Berücksichtigung nur derjenigen Fälle, in denen  $I_{Na}$  isoliert wurde, wäre der Unterschied noch größer ( $I_{Na}$  vorhanden: WZK mit Neuritenkontakten 87% ( $n = 23$ ), WZK ohne Neuritenkontakte 17% ( $n = 24$ )). In den wenigen Fällen von intraklonalen Neuritenverbindungen (s.o.) wurde  $I_{Na}$  in 80% der Zellen gefunden ( $n = 10$ ). In EK, wo es

i.d.R. nicht möglich war zu entscheiden, ob Neuritenverbindungen vorhanden waren, wurde  $I_{Na}$  in 35% der Zellen gefunden ( $n = 46$ ; Abb. 14D). In den Fällen in EK, in denen Neuritenverbindungen aufgrund optischer Kriterien identifiziert werden konnten (z.B. wenn ML-Klone separat lagen und überlappende Projektionen mit anderen Zellclustern zeigten), wurde eine den WZK entsprechende Abhängigkeit der  $I_{Na}$  Expression von Neuritenverbindungen beobachtet ( $n = 11$ ). Die  $Na^+$ -Stromdichten in denjenigen Zellen, in denen  $I_{Na}$  gut isoliert und angemessen kontrolliert wurde (vgl. II.8.1.), waren nahezu identisch in Neuronen mit ( $n = 11$ ) und ohne Neuritenverbindungen ( $n = 4$ ; Abb. 4E). Da unter allen drei Zellkulturbedingungen Kontakte zwischen den Zellsomata bestanden, legen diese Daten den Schluß nahe, daß Kontakte zwischen den Projektionen von Neuronen (und nicht zwischen Somata) die Wahrscheinlichkeit für die funktionale Expression von  $Na^+$ -Kanälen wesentlich erhöhen.

---

**Abb. 14 Expression von  $Na^+$ -Strömen korrelierte mit dem Vorhandensein von Neuritenkontakten**

**A.** Nach einem hyperpolarisierenden Präpuls von  $-100$  mV ( $1s$ ) wurde die Kommandospannung in  $10$  mV Inkrementen von  $-60$  auf  $+60$  mV erhöht. Dabei war am *in vitro* Tag eins (IVT 1) in  $0-Ca^{2+}$ -DS-Badlösung mit einer Pipettenlösung auf CsCl Basis (Intra 2; s. Material und Methoden II.1.2.) nur ein sehr kleiner Strom detektierbar. Ab IVT 3 wurde ein schnell aktivierender und inaktivierender spannungsgesteuerter  $Na^+$ -Strom ( $I_{Na}$ ) in ML-Neuronen deutlich meßbar. Bei den gezeigten Stromkurven wurden die Leckströme während der Messung subtrahiert.

**B.** Spannungsabhängigkeit von  $I_{Na}$  für ML-Neurone, die zumindest drei Tage in Kultur gehalten wurden. Die Ströme einzelner Zellen wurden leckstromkorrigiert, normiert und gegen die hinsichtlich des Serienwiderstandes korrigierte Kommandospannung aufgetragen (gepunktete Linien,  $n = 8$ ). Die ausgefüllten Kreise und die durchgezogene Linie sind der Mittelwert.  $I_{Na}$  aktivierte bei Spannungen oberhalb von  $-30$  mV und erreichte sein Maximum bei  $-11$  mV. Die Umkehrung des Stroms konnte nicht beobachtet werden.

**C.** ML-Neurone mit  $I_{Na}$  waren in der Lage Aktionspotentiale (AP) zu generieren, wenn sie im Current-clamp in DS Badlösung mit intrazellulärem KCl (Intra 1; s. Material und Methoden II.1.2.) elektrisch stimuliert wurden ( $9$  von  $12$ ). Selbst bei anhaltender Stimulation wurde immer nur ein AP generiert (einmal feuernde Zellen; gestrichelte Linie =  $0$  mV).

**D.**  $I_{Na}$  wurde in  $78\%$  der ML-Neurone mit Neuritenkontakten zu anderen Zellen beobachtet ( $n = 59$ ), aber nur in  $15\%$  der ML-Neurone, denen diese Kontakte fehlten. In Embryonenkulturen (EK), wo normalerweise nicht zwischen Zellen mit und ohne Neuritenkontakten unterschieden werden konnte, wurde  $I_{Na}$  in  $35\%$  der ML-Neurone gefunden ( $n = 46$ ).

**E.** Unter den gegebenen Ableitbedingungen waren die  $I_{Na}$ -Dichten für Neurone in WZK mit und ohne Neuritenkontakte nahezu identisch (Kontakt:  $11,7 \pm 7,3$  pA/pF ( $n = 11$ ); kein Kontakt:  $11,4 \pm 6,7$  pA/pF ( $n = 4$ ); MW  $\pm$  SD).

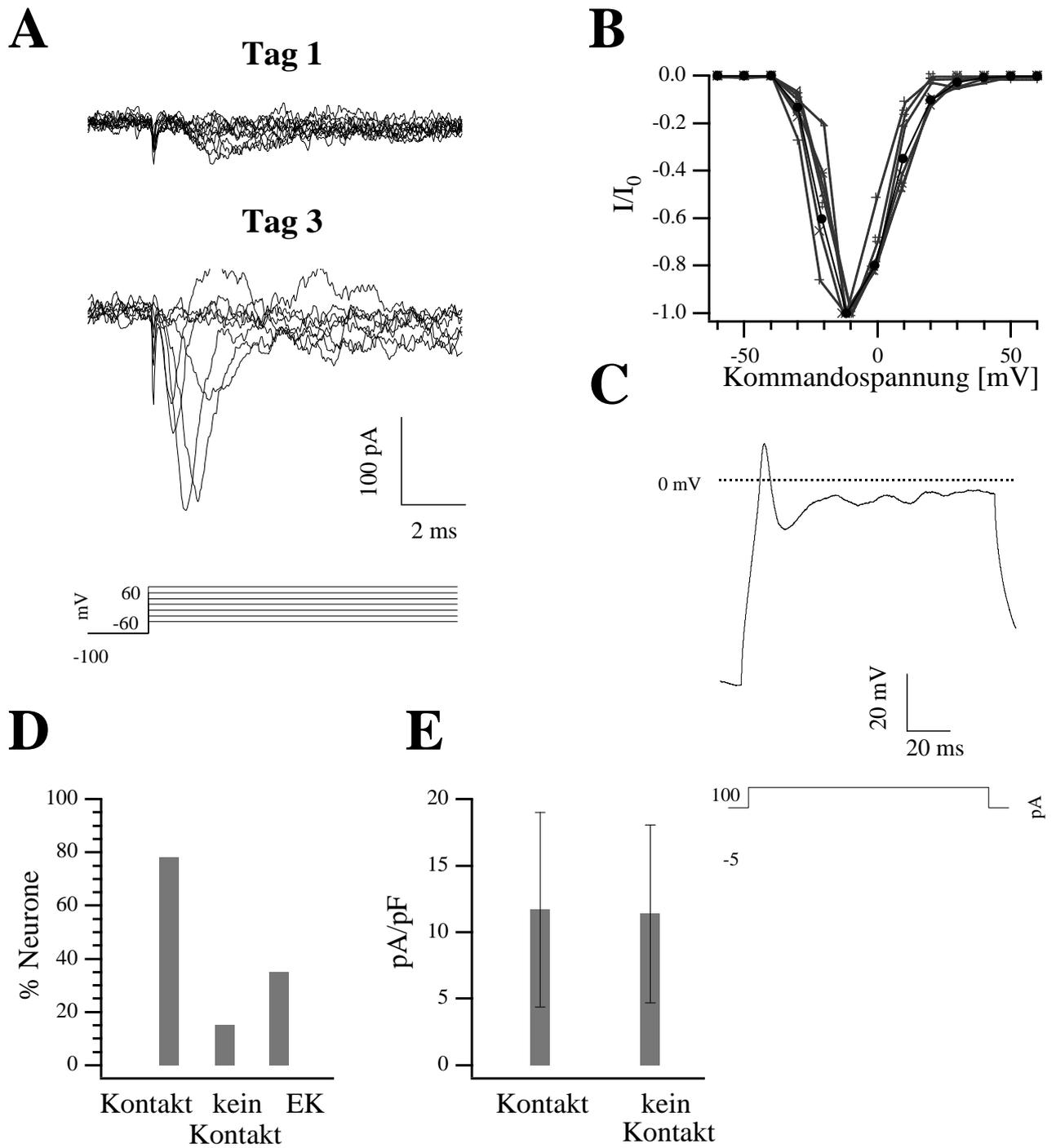


Abb. 14

### III.2.4. Neuritenverbindungen veränderten die Eigenschaften von spannungsgesteuerten $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen

Wurden extrazelluläres  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  durch Tris-X und  $\text{Ba}^{2+}$  ersetzt ( $\text{Ba}^{2+}$ -TDS; s. Material und Methoden II.1.2.), so war mit intrazellulärem CsCl (Intra 2) ein weiterer spannungsgesteuerter Einwärtsstrom zu beobachten, wenn die ML-Neurone depolarisiert wurden. Dieser Strom wurde vollständig und reversibel durch  $100 \mu\text{M}$  extrazelluläres  $\text{Cd}^{2+}$  blockiert ( $n = 3$ ; Daten nicht gezeigt). Wenn  $\text{Ca}^{2+}$  anstelle von  $\text{Ba}^{2+}$  als permeables Ion benutzt wurde, war der Strom sehr klein und in Abwesenheit von pharmakologischen Blockern vollständig durch  $\text{I}_{\text{Na}}$  und die  $\text{K}^+$ -Ströme verdeckt. Da der Strom vollständig durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal Blocker  $\text{Cd}^{2+}$  gehemmt wurde und bekannt ist, daß  $\text{Ba}^{2+}$  ein guter Substituent für  $\text{Ca}^{2+}$  als permeables Ion ist (Hille, 1992) und bereits zur Messung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen in *Drosophila*-Neuronen benutzt wurde (z.B. Byerly und Leung, 1988; Baines und Bate, 1998), wird der Strom hier als  $\text{I}_{\text{Ca(Ba)}}$  bezeichnet.

Am IVT 1 war  $\text{I}_{\text{Ca(Ba)}}$  typischerweise sehr klein. Ab dem zweiten Tag konnten in WZK zwei verschiedene Typen von  $\text{I}_{\text{Ca(Ba)}}$  beobachtet werden, die hier als Typ 1 (T1) und Typ 2 (T2) bezeichnet werden. Die Spannungsabhängigkeit von T1-Strömen war sehr steil und sie erreichten ihre Maximalamplituden bei Kommandospannungen um  $-10 \text{ mV}$  (Abb. 15Ai,B). Sie zeigten nur eine mäßige Inaktivierung während des  $300 \text{ ms}$  Testpulses ( $\tau = 433 \pm 258 \text{ ms}$  für den Maximalstrom,  $n = 12$ ). Demgegenüber hatten T2-Ströme eine flachere Spannungsabhängigkeit und erreichten ihr Maximum bei Kommandopotentialen um  $+10 \text{ mV}$  (Abb. 15Aii,B). Sie inaktivierten deutlich schneller als T1-Ströme ( $\tau = 129 \pm 35 \text{ ms}$  für den Maximalstrom,  $n = 11$ ;  $p = 0.086$ , T-Test). Manchmal wurden auch Ströme gefunden, die intermediäre Charakteristiken zwischen T1 und T2 aufwiesen (T1/2-Hybriden,  $n = 2$ ). Um die beiden  $\text{I}_{\text{Ca(Ba)}}$  weiter zu differenzieren, wurde  $1 \text{ mM}$  Amilorid gelöst in  $\text{Ba}^{2+}$ -TDS benutzt. Von dieser Amiloridkonzentration war berichtet worden, daß sie einen Vertebraten T-Typ ähnlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom im *Drosophila*-Muskel selektiv blockiert (Gielow et al., 1995) und auch  $\text{I}_{\text{Ca(Ba)}}$  in dorsal gelegenen Neuronen im *Drosophila*-Bauchmark *in situ* teilweise hemmt (Baines und Bate, 1998). Wurde Amilorid auf ML-Neurone mit T1/2-Hybridströmen appliziert ( $n = 2$ ), so reduzierte es die Stromamplitude, verschob das Maximum des Stroms zu negativen Kommandopotentialen hin und die Spannungsabhängigkeit wurde etwas steiler (Abb. 16A). Dies deutet eine Blockade der T2-Komponente in diesen Hybriden an. Wurde Amilorid jedoch auf T1 ( $n = 2$ ) oder T2 ( $n = 2$ ) alleine (beurteilt nach den o.g. Kriterien) appliziert, so wurde in beiden Fällen die Stromamplitude deutlich reduziert, aber es kam zu keiner Veränderung in der Lage des Maximums oder der Steigung der Spannungsabhängigkeit (Abb. 16B,C). Scheinbar

blockiert Amilorid beide  $I_{Ca(Ba)}$  in ML-Neuronen, vielleicht mit einer Präferenz für den T2-Strom in den Hybriden.

---

### Abb. 15 Neuritenkontakte veränderten die Eigenschaften von $Ca^{2+}$ -Strömen

**A.** Nach IVT 2 wurden mit  $Ba^{2+}$ -TDS im Bad mit intrazellulärem CsCl (Intra 2) mindestens zwei verschiedene spannungsgesteuerte  $Ca_{(Ba)}^{2+}$ -Ströme ( $I_{Ca(Ba)}$ ) in ML-Neuronen beobachtet, die ich als Typ 1 (T1) und Typ 2 (T2) bezeichnete. Die Ströme wurden durch in 10 mV Inkrementen ansteigende Kommandospannungen von -60 bis +60 mV ausgelöst, die einem hyperpolarisierenden Präpuls von -100 mV (1s) folgten.

**i.** T1-Ströme hatten eine steile Spannungsabhängigkeit und erreichten ihre Maximalamplitude bei Kommandospannungen um -10 mV. Der Maximalstrom zeigte nur eine mäßige Inaktivierung über die Testpulsdauer von 300 ms ( $\tau = 433 \pm 258$  ms, MW  $\pm$  SD; n = 12).

**ii.** T2-Ströme zeigten eine graduellere Spannungsabhängigkeit und erreichten ihr Maximum bei Kommandospannungen um +10 mV. Der Maximalstrom inaktivierte deutlich schneller während des 300 ms Testpulses als der T1-Strom ( $\tau = 129 \pm 35$  ms, MW  $\pm$  SD; n = 11; p = 0,086, T-Test).

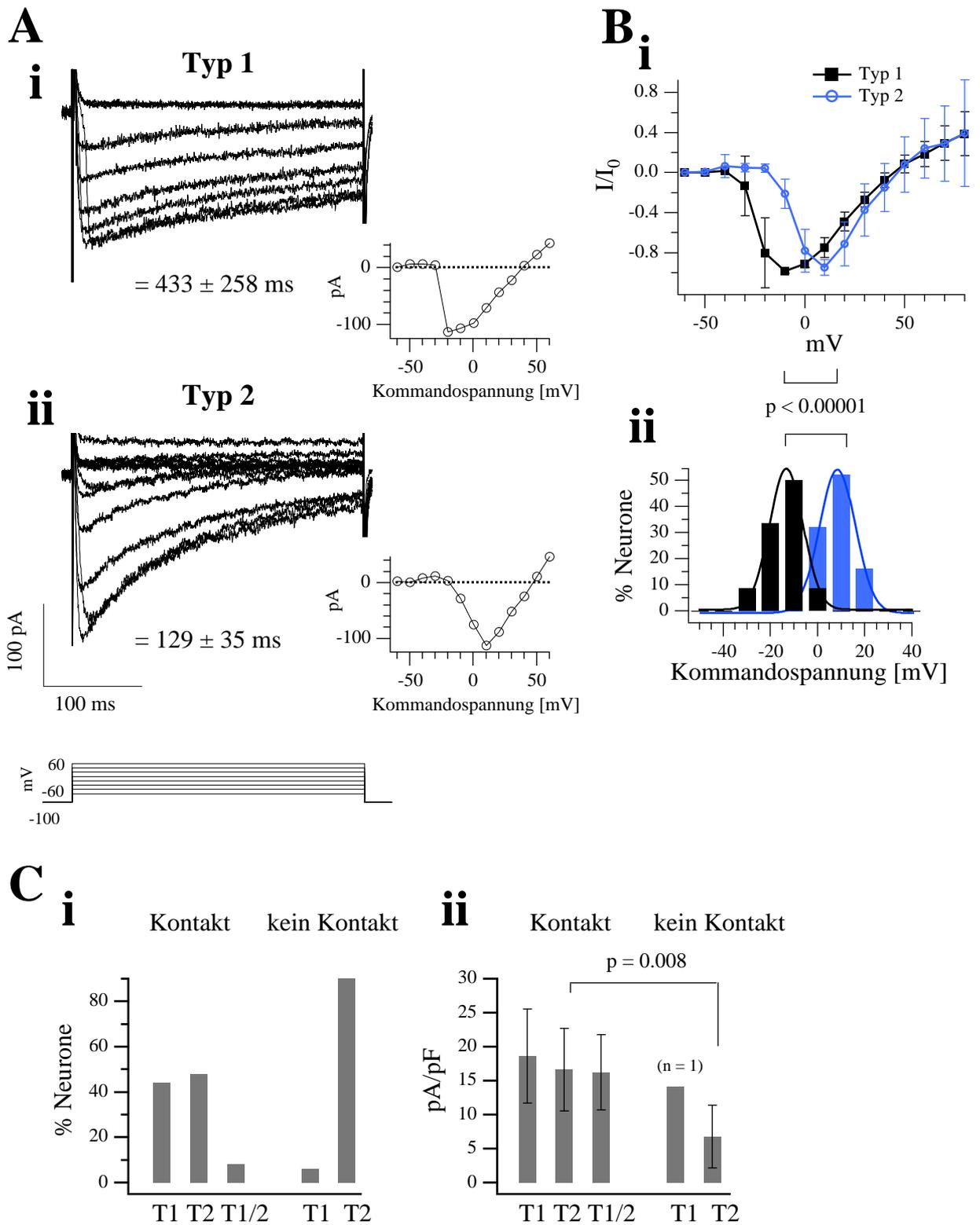
**B.** Strom-Spannungsbeziehungen für T1- und T2- $I_{Ca(Ba)}$  unter den Bedingungen in A.

**i.** Die Ströme individueller Zellen wurden normiert, die MW  $\pm$  SD berechnet und gegen die Kommandospannungen aufgetragen (T1 schwarz, n = 12; T2 blau, n = 11).

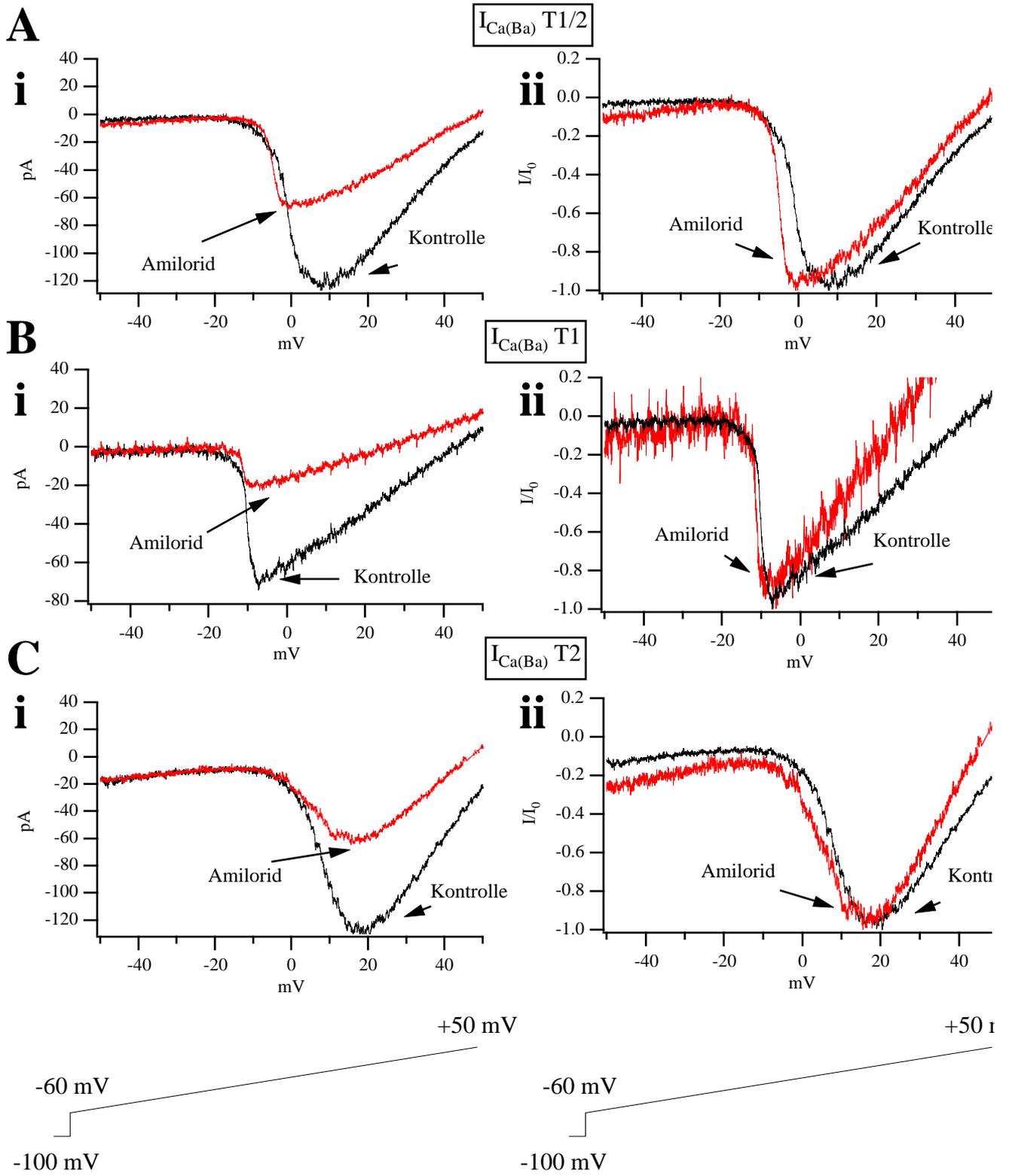
**ii.** Verteilung der Maximalamplituden von  $I_{Ca(Ba)}$  T1 (schwarz) und T2 (blau) entlang der Kommandospannungen. Die Verteilungen wurden mit zwei Gauß-Verteilungen gefittet, die einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Maximalamplituden der Ströme zeigten (T1 schwarz: Maximalstrom ( $I_{Max}$ ) bei  $-14,2 \pm 7,6$  mV; T2 blau:  $I_{Max}$  bei  $+8,4 \pm 6,7$  mV; p < 0,00001, T-Test).

