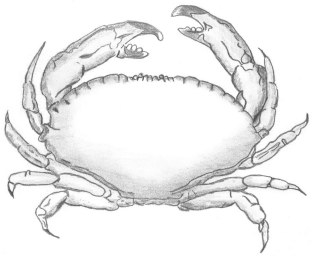
Institut für Neurobiologie

der Universität Ulm

Charakterisierung einer vom Gehirn absteigenden Bahn: Aktivierung und Zusammenspiel von höheren neuronalen Zentren, Projektionsneuronen und zentralen Mustergeneratoren im stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

der Fakultät für Naturwissenschaften

der Universität Ulm

Vorgelegt von

Ulrike B.S. Hedrich

aus Schwäbisch Gmünd

Ulm 2008

Dekan: Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

Erstgutachter: PD Dr. Wolfgang Stein

Zweitgutachter: Prof. Dr. Harald Wolf

Abgabe der Doktorarbeit: 31.03.2008

Tag der Promotion: 27. 05. 2008

Das Schönste, was wir entdecken können, ist das Geheimnisvolle.

Albert Einstein

Inhalt

Verzeichnis der Abkürzungen V

1 Zusammenfassung 1

2 Einleitung 3

2.1 Allgemeine Einführung 3

2.2 Morphologie des Taschenkrebses *Cancer pagurus* 5

2.3 Das Nervensystem des Taschenkrebses 8

2.3.1. Das stomatogastrische Nervensystem 9

2.3.2. Die Mustergeneratoren im stomatogastrischen Nervensystem 11

2.3.3. Neurotransmitter und Neuromodulatoren im STG 15

2.3.4. Modulation des pylorischen und gastrischen Mustergenerators durch Projektionsneurone in den Kommissuralganglien 17

2.4 Die inferioren Ventrikularneurone (IV Neurone) 20

2.5 Fragestellungen und Ziele 27

3 Material und Methoden 31

3.1 Verwendete Lösungen 31

3.1.1. Ringerlösung 31

3.1.2. Ringerlösung mit hoher Konzentration an divalenten Kationen (HiDi) 32

3.1.3. Ringerlösung mit niedriger Konzentration an Kalzium-Kationen 32

3.1.4. Verwendung des Histamin-Blockers Cimetidin und des Neuropeptids FLRFamid 33

3.2 Färbeprotokolle 34

3.2.1. Retrograde Färbung mit Nickelchlorid ($NiCl_2$) und Kobaltchlorid ($CoCl_2$) 34

3.2.2. Retrograde Färbung mit Lucifer Yellow CH Dilithium Salz (LY) 35

3.3 Präparationen 37

3.3.1. *in vivo* Präparation 37

3.3.2. *in vitro* Präparation 40

3.4 Versuchsaufbau 43

3.5 Applikation 44

3.5.1. Applikation von HiDi- und Low Ca^{2+}-Ringer 44

3.5.2. Applikation von Cimetidin und des Neuropeptids FLRFamid 44

3.6 Elektrophysiologie 45
3.6.1. Extrazelluläre Ableitungen 45
3.6.2. Intrazelluläre Ableitungen 47
3.7 Stimulationen 48
3.7.1. Extrazelluläre Stimulation des *ivn*s *in vitro* und *in vivo* 48
3.7.2. Sensorische Stimulation *in vivo* 49
3.8 Auswertung und statistische Verfahren 50
3.9 Bildmaterial 53
4 Ergebnisse 55
4.1 Morphologische Eigenschaften der *ivn* Axone 55
4.1.1. Lokalisation der IV Somata 55
4.1.2. Projektionen der IV Neurone 57
4.1.3. Projektionen der anderen *ivn* Fasern 58
4.2 Aktivierung der IV Neurone im intakten Tier 61
4.2.1. Fütterungsversuche 62
4.2.2. Visuelle Stimulation 65
4.2.3. Taktile Stimulation 68
4.2.4. Chemosensorische Stimulation 71
4.3 *in vitro* Oszillationen der IV Neurone 74
4.4 Effekte der IV Neurone auf den pylorischen Rhythmus 79
4.5 Effekte der IV Neurone auf den gastrischen Mühlenrhythmus 84
4.5.1. *ivn* Stimulation löst einen gastrischen Mühlenrhythmus aus 84
4.5.2. *ivn* Stimulation entrained einen spontanaktiven gastrischen Mühlenrhythmus 88
4.5.3. Die Effekte der IV Neurone auf den gastrischen Rhythmus sind indirekt 90
4.6 Einflüsse der IV Neurone auf den oesophagealen Rhythmus 92
4.7 Effekte der IV Neurone auf die Projektionsneurone 97
4.7.1. Effekte der IV Neurone auf das Projektionsneuron MCN1 98
4.7.2. Effekte der IV Neurone auf das Projektionsneuron MCN5 102
4.7.3. Effekte der IV Neurone auf das Projektionsneuron MCN7 107
4.7.4. Effekte der IV Neurone auf das Projektionsneuron CPN2 109
4.8 Beitrag der Projektionsneurone zu dem durch *ivn* Stimulation ausgelösten gastrischen Mühlenrhythmus 113
4.9 Mögliche Neuromodulatoren der IV Neurone 117
4.9.1. Einfluss von Histamin auf die Mustergeneratoren im STG 118

4.9.2. FLRFamid Applikation auf die Kommissuralganglien löst einen gastrischen Mühlenrhythmus aus 127
5 Diskussion 133
5.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse 133
5.2 Morphologische Eigenschaften der Axone im *ivn* 136
5.3 Die IV Neurone übertragen exterozeptive Information 138
5.4 *in vitro* Identifikation der IV Neurone 141
5.5 Die IV Neurone beeinflussen die zentralen Mustergeneratoren im stomatogastrischen Nervensystem 143
5.6 Die IV Neurone beeinflussen die Projektionsneurone in den CoGs 149
5.6.1. Einfluss der IV Neurone auf MCN1 150
5.6.2. Einfluss der IV Neurone auf MCN5 150
5.6.3. Einfluss der IV Neurone auf MCN7 150
5.6.4. Einfluss der IV Neurone auf CPN2 151
5.6.5. Verarbeitung der IV Information auf Ebene der Kommissuralganglien? 151
5.7 Die IV Neurone beeinflussen die zentralen Mustergeneratoren im STG über Projektionsneurone und Kotransmitter 152
5.7.1. Einfluss der IV Neurone auf den pylorischen Mustergenerator über Projektionsneurone und den Kotransmitter Histamin 153
5.7.2. Die IV Neurone beeinflussen den gastrischen Mustergenerator über Projektionsneurone und nicht über den Kotransmitter Histamin 156
5.7.3. FLRFamid aktiviert die Projektionsneurone MCN1 und CPN2 und löst einen gastrischen Mühlenrhythmus aus 158
5.8 Chemosensorische Verarbeitung bei Invertebraten 159
5.9 Verarbeitung von exterozeptiven und propriozeptiven Informationen im stomatogastrischen Nervensystem 161
5.10 Vergleich der IV Neurone mit höheren neuronalen Zentren in verschiedenen Invertebraten- und Vertebratenarten 166
5.11 Ausblick 170
6 Literaturverzeichnis 173
7 Abstract 187
8 Anhang 189

Verzeichnis der Abkürzungen

Ganglien

Abkürzung	Erklärung
CoG	Kommissuralganglion
OG	Oesophagealganglion
STG	stomatogastrisches Ganglion

Nerven

Abkürzung	Erklärung
A_1Nv	Antennalnerv I
aln	anteriorer Lateralnerv
coc	circumoesophageale Kommissur
dgn	dorsaler gastrischer Nerv
dpon	dorsaler posteriorer Oesophagealnerv
dvn	dorsaler Ventrikularnerv
ion	inferiorer Oesophagealnerv
ivn	inferiorer Ventrikularnerv
lgn	lateraler gastrischer Nerv
lvn	lateraler Ventrikularnerv
mvn	medialer Ventrikularnerv
pdn	pylorischer Dilatornerv
son	superiorer Oesophagealnerv
stn	stomatogastrischer Nerv

Neurone

Abkürzung	Erklärung
AB	anteriorer Burster
AGR	anteriorer gastrischer Rezeptor
CPN2	kommissurales Projektionsneuron 2
DG	dorsales gastrisches Motoneuron
DSI	dorsale Schwimm-Interneurone
GPR2	gastropylorisches Rezeptorneuron 2
IC	inferiores kardiales Motoneuron
IV	inferiores Ventrikularneuron
LG	laterales gastrisches Motoneuron
LP	laterales pylorisches Motoneuron
MCN1	modulatorisches Kommissuralneuron 1
MCN5	modulatorisches Kommissuralneuron 5
MCN7	modulatorisches Kommissuralneuron 7
MG	medianes gastrisches Motoneuron
OC	oesophageales Konstriktorneuron
OMN	oesophageales Motoneuron
PD	pylorisches Dilatormotoneuron
PY	pylorisches Konstriktormotoneuron
VCN	ventrales kardiales Neuron
VD	ventrales Dilatorneuron

Gehirnregionen

Abkürzung	Erklärung
AMPN	anteriores medianes protocerebrales Neuropil
AnN	Neuropil der zweiten Antenne
DLR	diencephale lokomotorische Region
LAN	laterales Neuropil der ersten Antenne
MAN	mediales Neuropil der ersten Antennen
MLR	mesencephale lokomotorische Region

ON	olfaktorisches Neuropil
PMPN	posteriores medianes protocerebrales Neuropil
PT	protocerebraler Trakt

Allgemeine Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
GMR	gastrischer Mühlenrhythmus
STNS	stomatogastrisches Nervensystem
ZNS	zentrales Nervensystem
LY	Lucifer Yellow CH Dilithiumsalz
PSTH	Peri-Stimulus-Time-Histogramm
M	Molar
N	Normal
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mMol	Millimol
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
s	Sekunde
min	Minute
V	Volt

Chemische Formeln

Abkürzung	Erklärung
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Calciumchlorid Dihydrat
GABA	γ-Aminobuttersäure
NaCl	Natriumchlorid
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Magnesiumchlorid Hexahydrat
KCl	Kaliumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
$NiCl_2$	Nickelchlorid

1 Zusammenfassung

Das Nervensystem nimmt Informationen aus der Umwelt auf, verarbeitet sie und reagiert auf Veränderungen mit einem adäquaten Verhalten. Es bildet daher die Grundlage für das Ausführen eines Verhaltens. Wie das Nervensystem ein solches adäquates motorisches Muster auswählt und verschiedene Sinnesmodalitäten verarbeitet, ist dabei nur wenig verstanden. Zur Untersuchung von Verhalten und der Funktion des Nervensystems eignen sich insbesondere einfach zu charakterisierende Bewegungsabläufe, wie sie z.B. bei sich rhythmisch wiederholenden Bewegungen wie beim Laufen, Atmen oder auch beim Herzschlag auftreten. Solche rhythmischen Bewegungen werden oft von einem zentralen Mustergenerator angetrieben. Die Bewegungen des Kaumagens von dekapoden Krebsen werden durch solche Mustergeneratoren im stomatogastrischen Nervensystem (STNS) erzeugt. Der oesophageale Rhythmus steuert dabei das Schlucken der Nahrung, der gastrische Mühlenrhythmus die Bewegungen der Zähne in der gastrischen Mühle und der pylorische Rhythmus koordiniert das Filtern der Nahrung. Diese Rhythmen werden durch den Einfluss mehrerer Projektionsneurone moduliert und über verschiedene sensorische Bahnen beeinflusst. Wie höhere Zentren, wie z.B. das Gehirn, motorische Muster aus diesen multifunktionellen Netzwerken selektieren und dadurch ein adäquates Verhalten auslösen, ist dabei unklar.

In dieser Arbeit wurden die Projektionen zweier vom Gehirn absteigender Bahnen, der inferioren Ventrikularneurone (IV Neurone), im Taschenkrebs *Cancer pagurus* charakterisiert. Zusätzlich wurde deren Aktivierung durch sensorische Eingänge analysiert und die Einflüsse auf die Mustergeneratoren im STNS untersucht. Im intakten Tier führten chemosensorische Stimuli zu einem rhythmischen Bursten der IV Neurone. Eine rhythmische Stimulation der IV Neurone *in vitro* löste gastrische Mühlenrhythmen aus oder entrainte spontanaktiv auftretende. Zusätzlich erregten die IV Neurone den oesophagealen Rhythmus und inhibierten einige pylorische Neurone. Die zentralen Mustergeneratoren wurden dabei hauptsächlich indirekt über absteigende Projektionsneurone in den Kommissuralganglien (CoGs) beeinflusst. Der Einfluss der IV Neurone auf vier identifizierte CoG Projektionsneurone wurde charakterisiert und deren synaptische Verbindungen zu den Projektionsneuronen beschrieben. Meine Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die Entscheidungsfindung und die Verarbeitung verschiedener sensorischer Informationen auf Ebene einzelner Neurone höherer Zentren stattfinden, im Taschenkrebs auf Ebene der CoG Projektionsneurone.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Einführung

Das Nervensystem hat die Aufgabe, Informationen aus der Umwelt wahrzunehmen, diese zu verarbeiten und anschließend auf mögliche Veränderungen optimal zu reagieren. Eine Reaktion auf solche Veränderungen kann sich z.B. in Bewegungen, Körperhaltungen und -formen äußern. Das Nervensystem bildet also die Grundlage für das Ausführen eines Verhaltens. Die Untersuchung der neuronalen Grundlage von Verhalten ist eines der Hauptziele der neurobiologischen Forschung. Hierzu eignen sich besonders einfach zu charakterisierende Bewegungsabläufe, wie sie z.B. bei sich rhythmisch wiederholenden Bewegungen auftreten. Vielen rhythmischen Verhaltensweisen wie dem Laufen (Bässler, 1993; Pearson, 2004), Atmen (Lieske et al., 2000) oder auch dem Zerkleinern von Nahrung (Marder and Calabrese, 1996) liegt ein zentraler Mustergenerator zugrunde, der zum einen im deafferentierten Zustand rhythmische Aktivität generieren kann, zum anderen aber auch durch sensorische Einflüsse moduliert wird. Die neuronalen Netzwerke, die solche zentralen Mustergeneratoren bilden, zeigen oft eine große Plastizität, die sich in einer großen Anzahl an motorischen Mustern äußert. Durch die hohe Anpassungsfähigkeit solcher multifunktionellen Netzwerke kann ein Organismus sein Verhalten besonders gut an unterschiedliche externe und interne Anforderungen anpassen. Unklar bleibt jedoch, wie das Nervensystem bestimmt, welche Aktivität der betreffenden Situation gerecht wird und wie z.B. die Information verschiedener Sinnesorgane zusammengeführt und auch verarbeitet wird, damit im Endeffekt ein adäquates Verhalten generiert werden kann. Zwei unterschiedliche Reize können z.B. dasselbe Verhalten auslösen: Ein visueller Reiz im Augenwinkel kann zur selben Reaktion führen, wie ein auditorischer Reiz aus derselben Richtung. Beide Reize bewirken, dass der Kopf dem Reiz zugewendet wird. Ein gleicher Reiz kann allerdings auch zwei unterschiedliche Verhalten auslösen: So beginnt der Blutegel bei mechanischer Reizung des caudalen Endes in Abhängigkeit der Wassertiefe entweder zu schwimmen oder zu kriechen (Shaw and Kristan Jr, 1997; Esch et al., 2002). Um ein adäquates Verhalten generieren zu können, muss eine Interaktion zwischen höheren neuronalen Zentren und den ausführenden motorischen Zentren stattfinden. Die Auswahl verschiedener motorischer Muster aus multifunktionellen Netzwerken, insbesondere durch höhere neuronale Zentren (wie z.B. dem Gehirn), ist daher von entscheidender Bedeutung für

das Verständnis der Funktion des Nervensystems und damit auch für das Verständnis der Kontrolle von Verhalten.

Neuronale Netzwerke des Menschen, die dem Verhalten zugrunde liegen, bestehen aus einer Vielzahl von Nervenzellen. Invasive Methoden zur Forschung sind am Menschen nur eingeschränkt möglich. Daher werden für solche Untersuchungen andere Spezies als Modellsysteme genutzt, insbesondere zur Charakterisierung von Netzwerkeigenschaften auf zellulärer Ebene. Die Modellsysteme zeichnen sich dadurch aus, dass bestimmte Verhaltensweisen in separaten Teilen des Nervensystems generiert werden und sich dadurch besser zur elektrophysiologischen Untersuchung eignen. Invertebraten verfügen über besondere Voraussetzungen, die sie als Modellsystem gegenüber Vertebraten hervorheben. Zum einen können sie leicht und schnell gezüchtet werden und stehen somit schnell und in großer Anzahl zu Verfügung, zum anderen besitzen sie ein dezentralisiertes Nervensystem, das sich häufig aus mehreren kleinen Subsystemen zusammensetzt. Jedes einzelne Subsystem steuert dabei jeweils ein anderes Verhalten (z.B. Atmen, Fliegen, Gehen usw.). Das Untersuchen der Grundlage eines Verhaltens ist deshalb wesentlich einfacher als bei komplexeren Systemen, wie z.B. dem Nervensystem von Vertebraten. Über die Jahre haben sich mehrere Invertebratenmodelle zur Verhaltensuntersuchung etabliert, wie z.B. das Flugsystem der Heuschrecke (Wolf and Pearson, 1987), das Laufsystem der Stabheuschrecke (Bässler, 1983), das Fütterungsverhalten in Aplysia (Kupfermann, 1991; Lechner et al., 2000a; 2000b), die Kriech- und Schwimmbewegungen des Blutegels (Friesen and Hocker, 2001; Kristan et al., 2005) und das Kau- und Filtersystem der Nahrung bei dekapoden Krebsen (Harris-Warrick et al., 1992; Marder and Bucher, 2001; Nusbaum and Beenhakker, 2002). Das Kauen und Filtern der Nahrung im Kaumagen wird bei dekapoden Krebsen von einer Erweiterung des Zentralnervensystems gesteuert, nämlich dem stomatogastrischen Nervensystem (STNS). Die Kau- und Filterbewegungen erfolgen, ähnlich wie beim Herzschlag oder Atmen, rhythmisch und werden von zentralen Mustergeneratoren erzeugt. Das STNS dekapoder Krebse wurde aufgrund seiner geringen Anzahl an Nervenzellen und der Möglichkeit, verschiedenste Untersuchungsmethoden anwenden zu können, in den letzten Jahrzehnten gut untersucht. Die Identifizierung vieler Mechanismen im STNS, die auf andere Netzwerke übertragen werden können, konnte zum allgemeinen Verständnis neuronaler Netzwerke beitragen.

In meiner Arbeit habe ich die Aktivierung und den Einfluss höherer neuronaler Zentren auf zentrale Mustergeneratoren untersucht. Die zentrale Frage, die in dieser Arbeit geklärt werden soll, lautet: Sind höhere neuronale Zentren an der Selektion motorischer Muster aus multi-

funktionellen Netzwerken beteiligt? Dazu habe ich mir die Vorteile des stomatogastrischen Nervensystems des Taschenkrebses *Cancer pagurus* zunutze gemacht, um die Verarbeitung von Informationen höherer neuronaler Zentren zu charakterisieren und somit einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Verarbeitung neuronaler Prozesse im Nervensystem zu leisten.

2.2 Morphologie des Taschenkrebses *Cancer pagurus*

Der Taschenkrebs *Cancer pagurus* ist eine in der Nordsee und dem Nordatlantik beheimatete Krabbe. Er gehört zum Stamm der Arthropoda, Klasse der Crustacea, Ordnung der Decapoda und dort zur Unterordnung der Brachyura (Richter and Scholtz, 2001). Zu den dekapoden Krustazeen, auch Zehnfußkrebse genannt, gehören neben den Krabben (Brachyura) die Langustenartigen (Palinura) sowie die Flusskrebse und Hummer (Astacidea). Die Zehnfußkrebse sind hauptsächlich marin, es gibt aber auch Arten, die im Süßwasser (z.B. Wollhandkrabben) oder an Land (z.B. Harlekinkrabbe) leben. Der Ordnungsname Decapoda oder Zehnfußkrebse leitet sich von den fünf Schreitbeinpaaren ab, wobei das erste Schreitbeinpaar in große, kräftige Scheren umgewandelt ist (siehe Abbildung 1B). Bei Brachyura sind Kopf und Rumpf nicht differenziert, und werden zusammen als Cephalothorax bezeichnet. Das Abdomen (Pleon) ist unter den Cephalothorax geklappt, der Zwischenraum dient bei den weiblichen Tieren als Brutraum. Dekapode Krebse besitzen gestielte Augen (siehe Abbildung 1), zwei Paar Antennen sowie drei Paar Mundwerkzeuge, die Mandibeln, erste Maxillen und zweite Maxillen. Die Mundwerkzeuge und der darunter liegende Schlund befinden sich auf der ventralen Seite des Krebses (siehe Abbildung 1B).

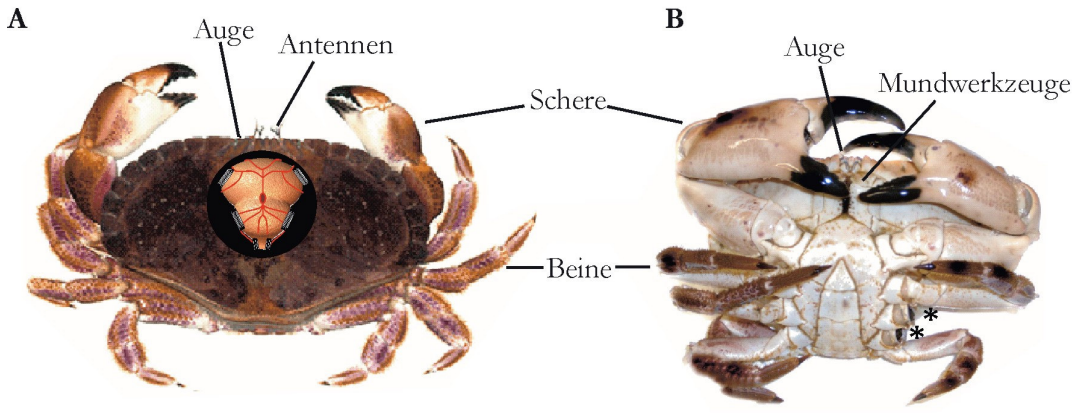


Abbildung 1: Ansicht des Taschenkrebses, *Cancer pagurus*. A: Dorsalansicht des Taschenkrebses. Schematisch angedeutet ist die Lage des Vorderdarms (dorsal unter dem Carapax) mit dem dorsal aufliegenden stomatogastrischen Nervensystem (rot) und der quergestreiften Muskulatur (grau). Der Kopf ist nicht vom Rumpf differenzierbar (verändert nach Mark Beenhakker, Stanford University). **B:** Ventralansicht des Taschenkrebses mit vier Schreitbeinpaaren (zwei fehlende mit * gekennzeichnet) und einem Scherenpaar. Das Pleon ist unter den Cephalothorax geklappt (verändert nach Carmen Smarandache, UC Davis).

Die kleineren ersten Antennen, auch als Antennulae bezeichnet, der Brachyura dienen vor allem der Chemorezeption (Brock, 1930). Der Grundaufbau der Antennulae ist dabei bei allen dekapoden Krebsen gleich. In Abbildung 2 ist eine erste Antenne von *Astacus fluviatilis* (Unterordnung Astacidea) dargestellt. Die Antennulae sind in zwei Geißeln gegliedert: aus dem Außenglied oder Exopodit, an dem sich die Sinnesborsten für die Chemorezeption befinden, und dem kürzeren Innenglied, auch als Endopodit bezeichnet. Die Antennulae reagieren schon auf geringe chemische Reize. Sie werden in Richtung der Stromrichtung, die durch die 2. und 3. Maxillipeden erzeugt wird, geschlagen, um diesen Wasserstrom zu prüfen (Brock, 1926). Aufgrund der paarigen Anordnung der Antennulae kann die Richtung eines Reizes bestimmt werden. Des Weiteren befinden sich Chemorezeptoren an verschiedenen Fortsätzen im Mundwerkzeugbereich. In Garm et al., 2005 wurden für die Langusten *Panulirus argus* und *Panulirus interruptus* weitere Chemorezeptoren beschrieben, nämlich am Endopodit der 2. und 3. Maxillipeden, am mandibularen Palpus und an der Basis des 1. Maxillipeds.

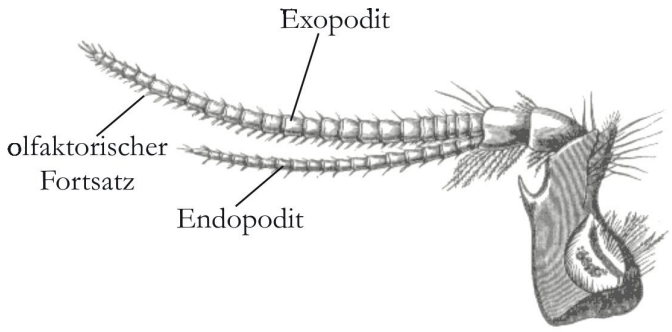


Abbildung 2: Innenansicht der rechten ersten Antenne (Antennulae) von *Astacus fluviatilis*. Verändert nach Huxley, 1880.

Die über chemische Reize lokalisierte Nahrung wird mit den Scheren und den Mundwerkzeugen grob zerkleinert, in den Oesophagus befördert und geschluckt. Von dort gelangt die Nahrung in den Magen des Taschenkrebses, der auf den Oesophagus folgt und sich auf der Dorsalseite des Krebses befindet. Er gehört zum ektodermalen Vorderdarm und wird daher mit dem Tier gehäutet. Der Magen kann in drei Abschnitte unterteilt werden, den Magensack, die gastrische Mühle und den Pylorus (siehe Abbildung 3). Die grob zerkleinerte Nahrung gelangt, wie schon oben erwähnt, über den Oesophagus in den Magensack, wo sie gespeichert und enzymatisch angedaut wird. In der gastrischen Mühle werden die grob zerkleinerten Nahrungsstücke durch zwei Lateralzähne und einen Medianzahn weiter zerkleinert. Diese drei Magenzähne können zur Zerkleinerung der Nahrungspartikel vielfältige Bewegungen ausführen (Heinzel et al., 1993). Im Pylorus werden die kleinen Nahrungspartikel gefiltert. Dort befinden sich in komplexer Anordnung Falten und Reusen, die grobe und fein zerkleinerte Nahrung trennen. Zur Endverdauung gelangen nur die kleinsten Nahrungspartikel in die Mitteldarmdrüse, die gröberen gelangen durch ein Trichterventil in den Enddarm. Die Kau- und Filterbewegungen des Vorderdarms werden durch quergestreifte Muskulatur ausgeführt, welche an verschiedenen kutikulären Spangen ansetzt. Die Muskulatur wird von Motoneuronen im stomatogastrischen Nervensystem, einer Erweiterung des Zentralnervensystems, innerviert.

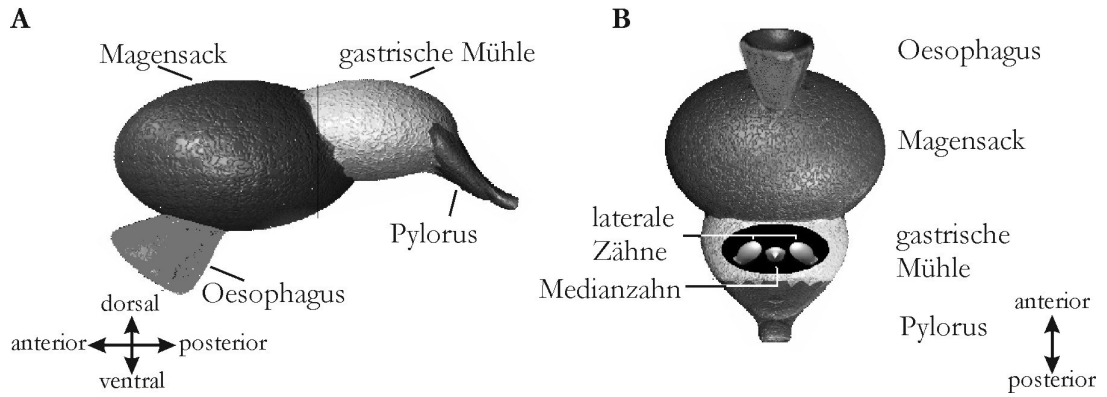


Abbildung 3: Ansicht des Vorderdarms dekapoder Krebse. Der Vorderdarm kann unterteilt werden in Oesophagus, Magensack, gastrische Mühle und Pylorus. **A:** Laterale Ansicht des Magens. **B:** Ventrale Ansicht des Magens. In der gastrischen Mühle befinden sich die beiden Lateralzähne und der Medianzahn (verändert nach Mark Beenhakker, Stanford University).

2.3 Das Nervensystem des Taschenkrebses

Im Vergleich zu Vertebraten besitzen Invertebraten ein relativ einfaches Nervensystem. Diese Einfachheit zeigt sich vor allem in der Anzahl der Nervenzellen und im Aufbau des Nervensystems. Während z.B. das Gehirn bei Vertebraten in fünf Abschnitte untergliedert werden kann, nämlich von rostral nach kaudal in Endhirn (Telencephalon), Zwischenhirn (Diencephalon), Mittelhirn (Mesencephalon), Hinterhirn (Metencephalon) und Nachhirn (Myelencephalon), das in das Rückenmark übergeht, besteht das Gehirn (Oberschlund- oder Supraoesophagealganglion) bei Arthropoden lediglich aus drei Abschnitten, dem Proto-, Deuto- und Tritocerebrum. Das Nervensystem der Arthropoden besteht neben dem Oberschlundganglion aus einem Unterschlundganglion (Suboesophagealganglion) und einem Bauchmark, das wiederum in weitere Ganglien segmentiert ist. Unter einem Ganglion versteht man eine Zusammenlagerung vieler Nervenzellkörper, die um ein Knäuel von Nervenfasern, dem Neuropil, organisiert sind. Diese Organisationsform ermöglicht umfassende Verbindungen der Neurone untereinander mittels vieler kollateraler Fortsätze (Eckert et al., 1993). Die Notwendigkeit einer genauen motorischen Kontrolle der gegliederten Körperextremitäten der Arthropoda bringt eine zunehmende Spezialisierung der ventralen Segmentalganglien mit sich. Bei Krebstieren besteht zusätzlich noch die Tendenz zur Fusionierung der segmentalen Ganglien, im Extremfall kommt es zur vollständigen Kondensation der Ganglien in ein cerebrales und ein thorakales Ganglion (z.B. bei Krabben). Die segmentalen Spezialisierungen

des Arthropodennervensystems können selbst extrem komplexe motorische Muster, wie z.B. rhythmische Bewegungen beim Fliegen oder Laufen, erzeugen.

Das Zentralnervensystem der Krustazeen ist in seiner ursprünglichen Form ein typisches Strickleiternervensystem. Dabei kann es aber, wie schon oben beschrieben, zu Variationen kommen. Im Nervensystem der Krustazeen liegt das Gehirn dorsal dem Oesophagus auf und ist mit dem Bauchmark über zwei Schlundkonnektive verbunden, die den Oesophagus umfassen (siehe Abbildung 4). Das Nervensystem des Taschenkrebses *C. pagurus* ähnelt dabei in seiner Anatomie dem in Abbildung 4H dargestellten Nervensystem der Strandkrabbe *Carcinus maenas*.

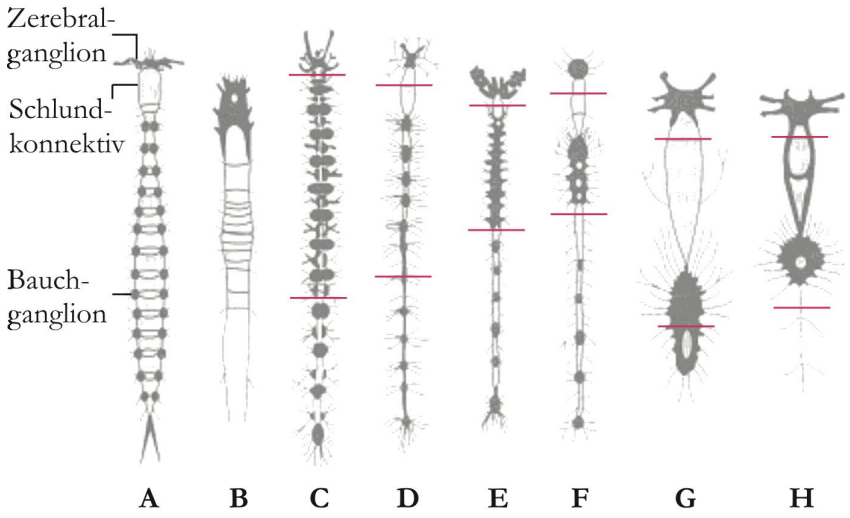


Abbildung 4: Variabilität des Krustazeen – Zentralnervensystems (ZNS) von einem Strickleiternervensystem (A, B) bis zur Kondensation aller Ganglien in einen zerebralen und thorakalen Komplex (G,H). Die roten Linien unterteilen zerebrale, thorakale und abdominale ZNS-Region (Dudel et al., 2001). **A:** *Branchipus* (Anostraca), **B:** *Simocephalus* (Cladocera, Wasserflöhe), **C:** *Gammarus* (Amphipoda, Flohkrebse), **D:** *Homarus* (Decapoda, Hummer), **E:** *Mysis* (Mysidacea), **F:** *Pagurus* (Decapoda, Einsiedlerkrebs), **G:** *Palinurus* (Decapoda, Languste), **H:** *Carcinus* (Decapoda, Strandkrabbe, Taschenkrebs).

2.3.1. Das stomatogastrische Nervensystem

Das stomatogastrische Nervensystem (STNS, siehe Abbildung 5) dekapoder Krebse ist eine Erweiterung des Zentralnervensystems, das den Mundbereich und den vorderen Darmabschnitt innerviert. Das STNS liegt dorsal auf dem Magen und steht sowohl nervös mit dem Gehirn (Supraoesophagealganglion) als auch mit dem Thorakalganglion in Verbindung. Es besteht aus vier Ganglien: den paarigen Kommissuralganglien (CoGs, jeweils ca. 500

Neurone), dem Oesophagealganglion (OG, 14 Neurone) und dem stomatogastrischen Ganglion (STG). Im STG befinden sich 26 Zellen (Kilman and Marder, 1996), Moto- und Interneurone, die zusammen die zwei Mustergeneratoren bilden, welche die quergestreifte Muskulatur kontrollieren, die für das Kauen der Nahrung in der gastrischen Mühle und für das Filtern im Pylorus verantwortlich sind (Harris-Warrick et al., 1992).

In Abbildung 5 ist ein isoliertes Nervensystem dargestellt, das über die circumoesophagealen Kommissuren (*coc*s) und den inferioren Ventrikularnerv (*ivn*) mit dem Gehirn verbunden ist (verändert nach Hooper et al., 1986; F. Nadim, Rutgers University; Christie et al., 2004). Die paarigen CoGs befinden sich im anterioren Teil des Nervensystems. Über die inferioren Oesophagelnerven (*ion*s) und die superioren Oesophagealnerven (*son*s) sind diese paarigen Ganglien mit dem unpaaren OG verbunden. Aus dem *son* spaltet sich der dorsale posteriore Oesophagealnerv (*dpon*) ab, der Axone sensorischer Neurone enthält. Der *ivn* mündet in das OG und stellt eine weitere direkte Verbindung zwischen Gehirn und dem STNS dar. Der stomatogastrische Nerv (*stn*) verbindet das OG und die CoGs mit dem STG und sorgt für dessen neuromodulatorische Innervation. Im posterioren Bereich des Nervensystems befinden sich die motorischen Nerven mit den Axonen der Motoneurone, welche die Muskulatur zur Steuerung der gastrischen Mühle und des pylorischen Filterapparats innervieren. Aus dem STG zweigen der dorsale Ventrikularnerv (*dvn*), der dorsale gastrische Nerv (*dgn*) und die beiden medialen Ventrikularnerven (*mvn*s) ab. Der *dvn* verzweigt sich wiederum in die beiden lateralen Ventrikularnerven (*lvn*s), von denen sich jeweils der laterale gastrische Nerv (*lgn*) und der pylorische Dilatornerv (*pdn*) abspalten. An diesen motorischen Nerven kann die Aktivität verschiedener gastrischer und pylorischer Neurone extrazellulär abgeleitet werden.