**C i.** In ML-Neuronen mit Neuritenkontakten zu anderen Zellen traten T1- (n = 11) und T2- (n = 12)  $I_{Ca(Ba)}$  etwa gleich verteilt auf. Darüber hinaus wurden zwei Fälle beobachtet, in denen eine Klassifizierung nicht möglich war. Der Strom wies Charakteristika von T1 und T2 auf und wurde daher als T1/2-Hybrid betrachtet. Im Gegensatz dazu wurde in Zellen ohne Neuritenkontakte mit nur einer einzigen Ausnahme ausschließlich der T2-Strom beobachtet (n = 16).

**ii.** Die Maximalstromdichten (in pA/pF) waren in ML-Neuronen mit Neuritenkontakten für T1 ( $18,6 \pm 7$ , n = 9) und T2 ( $16,6 \pm 6,1$ , n = 8) und T1/2 ( $16,2 \pm 5,5$ , n = 2) nahezu identisch. Demgegenüber war die T2-Stromdichte ( $6,8 \pm 4,6$ , n = 11; jeweils MW  $\pm$  SD) in Zellen, denen diese Kontakte fehlten, signifikant niedriger, verglichen mit der T2-Dichte in Zellen mit Kontakten (p = 0,008, T-Test). T1 wurde nur in einem Neuron ohne Neuritenkontakt zu anderen Zellen beobachtet und hatte dort eine ähnliche Stromdichte wie T1 in Zellen mit solchen Kontakten.



**Abb. 15**



**Abb. 16**

Andere  $I_{Ca}$  Blocker aus den Familien der Phenylalkamine und Dihydropyridine, die üblicherweise für die Klassifizierung von Vertebraten  $I_{Ca}$  benutzt werden, hatten sich in *Drosophila*-Neuronen (z.B. Byerly und Leung, 1988) und in der Biene (Schäfer et al., 1994) als nicht wirksam oder unspezifisch erwiesen. Daher wurden hier die o.g. elektrophysiologischen Kriterien verwendet, um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von Neuritenverbindungen in WZK auch die Eigenschaften von  $I_{Ca(Ba)}$  beeinflussen würde. In ML-Neuronen, die in WZK mit Neuritenverbindungen gehalten worden waren, waren T1- (n = 11) und T2- (n = 12) Ströme etwa gleich verteilt und ihre Stromdichten waren nahezu identisch. In zwei Fällen wurden T1/2-Hybride gefunden, die vergleichbare Stromdichten hatten wie T1 und T2. Demgegenüber wurde in ML-Neuronen in WZK ohne Neuritenverbindungen in 15 von 16 Fällen nur der T2-Strom beobachtet und seine Stromdichte war signifikant niedriger als die von T2 in Zellen mit Neuritenverbindungen ( $p = 0.008$ , T-Test; Abb. 15C). Diese Daten deuten an, daß Neuritenverbindungen, neben ihrem Einfluß auf  $I_{Na}$  auch in die funktionale Expression von spannungsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Kanälen involviert sind.

---

**Abb. 16 Effekt von Amilorid auf  $I_{Ca(Ba)}$**

$I_{Ca(Ba)}$  wurden wie in Abb. 15 beschrieben abgeleitet, außer daß hier eine 500 ms dauernde Spannungsrampe von -60 bis +50 mV verwendet wurde. Ein solches Protokoll liefert sofort die Strom-Spannungsbeziehung und sollte gravierende Effekte, die auf der Auswaschung von sekundären Botenstoffen beruhen, verhindern. Die Kontrollen (schwarz) wurden in  $Ba^{2+}$ -TDS aufgenommen. Amilorid (rot) wurde in einer Konzentration von 1 mM gelöst in  $Ba^{2+}$ -TDS appliziert. Vor der Verwendung der Spannungsrampe wurde jeweils eine Klassifizierung des Stroms aufgrund eines in Abb. 15 beschriebenen Aktivierungsprotokolls gemacht. Die Kurven links zeigen absolute Ströme, die rechts Normierungen auf die Maximalamplitude.

**A i.** Amilorid reduzierte die Amplitude von T1/2-Hybridströmen (n = 2).

**ii.** Die Normierung der Ströme zeigt, daß sich außerdem der Maximalstrom zu negativen Kommandospannungen hin verschoben hatte und eine etwas steilere Spannungsabhängigkeit vorhanden war.

**B i.** Applikation von Amilorid zu  $I_{Ca(Ba)}$  T1 reduzierte ebenfalls die Stromamplitude (n = 2).

**ii.** Die Normierung zeigt, daß weder die Lage der Kurve verschoben wurde noch sich die Steilheit der Spannungsabhängigkeit änderte.

**C i.** Auch die Amplitude von  $I_{Ca(Ba)}$  T2 wurde durch Amilorid reduziert (n = 2).

**ii.** In der Normierung ist weder eine Verschiebung des Maximalstroms noch eine Veränderung in der Steilheit der Spannungsabhängigkeit erkennbar.

### III.2.5. Neuritenkontakte beeinflussen ACh- und GABA-gesteuerte Ströme

Der wesentliche exzitatorische Neurotransmitter im Insekten ZNS ist Acetylcholin (ACh) und der wichtigste inhibitorische Transmitter ist  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) (Burrows, 1996). Es wurde getestet, ob kultivierte ML-Neurone in WZK auch auf diese beiden Transmitter reagieren und ob es Unterschiede unter den verschiedenen Kulturbedingungen gibt. Eine Abschätzung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen für ACh ( $n = 2$ ) und GABA ( $n = 2$ ) lieferte für beide Transmitter eine halbmaximale Wirkkonzentration ( $EC_{50}$ ) von ca.  $50 \mu\text{M}$  (Daten nicht gezeigt). Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen für *Drosophila*-Neurone in Massenzellkulturen (Albert und Lingle, 1993; Zhang et al., 1994). Es wurden daher  $100 \mu\text{M}$  ACh oder GABA gelöst in DS in der Nähe der untersuchten Zelle appliziert (Haltepotential  $-60 \text{ mV}$ ; Intra 1 Pipettenlösung, s.

---

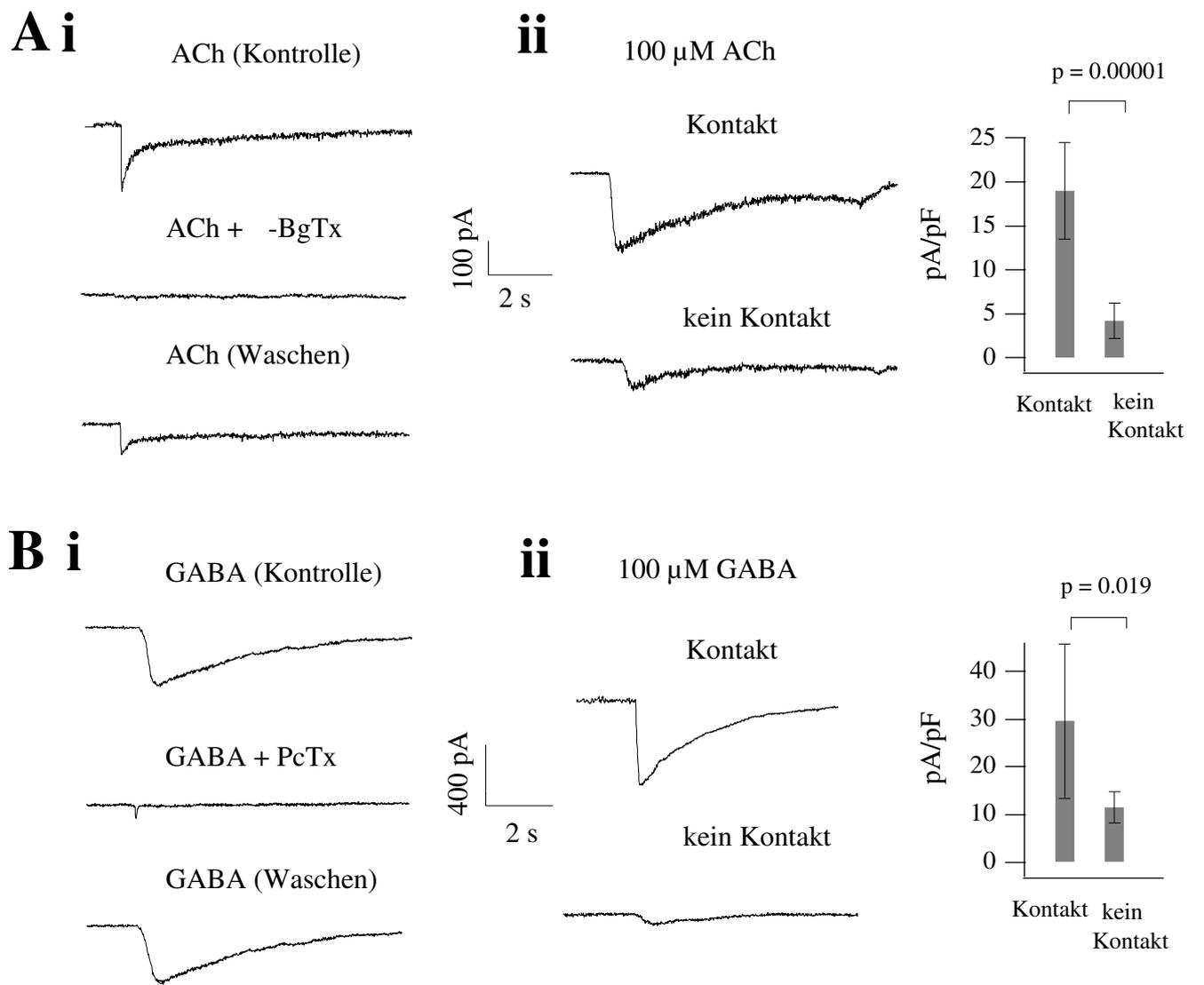
#### Abb. 17 Neuritenkontakte beeinflussen ACh- und GABA-gesteuerte Ströme

**A i.** Ganzzellströme, die durch Applikation von  $100 \mu\text{M}$  ACh in DS ( $I_{\text{ACh}}$ , oben; Haltespannung  $-60 \text{ mV}$ ) ausgelöst werden konnten, waren nach 15 min Inkubation in ca.  $2,5 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -BgTx) gelöst in DS (Mitte; vgl. Material und Methoden II.8.3.) vollständig blockiert. Nach 3 bis 5 min Waschen mit DS erholte sich der Strom auf etwa 50% seines ursprünglichen Wertes (unten;  $n = 4$ ).

**ii.** Unter obigen Bedingungen zeigten ML-Neurone in WZK mit und ohne Neuritenkontakte  $I_{\text{ACh}}$  (links). Allerdings waren die Stromdichten in Zellen mit Neuritenkontakten signifikant größer als die in Zellen ohne diese Kontakte (rechts; Kontakt  $19 \pm 5,5 \text{ pA/pF}$ ,  $n = 13$ ; kein Kontakt  $4,3 \pm 2 \text{ pA/pF}$ ,  $n = 7$ ; MW  $\pm$  SD;  $p = 0,00001$ ; T-Test).

**B i.** Ganzzellströme, die durch Applikation von  $100 \mu\text{M}$  GABA in DS ausgelöst werden konnten ( $I_{\text{GABA}}$ , oben; Haltespannung  $-60 \text{ mV}$ ), waren nahezu vollständig blockiert, wenn  $100 \mu\text{M}$  GABA und Picrotoxin (PcTx) gelöst in DS koappliziert wurden (Mitte). Der verbleibende sehr kleine und schnell inaktivierende Strom war aufgrund der Charakteristik von PcTx nur offene Kanäle zu blockieren zu erwarten. Der Strom war nach einer Minute Waschen mit DS vollständig wiederhergestellt (unten;  $n = 4$ ).

**ii.** Wiederum zeigten Zellen mit und ohne Neuritenkontakte Stromantworten auf die Applikation von GABA (links). Die  $I_{\text{GABA}}$ -Dichte war in ML-Neuronen mit Neuritenkontakten jedoch wiederum erheblich größer als die in Neuronen ohne diese Kontakte (rechts; Kontakt  $29,6 \pm 16,2 \text{ pA/pF}$  ( $n = 11$ ); kein Kontakt  $11,7 \pm 3,3 \text{ pA/pF}$  ( $n = 6$ ); MW  $\pm$  SD;  $p = 0,019$ ; T-Test).



**Abb. 17**

Material und Methoden II.1.2.). Unter diesen Bedingungen zeigten ML-Neurone mit und ohne Neuritenverbindungen Stromantworten auf beide Transmitter (Abb. 17). Der ACh-gesteuerte Strom ( $I_{\text{ACh}}$ ) wurde blockiert, wenn die Zellen für 15 min in ca.  $2,5 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -BgTx) inkubiert wurden. Nach etwa drei bis fünf Minuten Waschen mit DS erholte sich der Strom auf etwa 50% der anfänglichen Amplitude ( $n = 4$ ; Abb. 17Ai).  $I_{\text{ACh}}$  hatte ein Umkehrpotential zwischen 0 und 20 mV (Daten nicht gezeigt). Für  $\alpha$ -BgTx ist gezeigt worden, daß es unter vergleichbaren Bedingungen den Strom durch nikotinische ACh-Rezeptoren in *Drosophila*-Neuronen in Massenkultur blockiert (Albert und Lingle, 1993). Der durch  $100 \mu\text{M}$  GABA induzierte Strom ( $I_{\text{GABA}}$ ) hatte in symmetrischem Chlorid eine Umkehrspannung von ca. 0 mV und konnte durch Co-Applikation von  $100 \mu\text{M}$  Picrotoxin (PcTx) blockiert werden. Nach einer Minute Waschen mit DS erholte sich der Strom vollständig ( $n = 4$ ; Abb. 17Bi). Diese Beobachtungen korrespondieren mit früheren Beschreibungen von *Drosophila*-GABA-Rezeptoren (Zhang et al., 1994; als Überblick u.a. Hosie et al., 1997).

Im Unterschied zu den spannungsgesteuerten Strömen erreichten die durch ACh und GABA ausgelösten Ströme ihre Maximalamplituden bereits am IVT 1. Allerdings waren die Stromdichten bei beiden Neurotransmittern für ML-Neurone mit Neuritenverbindungen erheblich größer als bei Neuronen, denen diese Verbindungen fehlten (Abb. 17Aii,Bii;  $p < 0,001$  für ACh;  $p = 0,019$  für GABA; T-Test). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß Neuritenverbindungen für die Regulation oder Aufrechterhaltung der Rezeptorexpression oder ihrer Leitfähigkeit notwendig sind.

### III.2.6. Wurden an den Neuritenverbindungen Synapsen ausgebildet?

Die vorgelegten Ergebnisse legen es nahe, daß Neuritenverbindungen in die funktionale Expression von zahlreichen Ionenströmen involviert sind. Als einen ersten Schritt zur Analyse der Natur dieser Kontakte wurden die ML-Zellen von K. Lüer mittels Antikörper (AK)-Färbungen auf die Expression präsynaptischer Proteine untersucht. Da gezeigt worden war, daß Synapsine sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* verlässliche Marker für präsynaptische Regionen sind (Bähler et al., 1990, Chin et al., 1995, DeCamilli et al., 1990, Ferreira et al., 1995, Klagges et al., 1996, Valtorta et al., 1995), wurden ML-Neurone, die für ein bis drei Tage in WZK gehalten worden waren, mit einem  $\alpha$ -Synapsin AK gefärbt ( $n = 14$ ). Die Hauptneuritenäste waren bereits am IVT 1 vorhanden, aber bis IVT 3 kam es zu zusätzlichen Verästelungen (s.o. III.2.1.) und die Zahl der gefärbten Strukturen schien sich zu erhöhen (nicht quantifiziert). Abb. 18A zeigt eine Phasenkontrastaufnahme von zwei ML-Klonen mit Neuritenkontakten zueinander. Die konfokale Abbildung der gleichen Klone (Abb. 18B) zeigt,

daß viele der Kontaktpunkte positive Synapsin-Immunoreaktivität aufwiesen. Es wurden auch Endungen von Projektionen gefärbt, von denen einige eine wachstumskegelähnliche Morphologie hatten. Zusätzlich zu Neuritenkontakten zwischen verschiedenen Klonen zeigten auch intraklonale Verbindungen positive Synapsin-Immunoreaktivität (Daten nicht gezeigt). In Klonen ohne Neuritenkontakte wurde entweder keine -Synapsin-Färbung gefunden oder es wurden Färbungen an Neuritenendungen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

---

### **Abb. 18 Neuritenkontaktzonen und -endungen färben positiv für Synapsin**

Skalierung 10  $\mu$ M. Abb. nach Schmidt et al. (2000).

**A.** Phasenkontrastaufnahme von zwei Mittellinienklonen mit Neuritenverbindungen zueinander.

**B.** Konfokale Abbildung der Klone in A gefärbt mit einem -Synapsin Antikörper. An vielen Neuritenkontaktpunkten (gefüllte Pfeile) und an Neuritenendungen (ungefüllte Pfeile) ist die Intensität der Färbung stark erhöht. Einige der Endungen hatten wachstumskegelähnliche Morphologie.

---

### **Abb. 19 Synaptische Aktivität in verschiedenen Zellkulturmedien**

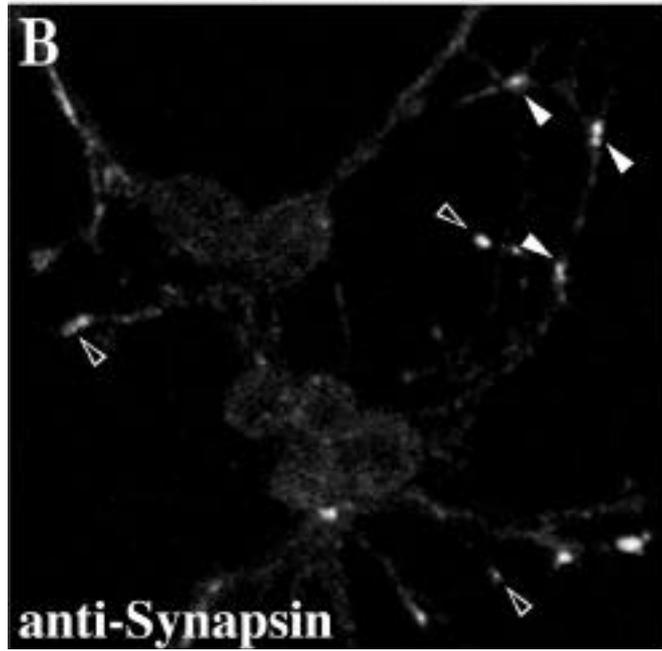
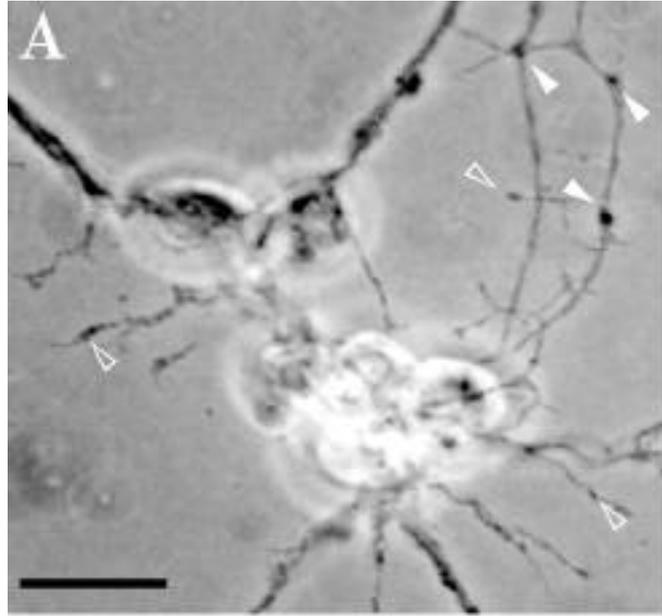
Die Zellen wurden bei -75 mV gehalten und die Stromspuren für insgesamt 20 s aufgenommen.

Als Badlösung wurde DS 1 und als Pipettenlösung Intra 1 verwendet (Material und Methoden II.1.2.).

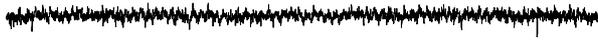
**A.** In kommerziellem Schneiders-Medium aufgewachsene ML-Neurone und Zellen in Massenkulturen zeigten unter den o.g. Bedingung keine synaptische Aktivität (n = 34; davon n = 5 mit Intra 3 statt Intra 1). Schneiders-Medium hat eine Kaliumionenkonzentration von ca. 21 mM.

**B.** In 5 von 10 Neuronen, die in Massenzellkulturen in einem modifizierten Zellkulturmedium (insb. nur 4 mM  $K^+$ ) gewachsen waren, wurden spontane Ereignisse beobachtet, die nach Kinetik und Dauer synaptische Ströme repräsentieren könnten (s. Ausschnittvergrößerungen rechts).

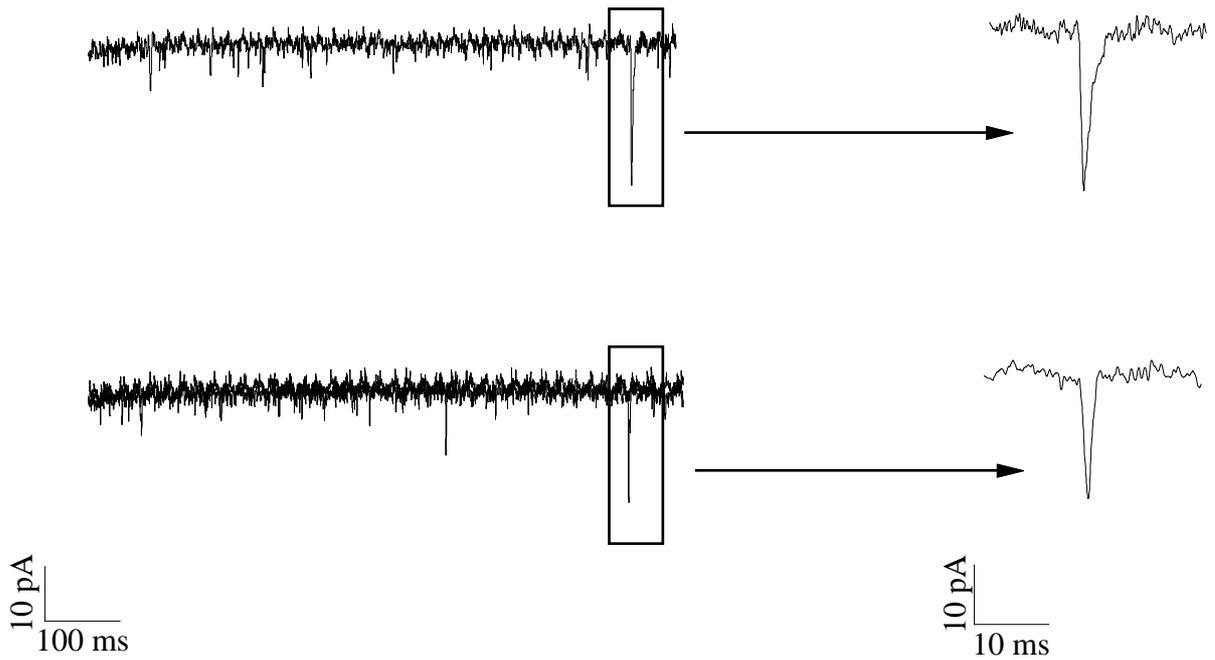
**C.** Ableitung von einem Neuron, das im modifizierten Medium in Massenkultur gewachsen war. Innerhalb der 20 s Ableitdauer waren keine oder nur ein sehr kleines, möglicherweise synaptisches Ereignis erkennbar (Kontrolle). Durch fokale Applikation einer 56 mM  $K^+$  enthaltenden Extrazellulärlösung (DS 2) auf ein Neuron, das Neuritenkontakte zu demjenigen hatte, von dem abgeleitet wurde (präsynaptische Stimulation), konnten Ereignisse ausgelöst werden, die zuvor ohne Stimulation nicht sichtbar waren (s. Material und Methoden II.8.3.). Es könnte sich hier um evozierte synaptische Ströme handeln.



**A** Schneiders Medium (21 mM K<sup>+</sup>)



**B** Modifiziertes Medium (4 mM K<sup>+</sup>)



**C** Kontrolle



**Präsynaptische Stimulation**



**Abb. 19**

Die AK-Färbungen ließen vermuten, daß die Neuritenkontakte Synapsen enthielten. Allerdings kann auf Grundlage von AK-Färbungen nicht auf das Vorhandensein funktionaler Strukturen geschlossen werden. Daher wurden ML-Neurone auch elektrophysiologisch auf synaptische Aktivität untersucht. In ML-Neuronen, die in kommerziellem Schneiders-Zellkulturmedium aufgewachsen waren und bei denen aufgrund der optischen Inspektion vom Vorhandensein von Neuritenverbindungen ausgegangen werden konnte, wurden keine spontanen synaptischen Ströme gefunden (DS 1 Badlösung; Intra 1 (n = 17) oder Intra 3 (n = 5) Pipettenlösung; s. II.1.2.; Abb. 19 A; alle folgenden Ableitungen mit Intra 1). Durch Applikation einer hohen Konzentration an  $K^+$  enthaltenden extrazellulären Lösung (DS 2) auf angenommene präsynaptische Zellen, die dadurch depolarisiert wurden (vgl. Material und Methoden II.8.3.) ließen sich keine synaptischen Ströme evozieren (n = 5). Daher wurde in von B. Küppers hergestellten Wildtyp Massenkulturen an unidentifizierten Neuronen nach synaptischer Aktivität gesucht. Sofern diese Zellen in dem herkömmlichen Schneiders-Medium aufgewachsen waren, wurden auch hier keine spontanen synaptischen Ströme gefunden (n = 12) noch ließen sie sich evozieren (n = 3). Schließlich wurde das Zellkulturmedium in Anlehnung an Lee und O'Dowd (1999) modifiziert (vgl. II.1.1.), die synaptische Aktivität in *Drosophila*-Massenzellkulturen berichtet hatten, und in 5 von 10 der untersuchten Zellen spontane Ereignisse gefunden, die nach ihrer Kinetik und Dauer synaptische Ströme sein könnten (Abb. 19B). Auch ließ sich in 1/1 Fall möglicherweise synaptische Transmission durch Depolarisation einer präsynaptischen Zelle evozieren (Abb. 19C). Die selektive Kultivierung von ML-Vorläufern in WZK in dem modifizierten Medium ist bislang noch nicht gelungen, da in diesem Medium sowohl das Teilungsmuster der Zellen als auch deren Vitalität beeinträchtigt zu sein scheinen (Lüer und Technau, unveröffentlichte Beobachtungen).

Zusammengenommen deuten diese Experimente darauf hin, daß die beobachtete positive - Synapsin Immunoreaktivität an ML-Neuritenkontakten entweder unreife oder funktional stille Synapsen repräsentiert. Faktoren, die für die Ausbildung funktionaler Synapsen *in vitro* notwendig sind, werden Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

### **III.2.7. Ausblick: Spannungsgesteuerte $K^+$ -Ströme *in situ***

Bei *in vitro* Präparationen stellt sich immer die Frage, inwieweit die dort beobachteten Verhältnisse die Situation im intakten Gewebe widerspiegeln. Es wurde daher versucht, in Anlehnung an die kürzlich publizierte *in situ* Präparation für dorsal im *Drosophila*-Bauchmark gelegene Neurone (Baines und Bate, 1998) auch andere Bereiche des ZNS zugänglich zu machen. Hierzu wurde das ZNS vollständig aus kurz vor dem Schlüpfen befindlichen Embryonen (spät Std. 17) herauspräpariert, wahlweise mit der ventralen oder der dorsalen Seite zum Betrachter weisend in der Ableitkammer befestigt und das Neurilemm enzymatisch entfernt (vgl. Material und Methoden II.8.2., Abb. 4). Da hierbei häufig die charakteristische

Lagebeziehung der Zellen im Gewebe zerstört wurde, war die Identifizierung individueller Zellen ohne zusätzlich Markerexpression nicht möglich. Elektrophysiologische Ableitungen wurden an unidentifizierten Neuronen im Bereich der ventralen oder dorsalen ML gemacht. Seals bildeten sich i.d.R. leicht aus und durch eine Kombination aus Unterdruck und "Zap"-Pulsen konnte in die Ganzzellkonfiguration eingebrochen werden. Die Ruhemembranpotentiale lagen zwischen -35 und -65 mV ( $-44 \pm 12,4$ ;  $n = 4$ ) und die Zellkapazitäten zwischen 1,5 und 7 pF ( $2,8 \pm 1,9$  pF;  $n = 6$ ). In 2/8 Zellen wurden vor dem Herstellen der Ganzzellkonfiguration ("on cell" bzw. "cell attached" Konfiguration) bei einem Haltepotential von -60 mV spontan auftretende, biphasische Ströme beobachtet, die auf Spontanaktivität der Zelle schließen lassen (Abb. 20A).

---

### Abb. 20 *In situ* Ableitungen

**Ai.** In 2/8 Zellen wurden vor dem Herstellen der Ganzzellkonfiguration ("cell attached"; Haltespannung -60 mV) extrazelluläre biphasische Ströme abgeleitet, die auf spontane Aktionspotentiale (APs) hindeuten.

**ii.** Während eines 50 ms Testpulses (-10 mV) traten in beiden Zellen zwei APs auf.

**B und C.** Die spannungsgesteuerten  $K^+$ -Ströme wurden von Zellen im Bereich der ventralen und dorsalen Mittellinie des intakten spätembryonalen Bauchmarks (spät Std. 17) abgeleitet. Die Ableitungen erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie die *in vitro* Ableitungen (vgl. Text zu Abb. 10, 11, 13).

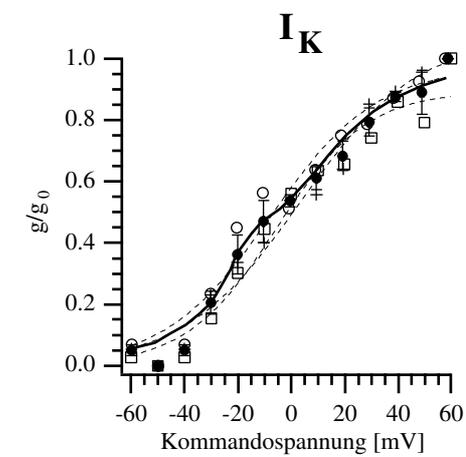
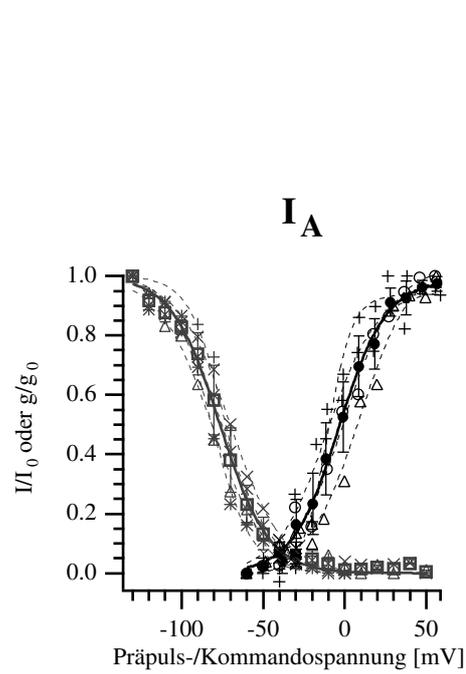
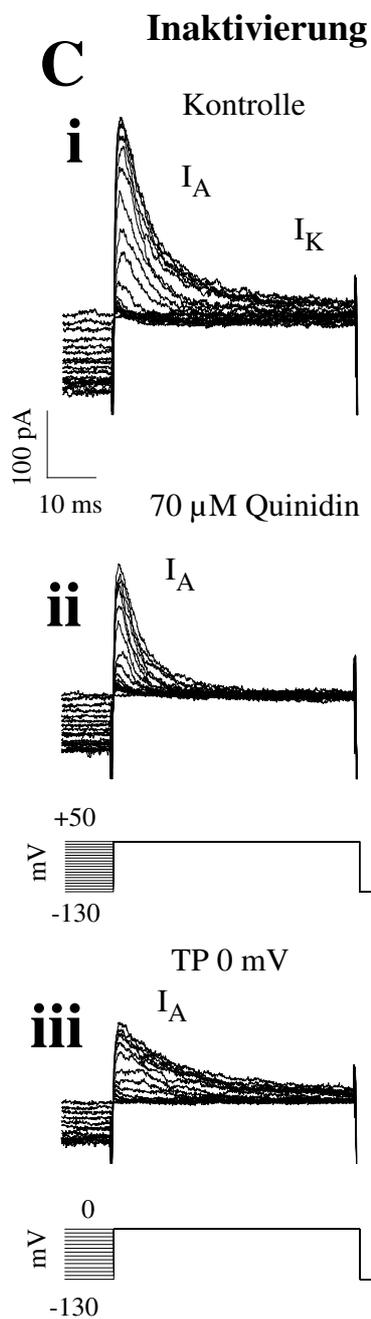
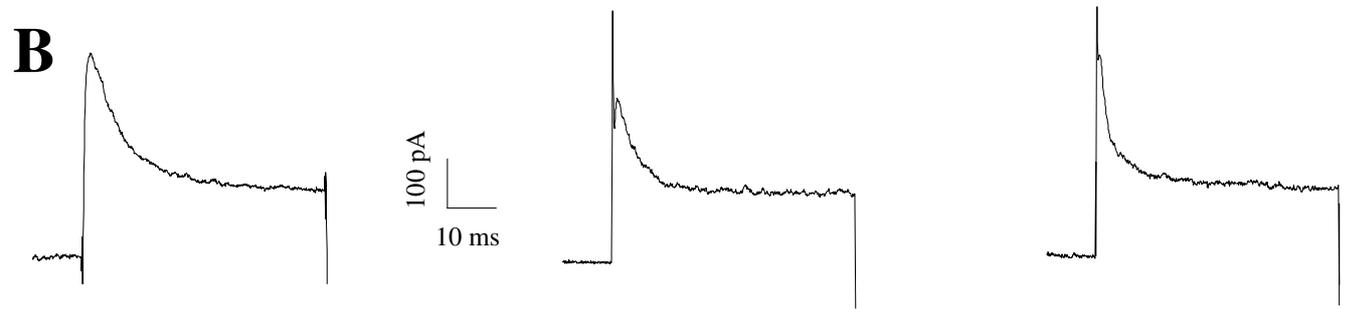
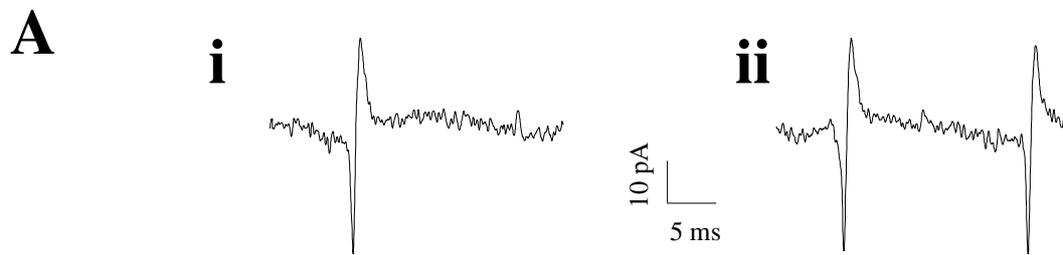
**B.** Die Ströme wurden wie in Abb. 10 beschrieben aufgenommen, allerdings wurden kürzere Testpulse verwendet (50 ms, beachte Skalierungen). Unter diesen Bedingungen zeigten sich Unterschiede in der qualitativen Erscheinung der Auswärtsströme. Aufgrund der geringen Zahl von Messungen ( $n = 8$ ) war es nicht sinnvoll, eine Korrelation mit der Lage der Zellen im Bauchmark zu machen. Möglicherweise lassen sich hinsichtlich der Inaktivierung des Stroms drei qualitative Gruppen erkennen, die den Gruppen zwei bis vier der ML-Neurone *in vitro* (s. Abb. 10) ähnlich scheinen. Die schnellen Spitzen in den beiden rechten Ableitungen sind kapazitive Artefakte.

**C.** Die Ströme wurden wie in Abb. 11 beschrieben aufgenommen. Es wurden allerdings kürzere Protokolle verwendet (50 ms), und in Aktivierungsprotokollen wurde die Kommandospannung in 10 mV Inkrementen von -60 auf +60 mV erhöht. Die Strom-Spannungsbeziehungen (Mitte) wurden wie in Abb. 13 beschrieben ermittelt. In den meisten Zellen waren zumindest zwei unterschiedliche  $K^+$ -Ströme vorhanden: ein inaktivierender ( $I_A$ ) und ein nicht inaktivierender, gleichrichter-ähnlicher ( $I_K$ ) Strom.  $I_K$  war i.d.R. sehr klein und  $I_A$  der dominante Strom.

**i bis iii.** Separation von  $I_A$  und  $I_K$  in Inaktivierungsprotokollen (links) und Aktivierungsprotokollen (rechts). Die linken und die rechten Stromspuren stammen jeweils von der gleichen Zelle.

**i.** Ganzzell-Ströme in Abwesenheit von pharmakologischen Blockern (TDS, Kontrolle).

**ii.** In Inaktivierungsprotokollen (links) konnte  $I_K$  durch Zugabe von 70  $\mu$ M Quinidin zur Badlösung blockiert werden. Zurück blieb der schnell aktivierende und inaktivierende  $I_A$ . In Aktivierungsprotokollen (rechts) konnte  $I_A$  durch einen depolarisierenden Präpuls von -40 mV (1s) eliminiert werden. Zurück blieben eine Leckstromkomponente und eventuell  $I_K$ , der stark durch diese überlagert war.



**Abb. 20**

iii. Da  $I_A$  der dominante Strom war, wurde wie bei den *in vitro* Ableitungen versucht, ihn in Inaktivierungsprotokollen (links) durch einen Testpuls auf nur 0 mV zu isolieren. Die Spannungsabhängigkeit des daraus resultierenden Stroms erwies sich bei der Auswertung als identisch zu der des Quinidin insensitive Stroms (nicht gezeigt) und er wurde daher als  $I_A$  betrachtet. Die Unterschiede in der Inaktivierungskinetik wurden wahrscheinlich dadurch hervorgerufen, daß Quinidin nur offene Kanäle blockiert. In Aktivierungsprotokollen (rechts) wurde  $I_A$  durch Subtraktion von  $I_K$  (ii) vom Kontrollstrom (i) ermittelt.