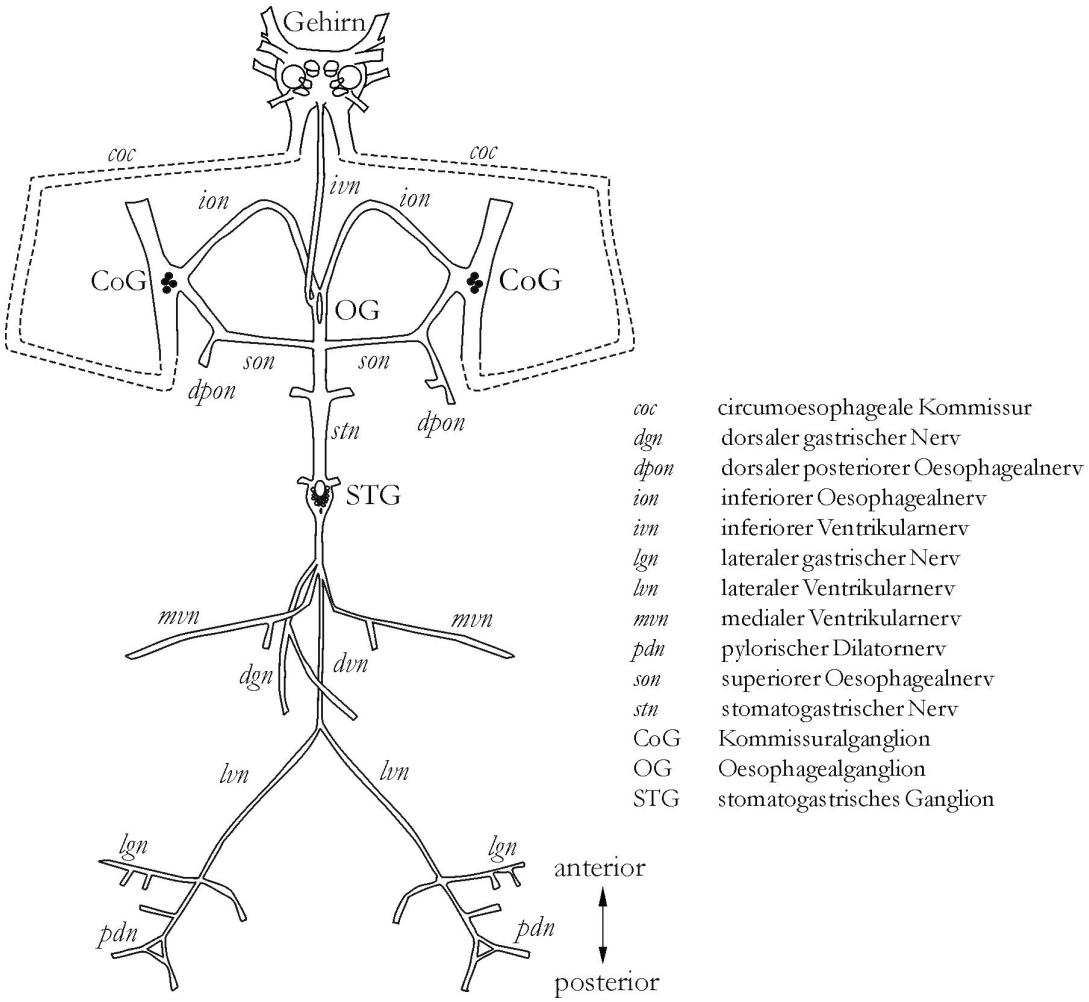


Abbildung 5: Isoliertes STNS des Taschenkrebses mit den paarigen Kommissuralganglien (CoGs) und den unpaaren Oesophageal- (OG) und stomatogastrischen Ganglien (STG), sowie efferenten und afferenten Nerven des STG. Das supraoesophageale Ganglion (Gehirn) ist über den inferioren Ventrikularnerv (*ivn*) und die circumoesophagealen Kommissuren (*coc*, gestrichelt dargestellt) verbunden. Verändert nach Hooper et al., 1986 und Farzan Nadim, Rutgers University).

2.3.2. Die Mustergeneratoren im stomatogastrischen Nervensystem

Das stomatogastrische Nervensystem generiert bis zu vier unterschiedliche motorische Muster, um die Bewegungen des Vorderdarms zu steuern. Die Rhythmen, die für die Steuerung des Oesophagus und Magensacks verantwortlich sind, werden im OG und in den beiden CoGs generiert.

Die Neurone, deren Somata im STG lokalisiert sind, generieren zweierlei Rhythmen: den gastrischen Mühlenrhythmus und den pylorischen Rhythmus. Der gastrische Rhythmus koordiniert die Bewegungen von drei am kaudalen Ende des Kaumagens gelegenen Zähnen

(zwei Lateralzähne und ein Medianzahn), welche die Nahrung weiter zerkleinern. Der pylorische Rhythmus kontrolliert die Peristaltik des pylorischen Filterapparats zwischen Kaumagen und Mitteldarm. Beide Rhythmen können im isolierten Nervensystem spontanaktiv sein und sind daher besonders gut untersucht (für Zusammenfassung siehe Nusbaum and Beenhakker, 2002).

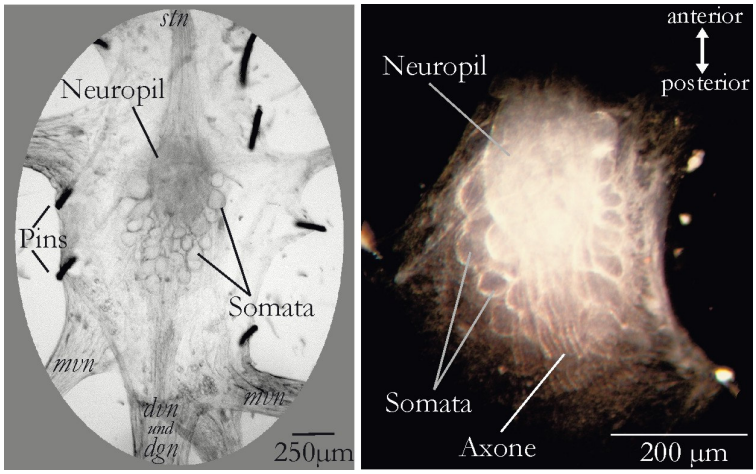


Abbildung 6: Das stomatogastrische Ganglion (STG). Das STG wurde in einer Petrischale ausgepinnt, die obere Ganglienhülle wurde entfernt. Man kann die Moto- und Interneurone sowie die Axone gut erkennen. Rechts: Ausschnittsvergrößerung eines STG im Dunkelfeld (verändert nach Wolfgang Stein).

Das pylorische Netzwerk ist das am besten untersuchte Netzwerk im stomatogastrischen Ganglion. Die pylorischen Motoneurone treiben mit ihrer rhythmischen Aktivität die Muskulatur des Pylorus so an, dass die Nahrung gefiltert werden kann. Im isolierten Nervensystem ist der pylorische Rhythmus stets spontanaktiv. Der pylorische Rhythmus ist mit einer Periodendauer von 0,5 bis 2 s relativ schnell und wird durch Schrittmacherzellen generiert, die autonom rhythmisch aktiv sind, selbst wenn sie völlig vom Rest des STNS isoliert sind (Anderson and Kushner, 1987; Bal et al., 1988). Zum pylorischen Schrittmacherensemble bei Krebsen gehören der anteriore Burster (AB), die beiden pylorischen Dilatormotoneurone (PD) sowie die zwei lateralen posterioren gastrischen Neurone (LPG; Norris et al., 1996; Nusbaum and Beenhakker, 2002). Diese Schrittmacherneurone koordinieren die Aktivität nachgeschalteter Zellen meist über inhibitorische Synapsen, so dass sie nur alternierend aktiv sein können. In Abbildung 7 ist ein pylorischer Rhythmus anhand extra- und intrazellulärer Ableitungen dargestellt. Die Aktivität von PD wird dabei als Anfang eines pylorischen Rhythmus definiert, da es sich um ein Schrittmacherneuron handelt. Darauf folgen das laterale pylorische Neuron (LP) und das inferiore kardiale Neuron (IC). Anschließend sind die

pylorischen Konstriktormotoneurone (PYs, 3-5 Zellen) und das ventrale Dilatorneuron (VD) aktiv. Die besonders gute experimentelle Zugänglichkeit zeigt sich auch darin, dass die Aktivität aller pylorischer Neurone, mit Ausnahme des anterioren Bursters (AB), extrazellulär auf verschiedenen Nerven abgeleitet werden kann. Die Aktivität von PD, LP und PY kann extrazellulär auf dem lateralen Ventrikularnerv (*lvn*) abgeleitet werden, die Aktivität von IC und VD auf dem medialen Ventrikularnerv (*mvn*; siehe Abbildung 7).

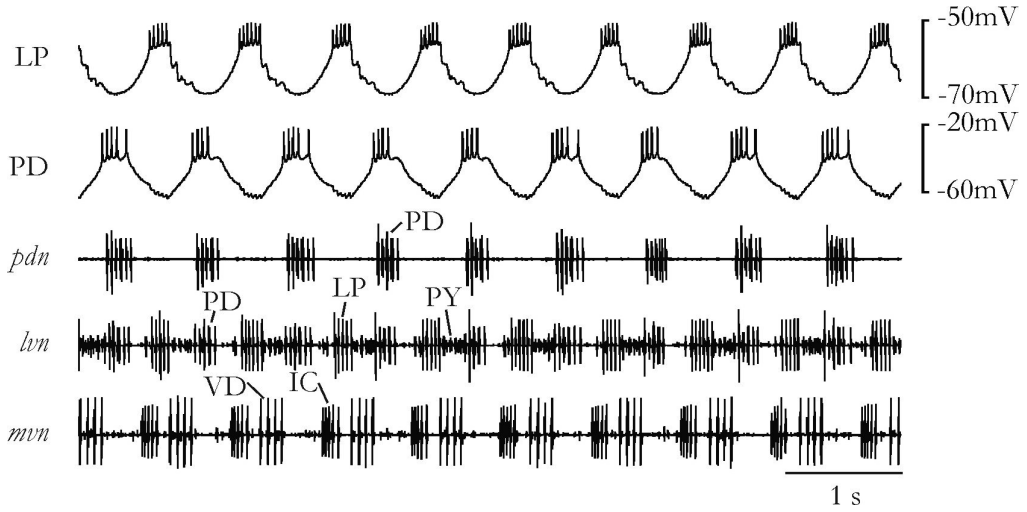


Abbildung 7: Der pylorische Rhythmus. Extrazelluläre Ableitungen des medialen Ventrikularnervs (*mvn*, untere Spur) mit den Aktivitäten des ventralen Dilatormotoneurons (VD) und des inferioren kardialen Neurons (IC), des lateralen Ventrikularnervs (*lvn*, zweite Spur von unten) mit den Aktivitäten der pylorischen Dilatorneurone (PD, zwei Zellen), des lateralen pylorischen Neurons (LP) und der pylorischen Konstriktorneurone (PY, 3-5 Zellen) und des pylorischen Dilatornervs (*pdn*, mittlere Spur) mit den Aktivitäten der beiden PDs. Die beiden oberen Spuren sind intrazelluläre Ableitungen von PD (zweite Spur von oben) und LP (obere Spur).

Der gastrische Mühlenrhythmus (GMR) generiert einen zweiphasigen Rhythmus, der dem Kauen der Nahrung (Pro- und Retraktion der Magenzähne) in der gastrischen Mühle zugrunde liegt. Er ist mit einer Periodendauer zwischen 6 und 25 s im Vergleich zum pylorischen Rhythmus sehr viel langsamer (siehe Abbildung 8). Im isolierten STNS ist der gastrische Rhythmus im Gegensatz zum pylorischen Rhythmus nicht immer spontanaktiv, da er nicht durch Schrittmacherneurone generiert wird, sondern hauptsächlich aufgrund der synaptischen Verbindungen zwischen den gastrischen Neuronen erzeugt wird, deren Aktivität von extrinsischen Eingängen abhängt. Den Kern des zentralen Mustergenerators bildet dabei das laterale gastrische Neuron (LG) und Interneuron1 (Int1), welche sich gegenseitig hemmen. Eine solche Verschaltung wird auch als „Half-Center“ bezeichnet. Eine alternierende Aktivität

dieser beiden Neurone wird allerdings nur durch erregende Eingänge erreicht, die z.B. durch Projektionsneurone aus den Kommissuralganglien zur Verfügung gestellt werden (siehe Abschnitt 2.3.4). Da die Aktivität von Int1 nur intrazellulär abgeleitet werden kann, wird der GMR über die alternierende Aktivität von LG und des dorsalen gastrischen Neurons (DG) charakterisiert. Da DG gleichzeitig mit Int1 aktiv ist, zeigt DG die Retraktorphase des Rhythmus an. Die Aktivitäten von LG, DG und einer weiteren Klasse von gastrischen Motoneuronen, den GMs (4 Zellen) können extrazellulär abgeleitet werden. Die GMs sind über elektrische Synapsen mit LG gekoppelt und daher annähernd gleichzeitig mit diesem aktiv (siehe Abbildung 8). In Abbildung 8 sind die Aktivitäten von LG (extrazellulär auf dem *lgn* abgeleitet), GM (intrazellulär aus dem Soma abgeleitet) und DG (extrazellulär vom *dgn* abgeleitet) dargestellt.

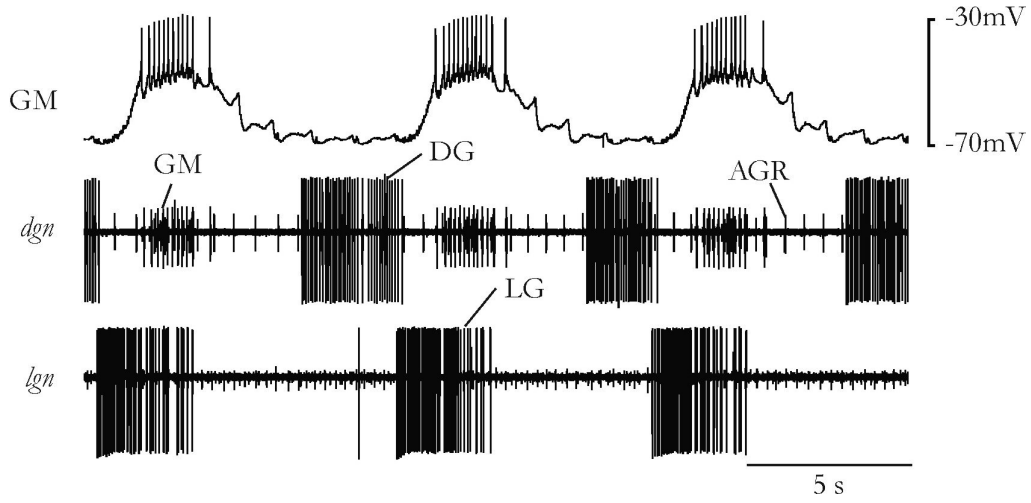


Abbildung 8: Der gastrische Mühlenrhythmus. Extrazelluläre Ableitungen des lateralen gastrischen Nervs (*lgn*, untere Spur) mit der Aktivität des lateralen gastrischen Neurons (LG) und des dorsalen gastrischen Nervs (*dgn*, mittlere Spur) mit den Aktivitäten des dorsalen gastrischen Neurons (DG), der vier gastrischen Motoneurone (GMs) und des anterioren gastrischen Rezeptors (AGR). In der oberen Spur ist eine intrazelluläre Ableitung eines gastrischen Motoneurons (GM) dargestellt. Ein GMR wird durch die alternierende Aktivität von LG und DG charakterisiert.

In Abbildung 9 sind die Verschaltungen der pylorischen und gastrischen Neurone untereinander dargestellt. Im STG befinden sich ausschließlich inhibitorische und elektrische Synapsen. Wie die einzelnen Zellen miteinander gekoppelt sind, ist weitgehend bekannt (für Zusammenfassung siehe Nusbaum and Beenhakker, 2002). Die Neurone der beiden Netzwerke (gastrisches und pylorisches) beeinflussen sich gegenseitig. So hat zum Beispiel die pylorische Schrittmacherzelle AB eine inhibitorische Synapse auf Interneuron 1, ein Mitglied

des gastrischen Half-Centers. Außerdem beeinflussen die gastrischen Half-Center Neurone die Aktivität von VD und IC. Dieses Zusammenspiel von gastrischen und pylorischen Neuronen wird auch als gastropylorische Interaktion bezeichnet (Bartos and Nusbaum, 1997).

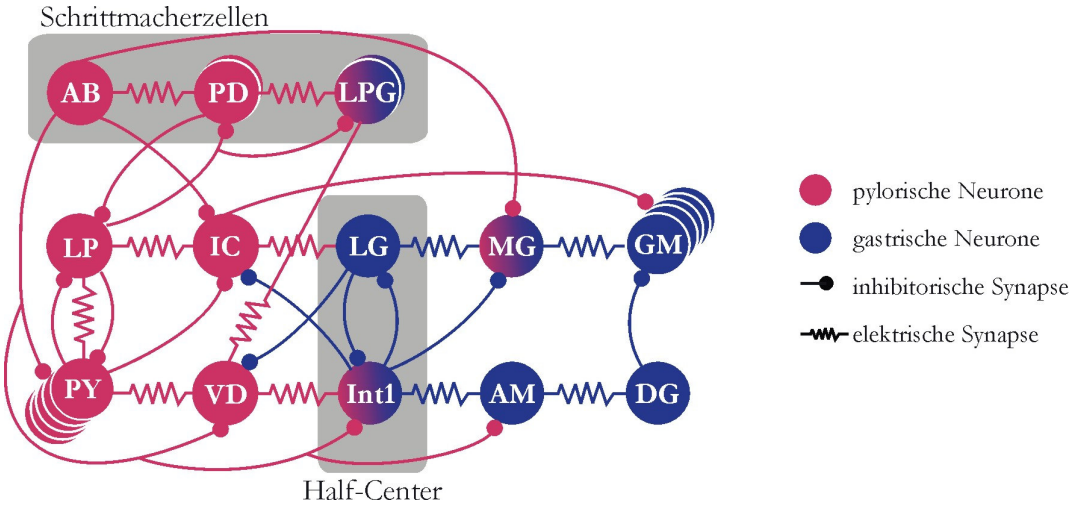


Abbildung 9: Verschaltung der Neurone im stomatogastrischen Ganglion. Das pylorische Netzwerk ist in rot, das gastrische Netzwerk ist in blau dargestellt. Die beiden Netzwerke sind über elektrische und inhibitorische chemische Synapsen miteinander verbunden.

2.3.3. Neurotransmitter und Neuromodulatoren im STG

Das stomatogastrische Nervensystem ist aufgrund der geringen Anzahl an Nervenzellen und der großen Menge der dort vorkommenden Neuromodulatoren besonders gut geeignet, um den Einfluss von Neurotransmittern und Neuromodulatoren auf rhythmische motorische Netzwerke zu untersuchen (Harris-Warrick et al., 1992; Marder and Calabrese, 1996; Skiebe, 2001). Bisher konnten zahlreiche Substanzen mit neuromodulatorischer Wirkung im STNS identifiziert werden (siehe Abbildung 10). Dazu gehören biogene Amine (wie z.B. Octopamin), Neuropeptide (wie z.B. TNRNFLRFamid) und auch klassische Neurotransmitter (wie z.B. γ-Aminobuttersäure, kurz GABA). Viele Amine und Peptide erreichen das in der ophthalmischen Arterie lokalisierte STG z.B. über den Blutstrom (Neurohormone). Zusätzlich werden Modulatoren lokal im STG aus den Terminalen von modulatorischen Projektionsneuronen und sensorischen Neuronen ausgeschüttet. In Abbildung 10 sind alle bisher bekannten neuromodulatorischen Substanzen im STNS von *Cancer borealis*, einem im Atlantik Nordamerikas beheimateten nahen Verwandten von *C. pagurus*, dargestellt.

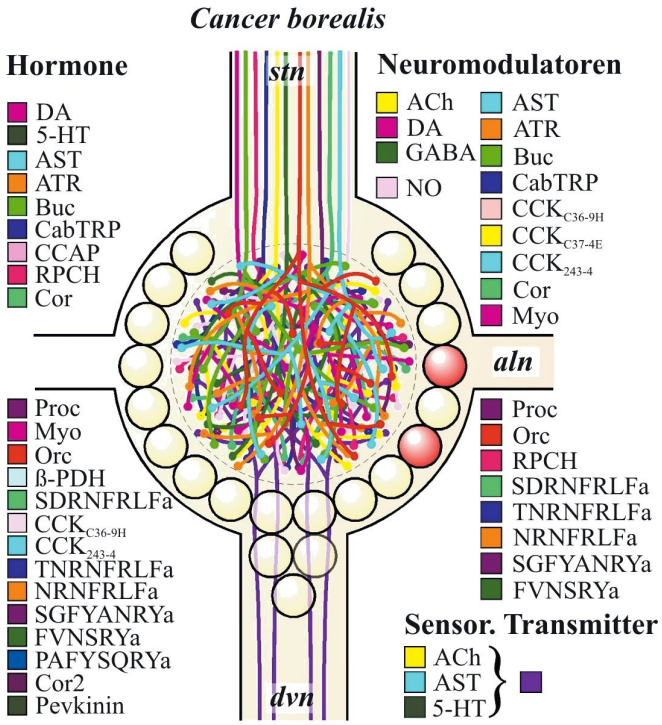


Abbildung 10: Verschiedene im STG vorkommenden Hormone, Neuromodulatoren und Transmitter. Die Substanzen werden dabei von den Projektionsneuronen aus dem OG oder den CoGs ausgeschüttet oder gelangen über den Blutstrom zum STG. *aln*: anteriorer Lateralnerv; *dvn*: dorsaler Ventrikularnerv; *stn*: stomatogastrischer Nerv. Verändert nach Eve Marder, Brandeis University; http://www.bio.brandeis.edu/faculty01/marder.html.

Das Vorkommen vieler verschiedener neuromodulatorischer Substanzen in einem System trägt dazu bei, dass nicht nur starre Aktivitätsmuster erzeugt werden können, sondern dass die Netzwerke sehr flexibel sind. Die neuronalen Netzwerke im STNS zeigen eine große Flexibilität (Plastizität), die dadurch verursacht wird, dass die vorkommenden neuromodulatorischen Substanzen sowohl die Verbindungen der Zellen untereinander als auch die Zelleigenschaften der Neurone qualitativ und quantitativ verändern können. In vielen Vertebraten- und Invertebratensystemen (auch im STNS) hat sich gezeigt, dass die meisten Neurone mehr als nur einen Transmitter besitzen und durch diese Kotransmitter zur hohen Plastizität der Netzwerke beitragen (z.B. Brezina and Weiss, 1997; Nusbaum et al., 2001). Üblicherweise findet man beim Vorkommen von Kotransmittern einen klassischen Neurotransmitter und ein oder mehrere Neuropeptide. Die Mechanismen, die die Wirkung dieser gleichzeitig ausgeschütteten Transmitter bestimmen, sind dabei aber nur wenig verstanden. Es gibt viele mögliche Wirkmechanismen, z.B. eine räumlich getrennte

Ausschüttung aus verschiedenen „Release Sites“ und/oder zeitlich getrennte Ausschüttung. Ebenso können die Wirkungen durch separate oder koinzidierende Rezeptorlokalisationen beeinflusst werden (Nusbaum et al., 2001; Stein et al., 2007). Die Kombination aus verschiedenen potentiellen Ausschüttungsstrategien auf verschiedene Zielneurone und verschiedene Rezeptorkombinationen in den Zielneuronen in einem neuronalen Netzwerk zeigt die enorme Flexibilitätsmöglichkeit solcher Multi-Transmitter Neurone. Im stomatogastrischen Nervensystem sind inzwischen die Transmitter mehrerer identifizierter Projektionsneurone und sensorischer Neurone bekannt, die das STG beeinflussen (Harris-Warrick et al., 1992; Coleman et al., 1992).

2.3.4. Modulation des pylorischen und gastrischen Mustergenerators durch Projektionsneurone in den Kommissuralganglien

Sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten gibt es Neurone, die in entferntere Bereiche des Nervensystems projizieren. Im Hirnstamm von Vertebraten zeigen z.B. Neurone weitläufige Projektionen bis ins Rückenmark und innervieren dort die motorischen Zentren (Rossignol et al., 2006). Projektionsneurone, die motorische Zentren innervieren, finden sich auch im stomatogastrischen Nervensystem (für Zusammenfassung siehe Nusbaum and Beenhakker, 2002). Diese Projektionsneurone befinden sich im unpaaren Oesophagealganglion sowie in den paarigen Kommissuralganglien und modulieren die beiden Mustergeneratoren im STG (Nusbaum and Marder, 1989; Coleman et al., 1992; Norris et al., 1994; , 1996). Ein Entfernen der Eingänge von OG oder CoGs schwächt oder beendet den pylorischen und gastrischen Rhythmus. Eine Aktivierung der Projektionsneurone startet nicht nur beide Rhythmen, sondern verändert auch deren Eigenschaften und Interaktion (Katz and Harris-Warrick, 1991; Norris et al., 1994; Bartos and Nusbaum, 1997; Nadim et al., 1998; Bartos et al., 1999). Ähnlich wie Applikation einzelner Modulatoren ins Bad führt auch eine Aktivierung individueller Projektionsneurone im isolierten STNS zu ganz spezifischen pylorischen und gastrischen Rhythmen (Blitz et al., 1999). Koapplikation von Modulatoren und Koaktivierung mehrerer Projektionsneurone lösen verschiedene, aber spezifische gastrische Rhythmen aus (Blitz and Nusbaum, 1997). Die Aktivität der Projektionsneurone scheint daher eine entscheidende Rolle bei der Selektion verschiedener Rhythmen aus den multifunktionellen STG Netzwerken zu spielen. Bisher wurden vier Projektionsneurone in den Kommissuralganglien identifiziert. Dabei wurden ihre Verbindungen zu den STG Neuronen untersucht (siehe Abbildung 11) und teilweise die verwendeten Neuromodulatoren

charakterisiert. Die Projektionsneurone treten in den paarig angelegten CoGs jeweils einmal auf.

Eines der identifizierten Projektionsneurone ist das modulatorische Kommissuralneuron 1 (MCN1; Nusbaum et al., 1992). MCN1 projiziert über den *ion* und *stn* zum STG und erregt dort Neurone beider Mustergeneratoren im STG über chemische Synapsen (siehe Abbildung 11A). Als Neuromodulatoren wurden Proctolin, γ-Aminobuttersäure (GABA) und *Cancer borealis* tachykinin related Peptid Ia (CabTRP Ia) identifiziert (Blitz and Nusbaum, 1999). Zusätzlich beeinflusst MCN1 das gastrische Neuron LG und das pylorische Neuron IC über elektrische Synapsen. Die Terminale von MCN1 wird von LG außerdem präsynaptisch inhibiert. Da MCN1 auch pylorische Neurone erregt, kann somit der gastrische Rhythmus auch einen Einfluss auf den pylorischen ausüben. Während der Protraktionsphase des GMR hemmt das Protraktormotoneuron LG die MCN1 Terminale und eliminiert so die Erregung auf beide STG Netzwerke. Während der Retraktionsphase ist LG nicht aktiv und MCN1 kann daher beide Rhythmen erregen (Coleman et al., 1995).

Das modulatorische Kommissuralneuron 5 (MCN5; Norris et al., 1996) projiziert wie MCN1 über den *ion* und den *stn* zum STG und erregt dort das pylorische Schrittmacherensemble sowie das gastrische Neuron DG und hemmt LP, PY, VD und IC über chemische Synapsen (siehe Abbildung 11B). MCN5 kann einen gastrischen Rhythmus auslösen, bei dem LPG und DG alternierend aktiv sind (D. Blitz, persönliche Mitteilung).

Ein weiteres identifiziertes Projektionsneuron ist das modulatorische Kommissuralneuron 7 (MCN7; Blitz et al., 1999). Das Axon dieses Neurons projiziert über den *son* und den *stn* zum STG und erregt die gastrischen Neurone LG und DG sowie die pylorischen Neurone IC und VD über chemische Synapsen (siehe Abbildung 11C). MCN7 schüttet dabei Proctolin aus.

Das vierte identifizierte Projektionsneuron ist das kommissurale Projektionsneuron 2 (CPN2; Norris et al., 1994). CPN2 projiziert wie MCN7 über den *son* und *stn* zum STG. Die Aktivität von CPN2 beeinflusst hauptsächlich die gastrischen Neurone im STG. Es erregt vor allem die gastrischen Neurone GM und LG über elektrische Synapsen und hemmt DG sowie das pylorische Neuron IC (siehe Abbildung 11D). Die exzitatorischen Effekte von CPN2 werden zumindest teilweise durch elektrische Synapsen vermittelt, die inhibitorischen Effekte dagegen über chemische Synapsen.

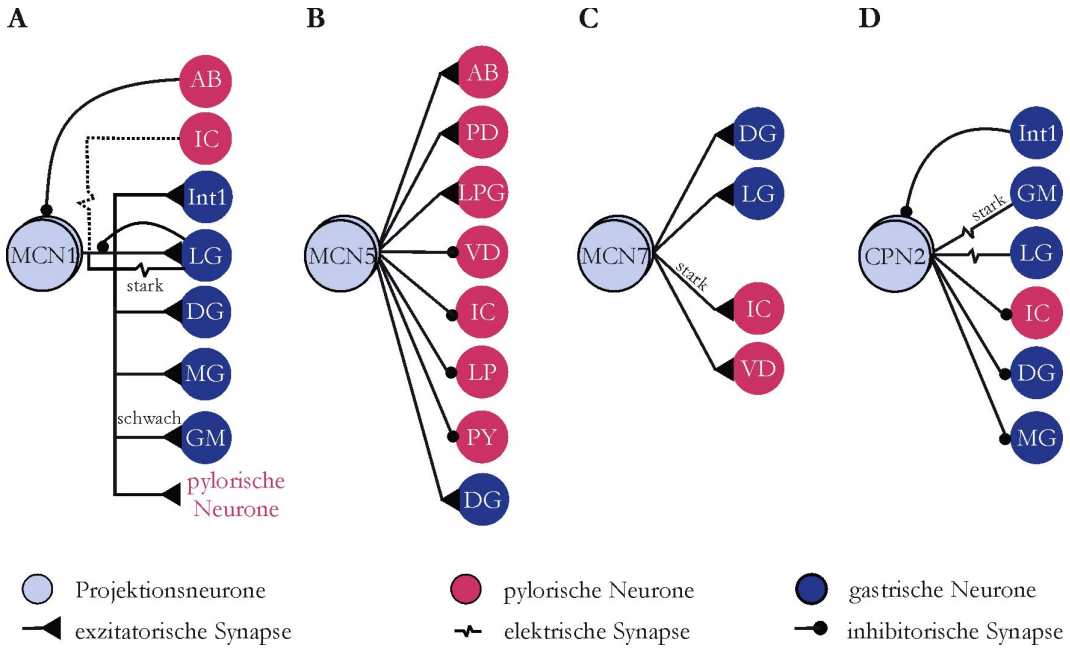


Abbildung 11: Synaptische Verbindungen zwischen den Projektionsneuronen in den Kommissuralganglien und den Neuronen im stomatogastrischen Ganglion. **A:** Das modulatorische Kommissuralneuron 1 (MCN1) erregt die pylorischen und gastrischen Neurone über chemische Synapsen. Die Terminale von MCN1 ist sowohl mit LG als auch mit IC elektrisch gekoppelt. Die MCN1 Terminale wird von LG präsynaptisch inhibiert. Das pylorische Schrittmacherneuron AB hemmt das räumlich weit entfernte Soma von MCN1. **B:** Das modulatorische Kommissuralneuron 5 (MCN5) erregt die pylorischen Schrittmacherneurone AB und PD sowie LPG. MCN5 hemmt die pylorischen Neurone LP, PY, VD und IC. Als einziges gastrisches Neuron wird DG von MCN5 erregt. **C:** Das modulatorische Kommissuralneuron 7 (MCN7) erregt die pylorischen Neurone VD und IC und die gastrischen Neurone LG und DG. **D:** Das kommissurale Projektionsneuron 2 (CPN2) erregt die gastrischen Neurone LG und GM über elektrische Synapsen und hemmt DG und das mediane gastrische Motoneuron (MG). Das pylorische Neuron IC wird ebenfalls gehemmt. Interneuron1 hat eine hemmende Synapse auf CPN2.

Die Aktivität aller vier bisher beschriebener Projektionsneurone wird durch verschiedene sensorische Neurone beeinflusst. Die ventralen kardialen Neurone (VCNs; Beenhakker and Nusbaum, 2004; Beenhakker et al., 2004) sind Mechanosensoren auf der Innenseite des Magens, welche wahrscheinlich den Füllungszustand des Vorderdarms messen. Die Axone der ca. 60 VCNs projizieren über den dorsalen posterioren gastrischen Nerven (*dpon*) zu den CoGs. In Beenhakker and Nusbaum, 2004 wurde gezeigt, dass die VCNs alle vier bisher identifizierten Projektionsneurone in den CoGs erregen, aber nur zwei dieser Neurone, nämlich MCN1 und CPN2, sind notwendig und hinreichend, um einen GMR auszulösen.

Ein weiteres sensorisches Neuron, das die Aktivität der Projektionsneurone beeinflusst, ist die bilaterale paarige gastrische Rezeptorzelle 2 (GPR2; Blitz et al., 2004; Beenhakker et al., 2005).

GPR2 ist ein Streckrezeptor, der durch die Kontraktion eines Muskels aktiviert wird, der gleichzeitig mit der Protraktion des Medianzahnes erregt wird. Die Axone des Rezeptors projizieren über *lvn* und *dvn* zum STG und über *stn* und *son* weiter zu den CoGs (Katz et al., 1989). Eine rhythmische Stimulation von GPR2 löst einen GMR aus, der für den Zeitraum der Reizung andauert. In Blitz et al. (2004) wurde gezeigt, dass GPR2 alle vier identifizierten Projektionsneurone erregt, und dass die Aktivität von MCN1 und CPN2 essentiell für das Auslösen eines GMR ist.

Die anteriore gastrische Rezeptorzelle (AGR) ist ein Muskelsehnenorgan, das die Aktivität des pylorischen und gastrischen Musters über Projektionsneurone in den CoGs beeinflusst (Smarandache, 2007). AGR, dessen Soma im STG lokalisiert ist, projiziert über den *stn* und die *son*s zu den CoGs und erregt dort CPN2 und MCN5. MCN1 wird dagegen gehemmt. Die MCN7 Aktivität wird auch von AGR beeinflusst. Es ist aber derzeit unklar, welcher Art der AGR Einfluss ist. Eine AGR Reizung entrained gastrische Rhythmen und kann sie auch auslösen. Die Aktivität von MCN7 und CPN2 war dabei hinreichend, um einen GMR auszulösen.

Die Information verschiedener Sinnesorgane konvergiert also auf Ebene der Projektionsneurone, und erlaubt damit eine adäquate Reaktion auf die vorliegende Situation. Neben sensorischer Information müssen auch höhere Zentren des Nervensystems, wie z.B. das Gehirn, in der Lage sein, motorische Muster zu steuern. In meiner Arbeit habe ich zwei vom Gehirn zum STNS projizierende Nervenzellen und deren Einfluss auf die motorischen Muster im STNS untersucht, die paarigen inferioren Ventrikularneurone (IV Neurone).

2.4 Die inferioren Ventrikularneurone (IV Neurone)

Die inferioren Ventrikularneurone, kurz IV Neurone, wurden schon in mehreren Brachyura, Palinura und Astacoidea Arten identifiziert und charakterisiert (Dando and Selverston, 1972; Sigvardt and Mulloney, 1982a; 1982b; Cazalets et al., 1987; Hooper and Moulins, 1990; Böhm et al., 2001; Christie et al., 2004). In Hummerarten werden diese Neurone aufgrund ihres Einflusses auf den pylorischen Rhythmus als „Pyloric supressor" Neurone, kurz PS Neurone, bezeichnet (Meyrand et al., 1994). Die Axone der IV bzw. PS Neurone projizieren über den inferioren Ventrikularnerv (*ivn*), einer Verbindung zwischen Gehirn und STNS, zum STNS. Zusätzlich zu den IV Neuronen projizieren in *Panulirus argus* (Dando and Selverston, 1972) und *Orconectes limosus* (Böhm et al., 2001) die Axone 6 weiterer Neurone durch den *ivn*. Die IV

Neurone sind allerdings die einzigen durch den *ivn* projizierenden Neurone mit im Gehirn lokalisierten Somata. In der bisher untersuchten Brachyura Art *Cancer borealis* waren die Zellkörper der IV Neurone im Gehirn nahe der Eintrittsstelle des *ivn*s lokalisiert, in den untersuchten Langusten und Astacidea Arten lagen die IV bzw. PS Somata dagegen im *ivn*. Die IV bzw. PS Neurone projizieren in *C. borealis* (Christie et al., 2004), *Panulirus interruptus* (Claiborne and Selverston, 1984) und im Hummer *Homarus gammarus* über den *ivn* zum STNS und dort über die *ion*s und *son*s zu den CoGs sowie über den *stn* zum STG. In der Languste *P. interruptus* und der nordamerikanischen Jonahkrabbe *C. borealis* konnte Histamin als Transmitter der IV Neurone nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in *C. borealis* ein Kotransmitter der IV Neurone identifiziert, das Neuropeptid FRLFamid (Christie et al., 2004).

Über die Aktivierung der IV bzw. PS Neurone im intakten Tier ist wenig bekannt. Lediglich in einer Art wurde die Aktivität des *ivn*s im freibeweglichen Tier untersucht. In *O. limosus* wurde die Aktivität der Neurone auf *ivn* und *dvn* während Fütterungsversuchen beobachtet (Böhm et al., 2001). Das Futter wurde den Tieren in einem Aquarium präsentiert. Bei Zugabe des Futters stieg die Aktivität auf dem *ivn* deutlich an (siehe Abbildung 12, schwarzer Pfeil). Nach Beginn der Futteraufnahme (schwarzer Balken in Abbildung 12) erhöhte sich die *ivn* Aktivität weiter, der pylorische Rhythmus wurde schneller und ein GMR begann. In diesen Versuchen wurde allerdings nicht zwischen der Aktivität der vom Gehirn absteigenden IV Neurone und den vom STNS aufsteigenden Neuronen unterschieden. Es ist daher nicht bekannt, ob eine Fütterung der Tiere die IV Neurone aktiviert, oder ob es vom STNS aufsteigende Neurone sind, deren Information an das Gehirn vermittelt wird.