**Mitte.** Normierte Spannungsabhängigkeit individueller Zellen (gestrichelt) und MW  $\pm$  SD (durchgezogen) der Inaktivierung (grau) und Aktivierung (schwarz) von  $I_A$  (oben: Inaktivierung,  $V_{1/2} = -76,2 \pm 4,5$  mV,  $S = -14,1 \pm 2,7$  mV/e,  $n = 5$ ; Aktivierung,  $V_{1/2} = -3 \pm 8,3$  mV,  $S = 13,5 \pm 3,4$  mV/e,  $n = 4$ ) und  $I_K$  (unten: Aktivierung, 1. Komponente  $V_{1/2} = -28,2 \pm 12,9$  mV,  $S = 5,1 \pm 5,3$  mV/e, 2. Komponente  $V_{1/2} = 22,2 \pm 5$  mV,  $S = 20,2 \pm 3,7$  mV/e;  $n = 3$ ), gefittet mit Boltzmann-Verteilungen (vgl. Abb. 13). Für  $I_A$  wurde die beste Anpassung an die Daten mit einer einzigen Boltzmann-Verteilung erreicht, für die Aktivierung von  $I_K$  mit einer Summe aus zwei Verteilungen. Da die erste Komponente stärker hyperpolarisiert ist als  $I_A$  und eine sehr große Streuung aufweist, ist eine unvollständige Isolation von  $I_K$  wahrscheinlich. Es wird davon ausgegangen, daß nur die zweite Komponente  $I_K$  repräsentiert. Aufgrund der geringen Größe von  $I_K$  war es bisher nicht möglich, die Spannungsabhängigkeit seiner Inaktivierung zu bestimmen.

Um zu testen, ob diese Präparation prinzipiell geeignet ist, entsprechende Datensätze wie *in vitro* zu generieren, wurden in einer vorläufigen Reihe von Experimenten spannungsgesteuerte Auswärtsströme entsprechend den Ausführungen in III.2.2. abgeleitet (TDS Badlösung, Intra 1 Pipettenlösung). Da diese Ströme in Abwesenheit von extrazellulärem  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  vorhanden waren und durch die Kaliumkanalblocker 4-AP und Quinidin gehemmt wurden (Daten nicht gezeigt), ist es wahrscheinlich, daß sie von  $K^+$  getragen wurden (Hille, 1992).

Es wurde Heterogenität in der Inaktivierung des makroskopischen  $K^+$ -Auswärtsstroms beobachtet (Abb. 20B), wobei es jedoch aufgrund der geringen Zahl von Messungen ( $n = 8$ ) noch nicht möglich war zu entscheiden, ob eine Korrelation mit dorsaler oder ventraler Lage der Zellen im Bauchmark bestand. Der  $K^+$ -Strom setzte sich i.d.R. aus zwei Komponenten zusammen, einer inaktivierenden ( $I_A$ ) und einer anhaltenden ( $I_K$ ), wobei  $I_A$ , wie bei den ML-Neuronen *in vitro*, die dominante Komponente war (Abb. 20C). Entsprechend den *in vitro* Ableitungen wurden die beiden Komponenten pharmakologisch und elektrophysiologisch separiert und ihre Spannungsabhängigkeiten für Aktivierung und Inaktivierung analysiert (Abb. 20C). Diese Analyse ergab für  $I_A$  nahezu identische  $V_{1/2}$  Werte für dorsal (Aktivierung und Inaktivierung je  $n = 2$ ) und ventral (Inaktivierung  $n = 3$ ; Aktivierung  $n = 2$ ) gelegene Neurone, die daher in einem Graphen zusammengefaßt wurden. Die gemeinsamen MW sind vergleichbar mit denen der ML-Neurone *in vitro* (Abb. 20C Mitte oben, Tab. 10).  $I_K$  blieb sehr klein ( $< 50$

pA bei einer Kommandospannung von 50 mV), weshalb nur die Spannungsabhängigkeit seiner Aktivierung in wenigen Fällen ( $n = 3$ ) analysiert werden konnte. Selbst in diesen Fällen wurde die beste Anpassung an die Daten mit einer Summe aus zwei Boltzmann-Verteilungen erzielt, was auf eine unvollständige Isolation schließen läßt. Dabei waren die Parameter der zweiten Komponente ähnlich wie die von  $I_K$  *in vitro*, diejenigen der ersten Komponente zeigten jedoch keine Übereinstimmung mit  $I_A$  (Abb. 20C Mitte unten, Tab. 10).

Diese vorläufigen Messungen zeigen, daß es in dieser *in situ* Präparation prinzipiell möglich ist, entsprechende Datensätze - bei Verwendung geeigneter Marker auch an identifizierten Zellen - wie *in vitro* zu erstellen.

## IV. Diskussion

Das embryonale ventrale Nervensystem (vNS) von *Drosophila* entsteht aus den sieben bis acht mesektodermalen Vorläufern der ventralen Mittellinie (ML) und ca. 60 neuroektodermalen Vorläufern (Neuroblasten (NBs)) pro Segment. Die Zellstammbäume der ML-Vorläufer und der aus dem ventralen Teil des Neuroektoderms stammenden NBs (vNE NBs) sind bereits beschrieben worden (Bossing und Technau, 1994; Bossing et al., 1996). In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Stammbäume der aus dem dorsalen Teil des Neuroektoderms stammenden NBs (dNE NBs) beschrieben. Insbesondere zeigte sich, daß die Mehrzahl der Gliazellen von den dNE NBs abstammt. Darüber hinaus wurde ein neuer NB (NB 1-3) anhand morphologischer und molekularer Kriterien charakterisiert, und das bereits zuvor beschriebene, laterale Cluster von *even-skipped* exprimierenden Zellen (EL; Patel et al., 1989) konnte dem NB 3-3 Klon zugeordnet werden. Damit sind mehr als 90% der Zellstammbäume im embryonalen Bauchmark (Thorax, Abdomen) von *Drosophila* bekannt. Viele zuvor beschriebene Neurone und fast alle Gliazellen sind bestimmten Vorläufern zugeordnet und damit mit einer Abstammungsgeschichte versehen.

Dieser hohe Grad an zellulärer Auflösung wurde genutzt, um die Entwicklung elektrischer Eigenschaften (Elektrogenese) in einer definierten Zellpopulation zu untersuchen. Solche Untersuchungen an definierten Zellpopulationen sind eine Grundvoraussetzung für die Identifizierung zelltypspezifischer Unterschiede während der Elektrogenese. Da sich bei der Zellstammbaumanalyse gezeigt hatte, daß die Klone der ventralen ML besonders übersichtlich sind, wurden Ganzzellströme in ML-Neuronen analysiert, die von selektiv kultivierten ventralen ML-Vorläufern abstammten. Die in der vorgelegten Arbeit beschriebenen Ströme in ML-Neuronen zeigten große Ähnlichkeit mit Ganzzellströmen in *Drosophila*-Neuronen von anderer ontogentischer Herkunft (z.B. Byerly und Leung, 1988; Saito und Wu, 1991; O'Dowd, 1995; Delgado et al., 1998). Darüber hinaus wurde in den Kulturen die Möglichkeit eingeschränkt, Neuritenverbindungen einzugehen. Patch-clamp Ableitungen unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen legen den Schluß nahe, daß Neuritenverbindungen, im Unterschied zu Kontakten zwischen den Zellsomata, für die funktionale Expression spannungsabhängiger Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ströme sowie ACh- und GABA-gesteuerter Ströme wesentlich sind. Bisherige Untersuchungen weisen darauf hin, daß der involvierte molekulare Mechanismus unabhängig von synaptischer Transmission ist. Spannungsgesteuerte K<sup>+</sup>-Ströme hingegen wurden unter allen Kulturbedingungen identisch exprimiert. Auch die Vitalität der Zellen schien nicht verändert. Dies könnte für einen hohen Grad an Zellautonomie bei der Expression der K<sup>+</sup>-Ströme sprechen.

## IV.1. Zellstammbaumanalyse mit DiI

### IV.1.1. Identifikation von NBs *in vivo*

Die Grundvoraussetzung für die Zuordnung der Zellstammbäume zu ihren Vorläuferzellen war die Identifizierung der markierten NBs im lebenden Embryo. Sie erfolgte bei beginnender Keimstreifverkürzung (Std. 11) unter Verwendung der invaginierenden trachealen Plakoden, der Parasegmentalfurchen und des Abstandes zur ML als morphologischen Landmarken. Weitere Kriterien waren der Zeitpunkt der Delamination des NBs, die relative Lage zu anderen NBs sowie Anzahl und Lage der Tochterzellen (vgl. Material und Methoden II.6.2.). Trotz dieser vielfältigen Kriterien blieb die NB-Bestimmung ein statistischer Prozeß. Aufgrund intensiver Proliferation in der neuralen Zellschicht waren unmarkierte NBs häufig schlecht zu sehen, was die Einordnung des markierten Vorläufers in das Muster der unmarkierten NBs erschwerte. Hinzu kam, daß durch die spät delaminierenden NBs (S4, S5) die klare dreispaltige Anordnung der frühen NBs aufgegeben wurde. Darüber hinaus wurde wie bei den vNE NBs (Bossing et al., 1996) auch für die dNE NBs eine gewisse Variabilität in den Segregationszeiten gefunden (Tab. 8). Die Verlässlichkeit der Bestimmung wurde daher durch die Häufigkeit widergespiegelt, mit der ein bestimmter Zellstammbaum für eine gegebene NB-Diagnose erhalten wurde ( $R$  in Tab. 7). Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen einem gegebenen Zellstammbaum mit den zugewiesenen NB-Identitäten berücksichtigt ( $F$  in Tab. 7). Die Werte für  $R$  und  $F$  variierten zwischen 50 bzw. 33 und 100%. Dies verdeutlicht, daß die Bestimmung einiger NBs, z.B. aufgrund räumlicher Nähe zu morphologischen Landmarken, leichter war als die anderer. Es wurde sooft wie möglich versucht, die NB-Diagnose durch zusätzliche Antikörper (AK)-Färbungen und durch Vergleich mit der Literatur zu untermauern. So zeigte z.B. der NB 5-6 zugeordnete Zellstammbaum die notwendige  $\alpha$ -Gsb-p-Färbung (Buenzo und Holmgren, 1995; Abb. 6A) und die longitudinale Glia wurde dem bereits beschriebenen Glioblasten GP (Jacobs et al., 1989) zugeordnet. Obwohl also eine eindeutige Bestimmung der NBs im lebenden Tier nicht möglich war, erlaubte doch die Menge der verwendeten Kriterien und Daten, nahezu jeden erhaltenen Zellstammbaum einem bestimmten NB zuzuordnen. Einzige Ausnahme ist Klon y, der aufgrund der geringen Häufigkeit ( $n = 4$ ), mit der er auftrat, nicht zugeordnet werden konnte.

Für vier NBs (X, 2-3, 3-4, 5-5) wurde kein Zellstammbaum gefunden. Hierfür gibt es keine offensichtliche Erklärung, denn in dem zweidimensionalen Epithel des Neuroektoderms sollte die Wahrscheinlichkeit markiert zu werden für jeden Vorläufer gleich groß sein. Die Möglichkeit, daß die DiI-Färbung die normale Entwicklung dieser vier NBs störte, ist unwahrscheinlich, da für alle anderen NBs keine Beeinträchtigung ihrer Entwicklung festgestellt wurde.

Ein bisher nicht beschriebener NB (NB 1-3) wurde identifiziert. Er lag an der Segmentgrenze nahe den trachealen Plakoden (Abb. 5). Da seine neuronalen Nachkommen im anterioren Teil des Segments lagen und für die dNE NBs genau wie für die vNE NBs (Bossing et al., 1996) eine räumliche Beziehung zwischen der Lage des NB und seinen Nachkommen im Segment gefunden wurde (s.u. IV.1.5.), wurde er der NB-Reihe 1 und nicht der Reihe 7 zugeordnet. Der nächste Nachbar von NB 1-3 war der bereits früher mit Nachkommen beschriebene Glioblast GP (Jacobs et al., 1989), der daher nicht identisch mit NB 1-3 sein kann. NB 1-3 ist somit durch eine charakteristische Lage in der NB-Schicht charakterisiert. Dieser Befund wird dadurch untermauert, daß ein zusätzlicher *hkb-lacZ* exprimierender Vorläufer in der nach der *in vivo* Beobachtung für NB 1-3 vorhergesagten Position beobachtet wurde (Abb. 7Ai). In späten Embryonen exprimierten durchschnittlich zwei periphere Gliazellen (PG) pro Segment *hkb-lacZ*. Da zum Stammbaum von NB 1-3 die Mehrzahl der PG gehörten und der einzige andere NB (NB 2-5), zu dessen Stammbaum PG gehörten, zu keiner Zeit *hkb* exprimierte, ist es wahrscheinlich, daß diese *hkb*-positiven PG von NB 1-3 abstammten. In Jones et al. (1995) wurde ein peripherer Glioblast beschrieben, der PG produziert und lateral zum GP liegt. Da NB 1-3 alle bekannten PG mit Ausnahme der zwei von NB 2-5 abstammenden generierte, ist es wahrscheinlich, daß diese Gliazellen identisch mit den Nachkommen von NB 1-3 sind. Damit wäre der periphere Glioblast ein Teil von NB 1-3.

#### **IV.1.2. Zuordnung des lateralen Clusters von *even-skipped* exprimierenden Zellen zum NB 3-3 Stammbaum**

Higashijima et al. (1996) veröffentlichten erste Hinweise darauf, daß das laterale Cluster von *even-skipped* (*eve*) exprimierenden Zellen (EL; Patel et al., 1989) zu den Nachkommen von NB 2-4 oder 3-3 gehört. Durch Doppelfärbung fotokonvertierter Klone mit einem *-Eve* AK wurde hier gezeigt, daß die EL in dem Stammbaum enthalten waren, der NB 3-3 zugeordnet wurde ( $R = 70\%$ ,  $F = 44\%$ ). Nach Higashijima et al. (1996) und unseren eigenen Daten wäre der einzige andere mögliche Vorläufer für die EL NB 2-4 gewesen. Sowohl die Nachkommen von NB 2-4 als auch die von NB 3-3 exprimieren *eagle* (Higashijima et al., 1996; Dittrich et al., 1997). Wurden Embryonen, in denen GFP-Expression über den *eagle*-Promotor getrieben wurde, mit *-Eve* AK doppelt gefärbt, so zeigte sich, daß die EL in dem Klon enthalten waren, der demjenigen glich, der NB 3-3 zugeordnet worden war (Abb. 8A). Dieser Klon und auch die EL lagen weiter posterior im Segment als der NB 2-4 zugeordnete Stammbaum. Berücksichtigt man die direkte Korrelation der anterior-posterioren Position des NBs in der NB-Schicht mit der anterior-posterioren Lage seiner Nachkommen im spätembryonalen Neuomer (Bossing et al., 1996 und IV.1.5.) und daß ansonsten nur noch die noch weiter posterior im Segment gelegenen Nachkommen von NB 6-4 und 7-3 *eagle* exprimieren (Higashijima et al., 1996,

Dittrich et al., 1997), so ist dies eine starke Unterstützung für die hier vorgenommene Zuordnung.

### IV.1.3. Zellstammbäume und Proliferationsmuster

Insgesamt generierten die dNE NBs durchschnittlich 120 Neurone und 22 bis 27 zentrale Gliazellen. Zusammen mit den Nachkommen der vNE NBs (Bossing et al., 1996) besteht damit ein thorakales oder abdominales Hemineuromer des späten *Drosophila*-Embryos aus ca. 350 Neuronen und 25 bis 30 Gliazellen (Schmidt et al., 1997). Hinzu kommen ca. 16 ML-Neurone und 4 ML-Glia pro Neuromer (Bossing und Technau, 1994). Damit stammt die Mehrzahl der Gliazellen von den dNE NBs ab (s.u. IV.1.4.). Ihre Gesamtzahl entspricht der aus früheren Beschreibungen (Ito et al., 1995). Zusätzlich wurden sechs bis neun periphere Gliazellen (PG) gefunden. Zu ihnen gehörten auch die sog. Exit Glia (Klämbt und Goodman, 1991), da diese in späten Embryonalstadien aus dem vNS auswanderten und damit eine Subpopulation der PG waren.

Die vNE NBs zeigten, wie aus der Anzahl ihrer Nachkommenzellen geschlossen wurde, deutliche Unterschiede in ihrer mitotischen Aktivität (Bossing et al., 1996). Die hier präsentierten Daten bestätigen diesen Befund (Zahl der Nachkommenzellen der dNE NBs s. Tab. 9) und unterstützten den Standpunkt, daß die Spezifizierung eines NBs auch die Definition seiner Proliferationsaktivität umfaßt. Prinzipiell generierten früh segregierende NBs mehr Nachkommen als später delaminierende. So bestanden die Zellstammbäume der S1 und S2 NBs aus 10 bis mehr als 20 Zellen, während die der S3 bis S5 NBs aus 2 bis 13 Zellen bestanden. Einzige Ausnahme ist der abdominale Stammbaum des S1 NB 5-6, der aus nur 7 bis 11 Zellen bestand. Interessanterweise hatte die Variabilität in der Segregationszeit eines NBs keinen offensichtlichen Einfluß auf seine Klongröße (s. auch IV.1.10.).

Die neuroektodermalen Vorläufer der sechs spät delaminierenden NBs (NBs 1-3, 2-4, 3-3, 4-3, 4-4, 5-4) teilten sich bereits im Ektoderm. Anschließend delaminierte nur eine der Tochterzellen als NB (Abb. 5, Tab. 9), während die andere in der Peripherie verblieb und einen epidermalen Subklon bildete. Dies steht im Einklang mit der Ansicht, daß innerhalb eines proneuralen Clusters nur eine Zelle zum neuralen Vorläufer wird (als Überblick s.u.a. Campos-Ortega, 1993). Für den S3 NB 6-4 wurde in einigen Fällen eine neuroektodermale Teilung vor der Delamination beobachtet, in anderen hingegen nicht. Eine neuroektodermale Teilung scheint daher für einige Vorläufer obligatorisch und für andere optional zu sein. Klon y trat zu selten auf, so daß hier nicht entschieden werden konnte, ob ein epidermaler Subklon obligatorisch oder optional war. Da für die vNE NBs ähnliche Beobachtungen gemacht wurden (Bossing et al., 1996), ist es wahrscheinlich, daß neuroektodermale Vorläufer vor der NB Delamination am normalen ektodermalen Teilungsmuster (Foe, 1989) teilnehmen. Daher proliferierten Vorläufer, die sich zu S1 und S2 NBs entwickelten, nicht im Neuroektoderm, solche, die S3 NBs hervorbrachten, konnten dort proliferieren und diejenigen, die spätere NBs erzeugten (S4, S5),

teilten sich immer im Neuroektoderm. Die typischerweise geringere Größe spät delaminierender NBs (Abb. 5) und ihre geringe Zahl an Nachkommen könnte auf die vorhergehende Teilung ihrer neuroektodermalen Vorläufer zurückzuführen sein.

Bei den NBs 4-3 und 4-4 wurde zusätzlich zu einem epidermalen Subklon häufig auch ein sensorischer beobachtet (Abb. 8B). Dies läßt vermuten, daß der im Ektoderm verbliebene Vorläufer nochmals an einem Zellkommunikationsprozeß teilnahm, der über sensorisches versus epidermales Schicksal entscheidet (zusammengefaßt u.a. in Campos-Ortega, 1993; Goodman und Doe, 1993; Abb. 8Bi). Darüber hinaus deuten diese Beobachtungen an, daß es zumindest in zwei Fällen räumliche Überlagerungen zwischen zentralen und peripheren proneuralen Clustern geben kann. Im Einklang mit dieser Vermutung wurden durch DiI-Markierungen im dorsalen Teil des Neuroektoderms häufig sensorische Strukturen gefärbt (Daten nicht gezeigt). Setzt man eine solche räumliche Überlagerung voraus, so muß die Spezifizierung der ZNS und PNS Vorläufer zeitlich verschoben sein.

NBs teilen sich nach ihrer Delamination üblicherweise asymmetrisch (Stammzellmodus), wobei sie Gangliemutterzellen (GMCs) abschnüren, die sich ihrerseits einmal symmetrisch in Neurone und/oder Gliazellen teilen (Bauer, 1904; Hartenstein et al., 1987). Einzige bisher bekannte Ausnahme ist MP2, der sich morphologisch nahezu symmetrisch teilt und nur zwei Neurone generiert, obwohl er sich sonst wie ein NB verhält (Thomas et al., 1984; Spana und Doe, 1995; Bossing et al., 1996). Er gleicht in dieser Hinsicht eher den ML-Vorläufern (Klämmt et al., 1991; Bossing und Technau, 1994). Hier wurden zwei weitere NBs (GP, NB 6-4A) beobachtet, die sich morphologisch symmetrisch teilten. Interessanterweise handelt es sich bei diesen beiden um reine Glioblasten. Für den Neuroglioblasten NB 6-4T ist kürzlich gezeigt worden, daß er sich zunächst in einen rein neuronalen und einen rein glialen Vorläufer teilt (Akiyama-Oda et al., 1999). Ob dies auch für die anderen Neuroglioblasten (z.B. NBs 5-6, 7-4) zutrifft, ist bisher nicht bekannt.