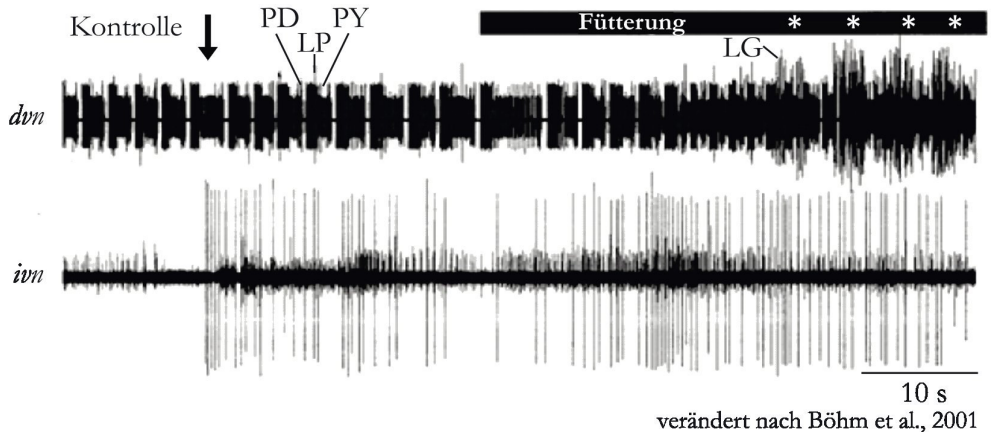
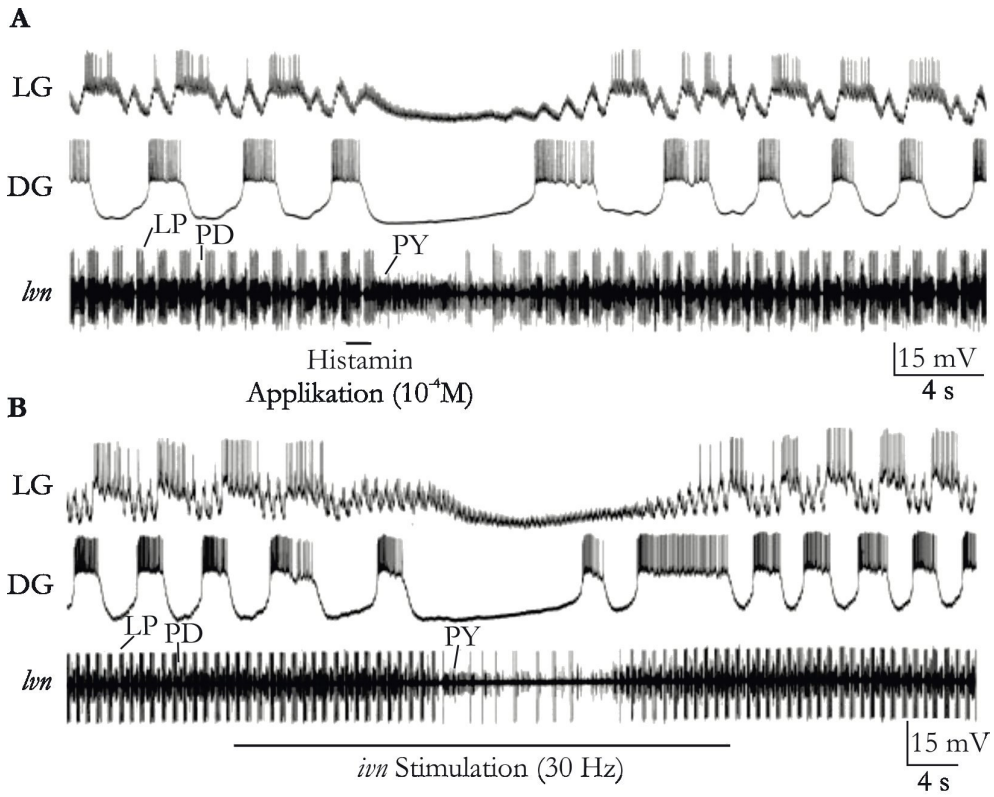


Abbildung 12: Fütterung von *O. limosus* erhöht die Aktivität auf dem *ivn* und löst einen GMR aus. Extrazelluläre Ableitungen des *ivn*s (untere Spur) und des *dvn*s (obere Spur) mit der Aktivität von PD, LP, PY und LG. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt an, an dem die Nahrung ins Aquarium gegeben wurde. Die Futteraufnahme ist durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Sterne markieren den Beginn der gastrischen Aktivität. Verändert nach Böhm et al. (2001).

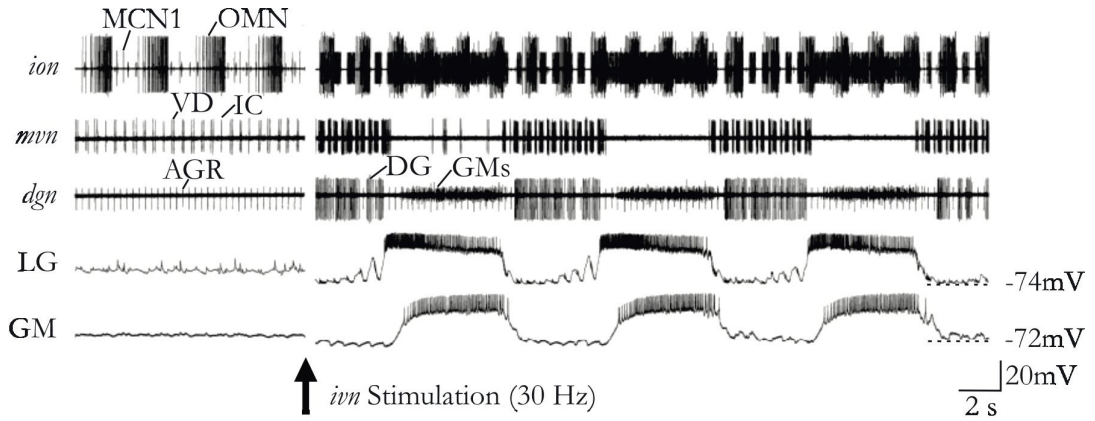
Der Einfluss der IV bzw. PS Neurone auf die zentralen Mustergeneratoren im isolierten STNS wurde dagegen in verschiedenen Krustazeenarten untersucht (Dando and Selverston, 1972; Sigvardt and Mulloney, 1982b; Cazalets et al., 1987; Hooper and Moulins, 1990; Meyrand et al., 1994; Böhm et al., 2001; Christie et al., 2004). In *C. borealis* z.B. werden pylorischer und gastrischer Rhythmus kurzzeitig unterbrochen wenn die IV Neurone gereizt werden (siehe Abbildung 13). Dies wird durch Histamin vermittelt. In diesen Versuchen waren die CoGs mit den Projektionsneuronen allerdings nicht vorhanden. Pylorischer und gastrischer Rhythmus wurden durch eine extrazelluläre Stimulation des MCN1 Axons (*ion* Reiz) ausgelöst.



verändert nach Christie et al., 2004

Abbildung 13: Histamin und IV Neuron Stimulation hemmen pylorischen und gastrischen Rhythmus im isolierten STG von *C. borealis*. Extrazelluläre Ableitung des *lvn*s (untere Spur) mit der Aktivität von LP, PD und PY und intrazelluläre Ableitungen von DG (mittlere Spur) und LG (obere Spur). GMR wurde durch eine tonische Stimulation (15 Hz) beider MCN1 Zellen ausgelöst. Die in LG sichtbaren postsynaptischen Potentiale (PSPs) repräsentieren PSPs von MCN1 (Coleman et al., 1995). **A:** Applikation von Histamin auf das STG Neuropil führt zur reversiblen Unterbrechung des GMR und des pylorischen Rhythmus. **B:** Extrazelluläre Stimulation des *ivn*s (30 Hz) führte zu einer Unterbrechung des pylorischen und gastrischen Rhythmus. Verändert nach Christie et al. (2004).

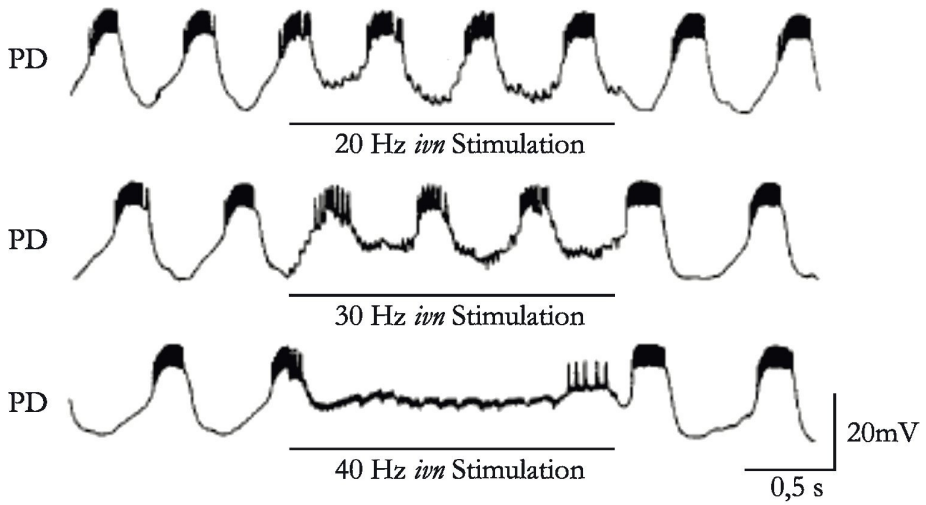
Christie et al. (2004) untersuchten nicht nur die Einflüsse der IV Neurone auf die zentralen Mustergeneratoren ohne die modulierende Wirkung der CoG Projektionsneurone. In Experimenten, in denen die CoGs mit den Projektionsneuronen vorhanden waren, löste eine Stimulation der IV Neurone hingegen einen gastrischen Mühlenrhythmus aus, der auch nach Ende der Stimulation für viele Minuten anhielt. Außerdem wurden pylorischer und oesophagealer Rhythmus stärker (siehe Abbildung 14). Durch Läsionsexperimente der Verbindungen zu den CoGs konnte festgestellt werden, dass das Auslösen eines GMR in *C. borealis* nicht direkt von den IV Neuronen gesteuert wird, sondern indirekt über Projektionsneurone in den CoGs vermittelt wird.



verändert nach Christie et al., 2004

Abbildung 14: IV Neuron Stimulation in *C. borealis* löst einen GMR aus, stärkt den pylorischen und oesophagealen Rhythmus und erregt MCN1 (Verändert nach Christie et al. (2004)). Intrazelluläre Ableitungen von GM (untere Spur) und LG (zweite Spur von unten) und extrazelluläre Ableitungen von pylorischem (*mvn*), gastrischem (*dgn*) und oesophagealem Rhythmus (*ion*) sowie der MCN1 Aktivität (*ion*). **Links:** Vor der *ivn* Stimulation war kein GMR spontanaktiv, der pylorische Rhythmus und MCN1 waren relativ schwach aktiv. Der oesophageale Rhythmus, wird über die Aktivität von OMN (größte Aktionspotentiale auf dem *ion*) beobachtet. **Rechts:** Durch die *ivn* Stimulation wurde ein GMR ausgelöst und der pylorische und oesophageale Rhythmus wurden gestärkt. Die MCN1 Aktivität nahm deutlich zu. Verändert nach Christie et al. (2004).

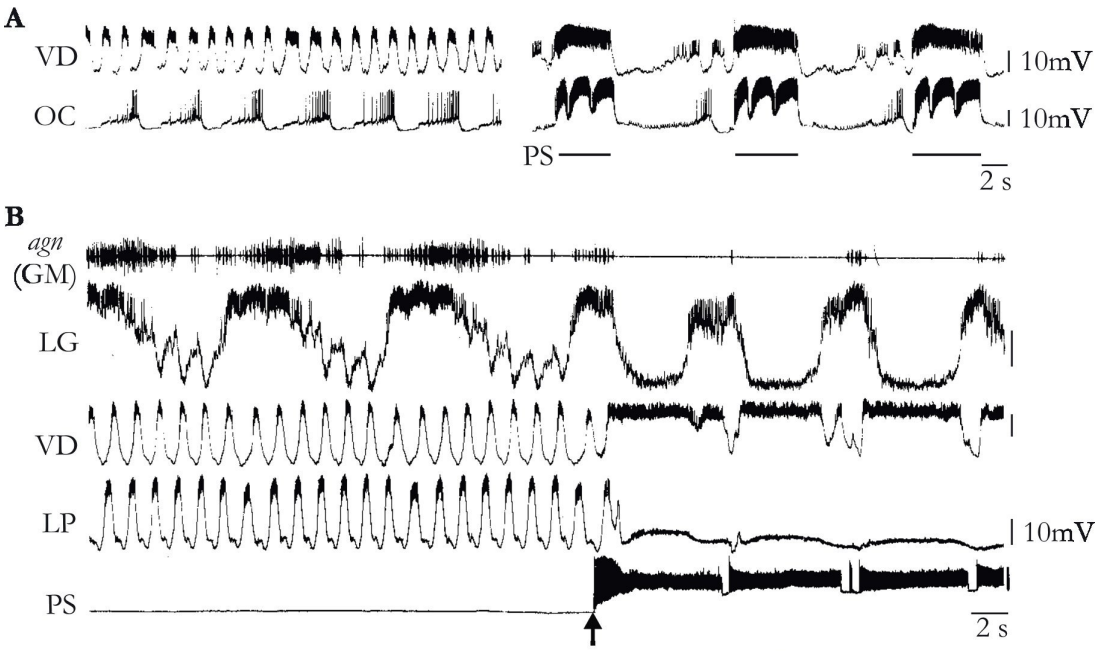
In der Languste *Panulirus interruptus* beeinflussen die IV Neurone ebenfalls das pylorische und gastrische Muster (Sigvardt and Mulloney, 1982b). Dabei wurden sowohl erregende als auch hemmende Einflüsse auf die STG Netzwerke beobachtet. Die Reizfrequenz der *ivn* Stimulation spielte dabei ebenfalls eine Rolle, wie in Abbildung 15 am Beispiel von PD dargestellt ist. Während eine Reizfrequenz von 20 oder 30 Hz keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die PD Aktivität hatte, verringerte eine 40 Hz *ivn* Stimulation die PD Aktivität stark.



verändert nach Sigvardt and Mulloney, 1982b

Abbildung 15: PD antwortet in *P. interruptus* unterschiedlich auf verschiedene *ivn* Reizfrequenzen. Intrazelluläre Ableitung von PD während verschiedener *ivn* Stimulationen. Eine Reizung des *ivn*s mit einer Frequenz von 20 Hz hat nur einen geringen Einfluss auf die PD Aktivität (obere Spur). Eine Stimulation mit einer Frequenz von 30 Hz erregt PD und eine *ivn* Reizfrequenz von 40 Hz verringert die PD Aktivität stark. Verändert nach Sigvardt and Mulloney (1982b).

Im europäischen Hummer *H. gammarus* löst eine Aktivierung der PS Neurone im isolierten Nervensystem aus den spontanaktiven pylorischen, gastrischen und oesophagealen Mustern ein einziges neues motorisches Muster aus (Meyrand et al., 1991). Dafür werden Neurone, die unterschiedlichen Netzwerken angehören und unabhängig voneinander agieren, zu einem neuen mustergenerierenden Netzwerk zusammengeschlossen, dessen resultierendes motorisches Muster sich vollständig von den generierten Mustern der einzelnen Netzwerke unterscheidet. Ein solches neu generiertes Muster ist in Abbildung 16 anhand intra- und extrazellulärer Ableitungen verschiedener pylorischer, gastrischer und oesophagealer Neurone dargestellt. Diese Ergebnisse aus *H. gammarus* zeigen, dass modulatorische Eingänge, wie in diesem Fall die PS Neurone, einen eigenen zentralen Mustergenerator festlegen können, der aus einzelnen Neuronen unterschiedlicher Herkunft besteht.



verändert nach Meyrand et al., 1991

Abbildung 16: Die PS Neurone lösen ein einziges neues motorisches Muster aus pylorischem, gastrischem und oesophagealem Rhythmus aus. A: Intrazelluläre Ableitung von VD (obere Spur) und OC (mittlere Spur) vor und während PS Aktivität. Die PS Neurone bilden aus pylorischem und oesophagealem Rhythmus einen einzigen, neuen Rhythmus. **B:** Intrazelluläre Ableitungen eines PS Neurons (untere Spur), von LP (zweite Spur von unten), VD (mittlere Spur) und LG (zweite Spur von oben) sowie eine extrazelluläre Ableitung des *agn*s mit der Aktivität von GM. Bei starker Depolarisation eines PS Neurons (Pfeil) feuert dieses in langen, sich wiederholenden Bursts. VD und LG beginnen sofort einen gemeinsamen neuen Rhythmus zu bilden. Die Aktivität von GM und LP nimmt dagegen ab bzw. wird ganz unterdrückt. Verändert nach Meyrand et al. (1991).

In *C. borealis* wurde gezeigt, dass die IV Neurone die Mustergeneratoren im STG indirekt über Projektionsneurone in den CoGs beeinflussen. Ob ein ähnlicher Mechanismus auch in anderen Krustazeenarten verwendet wird, um die zentralen Mustergeneratoren im STNS zu beeinflussen, wurde bisher nicht untersucht. Lediglich in einer weiteren Krustazeenart, in *H. gammarus*, wurde bisher ein erregender Effekt auf ein Projektionsneuron in den CoGs gezeigt (Meyrand et al., 1994).

2.5 Fragestellungen und Ziele

Die Anpassungsfähigkeit motorischer Muster an gegebene Umwelteinflüsse ist essentiell für das Auslösen eines adäquaten Verhaltens. Wie entscheidet aber das Gehirn, welche motorischen Muster generiert werden müssen, um das Verhalten an eine gegebene Situation anzupassen? Zur Selektion adäquater motorischer Muster müssen sensorische Informationen verschiedener Modalitäten gegeneinander abgewägt und zusammen mit der Information höherer Zentren so gewichtet werden, dass die funktional angepasste Aktivität veranlasst wird. In dieser Arbeit soll daher der Einfluss höherer neuronaler Zentren auf mustergenerierende Netzwerke geklärt werden. Dies soll am Beispiel des stomatogastrischen Nervensystems untersucht werden, dessen motorische Muster in früheren Arbeiten bereits beschrieben und charakterisiert wurden (Turrigiano and Heinzel, 1992; Marder and Calabrese, 1996; Nusbaum and Beenhakker, 2002). Meine Arbeit hat dabei drei Aspekte, die ich bearbeiten möchte: 1. die Erweiterung des Wissens über die Verarbeitung und die Mustergenerierung im STNS, 2. ein Vergleich des Einflusses absteigender Bahnen auf die Mustergeneration zwischen verschiedenen Krustazeenarten und anderer Organismen und 3. eine Darstellung allgemeiner Prinzipien zur Auswahl motorischer Muster aus multifunktionellen motorischen Zentren.

Das gastrische und pylorische Netzwerk im STG soll dabei als Beispiel für motorische Mustergeneration verwendet werden. Diese motorischen Muster werden von Projektionsneuronen in den CoGs moduliert, deren Aktivität eine wichtige Rolle bei der Selektion verschiedener motorischer Muster spielt (Norris et al., 1996; Blitz and Nusbaum, 1999; Wood et al., 2000; Nusbaum and Beenhakker, 2002). Als absteigende Bahn wurden die inferioren Ventrikularneurone (IV Neurone) gewählt, deren Einfluss auf die STG Mustergeneratoren bereits in verschiedenen Krustazeenarten beschrieben wurde (siehe Abschnitt 2.4; Dando and Selverston, 1972; Russell and Hartline, 1981; Marder and Eisen, 1984a; Cazalets et al., 1987; , 1990a; Hooper et al., 1990; Cazalets et al., 1990b; Meyrand et al., 1991; , 1994; Christie et al., 2004). Welche Informationen die IV bzw. PS Neurone verarbeiten und ob diese Zellen überhaupt Informationen vom Gehirn an das STNS übertragen wurde in den bisherigen Arbeiten nicht untersucht.

Im Taschenkrebs *C. pagurus* war bisher nur die Lage der IV Somata bekannt. Es stellte sich daher die Frage, ob die IV Neurone in *C. pagurus* an der Selektion verschiedener motorischer Muster beteiligt sind und eine ähnliche Wirkung auf die Mustergeneratoren im STNS haben

wie in den bisher untersuchten Krustazeenarten. Im Speziellen wurden folgende Fragen zur Klärung gestellt:

1) Gibt es morphologische Ähnlichkeiten zwischen den IV Neuronen in *C. pagurus* und in den bereits untersuchten Krustazeenarten?

   In der Brachyura Art *C. pagurus* konnte gezeigt werden, dass die Somata der IV Neurone im Gehirn lokalisiert sind (Christie et al., 2004). In Palinura und Astacidea Arten befanden sich die Somata dagegen im *ivn* (Dando and Selverston, 1972; Claiborne and Selverston, 1984; Cazalets et al., 1987; Böhm et al., 2001). Um die genaue Lage der IV Neuron Somata und deren axonale Projektionen in *C. pagurus* zu charakterisieren, sollen retrograde Färbungen in Kombination mit Frontalschnitten des Gehirns durchgeführt werden.

   Unterstützend sollen elektrophysiologische Ableitungen am isolierten Nervensystem aufzeigen, auf welchen Nerven (*ion*s, *son*s, *stn*) die Aktionspotentiale der IV Neurone nachgewiesen werden können.

2) Übertragen die IV Neurone Informationen vom Gehirn zum STNS und wenn ja, welche Art von Information wird übertragen?

   Um zu testen, ob über den *ivn* vom Gehirn Neurone absteigen, soll der *ivn* in intakten Tieren (*in vivo*) mit zwei extrazellulären Elektroden abgeleitet werden, um die Laufrichtung der Aktionspotentiale festzustellen.

   Im Flusskrebs *O. limosus* wurde gezeigt, dass sich die Aktivität der *ivn* Projektionen durch Futtergabe erhöht (Böhm et al., 2001). Ob es sich dabei um die IV Neurone handelt, wurde nicht überprüft. Daher soll überprüft werden, ob sensorische Einflüsse in *C. pagurus* ebenfalls eine Erhöhung der *ivn* Aktivität auslösen und ob es sich dabei um die IV Neurone handelt. Durch Präsentation verschiedener sensorische Reize soll dann bestimmt werden, welche Sinnesmodalität die IV Neurone vermitteln.

3) Welche Aktivität zeigen die IV Neurone?

   Das Aktivitätsmuster der IV Neurone (tonisch, rhythmisch, o.ä.) in intakten Tieren ist unbekannt. Um dieses zu messen, sollen die IV Neurone *in vivo* abgeleitet und die Aktivierung durch sensorische Reize getestet werden. Die resultierende Aktivität soll dann vergleichend dazu im isolierten STNS untersucht werden. In den Versuchen im isolierten Nervensystem soll zur Vereinfachung das Supraoesophagealganglion ("Gehirn") ausschließlich über den *ivn* mit dem STNS verbunden sein.

4) Wie beeinflussen die IV Neurone die motorischen Zentren im STNS?

   In diesen Versuchen soll vergleichend zu anderen Krustazeenarten aufgezeigt werden, ob die IV Neurone die drei in Krebsen auftretenden rhythmischen motorischen Muster beeinflussen, und wenn ja, auf welche Weise sie das tun.

   a) Pylorischer Rhythmus. Bisher konnte in den untersuchten Krustazeenarten ein meist hemmender Einfluss der IV Aktivität auf den pylorischen Rhythmus gezeigt werden. Um dies in *C. pagurus* zu untersuchen, sollen die IV Neurone extrazellulär gereizt und gleichzeitig verschiedene pylorische Neurone intrazellulär abgeleitet werden.

   b) Gastrischer Mühlenrhythmus. In *C. borealis* wurde gezeigt, dass eine Stimulation der IV Neurone einen lang anhaltenden gastrischen Mühlenrhythmus auslösen kann (Christie et al., 2004). Kann ein ähnlicher GMR auch in *C. pagurus* ausgelöst werden? Welche Eigenschaften besitzt dieser Rhythmus? Dazu sollen die IV Neurone extrazellulär gereizt werden und die Aktivität der verschiedenen gastrischen Neurone anhand extra- und intrazellulärer Ableitungen verfolgt werden.

      Gastrische Rhythmen können auch spontanaktiv sein. Der Einfluss der IV Neurone auf solche spontanaktiven gastrischen Mühlenrhythmen soll ebenfalls anhand extra- und intrazellulärer Ableitungen gastrischer Neurone während extrazellulärer *ivn* Stimulationen untersucht werden.

   c) Oesophagealer Rhythmus. In *C. borealis* (Christie et al., 2004) und in *H. gammarus* (Meyrand et al., 1991) konnte auch ein Einfluss auf den oesophagealen Rhythmus gezeigt werden. Um dies auch in *C. pagurus* zu untersuchen, soll das oesophageale Motoneuron sowohl intra- als auch extrazellulär während einer *ivn* Reizung abgeleitet werden und anhand seiner Aktivität die Charakteristika des Rhythmus und der Einfluss der IV Neurone auf diesen beschrieben werden.

5) Beeinflussen die IV Neurone die zentralen Mustergeneratoren direkt oder werden die Effekte indirekt vermittelt?

   In *C. borealis* konnte gezeigt werden, dass die IV Neurone neben dem STG auch die CoGs innervieren und dort mindestens ein modulatorisches Projektionsneuron aktivieren (Christie et al., 2004). In meiner Arbeit möchte ich den möglichen Einfluss der IV Neurone aufzeigen und feststellen ob die Projektionsneurone hinreichend und/oder notwendig zur Vermittlung der Effekte der IV Neurone sind. Im Zuge dieser Ableitungen sollen auch die synaptischen Verbindungen zwischen IV Neuronen und identifizierten Projektionsneuronen charakterisiert werden. Es sollen daher verschiedene Projektionsneurone intrazellulär während einer extrazellulären IV Neuron Stimulation ab-

geleitet werden. Zum Test, ob die Projektionsneurone hinreichend bzw. notwendig sind, um den Effekt der IV Neurone auf die STG Netzwerke zu vermitteln, sollen zusätzlich Läsionsexperimente durchgeführt werden, in denen selektiv der Einfluss bestimmter Projektionsneurone entfernt wird.

6) Können Histamin und FLRFamid als Transmitter der IV Neurone zu den Effekten der IV Neurone beitragen?

   In *C. borealis* enthalten die IV Neurone die Kotransmitter Histamin und FLRFamid (Christie et al., 2004). Histamin vermittelt dabei den inhibitorischen Effekt auf den pylorischen Rhythmus. Daher möchte ich in meinen Versuchen mit einem Histamin-Antagonisten testen, ob auch in *C. pagurus* Histamin an der Wirkung der IV Neurone beteiligt ist. Dazu soll der kompetitive Histamin-Antagonist Cimetidin auf das STG appliziert und anschließend eine IV Neuron Reizung durchgeführt werden.

   Weimann et al., (1993) zeigten, dass eine Applikation von FLRFamid auf das STNS einen gastrischen Rhythmus auslöst. Eine Applikation ausschließlich auf das STG löst keinen GMR aus, was zur Hypothese führte, dass FLRFamid hauptsächlich die Projektionsneurone in den CoGs beeinflusst. Dies soll nun untersucht werden. Dazu wird FLRFamid ausschließlich auf die CoGs appliziert und der Effekt auf CoG Projektionsneurone und motorische Muster im STG anhand von extra- und intrazellulären Ableitungen untersucht.

7) Können allgemeine Prinzipien der Verarbeitung sensorischer und vom Gehirn absteigender Information im Hinblick auf die Selektion motorischer Muster gewonnen werden? Dazu sollen vergleichend zu anderen Systemen die zusammengefassten Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert werden.

3 Material und Methoden

Der Einfluss höherer neuronaler Zentren auf die Selektion verschiedener motorischer Muster wurde am Beispiel des stomatogastrischen Nervensystems des Taschenkrebses *Cancer pagurus* untersucht. Alle Tiere wurden über die Firma Feinfisch in Neu-Ulm bezogen und bis zu den Experimenten in Salzwasseraquarien der Universität Ulm bei einer Wassertemperatur von 11°C und einer Salzdichte (künstliches Meersalz, Reefsalt, AquaMed) von 1,025 g/cm^3 (=35 g Salz in 1 Liter deionisiertem Wasser gelöst) gehalten. Alle durchgeführten Experimente wurden nach den Anforderungen der „Principles of animal care", publication No. 86-23, revised 1985, des National Institute of Health und des deutschen Gesetzes zur Tierhaltung und Tierexperimenten durchgeführt.

3.1 Verwendete Lösungen

3.1.1. Ringerlösung

Das Präparat wurde zu allen Zeiten in isotonischer Ringerlösung aufbewahrt. Während der Experimente wurde das isolierte Nervensystem mit dieser Ringerlösung perfundiert. Die Temperatur betrug dabei 10-13°C und wurde durch ein Peltierelement (Aufbau nach Nadim, Rutgers University NJ, USA) konstant bei dieser Temperatur gehalten. Während *in vivo* Experimenten wurden die Bereiche, an denen der Carapax des Tieres geöffnet wurde, mit dieser Ringerlösung perfundiert. Die Ringerlösung wurde aus folgenden Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen hergestellt:

Substanz	**Konzentration [$\frac{mMol}{l}$]**
NaCl	440
KCl	11
$CaCl_2 \bullet 2H_2O$	13
$MgCl_2 \bullet 6H_2O$	26
Trisma Base	12
Maleinsäure	5

Die isotonische Ringerlösung wurde anschließend mit Maleinsäure oder 1N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt.

3.1.2. Ringerlösung mit hoher Konzentration an divalenten Kationen (HiDi)

Um polysynaptische Verbindungen im stomatogastrischen Nervensystem zu blockieren, wurde eine Ringerlösung mit einer hohen Konzentration an divalenten Kationen (High divalent Saline (HiDi) mit 5 * Calcium und 5 * Magnesium, , Blitz and Nusbaum, 1999) verwendet. Während Perfusion mit dieser Ringerlösung wird die Aktionspotentialschwelle aller Zellen erhöht, d.h. es können nur erschwert Aktionspotentiale gebildet werden. Bei einer polysynaptischen Verbindung, d.h. bei einer Verbindung, bei der mindestens drei Zellen hintereinander verschaltet sind, können zwar durch Strominjektion in die erste Zelle in der darauf folgenden postsynaptischen Zelle noch postsynaptische Potentiale (PSPs) ausgelöst werden, diese PSPs können aber in weiteren nachgeschalteten Zellen nicht mehr registriert werden. Dadurch können Verbindungen genauer charakterisiert werden.
Diese Ringerlösung mit hoher Konzentration an divalenten Kationen wurde aus folgenden Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen hergestellt:

Substanz	**Konzentration [$\frac{mMol}{l}$]**
NaCl	439.0
KCl	11
$CaCl_2 \bullet 2H_2O$	64.5
$MgCl_2 \bullet 6H_2O$	130
Trisma Base	12
Maleinsäure	5

Die Ringerlösung wurde anschließend mit Maleinsäure oder 1N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt.

3.1.3. Ringerlösung mit niedriger Konzentration an Kalzium-Kationen

Um chemische Synapsen zu blockieren wurde eine Ringerlösung mit einer niedrigen Konzentration an Kalzium-Ionen (LowCa^{2+} Ringerlösung) verwendet (Blitz and Nusbaum, 1997). Chemische Synapsen benötigen Kalzium-Ionen, um ihre Neurotransmitter aus den synaptischen Endköpfchen ausschütten zu können. Bei Entfernen der Kalzium-Ionen aus der

Ringerlösung wird die Ausschüttung von Transmitter verhindert und die Signalübertragung unterbrochen. Elektrische Synapsen dagegen benötigen keine Kalzium-Ionen für die Signalübertragung, eine Übertragung kann daher auch in Low-Ca^{2+}-Ringerlösung stattfinden.

Diese Ringerlösung mit niedriger Konzentration an Kalzium-Ionen wurde aus folgenden Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen hergestellt:

Substanz	**Konzentration [$\frac{mMol}{l}$]**
NaCl	440
KCl	11
$CaCl_2 \bullet 2H_2O$	0.1
$MgCl_2 \bullet 6H_2O$	39.0
Trisma Base	11.2
Maleinsäure	5.1

Die Ringerlösung wurde anschließend mit Maleinsäure oder 1N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt.

3.1.4. Verwendung des Histamin-Blockers Cimetidin und des Neuropeptids FLRFamid

Der inhibitorische Neurotransmitter Histamin sowie der Peptid-Kotransmitter FLRFamid (TNRNFLRFamid, Bachem, Weil am Rhein, Deutschland) wurden in *C. borealis* als mögliche Neuromodulatoren der IV Neurone beschrieben (Christie et al., 2004). Daher wurde der Einfluss beider Substanzen auf das stomatogastrische Nervensystem (STNS) untersucht. Die Wirkung von Histamin im STNS wurde dabei durch den kompetitiven, reversiblen Histamin-Antagonist Cimetidin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) blockiert. Der Histamin-Blocker Cimetidin wurde in einer Konzentration von $5x10^{-3}$ M (nach Christie et al., 2004), das Peptid FLRFamid in einer Konzentration von 10^{-6} M (nach Weimann et al., 1993) auf das STNS appliziert. Unmittelbar vor der Applikation wurden beide Substanzen in isotonischer Ringerlösung gelöst und, falls erforderlich, mit 1N NaOH auf einen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt.

3.2 Färbeprotokolle

3.2.1. Retrograde Färbung mit Nickelchlorid ($NiCl_2$) und Kobaltchlorid ($CoCl_2$)

Die Lage der IV Neurone im Gehirn, als auch deren Projektionen, wurden mit Hilfe retrograder Füllungen folgender Nerven mit $NiCl_2$ ($NiCl_2$ Backfills) oder $CoCl_2$ ($CoCl_2$ Backfills) durchgeführt: *ivn*, *stn*, *ion*, *son*. Dazu wurde folgendes Versuchsprotokoll angewendet:

- Das stomatogastrische Nervensystem (STNS), welches über den *ivn* mit dem Gehirn verbunden ist, wurde in einer Petrischale ausgepinnt und eine Vaselinewanne um den zu färbenden Nerv angebracht.
- Der Nerv wurde anschließend mit einer Schere durchtrennt.
- Die Wanne wurde mit destilliertem Wasser gespült und für 3-5 min inkubiert, damit der Nerv aufquellen konnte.
- Anschließend wurde die Vaselinewanne mit einer $NiCl_2$ oder $CoCl_2$ Lösung (8 % in destilliertem H_2O) gefüllt und für mind. 15 Stunden im Kühlschrank inkubiert.
- Die Vaselinewanne wurde entfernt und das Präparat wurde mehrmals mit Ringer gespült.
- Anschließend wurden 5 bis 10 Tropfen pro 10ml Ringerlösung (entspricht 20 bis 25 Tropfen pro Petrischale) Dithiooxamid ($NH_2CSCS\ NH_2$) in die Petrischale gegeben; Ni^{2+} bzw. Co^{2+} bildete mit zwei Dithiooxamidmolekülen einen Komplex und fiel blau (für Nickel) bzw. rot (für Kobalt) aus.
- Nach 20 bis 30 min wurde mehrmals mit Ringerlösung gespült.
- Das Präparat wurde in 4 % Paraformaldehyd fixiert (mind. 1 Stunde) und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (mit Ethanol) entwässert.
- Alkoholreihe: Ethanol 30%ig 5 min
- Ethanol 50 %ig 5 min
- Ethanol 70 %ig mindestens 1 h
- Ethanol 90 %ig 5 min
- Ethanol 100 %ig 5 min

- Das Präparat wurde auf einen Objektträger überführt und für 5 min mit Salicylsäure-methylester aufgeklart.
- Anschließend wurden die gefärbten Zellen im Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) betrachtet und mit einer Kamera (CCD-1300B, Vosskühler, Osnabrück, Deutschland) fotografiert.

3.2.2. Retrograde Färbung mit Lucifer Yellow CH Dilithium Salz (LY)

Um die genaue Lage der IV Neurone im Gehirn auch in der Tiefe bestimmen zu können, wurden diese mit Lucifer Yellow (Abbildung 17, LY, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) über den *ivn* retrograd gefärbt (LY Backfill). Anschließend wurden Horizontalschnitte des Gehirns angefertigt (Schnittdicke 10µm, siehe Abbildung 18). Da es sich bei Lucifer Yellow um einen Fluoreszenzfarbstoff handelt, wurden die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet und fotografiert.

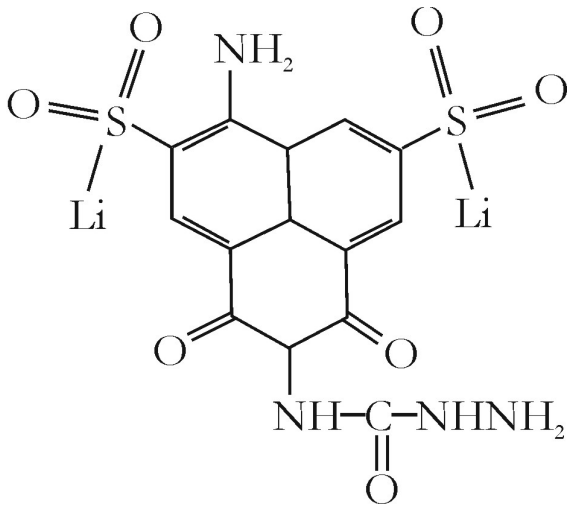


Abbildung 17: Strukturformel Lucifer Yellow CH Dilithium Salz (LY, $C_{13}H_9Li_2N_5O_9S_2$).

Für die Färbung der Zellen wurde das folgende Färbeprotokoll verwendet:

- Das Gehirn wurde in einer Petrischale ausgepinnt und eine Vaselinewanne um den *ivn* angebracht.
- Der *ivn* wurde anschließend mit einer Schere durchtrennt.
- Die Wanne wurde mit destilliertem Wasser gespült und für 3 bis 5 min stehen gelassen, damit der Nerv aufquellen konnte.

- Anschließend wurde die Vaselinewanne mit einer LY ($C_{13}H_9Li_2N_5O_9S_2$)-Lösung (5% in destilliertem H_2O) gefüllt und für mindestens 15 Stunden inkubiert.
- Die Vaselinewanne wurde entfernt und das Präparat in 4% Paraformaldehyd fixiert (mindestens 1 Stunde) und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (siehe Abschnitt 3.2.1).
- Das Präparat wurde auf einen Objektträger überführt und für 5 min mit Salicylsäure-methylester aufgeklart.
- Um das Gehirn schneiden zu können wurde dieses in Parafin eingebettet und anschließend geschnitten. Die Dicke der Schnitte betrug dabei 10 µm. Als Referenz-Schnittebene wurde die Stelle definiert, an der die beiden Hemisphären aufeinander trafen (siehe Abbildung 18).
- Schließlich wurden die gefärbten Zellen und Axone im Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) betrachtet und fotografiert.