#### **IV.1.4. Gliazellen**

Die Verteilung und Klassifizierung der ca. 30 Gliazellen pro Hemineuromer ist detailliert in Ito et al. (1995) beschrieben worden, aber bisher waren nur die longitudinale Glia (Jacobs et al., 1989), drei SPGs (Udolph et al., 1993, Bossing et al., 1996) und die ML-Glia (Klämmt et al., 1993; Bossing und Technau, 1994) einem bestimmten Vorläufer zugeordnet worden. In der hier vorgelegten Arbeit (Schmidt et al., 1997) ist es gelungen, alle zuvor beschriebenen Gliazellen mit Ausnahme der M-CG (Nomenklatur s. Ito et al., 1995; Tab. 6) und vielleicht einer SNG einem bestimmten Vorläufer zuzuordnen (Tab. 9). Trotz gewisser Identifikationsprobleme bei einigen wenigen Gliazellen (L- und VL-CBG bzw. VL- und DL-SPG konnten nicht unterschieden werden) zeigte sich, daß in einigen Klonen bestimmte Gliazellen immer vorhanden waren, während andere nur optional auftraten. Dies machte eine Unterscheidung zwischen konsistenten und variablen Gliazellen erforderlich, wobei in einem

Klon neben den konsistenten Gliazellen i.d.R. zwei oder mehr der variablen Zellen auftraten (Tab. 9).

Nach Ito et al. (1995) gibt es sieben oder acht interface Glia (IG) pro Hemineuromer. Auf Grundlage molekularer Marker (*ftz-lacZ*; *prospero*) wurden sechs longitudinale Gliazellen als Nachkommen des GP beschrieben (Jacobs et al., 1989; Doe, et al., 1991) und als Subpopulation der IG betrachtet (Ito et al., 1995). Die hier durchgeführten DiI-Markierungen zeigten, daß der Zellstammbaum des GP aus sieben bis neun IG bestand. Somit scheint die gesamte IG vom GP abzustammen und ist am Ende der Embryogenese identisch mit der longitudinalen Glia. Dies würde bedeuten, daß *prospero* nicht im gesamten GP Stammbaum exprimiert wird.

Hinsichtlich der D-SPGs konnte ein bestimmter Klon (Stammbäume von NBs 1-3, 5-6, 7-4) entweder die MD- oder die LD-SPG enthalten. Eine analoge Situation wurde auch bei den V-SPGs beobachtet, wo der abdominale Stammbaum von NB 1-1 entweder die MV- oder die LV-SPG enthalten konnte (Udolph und Bossing, unveröffentlichte Daten). Die andere der V-SPGs stammte jeweils von NB 5-6 ab. Für die L-SPGs (Nachkommen von NBs 5-6, 7-4) wird von einer entsprechenden Situation ausgegangen, obwohl es nicht möglich war, ihre relativen Lagen innerhalb der Klone mit absoluter Sicherheit zu bestimmen. Im Zellstammbaum von NB 7-4 wurden entweder zwei dorsale, zwei ventrale oder eine dorsale und eine ventrale CG beobachtet. Für die CGs (NB 7-4) und die IGs (GP) sind intensive gliale Wanderungen im Verlauf der Embryogenese beschrieben worden, aufgrund derer die Zellen, ausgehend von der lateralen Position ihrer Vorläufer, ihre engültigen Positionen im Bereich der ML einnehmen. Da auch die SPGs in einiger Entfernung von den restlichen Zellen der Klone liegen, ist es wahrscheinlich, daß auch sie ihre Positionen durch Migration erreichen. Damit wäre es möglich, daß im Verlauf dieser Zellmigrationen die relativen Lagen der SPGs und CGs durch Zellkommunikation festgelegt werden.

### IV.1.5. Räumliche Beziehungen

Genau wie bei den vNE NBs (Bossing et al., 1996) korrelierte auch bei den dNE NBs die medio-laterale Lage des NBs in der neuralen Zellschicht mit der ventro-dorsalen Lage des Vorläufers im Neuroektoderm. Auch die dorso-ventrale und anterior-posteriore Lage des Klons im spätembryonalen Bauchmark korrelierte - wiederum wie bei den vNE NBs - mit der vorherigen Lage des NBs in der neuralen Zellschicht. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Ausnahmen von dieser räumlichen Korrelation (Bossing et al., 1996) wurden hier weitere Ausnahmen gefunden. Aufgrund der im frühen Std. 12 beginnenden Migration der IG (Jacobs et al., 1989) lag sie im späten Embryo dorsal der Konnektive, also medial im Neuromer, während ihr Vorläufer (GP) ein lateraler NB ist. Auch die SPGs, die CGs und die MM-CBG lagen immer in einiger Entfernung vom Rest des Klons. Im Gegensatz dazu galt i.d.R. eine strikte räumliche Beziehung zwischen dem Vorläufer und seinen neuronalen Nachkommen.

Damit scheint es eine generelle räumliche Lagebeziehung zwischen dem Vorläufer und seinen Nachkommen zu geben, aber aufgrund von Zellmigrationen stellen die meisten Gliazellen (z.B. IG, SPG, CG) und einige Neurone (z.B. 2-5Ic1, aCC, pCC, RP2) Ausnahmen dar.

Die Mehrzahl der Gliazellen stammte von den dNE NBs ab. Mit Ausnahme von NB 3-5 (und möglicherweise NB 3-4) hatten die am weitesten lateral in jeder NB-Reihe gelegenen Vorläufer (NBs 1-3, 2-5, 5-6, 6-4, 7-4, GP) Gliazellen unter ihren Nachkommen. Im Gegensatz dazu generierte bei den vNE NBs jeweils nur ein Vorläufer in Thorax und Abdomen Gliazellen (NB 2-2T, NB 1-1A; Bossing et al., 1996). Damit wäre es denkbar, daß die Festlegung auf ein weit dorsales gelegenes NB-Schicksal auch die Spezifizierung als Neuroglioblast oder Glioblast umfaßt. Interessanterweise erzeugen dNE NBs, die heterotop nach ventral transplantiert werden, Zellstammbäume von vNE NBs, d.h. nehmen ein ventrales Schicksal an. Im Unterschied dazu wandern heterotop nach dorsal transplantierte vNE NBs zurück nach ventral und generieren ihrer Herkunft entsprechende Zellstammbäume, d.h. solche mit ventraler Charakteristik. Dies deutet das Vorhandensein eines ventralisierenden Signals an, das sowohl von vNE als auch von dNE NBs empfangen werden kann (Udolph et al., 1995). Es könnte daher sein, daß zur Spezifizierung eines dorsalen Schicksals dieses Signal fehlen oder unterdrückt sein muß. Dieses Signal könnte auch an der Spezifizierung eines Vorläufers als Neuroglioblast oder Glioblast beteiligt sein. Allerdings müßten in diesem Szenario hinsichtlich der glialen Zellschicksale noch die Ausnahmen wie NBs 1-1, 3-5 erklärt werden.

#### IV.1.6. Segmentpezifität

Anders als im Grashüpferembryo (Bate, 1976; Doe and Goodman, 1985) gibt es in *Drosophila* keinen offensichtlichen Unterschied in der Anordnung thorakaler und abdominaler NBs. Trotzdem wurden bei drei Zellstammbäumen, die von vNE NBs abstammten, segmentspezifische Unterschiede gefunden (NBs 1-1, 2-2, 3-1; Udolph et al., 1993; Bossing et al., 1996). Auf Grundlage morphologischer Kriterien wurden hier bei den dNE NBs vier weitere Fälle segmentaler Unterschiede gefunden (NBs 2-4, 5-4, 5-6, 6-4; Tab. 9). Darüber hinaus wurde festgestellt, daß es im NB 3-3 Stammbaum Unterschiede in der *eve* Expression zwischen Thorax und Abdomen gab, obwohl die Gesamtzellzahl nicht segmental verschieden war.

Für NB 1-1 ist gezeigt worden, daß seine Tagmaspezifität bereits im Neuroektoderm durch die Aktivität homöotischer Gene (*Ubx*, *abd-A*) festgelegt wird (Prokop und Technau, 1994). Weitere segmentale Unterschiede im ZNS sind für postembryonale Stadien beschrieben worden (Truman und Bate, 1988; Prokop und Technau, 1991), wobei auch diese bereits im Neuroektoderm festgelegt wurden (Prokop et al., 1998). Daher ist es wahrscheinlich, daß auch die hier gefundenen Segmentspezifitäten bereits im Neuroektoderm der frühen Gastrula festgelegt wurden.

#### IV.1.7. Projektionsmuster

Zusammen mit den Zellstammbäumen der vNE NBs (Bossing et al., 1996) hatten im späten Embryo nur vier Zellstammbäume keine kontralateral projizierenden Interneurone (NBs 1-1, 5-4, 4-3, MP2). Darüber hinaus waren die kontralateralen Faszikel i.d.R. wesentlich prominenter als die ipsilateralen. Im Gegensatz dazu verliefen die meisten Motoprojektionen ipsilateral. Von insgesamt 14 Zellstammbäumen mit motoneuronalen Fasern hatten nur fünf (NBs 1-3, 2-4, 3-1, 5-2, Klon y) solche, die kontralateral verliefen. Klon y ist der einzige Fall, in dem eine ipsilaterale und kontralaterale Motoprojektion gefunden wurde. Diese Projektion bifurkierte und erstreckte sich entlang des transversalen Nervs zu beiden Seiten. Dieser Nerv wird komplett von den dorsomedianen (DM) Zellen eingehüllt (Gorczyca et al., 1994). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten des transversalen Nervs zeigen, daß insgesamt vier Axone von den DM-Zellen eingeschlossen werden (R. Canterra, persönliche Mitteilung). Interessanterweise sind die DM-Zellen trotz dieser glialen Charakteristik mesodermale Derivate (Beer et al., 1987; Lüer et al., 1997).

Klone, die anterior im Neuromer lagen, projizierten üblicherweise durch die anteriore Kommissur (AK) nach kontralateral, während diejenigen, die posterior lagen, typischerweise auch durch die posteriore Kommissur projizierten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen für die vNB NBs (Bossing et al., 1996). Ausnahmen von dieser Regel waren nur NB 5-6, der durch beide Kommissuren projizierte, und Klon y, der neben Fasern in seinem eigenen Segment auch Projektionen durch die AK des nächst posterioren Segments hatte.

#### IV.1.8. Apoptose

Apoptose oder programmierter Zelltod (PZT) ist ein konservierter Prozeß in vielen Spezies, insbesondere auch während der Entwicklung (zusammengefaßt u.a. in Vaux et al., 1994). Bei der Entwicklung des *Drosophila*-ZNS ist geschätzt worden, daß ca. 50% der Zellen durch PZT sterben (White et al., 1994). In der hier durchgeführten Untersuchung wurde Zelltod allerdings nur im Stammbaum von NB 4-4 beobachtet, wo in den meisten Fällen ein bis zwei, morphologisch abnormale Zellen etwas lateral vom Klon beobachtet wurden. Da dies der einzige Fall von Zelltod war, ist es unwahrscheinlich, daß es sich hierbei um ein experimentelles Artefakt handelte. Wahrscheinlicher ist, daß PZT ablief. Apoptotische Zellen wurden auch in den Stammbäumen der NBs 3-1, 5-3, 6-2 und 7-3 beschrieben (Bossing et al., 1996). Der Grund, warum PZT hier in so wenigen Fällen beobachtet wurde, ist sicherlich im Beobachtungszeitraum zu suchen. Die *in vivo* Beobachtungen wurden Ende Std. 11 beendet und die Embryonen dann im Std. 17 präpariert. PZT beginnt aber erst nach dem Std. 12, und die Überreste der abgestorbenen Zellen werden i.d.R. sofort von Makrophagen beseitigt (White et al., 1994), weshalb es hier unwahrscheinlich war, sie zu entdecken.

#### IV.1.9. Variabilität

Die hier beschriebenen NBs und ihre Stammbäume zeigten charakteristische Musterelemente, die sie individuell identifizierbar machten. Allerdings wurde eine gewisse Variabilität in den Segregationszeiten (Doe, 1992) einiger NBs (z.B. NBs 2-4, 3-3, 4-4, 5-4) gefunden. Andere NBs (z.B. NBs 2-5, 3-5, 5-6, 7-4) hingegen delaminierten eher stereotyp zu einer bestimmten Zeit. Dies deckt sich mit den Befunden bei den vNE NBs (Bossing et al., 1996). Interessanterweise war die Variabilität bei den spät delaminierenden NBs (S4, S5) größer.

Auch in der Anzahl der Zellen wurde bei den meisten Stammbäumen eine gewisse Variabilität beobachtet (Tab. 9), wohingegen die Projektionsmuster invariant erschienen. Dabei hatte die Variabilität in den Segregationszeiten keinen offensichtlichen Einfluß auf die Klongröße. Dies ist vereinbar mit der Ansicht, daß das Schicksal eines NBs bereits im Neuroektoderm spezifiziert wird (Chu-LaGraff und Doe, 1993; Skeath et al., 1995). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei den vNE NBs gemacht. Einige Zellen, wie z.B. die konsistenten Gliazellen oder das 2-5Ic1 Neuron, waren innerhalb der Stammbäume allerdings immer vorhanden. Dies spiegelt möglicherweise ihre strukturelle oder funktionale Wichtigkeit wider. Die beobachtete Variabilität könnte Ausdruck einer gewissen Redundanz sein, die bereits früh in der Ontogenese einen Rahmen für Plastizität schafft oder das phylogenetische Potential widerspiegelt. Es wäre jedoch auch möglich, daß die verschiedenen Zellzahlen innerhalb eines Stammbaums unterschiedlich weit fortgeschrittenen PZT dokumentieren.

#### IV.2. Entwicklung von Ionenströmen in ML-Neuronen

Mit der Zellstammbaumanalyse wurde zum Verständnis der neuralen Entwicklung ein Ansatz verfolgt, in dem sich der ausdifferenzierten Zelle von ihrem Vorläufer aus genähert wurde ("von unten nach oben"). Eine andere Strategie ist es, von den elektrophysiologischen Eigenschaften der differenzierten Zelle auszugehen und nach Faktoren zu suchen, die diesen Differenzierungszustand beeinflussen ("von oben nach unten"). Vorliegend wurden daher zunächst die Ionenströme in einer definierten Population von ausdifferenzierten Neuronen - den ML-Neuronen - *in vitro* beschrieben. Anschließend wurde durch Variation der Kulturbedingungen das Vorhandensein von Neuritenverbindungen als wesentlich für die funktionale Expression vieler Ionenströme identifiziert, wohingegen spannungsgesteuerte K<sup>+</sup>-Ströme im wesentlichen zellautonom reguliert zu sein schienen.

### IV.2.1. Ionenströme in kultivierten ML-Neuronen

Unabhängig von der Größe der Klone und dem Alter der Kulturen waren ML-Neurone *in vitro* heterogen in der Inaktivierungscharakteristik eines makroskopischen  $K^+$ -Auswärtsstroms (Abb. 10). Auf Grundlage qualitativer Kriterien ließen sich möglicherweise vier Gruppen von  $K^+$ -Strömen unterscheiden. In drei Gruppen (1, 2, 4) dominierte die inaktivierende Komponente des Stroms, wobei sich jeweils die Inaktivierungskinetik zu unterscheiden schien. In einer Gruppe (3) war die inaktivierende Komponente klein. Vergleichbar heterogene  $K^+$ -Ströme sind in embryonalen *Drosophila*-Neuronen, die in einem chemisch definierten Medium aufgewachsen waren (O'Dowd, 1995), und in kultivierten Pilzkörperneuronen (Delgado et al., 1998) beschrieben worden. In den Pilzkörperneuronen waren  $K^+$ -Ströme mit unterschiedlicher makroskopischer Inaktivierungskinetik unterschiedlich sensitiv für 4-AP. Obwohl diese Frage hier nicht intensiv untersucht wurde, ist kein offensichtlicher Unterschied in der 4-AP Sensitivität zwischen Neuronen der vier genannten Gruppen gefunden worden. Als Ursachen für die beobachtete Heterogenität des  $K^+$ -Stroms kommen einerseits unterschiedliche Untereinheiten oder modulatorische Zustände eines Kanals und/oder unterschiedliche Typen von Kanälen in Betracht. In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Frage nach unterschiedlichen Typen von  $K^+$ -Kanälen gestellt und es wurden ein A-Typ ähnlicher Strom ( $I_A$ ) und ein gleichrichterähnlicher Strom ( $I_K$ ) gefunden. Diese beiden Ströme wurden ursprünglich aufgrund pharmakologischer Untersuchungen als separable Komponenten identifiziert (Thompson, 1982; zusammengefaßt u.a. in Hille, 1992). Später wurde in heterologen Expressionssystemen gezeigt, daß *Shaker*, *Shal*, *Shab* und *Shaw* voneinander unabhängige  $K^+$ -Ströme kodieren (Covarrubias et al., 1991). In *Drosophila* wurde die ontogenetische und funktionale Unabhängigkeit des A-Typ Stroms und des gleichrichterähnlichen Stroms zunächst im Muskel gezeigt. Hier fehlte in *Shaker*-Nullmutanten der A-Typ Strom aber nicht  $I_K$  (z.B. Salkoff und Wyman, 1981; Salkoff, 1983; Wu und Haugland, 1985; Solc et al., 1987; Zagotta et al., 1988; Broadie und Bate, 1993 c). Auch für *Drosophila*-Photorezeptoren wurde gezeigt, daß *Shaker* dort der wesentliche  $I_A$  ist (z.B. Hardie, 1991; Hevers und Hardie, 1995). Vermutlich trifft dies auch für Kenyon-Zellen in den Pilzkörpern der Honigbiene zu (Schäfer et al., 1994). Schließlich wurde auch in *Drosophila*-Neuronen in Massenzellkultur gezeigt, daß  $I_A$  und  $I_K$  genetisch unabhängig voneinander sind, wobei der wesentliche Beitrag zu  $I_A$  hier von *Shal* stammt (Tsunoda und Salkoff, 1995b). Nur in Subpopulationen von *Drosophila*-Neuronen wurde auch ein von *Shaker* kodierter  $I_A$  beobachtet (z.B. Baker und Salkoff, 1990; Tsunoda und Salkoff, 1995b). Der bedeutendste gleichrichterähnliche Strom sowohl im Muskel als auch in Neuronen wird in *Drosophila* von *Shab* kodiert (Tsunoda und Salkoff, 1995a).

In den hier untersuchten ML-Neuronen lagen die  $V_{1/2}$  Werte der Inaktivierung von  $I_A$  in hyperpolarisierten Bereichen um -70 mV. In allen Fällen wurde die beste Anpassung an die Daten (fit) mit nur einer Boltzmann-Verteilung erzielt (Abb. 12; Tab. 10), was dafür spricht, daß tatsächlich eine isolierte Stromkomponente analysiert wurde. Tsunoda und Salkoff

(1995a,b) hatten gezeigt, daß  $V_{1/2}$  Werte um  $-70$  mV in *Drosophila*-Neuronen charakteristisch für *Shal* sind. Im Gegensatz dazu haben neuronale *Shaker*-Ströme sowohl in *Drosophila* als auch in der Biene typischerweise eine stärker depolarisierte Spannungsabhängigkeit mit  $V_{1/2}$  Werten um  $-35$  mV (Solc et al., 1987; Baker und Salkoff, 1990; Schäfer et al., 1994; Tsunoda und Salkoff, 1995b). In Ableitungen von *Shaker*-nullmutanten ML-Neuronen war  $I_A$  vorhanden (Abb. 13A) und seine  $V_{1/2}$  Werte waren ähnlich wie die im Wildtyp (WT). Zusammengefasst sprechen die vorgelegten Daten dafür, daß  $I_A$  in ML-Neuronen im wesentlichen von *Shal* kodiert wurde. Unterstützt wird diese Auffassung durch immunohistochemische Untersuchungen, in denen *Shaker*-Expression erst in larvalen Stadien und dann hauptsächlich in den Pilzkörpern gefunden wurde (Rogero und Tejedor, 1995; Rogero et al., 1997). Da der *Shal*-Strom hier nicht genetisch ablatiert werden konnte (s.u.) und *Shaker*-Immunoreaktivität auch im Neuropil beobachtet wurde, kann ein geringer *Shaker*-Beitrag zu  $I_A$  nicht vollständig ausgeschlossen werden.