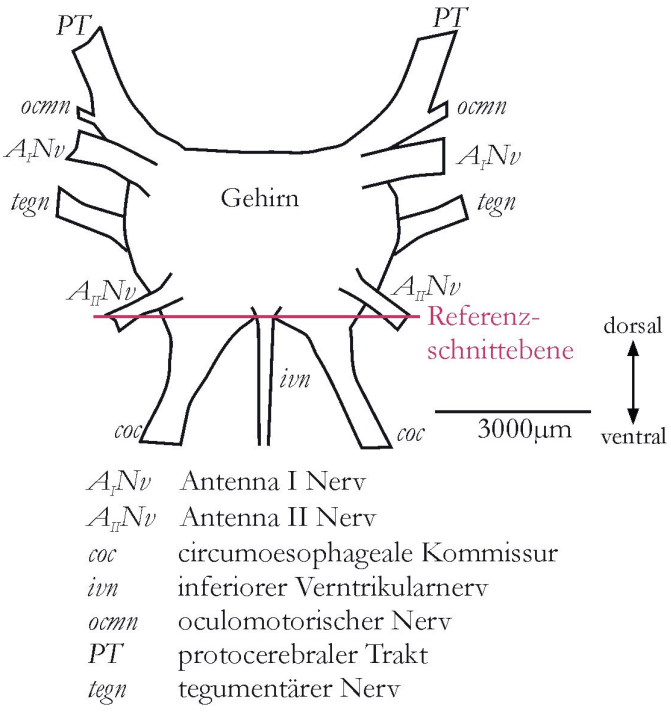


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Gehirns. Die Referenzschnittebene ist in rot eingezeichnet. Diese liegt dabei in dem Bereich, in dem die beiden Hemisphären aufeinander treffen. Die Somata der beiden IV-Neurone sind nahe der Eintrittsstelle des *ivn*s lokalisiert.

3.3 Präparationen

3.3.1. *in vivo* Präparation

Für die *in vivo* Versuche wurde das Tier zunächst ca. 20 min auf Eis betäubt. Anschließend wurden die vier Beinpaare und das Scherenpaar mit Gummibändern fixiert und das Tier in einer Halterung angebracht (siehe Abbildung 20A, B). Die in einer kühlbaren Box befestigte drehbare Krebshalterung wurde von Herrn Prof. H.G. Heinzel (Zoologisches Institut, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Ziel dieser Präparation war es, eine Hakenelektrode am *dvn* und zwei am *ivn* anzubringen.

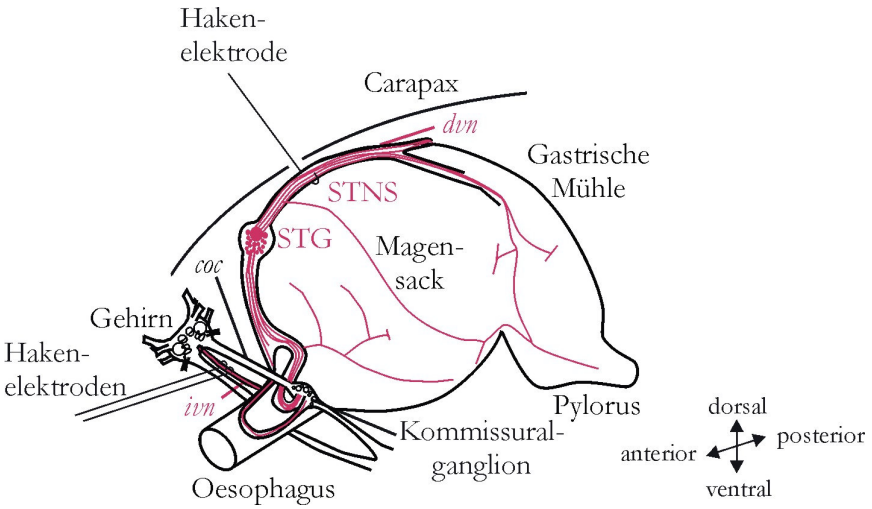


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Kaumagens mit den Hakenelektroden an *dvn* und *ivn*. Verändert nach Katz and Harris-Warrick, 1989.

Präparation der Dorsalseite:

Eine Hakenelektrode wurde an den dorsalen Ventrikularnerv (*dvn)* angebracht, um den gastrischen und den pylorischen Rhythmus beobachten zu können (Abbildung 19). Für Fütterungsversuche wurde dem Krebs ein Schlauch in den Schlund eingeführt (siehe Abbildung 20A und B). Der Krebs wurde in der Halterung auf die Dorsalseite gedreht (siehe Abbildung 20C) und der Bereich, der geöffnet werden sollte, markiert (siehe Abbildung 20D). Die unebene Oberfläche des Carapax wurde im markierten Bereich mit Sekundenkleber (Sekundenkleber blitzschnell; Conrad, Hirschau, Deutschland) behandelt, dadurch konnte während der anschließenden Präparation das Insektenwachs (Mischungsverhältnis: 20% Bienenwachs zu 80% Kollophonium) besser haften (siehe Abbildung 20D). Anschließend

wurde ein Fenster im Carapax mit einem Bohr- und Fräsgerät (MICROMOT 50/EF, Firma Proxxon) eröffnet (siehe Abb. 3E).

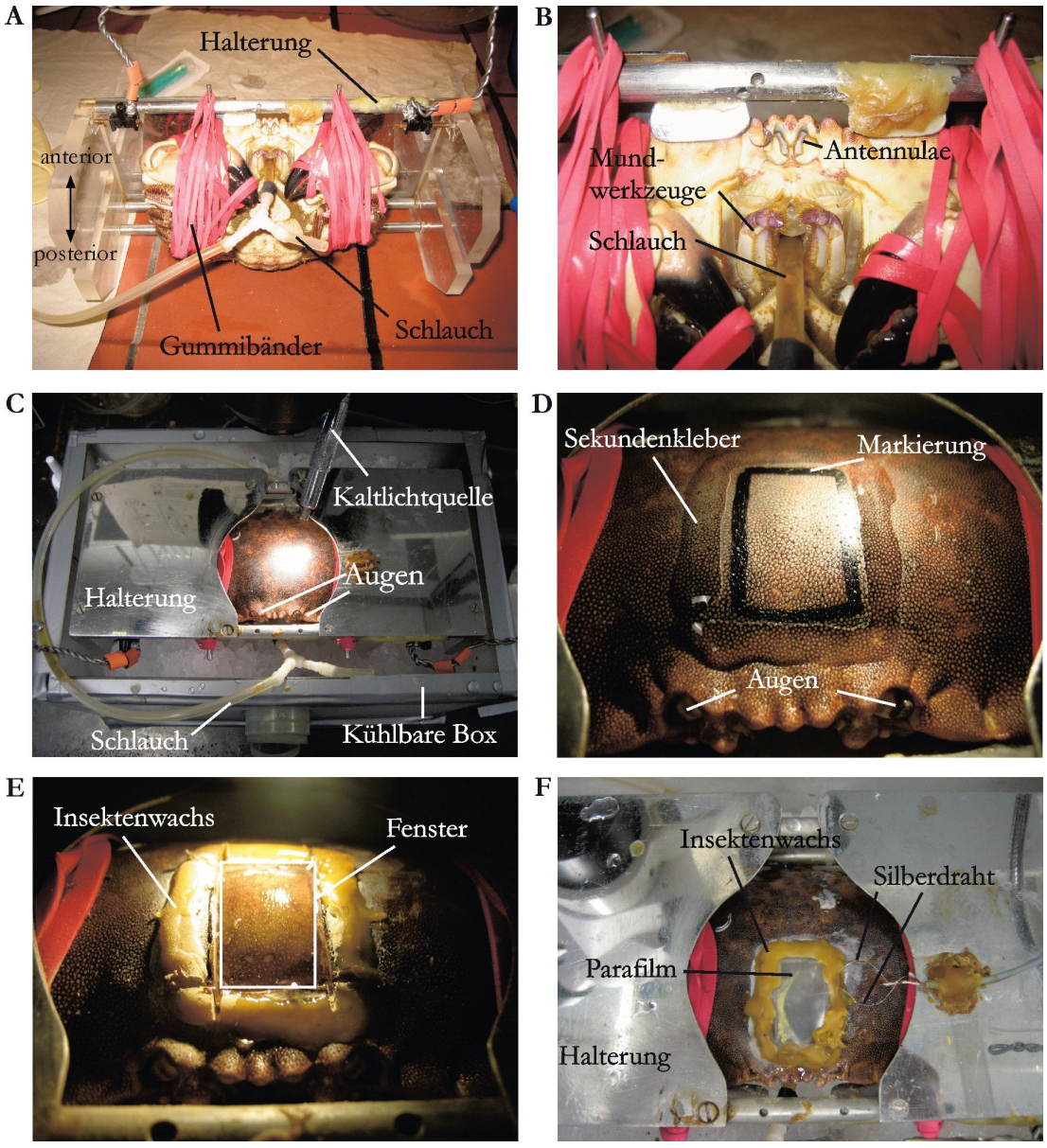


Abbildung 20: Verschiedene Ansichten der *in vivo* Präparation des dorsalen Ventrikularnervs (*dvn*). **A:** Ventrale Ansicht des Krebses, der mit Gummibändern an der Halterung fixiert wurde. **B:** In den Schlund eingeführter Schlauch für Fütterungsversuche. **C-F:** Dorsalansicht des Krebses. **C:** Dorsalansicht des Krebses in der Versuchsbox. **D:** Der zu öffnende Bereich wurde markiert. Die Ränder wurden mit Sekundenkleber versehen um eine bessere Befestigung des Insektenwachses zu ermöglichen. **E:** Insektenwachs wurde angebracht und der markierte Bereich des Carapax geöffnet. **F:** Anschließend wurde die Hakenelektrode angebracht und die Öffnung mit Parafilm verschlossen.

Die Hypodermis oberhalb des STNS wurde entfernt, der *dvn* freigelegt und auf einen aus Silberdraht geformten Haken (Durchmesser 0,075 mm, Isolierung Polytetrafluorethylen (Teflon, PTFE); Isolationsstärke 0,010 mm, Good Fellow, Cambridge, England) gelegt, welcher mit Insektenwachs am Carapax befestigt wurde. Der Nerv wurde trocken gelegt und mit einem Gemisch aus Sylgard (ELASTOSIL RT-601, Wacker, München, Deutschland) und einem Härtungsbeschleuniger (Katalysator EP, Wacker, München, Deutschland) isoliert. Das Fenster wurde mit Parafilm und Insektenwachs wieder verschlossen (siehe Abbildung 20F).

Präparation der Ventralseite:

Die Aktivität des inferioren Ventrikularnervs (*ivn*) wurde mit zwei Haken abgeleitet, um die Laufrichtung der Aktionspotentiale bestimmt zu können (siehe Abbildung 21). Wie in Abbildung 21A zu sehen wurde der Krebs in der Halterung auf die Ventralseite gedreht und die Kiemen mit Zellstoff fixiert, um störende Bewegungen zu verhindern (siehe Abbildung 21B). Anschließend wurde ein kleiner Bereich, wie in Abbildung 21B schematisch dargestellt, geöffnet. Die Hypodermis oberhalb des Gehirns wurde vorsichtig entfernt und zwei Hakenelektroden am *ivn* angebracht (siehe Abbildung 21C). Die aus Silberdraht gefertigten Hakenelektroden wurden mit Insektenwachs an einer Pasteurpipette fixiert und an einem Mikromanipulator angebracht (siehe Abbildung 21D), um den freigelegten *ivn* in der ca. 0,5 cm großen Öffnung gezielt aufhaken zu können. Der *ivn* wurde anschließend trocken gelegt und mit Sylgard (ELASTOSIL RT-601, Wacker, München, Deutschland) und einem Härtungsbeschleuniger (Katalysator EP, Wacker, München, Deutschland) isoliert. In Abbildung 21C ist der geöffnete Bereich mit den Hakenelektroden dargestellt.

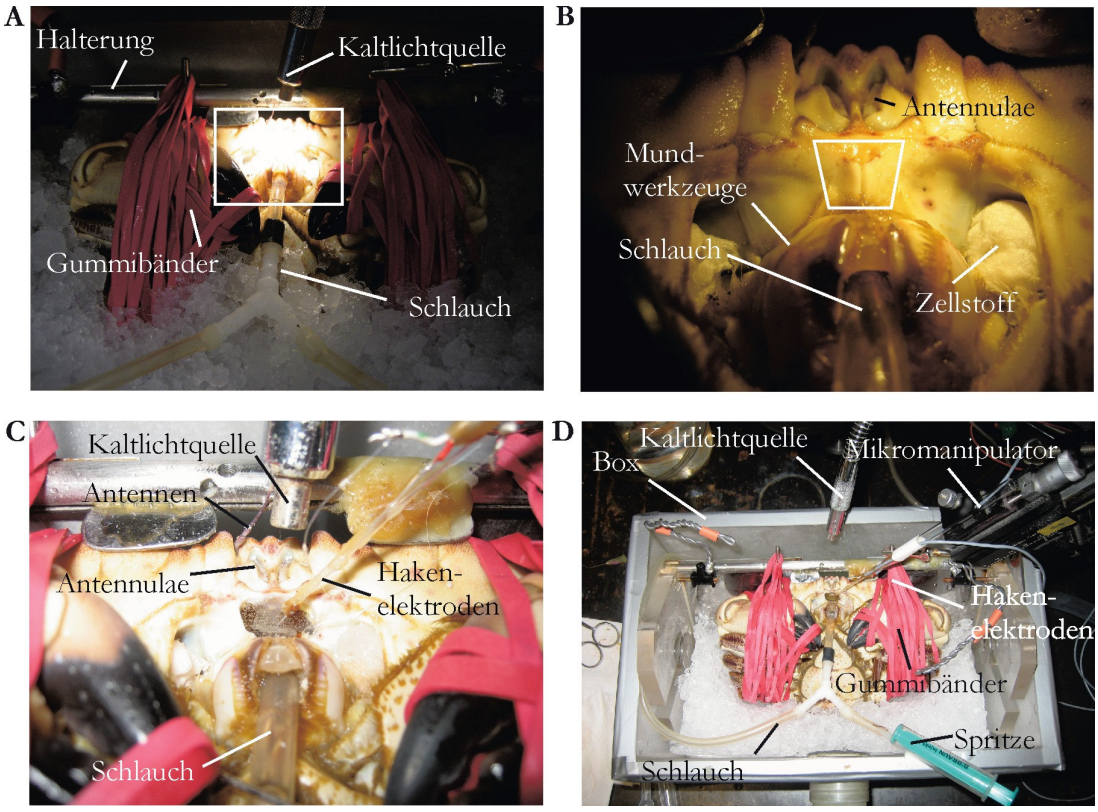


Abbildung 21: *in vivo* Präparation des inferioren Ventrikularnervs (*ivn*). **A:** Aufsicht auf Ventralseite des Krebses in der drehbaren Box. **B:** Vergrößerung aus A (weißes Rechteck). Der gekennzeichnete Bereich wurde anschließend mit einem Bohr- und Fräsgerät geöffnet. **C:** Hakenelektroden am *ivn*. **D:** Krebs auf Eis in drehbarer Versuchsbox. Die Hakenelektroden befinden sich an einem Mikromanipulator.

3.3.2. *in vitro* Präparation

Die Versuchstiere (Abbildung 22A) wurden 20 bis 40 min auf Eis betäubt, bevor der Magen mit dem stomatogastrischen Nervensystem aus dem Tier präpariert wurde. In einigen Präparaten wurde das Gehirn mit dem STNS aus dem Tier präpariert. Die gesamte Präparation wurde in gekühlter Ringerlösung durchgeführt (Stein et al., 2005). Zunächst wurden die vier Beinpaare sowie das Scherenpaar mit einer Hohlmeißelzange (Hartmann, 15 cm, 5 mm HLW-Deutschland) entfernt (siehe Abbildung 22B). Außerdem wurden die Mundwerkzeuge bestehend sowohl aus erstem, zweitem und drittem Kieferfußpaar, als auch aus erstem und zweitem Maxillenpaar und den Mandibeln, entfernt (siehe Abbildung 22C).

Um den Kaumagen isolieren zu können, wurde der Carapax seitlich geöffnet und vorsichtig mit einem Spatel von der Hypodermis und den dort ansetzenden Muskeln gelöst (siehe Abbildung 22D). Der Carapax wurde bis hin zur Herzregion (siehe Abbildung 22E) entfernt.

In Tieren, in denen das STNS mit intaktem Gehirn präpariert wurde, wurde anschließend die ophthalmische Arterie, in der sich das stomatogastrische Ganglion befindet und durch welche Hämolymphe zum Gehirn transportiert wird, durchtrennt (siehe Abbildung 22F) und für 5 bis 10 min mit gekühlter Ringerlösung perfundiert. Dies war für die Erhaltung der neuronalen Aktivität im Gehirn notwendig (M.P. Nusbaum, persönliche Mitteilung). Nach Entfernen des Augen- und Mundbereichs mit Hilfe einer Hohlmeißelzange (Abbildung 22G) wurde der Magen am Schlund mit Hilfe einer Venenklemme gehalten (Abbildung 22H). Auf der ventralen Seite des Tieres wurden Bindegewebe, Sehnen und Muskeln durchtrennt und der Magen aus dem Tier gelöst. Der Kaumagen wurde caudal der Ampullen, die sich am Ende des Pylorus befinden, durchtrennt. Der Magen wurde anschließend an der ventralen Seite vom Schlund bis hin zu den Ampullen eröffnet, außerdem erfolgten zwei Lateralschnitte vom Magensack ausgehend bis hin zur gastrischen Mühle, durch die der Magen vollständig geöffnet wurde (Abbildung 22H). Da sich das stomatogastrische Nervensystem auf der Dorsalseite des Magens befindet wurde der Magen mit der Mageninnenseite nach unten flach in eine mit Kohle geschwärztem Sylgard (ELASTOSIL RT-601, Wacker, München, Deutschland) gefüllten Schale ausgepinnt (siehe Abbildung 22I). Die beiden Lateralzähne sowie der Medianzahn der gastrischen Mühle wurden entfernt, da sie das flache Auspinnen behindert hätten. Nach Entfernen der Muskeln und der Magenwand konnte das isolierte stomatogastrische Nervensystem mit oder ohne Gehirn in einer mit durchsichtigem Sylgard gefüllten Petrischale flach ausgepinnt werden. Das Gehirn war dabei ausschließlich über den *ivn* mit dem STNS verbunden. Die obere Ganglienhaut wurde vorsichtig mit einer Moria Feinschere (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) entfernt, um zu gewährleisten, dass die applizierten Ringerlösungen bzw. Substanzen (siehe 3.1) bestmöglichen Zugang zu den Zellen im stomatogastrischen Ganglion bzw. den Kommissuralganglien hatten. Dadurch lagen die Somata der Neurone frei und waren somit auch besser zugänglich für die intrazellulären Ableitungen.