$I_K$  war in kultivierten ML-Neuronen i.d.R. sehr klein und durch eine anhaltende Komponente von  $I_A$  überlagert (Abb. 11, 13B; Tab. 10). Er war daher schwer zu analysieren. In den wenigen Ableitungen an *Shaw*-defizienten ML-Neuronen hatte die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung des  $K^+$ -Stroms in Abwesenheit pharmakologischer Blocker einen dem WT vergleichbaren doppelt exponentiellen Verlauf (Abb. 13B). Die Parameter der ersten Komponente waren dabei vergleichbar mit  $I_A$  im WT. Diejenigen der zweiten Komponente waren mit  $V_{1/2}$  Werten um  $-30$  mV ähnlich wie die Parameter für den *Shab*-Strom in anderen *Drosophila*-Präparationen (Tsunoda und Salkoff, 1995b). In Anwesenheit von 4-AP blieb ein anhaltender Auswärtsstrom sowohl in WT als auch in *Shaw*-defizienten ML-Neuronen erhalten (Abb. 11, 13B). *Shab*-Kanäle, die in *Xenopus* Oozyten exprimiert wurden, waren insensitiv gegenüber 4-AP (Covarrubias et al., 1991), während für *Shaw* gezeigt worden ist, daß die von ihm exprimierten Kanäle durch 4-AP blockiert werden (Wei et al., 1990). Da *Shab* darüber hinaus der am weitesten verbreitete  $I_K$  in *Drosophila*-Neuronen *in vitro* ist (Tsunoda und Salkoff, 1995b), ist es wahrscheinlich, daß  $I_K$  in ML-Neuronen zumindest teilweise von *Shab* kodiert wurde. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß der Spannungs-Arbeitsbereich des isolierten  $I_K$  stärker depolarisiert war als der in früheren Beschreibungen in *Drosophila*-Neuronen (Tab. 10). Dies könnte ML-spezifisch sein. Da jedoch die Strom-Spannungs-Beziehung der Inaktivierung von  $I_K$  selbst in Anwesenheit von 4-AP immer noch einen doppelt exponentiellen Verlauf hatte, wären auch eine unvollständige Separation von der anhaltenden Komponente von  $I_A$  (vgl. Tab. 10) oder ein weiterer Strombeitrag, z.B. von *Shaw*, möglich.

$I_K$  konnte bereits am IVT 1 beobachtet werden, wohingegen  $I_A$  zumeist erst ab IVT 2 deutlich erkennbar war. Die Stromdichte von  $I_K$  war allerdings am IVT 1 so gering, daß eine Analyse nicht möglich war. Die Dichte des  $K^+$ -Stroms insgesamt nahm bis IVT 3 zu. Das zeitliche Auftreten der beiden  $K^+$ -Ströme steht im Einklang mit Beobachtungen an dorsal im vNS gelegenen Neuronen *in situ* (Baines und Bate, 1998), allerdings mit einer gewissen

Verzögerung, die auf die Anpassung der Zellen an die *in vitro* Situation zurückzuführen sein könnte.

Kultivierte ML-Neurone exprimierten auch spannungsgesteuerte Einwärtsströme, von denen einer durch  $\text{Na}^+$  (Abb. 14) verursacht wurde und ein anderer durch  $\text{Ca}_{(\text{Ba})}^{2+}$  (Abb. 15). In *Drosophila*-Neuronen, die in einem chemisch definierten Medium in Massenzellkultur aufgewachsen waren, und in zellzyklusarretierten Neuroblasten sind ein schnell inaktivierender und ein anhaltender  $\text{I}_{\text{Na}}$  beschrieben worden. Bei anhaltender elektrischer Stimulation wurde eine große Spanne in den Aktivitätsmustern dieser Zellen gefunden. Sie konnten ein Aktionspotential (AP, Spike) bis hin zu vielen ohne Anzeichen von Adaptation generieren (Saito und Wu, 1991; O'Dowd, 1995). Ein transienter und ein anhaltender  $\text{I}_{\text{Na}}$  sind auch in anderen Insektenneuronen, z.B. aus der Schabe (Christensen et al., 1988; Laped et al., 1989) und der Biene (Schäfer et al., 1994), beschrieben worden. In den hier untersuchten ML-Neuronen wurde demgegenüber nur der transiente  $\text{I}_{\text{Na}}$  gefunden. Seine Spannungsabhängigkeit war ähnlich wie die in den früheren Beschreibungen über den inaktivierenden  $\text{I}_{\text{Na}}$  (vgl. Abb. 14). Im Unterschied zu den früheren Beschreibungen waren die ML-Neurone homogen in ihrem Aktivitätsmuster. Selbst bei anhaltender elektrischer Stimulation generierten alle daraufhin untersuchten Zellen nur ein einziges AP (Abb. 14).

Ableitungen von Ganzzellströmen in verschiedenen Massenzellkulturen ließen vermuten, daß es in *Drosophila*-Neuronen zumindest zwei verschiedene spannungsgesteuerte  $\text{I}_{\text{Ca}}$  gibt (Byerly und Leung, 1988; Leung et al., 1989; Saito und Wu, 1991; O'Dowd, 1995). Auch Einzelkanalableitungen von neuronalen *Drosophila*-Zellmembranen deuteten das Vorhandensein von mindestens zwei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen an (Leung und Byerly, 1991). Demgegenüber wurde in den Kenyon-Zellen der Biene (Schäfer et al., 1994) und in nicht spikenden Interneuronen der Heuschrecke (Laurent et al., 1993) nur ein Typ von  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen gefunden. In den hier untersuchten ML-Neuronen wurden zumindest zwei verschiedene  $\text{I}_{\text{Ca(Ba)}}$  gefunden (T1 und T2), die sich hinsichtlich ihrer Inaktivierungskinetik und der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung unterschieden (Abb. 15). In einigen wenigen Fällen wurden auch eindeutige Hybride zwischen diesen beiden Strömen beobachtet (T1/2). Wie die große Standardabweichung (SD) für die Inaktivierung des T1-Stroms andeutet, könnten noch mehr Fälle des Hybridstroms vorhanden gewesen sein, wurden aber durch die Dominanz entweder von T1 oder T2 verdeckt. Es wurde daher versucht, die  $\text{I}_{\text{Ca(Ba)}}$  in ML-Neuronen unter Verwendung von 1 mM Amilorid pharmakologisch zu differenzieren. Für diese Amiloridkonzentration ist beschrieben worden, daß sie ein Vertebraten-T-Typ  $\text{I}_{\text{Ca}}$ -Homolog in *Drosophila*-Muskeln und Neuronen blockiert (Gielow et al., 1995; Baines und Bate, 1998). In meinen Versuchen reduzierte Amilorid jedoch sowohl die Amplitude von T1 als auch die von T2. In den T1/2-Hybriden wurde durch Amiloridapplikation die Maximalamplitude des Stroms zu stärker hyperpolarisierten Kommandospannungen hin verschoben und die Spannungsabhängigkeit schien steiler zu werden. Beides ist charakteristisch für den T1-Strom, was für eine präferentielle Hemmung der T2-Komponente in den Hybriden spricht (vgl. Abb.

16). Andere  $I_{Ca}$ -Blocker aus den Familien der Phenylalkamine und Dihydropyridine waren sowohl in *Drosophila*-Neuronen (Byerly und Leung, 1988) als auch in der Biene (Schäfer et al., 1994) uneffektiv oder unspezifisch und wurden daher hier nicht weiter untersucht. Vertebraten  $Ca^{2+}$ -Kanäle sind zusätzlich zu spezifischer Sensitivität gegenüber den o.g. Pharmaka klar verschieden in ihrer Aktivierungsspannungsabhängigkeit. So haben z.B. T-Typ Kanäle niedrige Aktivierungsschwellen (unter -60 mV), wohingegen L-Typ Kanäle erst bei höheren Spannungen aktivieren (zwischen -60 und -10 mV) (Hille, 1992). Ein so deutlicher Unterschied in den Spannungsarbeitsbereichen wurde weder hier in den ML-Neuronen gefunden noch in den o.g. *Drosophila*-Präparationen. Hinzu kommt, daß T-Typ Kanäle i.d.R. resistent gegenüber einer Blockade durch  $Cd^{2+}$  sind und keine höhere Leitfähigkeit für  $Ba^{2+}$  als für  $Ca^{2+}$  haben (Hille, 1992). In den ML-Neuronen wie auch in anderen *Drosophila*-Neuronen und Muskeln wurde  $I_{Ca(Ba)}$  durch  $Cd^{2+}$  blockiert und die Stromamplitude vergrößerte sich deutlich, wenn  $Ba^{2+}$  als permeables Ion verwendet wurde. Daher scheint es, zumal in Abwesenheit eines spezifischen pharmakologischen Blocks, zur Zeit nicht sinnvoll, T1 und T2 in die Vertebraten- $I_{Ca}$ -Klassifikation einzupassen.

Der hauptsächliche exzitatorische Neurotransmitter im Insekten-ZNS ist ACh, der wesentliche inhibitorische Transmitter GABA (Burrows, 1996). Baines und Bate (1998) haben gezeigt, daß dorsal im vNS gelegene embryonale *Drosophila*-Neurone bereits in einem recht frühen Entwicklungsstadium (13 bis 14 h nach Eiablage) auf ACh reagieren. Kürzlich wurde beschrieben, daß *Drosophila*-Neurone bereits zu Beginn des axonalen Wachstums ACh u.a. aus dem Wachstumskegel ausschütten, zumindest *in vitro* (Yao et al., 2000). Die dorsalen unpaaren medianen (DUM) Neurone im Grashüpfer-Embryo zeigten schon zu Beginn des axonalen Wachstums (40% der Embryogenese) ACh- und GABA-induzierte Ströme (Goodman und Spitzer, 1979). Ähnliche Beobachtungen wurden in Vertebraten gemacht, wo angenommen wurde, daß die Fusion der Vesikel das Axon mit Membranteilen für das Wachstum versorgt. Der ausgeschüttete Neurotransmitter könnte trophische Funktionen haben und damit zur axonalen Musterbildung beitragen (z.B. Osen-Sand et al., 1993; Igarashi et al., 1997). Die hier abgeleiteten ML-Neurone reagierten bereits am IVT 1 mit maximaler Stromamplitude auf beide Transmitter. Demgegenüber erhöhten sich die Stromdichten der spannungsgesteuerten Ströme bis IVT 3. Dies würde im Einklang mit einer angenommenen ontogenetischen Funktion der Neurotransmitter stehen. Andererseits haben Untersuchungen an *Drosophila*-Nullmutanten für das synthetische (Cholinacetyltransferase) und das degenerative (Acetylcholinesterase) Enzym des ACh-Metabolismus gezeigt, daß sich sowohl auf dem lichtmikroskopischen als auch auf dem ultrastrukturellen Niveau ein nicht vom Wildtyp zu unterscheidendes larvales ZNS ausbildet (u.a. Chase und Kankel, 1988). In *Drosophila syntaxin-1A*-Mutanten, in denen u.a. keine synaptische Transmission an der neuromuskulären Endplatte stattfindet, bilden sich selbst ultrastrukturell normale Endplatten aus (allerdings mit erhöhter Zahl von "Docked Vesicles"; zusammengefaßt u.a. in Wu und Bellen, 1997). Darüber hinaus wurde kürzlich in *munc18-1*-

nullmutanten Mäusen gefunden, daß sich in Abwesenheit von Neurosekretion ein normales Gehirn entwickelt (Verhage et al., 2000).

Da die ML-Neurone nur eine sehr kleine Population von Zellen im embryonalen ZNS von *Drosophila* sind (2%), ist es wahrscheinlich, daß die meisten Ableitungen in den Massenkulturen mit unbekannter Zellidentität (z.B. Byerly und Leung, 1988; Saito und Wu, 1991; O'Dowd, 1995; Tsunoda und Salkoff, 1995a,b) von Neuronen gemacht wurden, die von neuroektodermalen Vorläufern (NBs) abstammten. Die dort abgeleiteten Ströme lassen viele Ähnlichkeiten zu den hier beschriebenen Ionenströmen in den ML-Neuronen erkennen. Obwohl die mesektodermalen ML-Neurone in vielen Aspekten - z.B. Genexpression, Zellstammbaum - von den neuroektodermalen Neuronen verschieden sind, teilen sie hinsichtlich der Ionenströme viele Charakteristika mit diesen. Allerdings wurden auch Unterschiede gefunden. Die  $V_{1/2}$  Werte der Inaktivierung von  $I_A$  umfaßten in anderen Präparationen einen sehr großen Bereich von ca. -40 bis nahezu -100 mV. Demgegenüber hatten die ML-Neurone einen etwas engeren Inaktivierungsbereich mit  $V_{1/2}$  Werten von ca. -60 bis -100 mV. Darüber hinaus fehlte in den ML-Neuronen eine anhaltende  $I_{Na}$ -Komponente und sie waren homogen hinsichtlich der Generierung von APs, was darauf hindeuten könnte, daß sie spezifische Signalleitungseigenschaften haben. Weitere Arbeiten an definierten neuralen Zellstammbäumen werden vermutlich mehr spezifische Unterschiede in den Ionenströmen zu Tage fördern und damit zu einem tieferen Verständnis des Verhältnisses von Genexpression, Zellstammbaum und Funktion beitragen.

### IV.2.2. Neuritenkontakte beeinflussen die Expression vieler Ionenströme

ML-Vorläufer wurden entweder eng benachbart zueinander kultiviert, was die Ausbildung von Neuritenkontakten zwischen den Tochterzellklonen begünstigte (WZK mit Neuritenkontakten), oder in einiger Entfernung zueinander, was die Ausbildung dieser Kontakte verhinderte (WZK ohne Neuritenkontakte). Als Kontrolle wurden Massenzellkulturen angefertigt, in denen die ML-Zellen durch GFP-Expression markiert waren (EK; Abb. 3). Unter allen drei Kulturbedingungen wurde eine vergleichbare Heterogenität in der makroskopischen Erscheinung des spannungsgesteuerten  $K^+$ -Auswärtsstroms beobachtet (Abb. 10), wobei sich dieser jeweils aus  $I_A$  und  $I_K$  zusammensetzte (Abb. 11). Die Spannungsabhängigkeiten von  $I_A$  und  $I_K$  sowie ihre Stromdichten waren unabhängig von den Kulturbedingungen (Abb. 12, Tab. 10). Selbst ML-Neurone, die von Vorläufern abstammten, die in WZK ohne Neuritenkontakte aufgewachsen waren, exprimierten identische  $K^+$ -Ströme wie diejenigen in WZK mit Neuritenkontakten oder in EK. Da die Vorläufer dieser Zellen bereits im frühen Gastrulastadium aus dem Embryo entnommen wurden, zu einem Zeitpunkt also, als die subepidermale neurale Zellschicht noch nicht ausgebildet war, spricht dies für einen hohen Grad an Zellautonomie in der Expression spannungsgesteuerter  $K^+$ -Ströme. Allerdings

bestanden unter allen drei Kulturbedingungen Kontakte zwischen den Somata der Tochterzellen eines Klons. Induktive Effekte auf dieser Ebene können daher nicht ausgeschlossen werden. Zumindest scheint die Expression spannungsgesteuerter  $K^+$ -Ströme jedoch unabhängig von Interaktionen auf der Ebene von Zellprojektionen zu sein.

Im Unterschied zur identischen Expression der  $K^+$ -Ströme wurde der spannungsgesteuerte  $Na^+$ -Strom in ML-Neuronen in WZK mit Neuritenkontakten (78%) signifikant häufiger gefunden als in Neuronen in WZK ohne diese Kontakte (15%) (Abb. 14). Darüber hinaus wurden in vernetzten Neuronen zwei verschiedene Typen von  $I_{Ca(Ba)}$  beobachtet (T1 und T2) und in einigen Fällen auch Hybride zwischen diesen beiden Strömen (T1/2), wohingegen in ML-Neuronen ohne Neuritenkontakte nahezu ausnahmslos nur ein Stromtyp (T2) gefunden wurde. Während die Stromdichten von T1, T2 und T1/2 in ML-Neuronen mit Neuritenverbindungen annähernd identisch waren, war die T2-Stromdichte in Neuronen ohne diese Verbindungen deutlich geringer. Auch die Stromdichten von  $I_{ACh}$  und  $I_{GABA}$  waren bei vorhandenen Neuritenverbindungen wesentlich größer als in Abwesenheit dieser Kontakte. Da die Somata der Tochterzellen innerhalb eines Klons selbst in WZK ohne Neuritenkontakte in Verbindung zueinander standen, ist es wahrscheinlich, daß die beobachteten Veränderungen in den genannten Ionenströmen auf die Ausbildung von Neuritenverbindungen zurückzuführen sind.

Der eine Fall, in dem ein T1- $I_{Ca(Ba)}$  in einem nicht verknüpften Neuron gefunden wurde, könnte auf das Zurückziehen von Neuriten zurückzuführen sein. Ein solches Einziehen von Neuriten wurde gelegentlich selbst aus bereits bestehenden morphologischen Verbindungen in Zeitrafferaufnahmen beobachtet (K. Lüer, unveröffentlichte Daten). Dies würde auch erklären, warum die Dichte dieses  $I_{Ca(Ba)}$  vergleichbar mit denjenigen in Neuronen mit Neuritenkontakten war. Ein solcher Rückzug von Projektionen könnte möglicherweise auch die wenigen Fälle von  $I_{Na}$  in ML-Neuronen ohne Neuritenkontakte erklären. Wiederum waren hier die Stromdichten ähnlich wie die in den Neuronen mit entsprechenden Kontakten. Es wäre allerdings auch möglich, daß die Expression von Ionenkanälen ein stochastischer Prozeß ist, wobei die Wahrscheinlichkeit für deren Expression oder Erhaltung durch die Ausbildung von Neuritenkontakten positiv beeinflußt wird.

In den als Kontrolle benutzten Massenzellkulturen (EK) konnte i.d.R. nicht entschieden werden, ob Neuritenverbindungen vorhanden waren oder nicht. In ML-Neuronen, die unter diesen Kulturbedingungen aufgewachsen waren, wurde  $I_{Na}$  in 35% der Fälle gefunden, also etwa zu einem Prozentsatz, der zwischen denen der beiden WZK liegt. Da  $I_{Na}$  in 78% der ML-Neurone in WZK mit Neuritenverbindungen gefunden wurde, impliziert dies, daß die beobachteten Veränderungen in  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca(Ba)}$ ,  $I_{ACh}$  und  $I_{GABA}$  nicht auf einen diffusiblen Faktor mit großer Reichweite zurückzuführen sind, denn ein solcher Faktor sollte in den Massenzellkulturen in höherer Konzentration vorhanden gewesen sein. Darüber hinaus wurde  $I_{Na}$  in Fällen, wo in EK Neuritenverbindungen erkannt werden konnten (z.B. bei isoliert liegenden Klonen), nahezu immer gefunden. Zusammengenommen legen die hier präsentierten

Daten den Schluß nahe, daß der Kontakt zwischen neuronalen Fortsätzen und/oder ein lokal wirkender diffusibler Faktor in der Nähe der Kontaktzonen essentiell für die funktionale Expression vieler Ionenströme ist. Interessanterweise beobachteten Baines und Bate (1998) das erste Auftreten von  $I_{Na}$  *in situ* zeitgleich mit dem ersten Auftreten von exzitatorischen postsynaptischen Strömen (EPSCs).

Die beschriebenen Effekte könnten auf eine Neusynthese von Ionenkanälen, veränderte Lokalisation der Kanäle oder auf Modulation ihrer Leitfähigkeiten zurückzuführen sein. Prinzipiell können viele Neurotransmitter pleiotrophe Effekte auslösen, die entweder direkt oder indirekt die Funktion oder Expression von Ionenkanälen modulieren. Dabei verläuft die Signaltransduktion in den meisten bislang bekannten Fällen über die Aktivierung von G-Proteinen und/oder über  $Ca^{2+}$ -Einstrom (zusammengefaßt u.a. in Comb et al., 1987; Hille, 1992; Jessell und Kandel, 1993; Bito et al., 1997; Imprey et al., 1999). So ist z.B. für Proteinkinase A (PKA) gezeigt worden, daß sie an der Modulation von  $I_{Na}$  beteiligt ist und auch bei der Lokalisation vieler anderer Ionenkanäle eine Rolle spielt (zusammengefaßt u.a. in Cukierman, 1996; Gray et al., 1998). In den meisten Fällen sind diese Signalwege jedoch eher mit neuronaler Plastizität als mit Entwicklungsprozessen in Verbindung gebracht worden. In *Drosophila* wurde an der sich entwickelnden neuromuskulären Endplatte gezeigt, daß motoneuronale Aktivität für eine verstärkte Expression von Glutamatrezeptoren und für deren korrekte Lokalisation notwendig ist (Broadie und Bate, 1993a,b). In Vertebraten ist z.B. für GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten und für NMDA-Rezeptoren gezeigt worden, daß ihre funktionale Expression vom Membranpotential abhängt, welches in intakten neuronalen Netzen über Neurotransmission reguliert werden könnte (z.B. Vallano et al., 1996; Gault und Siegel, 1997; Mellor et al., 1998). Außer den Neurotransmittern könnten noch andere Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, für die beobachteten Effekte verantwortlich sein (Übersicht z.B. in Lee und Sheng, 2000). So deuten Experimente in Ratten-PC12-Zellen darauf hin, daß die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs über wachstumsfaktorenbindende Rezeptortyrosinkinasen sowohl die Expression und Funktion von  $Na^{+}$ -Kanälen regulieren kann als auch die  $I_{Ca}$ -Dichte (z.B. Fanger et al., 1997; Hilborn et al., 1998).

Um festzustellen, ob die hier beobachteten Neuritenkontakte Synapsen enthielten, wurden die Kontaktzonen auf synapsenspezifische Immunreaktivität untersucht. In Vertebraten sind Synapsine verlässliche Marker für präsynaptische Regionen und man nimmt an, daß sie eine wesentliche Rolle während der Synaptogenese und bei der Freisetzung von Neurotransmittern spielen (Bähler et al., 1990; DeCamilli et al., 1990; Chin et al., 1995; Ferreira et al., 1995; Valtorta et al., 1995). In *Drosophila* ist für Synapsine gezeigt worden, daß sie sowohl an zentralen als auch an neuromuskulären Synapsen lokalisiert sind (Klagges et al., 1996). In den hier untersuchten ML-Neuronen färbten inter- und intraklonale Kontakte positiv mit einem -Synapsin-Antikörper. Positive -Synapsin-Immunreaktivität wurde auch an Projektionsendungen gefunden, von denen einige wachstumskegelähnliche Strukturen

aufwiesen (Abb. 18). Dies steht im Einklang mit der angenommenen frühen Rolle von Synapsinen während der Synapsenbildung, verhinderte aber eine eindeutige Schlußfolgerung über das Vorhandensein von Synapsen in den Neuritenverbindungen. Darüber hinaus ist es nicht möglich, aus dem Vorhandensein struktureller Proteine auf tatsächlich funktionale Synapsen zu schließen. Daher wurde sowohl in ML-Neuronen als auch in unidentifizierten Neuronen in Massenzellkultur nach synaptischer Aktivität gesucht. In mehr als 30 Ableitungen von Zellen, die in kommerziellem Schneiders-Insektzellkulturmedium aufgewachsen waren, wurden dabei weder spontane synaptische Ströme gefunden noch ließen sie sich evozieren (Abb. 19). Es wäre mithin möglich, daß, obwohl ML-Neurone über ACh- und GABA-Rezeptoren verfügten, sie nicht die entsprechenden Transmitter exprimierten, die Rezeptoren an den falschen Stellen lokalisiert waren oder die synaptischen Vesikel nicht freigesetzt werden konnten. Auf der anderen Seite waren die Ruhemembranpotentiale ( $V_{\text{Mem}}$ ) mit Werten zwischen -20 und -40 mV relativ depolarisiert, was die synaptische Übertragung beeinträchtigen könnte. Lee und O'Dowd (1999) berichteten, daß in *Drosophila*-Neuronen, die in einem chemisch definierten Medium gewachsen sind, synaptische Aktivität vorhanden ist. Ein Vergleich dieses Mediums mit dem hier verwendeten Schneiders-Medium ergab insbesondere eine ca. fünffach höhere  $K^+$ -Ionen-Konzentration im Schneiders-Medium. Nach Nernst sollte die höhere  $K^+$ -Konzentration zu einer deutlichen Verschiebung des  $V_{\text{Mem}}$  zu depolarisierten Potentialen führen (Gl. 2 in II.8.3.). Interessanterweise untersuchten Mellor et al. (1998) den Effekt von Zellkulturmedien, die entweder 25 oder 5 mM  $K^+$  enthielten, auf die synaptische Übertragung zwischen Granulazellen des Cerebellums. Sie fanden, daß bei hohem extrazellulären  $K^+$  keine synaptische Transmission stattfand, während sie bei 5 mM  $K^+$  vorhanden war. Daher wurde das Schneiders-Medium in Anlehnung an Lee und O'Dowd (1999) modifiziert. Unidentifizierte Neurone in Massenzellkultur, die in diesem Medium aufgewachsen waren, zeigten schließlich Ereignisse, die hinsichtlich ihrer Größe und Kinetik synaptische Ströme sein könnten (Abb. 19). Die Aufzucht von ML-Vorläufern in dem veränderten Kulturmedium in WZK ist bisher noch nicht gelungen und Zeitrafferaufnahmen lassen vermuten, daß die veränderten Ionenkonzentrationen das Teilungsverhalten der Zellen, zumindest in WZK, beeinträchtigten (K. Lüer, unveröffentlichte Beobachtungen).

Zusammengefaßt lassen diese Befunde vermuten, daß sich an den Neuritenverbindungen zwischen ML-Neuronen Synapsen zwar morphologisch ausbildeten, diese aber wahrscheinlich aufgrund der depolarisierenden Kulturbedingungen nicht funktional waren. Dies impliziert, daß die beschriebenen Effekte auf die verschiedenen Ionenströme unabhängig von synaptischer Transmission waren und möglicherweise z.B. über Rezeptortyrosinkinasen induziert wurden. Allerdings kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß eine frühe Transmitterausschüttung - z.B. während des Auswachsens der Axone und der Synaptogenese - oder eine sehr niederfrequente Transmission stattfanden. Die Synaptogenese zwischen kultivierten Neuronen und die Aufschlüsselung des molekularen Mechanismus, der zu Veränderungen in den Ionenströmen führte, wird zukünftigen Arbeiten vorbehalten bleiben.

### IV.2.3. Validität der *in vitro* Ableitungen

Allgemein haben Kultursysteme den Vorteil, daß die Zellen gut zugänglich sind und man darüber hinaus ihre Umgebung präzise kontrollieren kann. Das hier verwendete *in vitro* System hat zudem den Vorteil, daß es die Kultivierung identifizierter Vorläuferzellen erlaubt. Ferner ist in diesem System eine exakte Kontrolle des Alters und der Anzahl der Zellen sowie ihrer Distanz zueinander möglich, was es erlaubt, zwischen wahrscheinlich zellautonomen und induzierten Prozessen während der Entwicklung zu unterscheiden. In jedem *in vitro* System stellt sich jedoch die Frage, in wie weit dort gemachte Beobachtungen die tatsächlichen Verhältnisse im intakten Gewebe widerspiegeln. Die Klongrößen in den ML-WZK entsprachen im wesentlichen denen *in vivo* (Bossing und Technau, 1994). Die Nachkommen hatten neuronale und gliale Morphologien und exprimierten spezifische molekulare Marker (*slit*, *sim*, HRP). Für einzeln kultivierte neuroektodermale Vorläufer war zuvor bereits gezeigt worden, daß sie sich als NBs oder Epidermoblasten entwickeln können (Lüer und Technau, 1992). Da die Zellmorphologie und  $K^+$ -Strom Expression unabhängig von den Kulturbedingungen war, ist es sehr unwahrscheinlich, daß die beobachteten Effekte hinsichtlich der Expression bestimmter Ionenströme auf eine generell verminderte Vitalität der Zellen in WZK ohne Neuritenkontakte zurückzuführen sind. Baines und Bate (1998) haben darüber hinaus gezeigt, daß  $I_A$  *in vivo* als letzter Strom erscheint. Da sogar die ML-Neurone in WZK ohne Neuritenkontakte  $I_A$  exprimierten, ist es wahrscheinlich, daß die zellintrinsic Entwicklungsprogramme normal abliefen. Daher ist das hier verwendete Kultursystem ein exzellentes Werkzeug zur Identifikation und Manipulation von Faktoren, die für die Entwicklung identifizierter neuraler Zellen notwendig sind.

In der Arbeit von Baines und Bate (1998) wurde nur das sequentielle Auftreten der verschiedenen Ionenströme im Laufe der Entwicklung, nicht jedoch deren Spannungsabhängigkeiten beschrieben. Deshalb erschien es trotz der vielen indirekten Evidenzen für die Validität der *in vitro* Ableitungen wünschenswert, eine *in situ* Präparation zu entwickeln, die einen direkten Vergleich erlauben würde. Darüber hinaus waren in der o.g. Präparation nur dorsal im ZNS gelegene Zellen für elektrophysiologische Ableitungen zugänglich. Hier wurde daher das komplette spätembryonale ZNS aus dem Embryo herauspräpariert (vgl. II.8.2., Abb. 4), was es ermöglichte, sowohl von dorsalen als auch von ventralen Zellen abzuleiten. Vorläufige Messungen von spannungsgesteuerten  $K^+$ -Strömen an unidentifizierten Zellen im Bereich der ventralen und dorsalen ML des vNS zeigten große Übereinstimmungen mit  $K^+$ -Strömen in unidentifizierten Zellen in Massenzellkulturen (z.B. Saito und Wu, 1991; O'Dowd, 1995; Tsunoda und Salkoff, 1995a,b) und damit auch mit den hier in den ML-Neuronen beschriebenen. Dies gilt sowohl für die makroskopische Erscheinung des Stroms als auch für die Spannungsabhängigkeit von mindestens  $I_A$  (Abb. 20). Diese vorläufigen Daten unterstützen die Ansicht, daß die zellintrinsic Entwicklungsprogramme

in den *in vitro* Systemen intakt blieben und unterstreichen den Wert der dort generierten Datensätze. Darüber hinaus machen sie deutlich, daß bei Verwendung entsprechender GFP-Marker quantitative elektrophysiologische Untersuchungen auch für identifizierte zentrale *Drosophila*-Zellen *in situ* möglich sind. Damit wäre man in der Lage, unter Verwendung der idealen Manipulationsmöglichkeiten *in vitro* Arbeitshypothesen aufzustellen und diese dann gezielt *in situ* zu überprüfen.

## V. Perspektiven

Die hier vorgelegte Arbeit bildet den (vorläufigen) Abschluß der Zellstammbaumanalyse im vNS des *Drosophila*-Embryos. Zusammen mit vorangegangenen Arbeiten sind mehr als 90% der spätembryonalen Zellstammbäume des Bauchmarks bekannt, und viele zuvor beschriebene Neurone und fast alle Gliazellen sind einer Vorläuferzelle zugeordnet. Dieser komplette Datensatz bildet eine Grundlage für die Interpretation genetisch oder experimentell veränderter Phänotypen, was die Analyse von Mechanismen erleichtern sollte, die zur Festlegung von Zellschicksalen und zur Differenzierung im ZNS führen. Darüber hinaus könnten die Daten hilfreich sein, das Verhältnis zwischen Herkunft einer Zelle, Genexpression und ihrer Funktion weiter zu beleuchten. Zukünftigen Experimenten wird insbesondere die Klärung der Frage nach der zeitlichen Reihenfolge, in der die Tochterzellen gebildet werden, und den Mechanismen, die zur Spezifizierung eines Vorläufers als Neuroblasten, Neuroglioblasten oder Glioblasten führen, vorbehalten bleiben.

Das hohe Maß an zellulärer Auflösung wurde vorliegend dazu genutzt, Ionenströme in einer definierten Zellpopulation - den ML-Neuronen - *in vitro* zu analysieren und nach Faktoren zu suchen, die deren Elektrogenese beeinflussen. Obwohl die ML-Neurone in vielen Aspekten - z.B. Genexpression und Zellstammbaum - von Neuronen anderer ontogenetischer Herkunft verschieden sind, waren ihre Stromantworten weitestgehend identisch mit denen der anderen Zellen. Interessanterweise wurde die funktionale Expression vieler Ströme durch das Vorhandensein von Neuritenverbindungen signifikant beeinflusst. Demgegenüber schienen K<sup>+</sup>-Ströme weitestgehend zellautonom exprimiert zu werden. Anfängliche Experimente lassen darauf schließen, daß der zugrundeliegende Mechanismus unabhängig von synaptischer Transmission ist. Die detaillierte Aufklärung dieses Mechanismus, die auch eine genauere Analyse der synaptischen Ströme umfassen muß, bleibt nachfolgenden Arbeiten vorbehalten. Mit der hier vorgestellten *in situ* Präparation sollte es ferner möglich sein, die Validität von elektrophysiologischen *in vitro* Daten an identifizierten Zellpopulationen direkt zu prüfen. Wie mit der anfänglichen Analyse der K<sup>+</sup>-Ströme *in situ* gezeigt wurde, bietet sich in dem Modellsystem "*Drosophila*-Embryo" jetzt ferner die Möglichkeit einer detaillierten Aufklärung der Spannungsabhängigkeiten der einzelnen Ionenströme.

## VI. Referenzen

Akiyama-Oda Y, Hosoya T, Hotta Y. 1999. Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in *Drosophila*. *Development* 126:1967-1974.

Albert JL, Lingle CJ. 1993. Activation of nicotinic acetylcholine receptors on cultured *Drosophila* and other insect neurons. *J Physiol* 463:605-630.

Albright TD, Jessel TM, Kandel ER, Posner MI. 2000. Neural Science: A century of progress and the mysteries that remain. *Neuron/Cell* 25/100:1-55.

Armstrong CM, Hille B. 1998. Voltage gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20:371-380.

Bähler M, Benfenati F, Valtorta F, Greengard P. 1990. The Synapsins and the regulation of synaptic function. *Bioessays* 12:259-263.

Baines RA, Bate M. 1998. Electrophysiological development of central neurons in the *Drosophila* embryo. *J Neurosci* 18:4673-4683.

Bang AG, Goulding MD. 1996. Regulation of vertebrate neural cell fate by transcription factors. *Curr Opin Neurobiol* 6:25-32.

Baker K, Salkoff L. 1990. The *Drosophila Shaker* gene codes for a distinctive  $K^+$  current in a subset of neurons. *Neuron* 4:129-40.

Bate M. 1976. Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. *J Embryol Exp Morph* 35:107-123.

Bate M, Grunewald EB. 1981. Embryogenesis of an insect nervous system. II. A second class of neuron precursor cells and the origin of the intersegmental connectives. *J Embryol Exp Morph* 61:317-330.

Bate CM. 1993. The mesoderm and its derivatives. In: M Bate, A Martinez. The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 1013-1091.

Bauer V. 1904. Zur inneren Metamorphose des Zentralnervensystems der Insekten. *Zool Jhb Anat Ontog Tiere* 20:123-150.

## Referenzen

---

- Beer J, Technau GM, CamposOrtega JA. 1987. Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. IV. Commitment and proliferative capabilities of mesodermal cells. Roux's Arch Dev Biol 196:222-230.
- Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. 1997. Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation in neuronal gene expression. Curr Opin Neurobiol 7:419-29.
- Bossing T, Technau GM. 1994. The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling. Development 120:1895-1906.
- Bossing T, Udolph G, Doe CQ, Technau GM. 1996. The embryonic CNS lineages of *Drosophila melanogaster*. I. The lineages derived from the ventral half of the truncal neuroectoderm. Dev Biol 179:41-64.
- Bossing T. Dissertation 1996. Analyse der embryonalen Zellstammbäume im ventralen ZNS von *Drosophila melanogaster*. Universität Mainz.
- Broadie K, Bate M. 1993a. Activity-dependent development of the neuromuscular synapse during *Drosophila* embryogenesis. Neuron 11:607-619.
- Broadie K, Bate M. 1993b. Innervation directs receptor synthesis and localization in *Drosophila* embryo synaptogenesis. Nature 361:350-353.
- Broadie KS, Bate M. 1993c. Development of larval muscle properties in the embryonic myotubes of *Drosophila melanogaster*. J Neurosci 13:167-80.
- Broadus J, Skeath JB, Spana EP, Bossing T, Technau GM, Doe CQ. 1995. New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. Mech Dev 53:393-402.
- Budnik V, Gramates LS. 1999. Neuromuscular junctions in *Drosophila*. New York: Academic Press.
- Buenzow DE, Holmgarten R. 1995. Expression of the *Drosophila* *gooseberry* locus defines a subset of neuroblast lineages in the central nervous system. Dev Biol 170:338-349.
- Burrows M. 1996. The neurobiology of an insect brain. Oxford: Oxford UP.
- Byerly L, Leung HT. 1988. Ionic currents of *Drosophila* neurons in embryonic cultures. J Neurosci 8:4379-4393.

- Cameron JS, Lhuillier L, Subramony P, Dryer SE. 1998. Developmental regulation of neuronal K<sup>+</sup> Channels by target-derived TGF *in vivo* and *in vitro*. *Neuron* 21:1045-1053.
- Campos-Ortega JA. 1995. Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Neurobiol* 10:75-89.
- Campos-Ortega JA, Hartenstein V. 1997. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin, Heidelberg, New York.
- Chase BA, Kankel DR. 1988. On the role of normal acetylcholine metabolism in the formation and maintenance of the *Drosophila* nervous system. *Dev Biol* 125:361-380.
- Chin L-S, Li L, Ferreira A, Kosik KS, Greengard P. 1995. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of Synapsin I-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 92:9230-9239.
- Christensen BN, Larmer Y, Shimahara T, Beadle D, Pichon Y. 1988. Ionic currents in neurones cultured from embryonic cockroach (*Periplaneta americana*) brains. *J Exp Biol* 135:193-214.
- Comb M, Hyman SE, Goodman HM. 1987. Mechanisms of transsynaptic regulation of gene expression. *Trends Neurosci* 10:473-478.
- Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. 1991. *Shaker*, *Shal*, *Shab*, and *Shaw* express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron* 7:763-73.
- Cukierman S. 1996. Regulation of voltage-dependent sodium channels. *J Membr Biol* 151:203-14.
- DeCamilli P, Benefenati F, Valtorta F, Greengard P. 1990. The Synapsins. *Annu Rev Cell Biol* 6:433-460.
- Delgado R, Davis R, Bono MR, Latorre R, Labarca P. 1998. Outward currents in *Drosophila* larval neurons: *dunce* lacks a maintained outward current component downregulated by cAMP. *J Neurosci* 18:1399-1407.
- Dittrich R, Bossing T, Gould AP, Technau GM, Urban J. 1997. The differentiation of the serotonergic neurons in the *Drosophila* ventral nerve cord depends on the combined function of the zinc finger proteins Eagle and Hucklebein. *Development* 124:2515-2525.
- Doe CQ. 1992. Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116:855-863.

## Referenzen

---

- Doe CQ, ChuLagraff Q, Wright DM, Scott MP. 1991. The *prospero* gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* 65:451-464.
- Doe CQ, Goodman CS. 1985. Early events in insect neurogenesis I. Development and segmental differences in the pattern of neuro- nal precursor cells. *Dev Biol* 111:193-205.
- Fanger GR, Vaillancourt RR, Heasley LE, Montmayeur JR, Johnson GL, Maue RA. 1997. Analysis of mutant platelet-derived growth factor receptors expressed in PC12 cells identifies signals governing sodium induction during neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 17:89-99.
- Ferreira A, Han H-Q, Greengard P, Kosik KS. 1995. Suppression of Synapsin II inhibits the formation and maintenance of synapses in hippocampus culture. *Proc Nat Acad Sci USA* 92:9225-9229.
- Foe VE. 1989. Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. *Development* 107:1-22.
- Fuerstenberg S, Broadus J, Doe CQ. 1998. Asymmetry and cell fate in the *Drosophila* embryonic CNS. *Int J Dev Biol* 42:379-83.
- Gault LM, Siegel RE. 1997. Expression of the GABA<sub>A</sub> receptor delta subunit is selectively modulated by depolarization in cultured rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 17:2391-9.
- Germeraad S, O'Dowd D, Aldrich RW. 1992. Functional assay of a putative *Drosophila* sodium channel gene in homozygous deficiency neurons. *J Neurogenet* 8:1-16.
- Gielow ML, Gu GG, Singh S. 1995. Resolution and pharmacological analysis of the voltage-dependent calcium channels of *Drosophila* larval muscles. *J Neurosci* 15:6085-6093.
- Gilbert SF. 1994. *Developmental biology*. Sin Assoc Inc.
- Goodman CS, Bastiani MJ, Doe CQ, DuLac S, Helfand SL, Kuwada JY, Thomas JB. 1984. Cell recognition during neuronal development. *Science* 225:1271-1279.
- Goodman CS, Doe CQ. 1993. Embryonic development of the *Drosophila* nervous system. In: M Bate, A Martinez-Arias. *The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 1131-1206.
- Goodman CS, Shatz CJ. 1993. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 10:77-98.