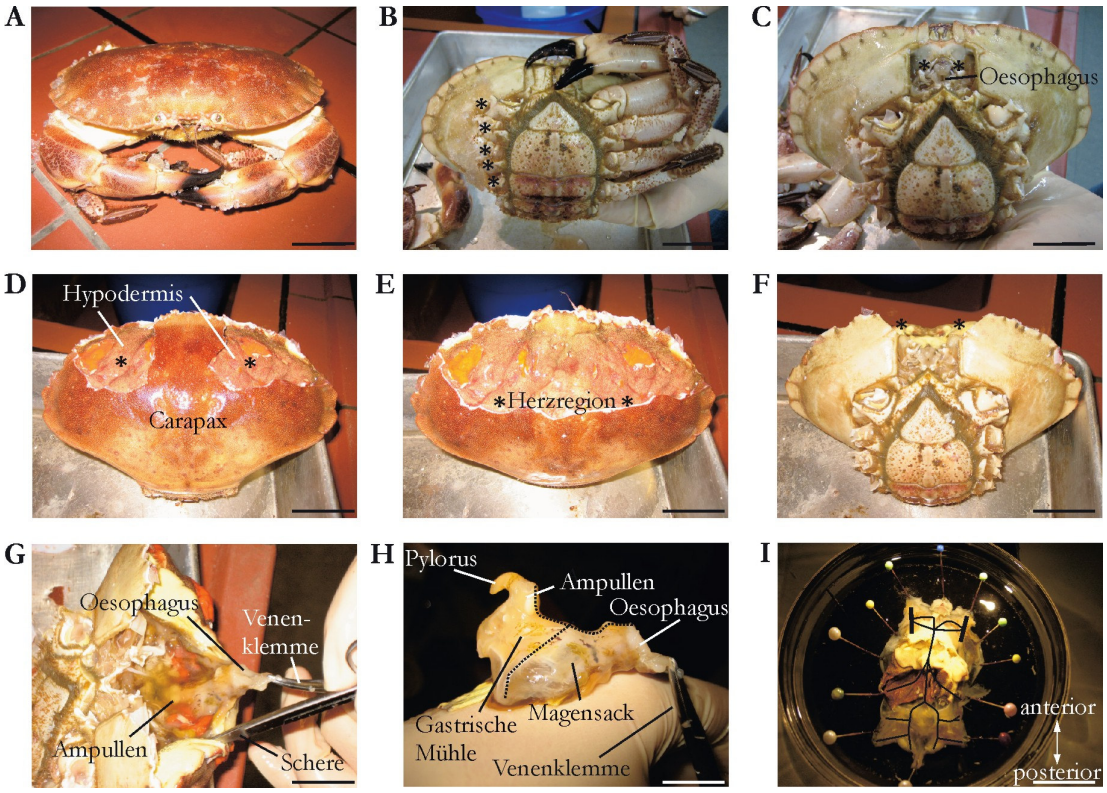


Abbildung 22: Präparation des STNS. **A:** Dorso-rostrale Ansicht des Taschenkrebses *Cancer pagurus*, weiblich. **B:** Ventralansicht des Taschenkrebses. Die vier Beinpaare und das Scherenpaar wurden einseitig entfernt (*). **C:** Alle Mundwerkzeuge wurden entfernt (*). **D:** Dorsalansicht des Taschenkrebses. Seitliches Entfernen des Carapax (*) nach vorsichtigem Entfernen der Hypodermis vom Carapax. **E:** Carapax wurde bis hin zur Herzregion entfernt (*). **F:** Entfernen des Augen- und Mundbereichs (*). **G:** Herauspräparieren des Kaumagens aus dem Tier. Der Oesophagus wird mit einer Venenklemme fixiert. **H:** Seitliche Ansicht des Kaumagens mit Oesophagus, Magensack, gastrischer Mühle und Pylorus. Die Schnittebenen zur Eröffnung des Magens sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. **I:** Der Magen wurde anschließend mit der Außenseite nach oben in einer mit Ringer gefüllten Schale fixiert. Das stomatogastrische Nervensystem ist schematisch dargestellt. Maßstab: 2 cm.

3.4 Versuchsaufbau

Das isolierte stomatogastrische Nervensystem wurde in einer mit Sylgard (ELASTOSIL RT-601, Wacker, München, Deutschland) gefüllten Petrischale mit Pins befestigt. Die Petrischale wurde in einem Plexiglasständer im Setup mit Knetmasse befestigt (siehe Abbildung 23). Das Nervensystem wurde kontinuierlich mit gekühlter isotonischer Ringerlösung (10-12°C) mit einer konstanten Geschwindigkeit von 7-12ml/min perfundiert. Die Beleuchtung des Präparats fand mit Hilfe einer Kaltlichtquelle statt. Dabei wurde das Licht mit Hilfe eines Spiegels von unten auf die Petrischale geleitet. Für intrazelluläre Ableitungen wurde zusätzlich ein Dunkelfeldkondensor (Nikon, Tokyo, Japan) verwendet, um die einzelnen Somata besser sichtbar zu machen.

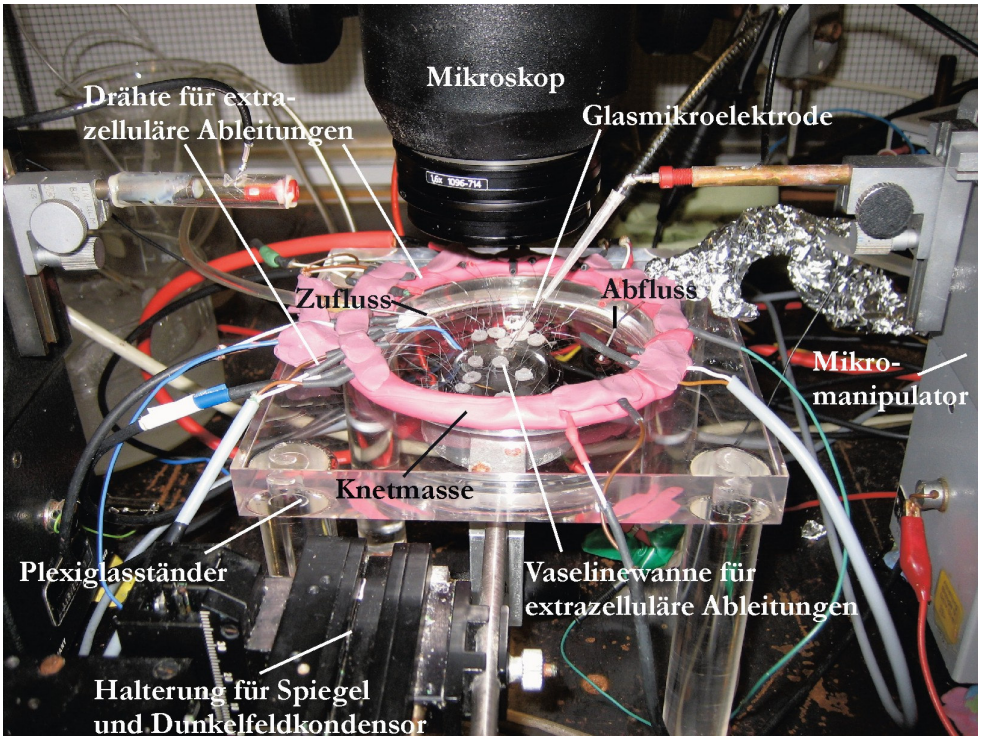


Abbildung 23: Petrischale mit STNS im Plexiglasständer. Die Schale wurde mit Knetmasse befestigt.

3.5 Applikation

3.5.1. Applikation von HiDi- und Low Ca^{2+}-Ringer

Die Petrischale, in der sich das isolierte Nervensystem befand, wurde mit Vaseline in zwei Bereiche unterteilt, wodurch das stomatogastrische Ganglion (STG) und die motorischen Nerven von den Kommissuralganglien (CoGs) und dem Oesophagealganglion (OG) getrennt wurden. In beiden Bereichen befand sich jeweils ein Zu- und Abfluss für die Ringerlösung bzw. für die Applikation der verschiedenen Lösungen (siehe Abbildung 24). HiDi- und LowCa^{2+}-Ringer wurden dabei nacheinander ausschließlich auf den anterioren Bereich des Nervensystems appliziert. Zwischen den einzelnen Versuchen wurde die verwendete Ringerlösung zwischen 30 und 60 min mit isotonischer Ringerlösung ausgewaschen. Mit Hilfe von HiDi- und LowCa^{2+}-Ringerlösungen wurden die synaptischen Verbindungen zwischen den IV Neuronen und verschiedenen bereits identifizierten Projektionsneuronen in den CoGs untersucht. Der posteriore Bereich wurde währenddessen weiterhin mit isotonischer Ringerlösung perfundiert.

3.5.2. Applikation von Cimetidin und des Neuropeptids FLRFamid

Durch die Unterteilung der Petrischale in zwei Bereiche konnte der Einfluss der in den IV Neuronen enthaltenen Kotransmitter auf das stomatogastrische Nervensystem untersucht werden (siehe Abbildung 24). Der Histamin-Antagonist Cimetidin wurde dabei ausschließlich auf das enthäutete STG appliziert wohingegen das Neuropeptid FLRFamid ausschließlich auf den anterioren Bereich des STNS, also auf die enthäuteten CoGs und das OG, appliziert wurde. Die beiden Substanzen wurden mit einer Temperatur von 10 – 12°C perfundiert. Die Applikationen der beiden Substanzen fanden dabei stets in unterschiedlichen Tieren statt. Vor und nach den jeweiligen Applikationen wurden beide Teile der Petrischale mit gekühltem Ringer perfundiert. Nach Applikation des Histamin-Antagonisten Cimetidin bzw. des Peptids FLRFamid wurde zwischen 45 und 60 min mit normalem Ringer gewaschen, um eine Nachkontrolle ohne den Einfluss der beiden Substanzen durchführen zu können. Die Perfusion sowie die Applikation der verschiedenen Substanzen erfolgten während der Experimente mit einer konstanten Geschwindigkeit von 7-12ml/min.

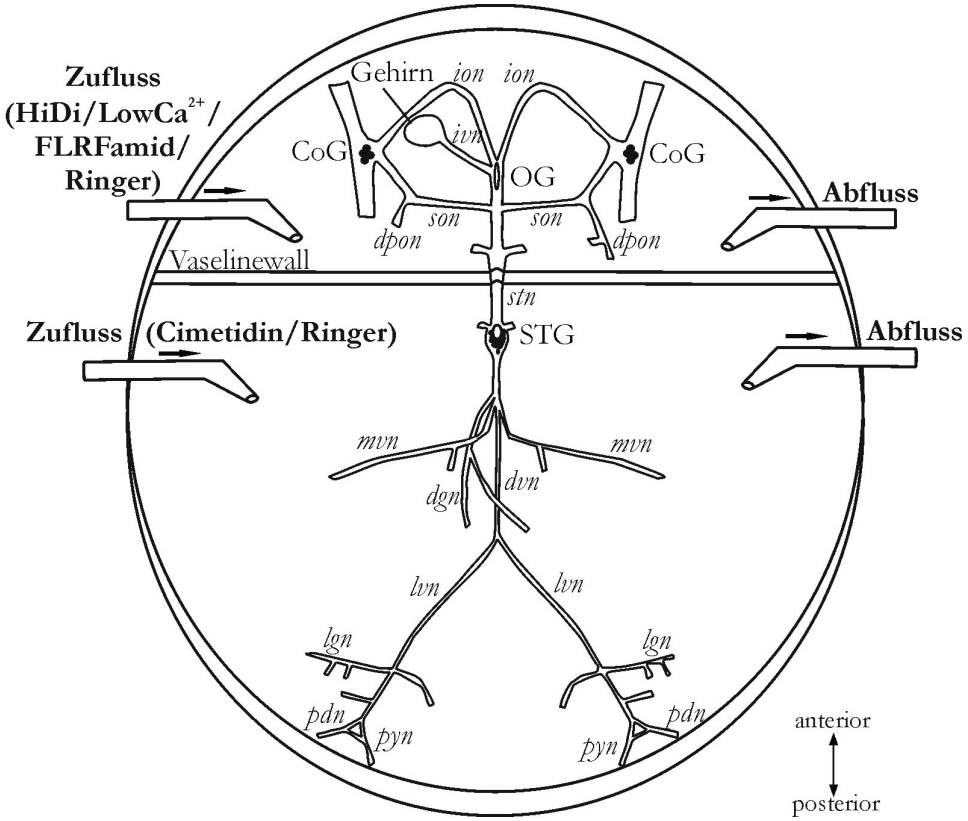


Abbildung 24: Applikation der unterschiedlichen Ringerlösungen und neuromodulatorischen Substanzen: Die Petrischale mit dem ausgepinnten stomatogastrischen Nervensystem wurde mit einem Vaselinewall in zwei Bereiche unterteilt. So konnte entweder HiDi- oder LowCa^{2+}-Ringer auf die CoGs appliziert werden, um die synaptischen Verbindungen zwischen den IV-Neuronen und verschiedenen identifizierten Projektionsneuronen zu untersuchen. Des Weiteren konnte der Histamin-Antagonist Cimetidin auf das STG oder das Peptid FLRFamid auf die CoGs appliziert werden.

3.6 Elektrophysiologie

3.6.1. Extrazelluläre Ableitungen

Der Versuchsaufbau für die extrazellulären Ableitungen verschiedener Nerven war bei allen *in vitro* Experimenten gleich. Dabei konnten bis zu zehn Nerven simultan extrazellulär abgeleitet werden. Sechs von diesen zehn extrazellulären Ableitungen wurden zunächst über einen Vorverstärker (Heinecke) 10fach verstärkt und dann mit einem extrazellulären Nachverstärker (Differenzverstärker, AC-Filtamp, Heinecke, Deutschland) erneut 1 bis 500-fach verstärkt und über einen Bandpassfilter gefiltert (Abbildung 26). Die anderen vier extrazellulären Ableitungen wurden mit einem Differenzverstärker A-M Systems (Modell 1700, Carlsborg, WA, USA) bis zu 10.000fach verstärkt und bandpassgefiltert. Die analogen Signale der extra-

zellulären Heinecke Nachverstärker wurden auf einem digitalen Oszilloskop (Yokogawa DL 708E, Japan) sichtbar gemacht.

Die extrazellulären Ableitungen des *dvn*s und *ivn*s wurden im intakten Tier mit Hilfe von Hakenelektroden durchgeführt (siehe Abbildung 19). Die extrazellulären Ableitungen wurden, wie teilweise im isolierten Nervensystem, mit einem Differenzverstärker A-M Systems (Modell 1700, Carlsborg, WA, USA) bis zu 10.000fach verstärkt und bandpassgefiltert.

Die Signale wurden *in vitro* und *in vivo* über ein A/D-Wandlersystem (micro 1401 mkII, Cambridge Electronics Design, Cambridge, England) in digitale Daten konvertiert, welche auf einem Pentium PC sichtbar gemacht bzw. aufgezeichnet wurden. Die Daten konnten anschließend bearbeitet werden.

Um den Einfluss der IV-Neurone auf den pylorischen und den gastrischen Rhythmus untersuchen zu können, wurden die Aktivitäten verschiedener pylorischer und gastrischer Neurone extrazellulär von verschiedenen Nerven abgeleitet. Aktionspotentiale konnten extrazellulär abgeleitet werden, indem Vaselinewannen so an die Nerven angebracht wurden, dass ein Teil des abgeleiteten Nervs vom restlichen Bad isoliert wurde (siehe Abbildung 25). Der Ableitelektrodendraht aus Stahl wurde in den Sylgardboden des isolierten Teils der Vaselinewanne, der Referenzelektrodendraht dagegen im Sylgardboden des Bads außerhalb der Wanne platziert (siehe Abbildung 25).

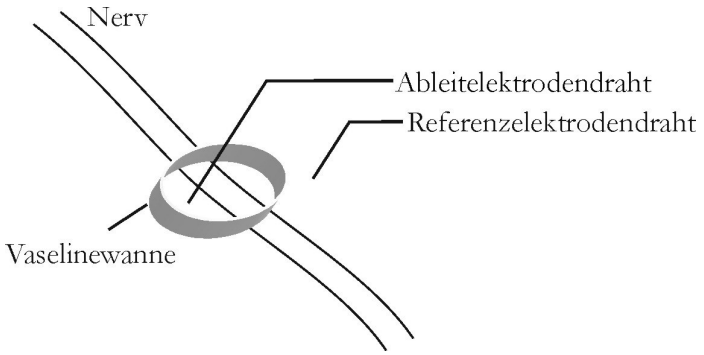


Abbildung 25: Schematische Darstellung eines Nervs mit Vaselinewanne und extrazellulären Ableitdrähten.

Die extrazellulären Ableitungen verschiedener Nerven wurden dazu verwendet, sowohl den pylorischen als auch den gastrischen Rhythmus anhand der Aktivität verschiedener pylorischer bzw. gastrischer Motoneurone aufzuzeichnen und anschließend zu analysieren. Dabei konnte auf den verschiedenen motorischen Nerven die Aktivität von unterschiedlichen Motoneuronen abgeleitet werden: Die Aktivität des lateralen pylorischen Neurons (LP) wurde durch eine Ableitung des lateralen Ventrikularnerven (*lvn*) bestimmt, die des inferioren

kardialen Neurons (IC) und des ventrikularen Dilatorneurons (VD) anhand des medialen Ventrikularnervs (*mvn*). Die Aktivität des pylorischen Dilatorneurons (PD) konnte sowohl am pylorischen Dilatornerv (*pdn*) als auch am lateralen Ventrikularnerv (*lvn*) extrazellulär abgeleitet werden. Die Aktivität der gastrischen Neuronen wurden ebenfalls extrazellulär abgeleitet: das laterale gastrische Neuron (LG) am lateralen gastrischen Nerven (*lgn*) und das dorsale gastrische Neuron (DG) am dorsalen gastrischen Nerven (*dgn*). Um die Aktivität des Projektionsneurons MCN1 im rechten und linken Kommissuralganglion aufzuzeichnen, wurden die beiden inferioren Oesophagealnerven (*ion*s) extrazellulär abgeleitet. Die Aktivität der IV-Neurone konnte auf einer extrazellulären Ableitung des inferioren Ventrikularnervs (*ivn*s) beobachtet werden. Hierbei wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an zwei Stellen des *ivn*s extrazellulär abgeleitet. Die Ableitung näher am Gehirn wurde dabei als ivn_{high} bezeichnet, diejenige näher am STNS als ivn_{low}. Die IV Neurone wurden anhand der Fortleitungsrichtungen ihrer Aktionspotentiale identifiziert.

3.6.2. Intrazelluläre Ableitungen

Gastrische und pylorische Zellen sowie die identifizierten Projektionsneurone in den CoGs wurden zusätzlich zu den extrazellulären Ableitungen intrazellulär im Soma abgeleitet. Ein Dunkelfeldkondensor (Nikon, Tokyo, Japan) wurde benutzt, um die Somata im STG und den CoGs besser lokalisieren zu können. Zur Vereinfachung wurde vor jedem Experiment eine Karte des STG mit der