- Goodman CS, Spitzer CN. 1979. Embryonic development of identified neurons: differentiation from neuroblast to neuron. *Nature* 280:208-214.
- Gorczyca MG, Phillis RW, Budnik V. 1994. The role of *tinman*, a mesodermal cell fate gene, in axon pathfinding during the development of the transverse nerve in *Drosophila*. *Development* 120:2143-2152.
- Gray PC, Scott JD, Catterall WA. 1998. Regulation of ion channels by cAMP-dependent protein kinase and A-kinase anchoring proteins. *Curr Opin Neurobiol* 8:330-4.
- Halliwel JV, Plant TD, Standen NB. 1994. Voltage clamp techniques. In: D Ogden. *Microelectrode techniques*. Cambridge, UK: The company of biologists limited, p 17-36.
- Halter DA, Urban J, Rickert C, Ner SS, Ito K, Travers A, Technau GM. 1995. The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* 121:317-332.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Europ J Physiol (Pflügers Archiv)* 391:85-100.
- Hardie RC. 1989. A histamine-activated chloride channel involved in neurotransmission at a photoreceptor synapse. *Nature* 339:704-6.
- Hardie RC. 1991. Voltage-sensitive potassium channels in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci* 11:3079-95.
- Harrison RG. 1935. On the origin and development of the nervous system studied by the methods of experimental embryology. *Proc R Soc Lond (Biol)* 118:155-196.
- Hartenstein V, Campos-Ortega JA. 1984. Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* 193:308-325.
- Hartenstein V, Rudloff E, CamposOrtega JA. 1987. The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* 196:473-485.
- Hevers W, Hardie RC. 1995. Serotonin modulates the voltage dependence of delayed rectifier and *Shaker* potassium channels in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 14:845-56.

## Referenzen

---

Higashijima S, Shishido E, Matsuzaki M, Saigo K. 1996. *eagle*, a member of the steroid receptor gene superfamily, is expressed in a subset of neuroblasts and regulates the fate of their putative progeny in the *Drosophila* CNS. *Development* 122:527-536.

Hilborn MD, Vaillancourt RR, Rane SG. 1998. Growth factor receptor tyrosine kinases acutely regulate neuronal sodium channels through the Src signaling pathway. *J Neurosci* 18:590-600.

Hille B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland: Sinauer Associated Inc.

Hodgkin AL, B K. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* 108:37-77.

Hodgkin AL, Huxley AF. 1952a. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:449-472.

Hodgkin AL, Huxley AF. 1952b. The components of the membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:473-496.

Hodgkin AL, Huxley AF. 1952c. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:497-506.

Hodgkin AL, Huxley AF. 1952d. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:424-448.

Hosie AM, Aronstein K, Sattelle DB, French-Constant RH. 1997. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci* 20:578-583.

Igarashi M, Tagaya M, Komiya Y. 1997. The soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attached protein receptor complex in growth cones: Molecular aspects of the axon terminal development. *J Neurosci* 17:1460-1470.

Imprey S, Obrietan K, Storm D. 1999. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23:11-14.

Ito K, Urban J, Technau GM. 1995. Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux's Arch Dev Biol* 204:284-307.

- Jacobs RJ, Hiromi Y, Patel NH, Goodman CS. 1989. Lineage, migration, and morphogenesis of longitudinal glia in the *Drosophila* CNS as revealed by a molecular lineage marker. *Neuron* 2:1625-1631.
- Jan LY, Jan YN. 1982. Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc Nat Acad Sci USA* 79:2700-2704.
- Jessell TM, Kandel ER. 1993. Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 72 Suppl:1-30.
- Jones BW, Fetter RD, Tear G, Goodman CS. 1995. *Glial cells missing*: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* 82:1013-1023.
- Karpen GH, Spradling AC. 1992. Analysis of subtelomeric heterochromatin in the *Drosophila* minichromosome DP 1187 by single P-element insertional mutagenesis. *Genetics* 132:737-753.
- Katz LC, Shatz CJ. 1996. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-1138.
- Klagges RE, Heimbeck FA, Godenschwege AH, Hofbauer A, Pflugfelder GO, Reifegerste R, Reisch D, Schaupp M, Buchner S, Buchner E. 1996. Invertebrate Synapsins: A single gene codes for several isoforms in *Drosophila*. *J Neurosci* 16:3154-3165.
- Klämbt C, Goodman CS. 1991. The diversity and pattern of glia during axon pathway formation in the *Drosophila* embryo. *Glia* 4:205-213.
- Klämbt C, Jacobs JR, Goodman CS. 1991. The midline of the *Drosophila* central nervous system: A model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* 64:801-815.
- Lapied B, Molecot O, Pelhate M. 1989. Ion species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurons isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol* 144:535-549.
- Laurent G, Seymour-Laurent KJ, Johnson K. 1993. Dendritic excitability and a voltage-gated calcium current in locust nonspiking local interneurons. *J Neurophysiol* 69:1484-98.
- Lee D, O'Dowd DK. 1999. Fast excitatory synaptic transmission mediated by nicotinic acetylcholine receptors in *Drosophila* neurons. *J Neurosci* 19:5311-5321.
- Lee SH, Sheng M. 2000. Development of neuron-neuron synapses. *Curr Opin Neurobiol* 10:125-131.

## Referenzen

---

Leung H-T, Branton WD, Phillips HS, Jan L, Byerly L. 1989. Spider toxins selectively block calcium currents in *Drosophila*. *J Neurosci* 3:767-772.

Leung HT, Byerly L. 1991. Characterization of single calcium channels in *Drosophila* embryonic nerve and muscle cells. *J Neurosci* 11:3047-3059.

Lichtinghagen, Stocker M, Wittka R, Boheim G, Stühmer W, Ferrus A, Pongs O. 1990. Molecular basis of altered excitability in *Shaker* mutants of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 9:4399-4407.

Lindsley DC, Zimm GG. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press Inc.

Littleton JT, Ganetzky B. 2000. Ion channels and synaptic organization: Analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 26:35-43.

Lüer K, Technau GM. 1992. Primary culture of single ectodermal precursors of *Drosophila* reveals a dorsoventral prepattern of intrinsic neurogenic and epidermogenic capabilities at early gastrula stage. *Development* 116:377-385.

Lüer K, Urban J, Klämbt C, Technau GM. 1997. Induction of identified mesodermal cells by CNS midline progenitors in *Drosophila*. *Development* 124:2630-2681.

Mellor JR, Merlo D, Jones A, Wisden W, Randall AD. 1998. Mouse cerebellar granule cell differentiation: Electrical activity regulates the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 6$  subunit gene. *J Neurosci* 18:2822-2833.

Nambu JR, Franks RG, Hu S, Crews ST. 1990. The *single minded* gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* 63:63-75.

Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA, Crews ST. 1991. The *Drosophila single minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67:1157-1167.

Nambu JR, Lewis JO, Crews ST. 1993. The development and function of the *Drosophila* CNS midline cells. *Comp Biochem Physiol* 104A:399-409.

Neher E. 1992. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207:123-131.

Neher E. 1995. Voltage offsets in patch-clamp experiments. In: B Sakmann, E Neher. Single channel recording. New York and London: Plenum Press, p 147-154.

- Numberger M, Draguhn A. 1996. Patch-clamp-Technik. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum.
- Ogden D, Stanfield P. 1994. Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording. In: D Ogden. Microelectrode techniques. Cambridge, UK: The company of biologists limited, p 53-78.
- O'Dowd DK. 1995. Voltage-gated currents and firing properties of embryonic *Drosophila* neurons grown in a chemically defined medium. *J Neurobiol* 27:113-126.
- O'Dowd DK, Ribera AB, Spitzer NC. 1988. Development of voltage-dependent calcium, sodium and potassium currents in *Xenopus* spinal neurons. *J neurosci* 8:792-805.
- Osen-Sand A, Catsicas M, Staple JK, Jones KA, Ayala G, Knowles J, Grenningloh G, Motecuccio C, Catsicas S. 1993. Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Nature* 364:445-448.
- Patel NH, Schafer B, Goodman CS, Holmgren R. 1989. The role of segment polarity genes during *Drosophila* neurogenesis. *Gene Develop* 3:890-904.
- Penner R. 1995. A practical guide to patch clamping. In: B Sakmann, E Neher. Single-channel recording. New York and London: Plenum Press, p 3-31.
- Piccolino M. 1997. Luigi Galvani and animal electricity: two centuries after the foundation of electrophysiology. *Trends Neurosci* 20:443-448.
- Pongs O, Kecskemethy N, Müller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S, Ferrus, A. 1988. *Shaker* encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J* 7:1087-1096.
- Poulson DF. 1950. Histogenesis, organogenesis, and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster*. In: M Demerec. *Biology of Drosophila*. Wiley, New York, p 168-274.
- Prokop A, Technau GM. 1991. The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. *Development* 111:79-88.
- Prokop A, Technau GM. 1993. Cell transplantation. In: DA Hartley. Cellular interactions in development. Oxford, New York, Tokio: IRL Press, p 33-58.
- Prokop A, Technau GM. 1994. Early tagma-specific commitment of *Drosophila* CNS progenitor NB1-1. *Development* 120:2567-2578.

## Referenzen

---

- Prokop A, Bray S, Harrison E, Technau GM. 1998. Homeotic regulation of segment specific differentiation in neuroblast numbers and proliferation in the *Drosophila* CNS. *Mechan Dev* 74:99-110.
- Ramón y Cajal S. 1937. Recollection of my life. In: *Memoirs of the American Philosophical Society*. Philadelphia: Reprinted by MIT Press Cambridge, MA, 1960.
- Ribera AB, Spitzer NC. 1990. Differentiation of  $I_{KA}$  in amphibian spinal neurons. *J Neurosci* 10: 1886-1991.
- Rogero O, Hammerle B, Tejedor FJ. 1997. Diverse expression and distribution of *Shaker* potassium channels during the development of the *Drosophila* nervous system. *J Neurosci* 17:5108-18.
- Rogero O, Tejedor FJ. 1995. Immunochemical characterization and developmental expression of *Shaker* potassium channels from the nervous system of *Drosophila*. *J Biol Chem* 270:25746-51.
- Rothberg MJ, Hartley DA, Walther Z, Artavanis-Tsakonas S. 1988. Slit: An EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* 56:1047-1059.
- Saito M, Wu CF. 1991. Expression of ion channels and mutational effects in giant *Drosophila* neurons differentiated from cell division-arrested embryonic neuroblasts. *J Neurosci* 11:2135-2150.
- Salkoff L. 1983. *Drosophila* mutants reveal two components of fast outward current. *Nature* 302:249-51.
- Salkoff L, Baker K, Butler A, Covarrubias M, Pak MD, Wei A. 1992. An essential set of  $K^+$  channels conserved in flies, mice and humans. *Trends Neurosci* 15:161-166.
- Salkoff L, Wyman R. 1981. Outward currents in developing *Drosophila* flight muscle. *Science* 212:461-3.
- Schäfer S, Rosenboom H, Menzel R. 1994. Ionic currents of kenyon cells from the mushroom body of the honeybee. *J Neurosci* 14:4600-4612.
- Schmidt H, Rickert C, Bossing T, Vef O, Urban J, Technau GM. 1997. The Embryonic Central Nervous System Lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast Lineages Derived from the Dorsal Part of the Neuroectoderm. *Dev Biol* 189:186-204.
- Schmidt H, Lüer K, Hevers W, Technau GM. 2000. Ionic currents of *Drosophila* embryonic neurons derived from selectively cultured CNS midline precursors. *J Neurobiol* in press.
- Sherrington CS. 1961. *The integrativ action of the nervous system*. New Haven: Yale University Press.

- Skingsley DR, Loughlin SB, Hardie RC. 1995. Properties of histamine activated chloride channels in the large monopolar cells of the dipteran compound eye: A comparative study. *Journal of Comparative Physiology* 17:611-623.
- Smith LA, Wang X, Peixoto AA, Neumann EK, Hall LM, Hall JC. 1996. A *Drosophila* calcium channel 1 subunit gene maps to a genetic locus associated with behavioral and visual defects. *J Neurosci* 16:7868-7879.
- Solc CK, Aldrich RW. 1988. Voltage-gated potassium channels in larval CNS neurons of *Drosophila*. *J Neurosci* 8:2556-2570.
- Solc CK, Zagotta WN, Aldrich RW. 1987. Single-channel and genetic analyses reveal two distinct A-type potassium channels in *Drosophila*. *Science* 236:1094-8.
- Sonnenfeld MJ, Jacobs JR. 1994. Mesectodermal cell fate analysis in *Drosophila* midline mutants. *Mech of Dev* 46:3-13.
- Sontheimer H. 1995. Whole-cell patch-clamp recordings. In: AA Boulton, GB Baker, W Walz. Patch-clamp applications and protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press, p 37-74.
- Spana EP, Doe CQ. 1995. The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* 121:3187-3195.
- Sperry RW. 1959. The growth of nerve circuits. *Sci Amer* 201:68-75.
- Sperry RW. 1963. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Nat Acad Sci USA* 50:703-710.
- Spitzer NC. 1994. Development of voltage-dependent and ligand-gated channels in excitable membranes. In: J van Pelt, MA Corner, HBM Uylings, FH Lopes da Silva. Progress in brain research. Amsterdam: Elsevier, p 169-179.
- Standen NB, Davies NW, Langton PD. 1994. Separation and analysis of macroscopic currents. In: D Ogden. Microelectrode techniques. Cambridge, UK: The company of biologists limited, p 37-52.
- Stone LS. 1944. Functional polarization in the retinal development and its reestablishment in regenerating retinæ of rotated grafted eyes. *Proc Soc Exp Biol Med* 57:13-14.

## Referenzen

---

Technau GM, CamposOrtega JA. 1985. Fate-mapping in wild-type *Drosophila melanogaster*. II. Injections of horseradish peroxidase in cells of the early gastrula stage. Roux's Arch Dev Biol 194:196-212.

Tempel BL, Papazian DM, Schwarz TL, Jan YN, Jan LY. 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*. Science 237:770-775.

Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996. The molecular biology of axon guidance. Science 274:1123-33.

Thomas JB, Bastiani MJ, Bate M, Goodman CS. 1984. From grasshopper to *Drosophila*: a common plan for neuronal development. Nature 310:203-207.

Thompson S. 1982. Aminopyridine block of transient potassium current. J Gen Physiol 80:1-18.

Truman JW, Bate M. 1988. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. Dev Biol 125:145-157.

Tsunoda S, Salkoff L. 1995a. Genetic analysis of *Drosophila* neurons: *Shal*, *Shaw*, and *Shab* encode most embryonic potassium currents. J Neurosci 15:1741-1754.

Tsunoda S, Salkoff L. 1995b. The major delayed rectifier in both *Drosophila* neurons and muscle is encoded by *Shab*. J Neurosci 15:5209-5221.

Udolph G, Lüer K, Bossing T, Technau GM. 1995. Commitment of CNS progenitors along the dorsoventral axis of *Drosophila* neuroectoderm. Science 269:1278-1281.

Udolph G, Prokop A, Bossing T, Technau GM. 1993. A common precursor for glia and neurons in the embryonic CNS of *Drosophila* gives rise to segment-specific lineage variants. Development 118:765-775.

Vallano ML, Lambolez B, Audinat E, Rossier J. 1996. Neuronal activity differentially regulates NMDA receptor subunit expression in cerebellar granule cells. J Neurosci 16:631-9.

Valtorta F, Iezzi N, Benfenati F, Lu B, Poo M, Greengard P. 1995. Accelerated structural maturation induced by Synapsin I at developing neuromuscular synapses of *Xenopus laevis*. Europ J Neurosci 7:261-270.

Vaux DL, Haecker G, Strasser A. 1994. An evolutionary perspective on apoptosis. Cell 76:777-779.

Verhage M, Maia A, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Südhof TC. 2000. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. Science 287:864-869.

- Wei A, Covarrubias M, Butler A, Baker K, Pak M, Salkoff L. 1990. K<sup>+</sup> current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science* 248:599-603.
- Wheeler WM. 1891. Neuroblasts in the arthropod embryo. *J Morphol* 4:337-343.
- Wheeler WM. 1893. A contribution to insect embryology. *J Morphol* 8:1-160.
- White K, Grether ME, Abrams JM. 1994. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264:677-683.
- Wu CF, Haugland FN. 1985. Voltage clamp analysis of membrane currents in larval muscle fibers of *Drosophila*: Alteration of potassium currents in *Shaker* mutants. *J Neurosci* 5:2626-2640.
- Wu MN, Bellen HJ, Genetic dissection of synaptic transmission in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 7:624-630.
- Yao W-D, Rusch J, Poo M, Wu C-F. 2000. Spontaneous acetylcholine secretion from developing growth cones of *Drosophila* central neurons in culture: Effects of cAMP-pathway mutations. *J Neurosci* 20:2626-2637.
- Zagotta WN, Brainard MS, Aldrich RW. 1988. Single-channel analysis of four distinct classes of potassium channels in *Drosophila* muscle. *J Neurosci* 8:4765-79.
- Zhang H-G, ffrench-Constant RH, Jackson MB. 1994. A unique amino acid of the *Drosophila* GABA receptor with influence on drug sensitivity by two mechanisms. *J Physiol* 479.1:65-75.
- Zhang Y, Ungar A, Fresquez C, Holmgren R. 1994. Ectopic expression of either the *Drosophila* *gooseberry-distal* or *proximal* gene causes alterations of cell fate in the epidermis and central nervous system. *Development* 120:1151-1161.
- Zheng W, Feng G, Ren D, Ervel D, Hannan F, Dubald M, Hall LM. 1995. Cloning and characterization of a calcium channel  $\alpha 1$  subunit from *Drosophila melanogaster* with similarity to rat brain type D isoform. *J Neurosci* 15:1132-1143.

## VII. Anhang

### Häufig verwendete Abkürzungen

A	Abdomen
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ca.	circa
d.h.	daß heißt
GABA	-Aminobuttersäure
h	Stunde
$I_A$	spannungsabhängiger A-Typ Kaliumstrom
$I_{ACh}$	ACh-gesteuerter Strom
$I_{Ca(Ba)}$	spannungsabhängiger Kalzium(Barium)-Strom
$I_{GABA}$	GABA-gesteuerter Strom
$I_K$	spannungsabhängiger gleichrichterähnlicher Kaliumstrom
min	Minuten
NB	Neuroblast
s	Sekunde
S	Segregationswelle
Std.	Stadium
u.a.	unter anderem
T	Thorax
Tab.	Tabelle
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil

**Abbildungsverzeichnis**

		<u>Seite</u>
Abb. 1	Anlagenkarte und DiI-Markierung	8
Abb. 2	Patch-clamp Apparatur	16
Abb. 3	Zellkulturen für die Elektrophysiologie	26
Abb. 4	<i>In situ</i> Präparation für die Elektrophysiologie	32
Abb. 5	Neuroblastenkarte	48
Abb. 6	Zellstammbäume von S1 Neuroblasten	51
Abb. 7	Zellstammbäume von S3 Neuroblasten	52
Abb. 8	Zellstammbäume von S4 und S5 Neuroblasten	52
Abb. 9	Der Auswärtsstrom wurde von K <sup>+</sup> getragen	54
Abb. 10	Ähnliche Heterogenität von K <sup>+</sup> -Auswärtsströmen unter verschiedenen Kulturbedingungen	56
Abb. 11	ML-Neurone exprimieren inaktivierende und gleichrichterähnliche K <sup>+</sup> -Ströme	58
Abb. 12	Spannungsabhängigkeit und Stromdichten von K <sup>+</sup> -Strömen unter den verschiedenen Zellkulturbedingungen	59
Abb. 13	K <sup>+</sup> -Kanal Mutanten	60
Abb. 14	Expression von Na <sup>+</sup> -Strömen korrelierte mit dem Vorhandensein von Neuritenkontakten	62
Abb. 15	Neuritenkontakte veränderten die Eigenschaften von Ca <sup>2+</sup> -Strömen	64
Abb. 16	Effekt von Amilorid auf I <sub>Ca(Ba)</sub>	65
Abb. 17	Neuritenkontakte beeinflussten ACh und GABA gesteuerte Ströme	66
Abb. 18	Neuritenkontaktzonen und -endungen färbten positiv für Synapsin	68
Abb. 19	Synaptische Aktivität in verschiedenen Zellkulturmedien	68
Abb. 20	<i>In situ</i> Ableitungen	70

## Tabellenverzeichnis

		<u>Seite</u>
Tab. 1	Extrazelluläre Lösungen	13
Tab. 2	Intrazelluläre Lösungen	14
Tab. 3	Einstellungen am Ziehgerät Sutter P 30	22
Tab. 4	Zuordnung zu den Segregationswellen	24
Tab. 5	Nomenklatur von Neuronen	45
Tab. 6	Nomenklatur von Gliazellen	46
Tab. 7	Zuordnung der Zellstammbäume zu individuellen NBs	46
Tab. 8	<i>In vivo</i> beobachtete Segregationszeiten individueller NBs	50
Tab. 9	Zusammensetzung der Zellstammbäume	50
Tab. 10	Spannungsabhängigkeit des K <sup>+</sup> -Stroms in Wildtyp ML-Neuronen	58a

## **Ich danke**

### **Versicherung gem. § 3 Absatz 3d der Promotionsordnung**

- a) Ich habe die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Geräte, Materialien) in der Arbeit angegeben.
  
- b) Die vorliegende Arbeit wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.
  
- c) Ich habe weder die jetzt als Dissertation vorliegende Arbeit noch Teile einer Abhandlung davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, den

---

(Hartmut Schmidt)

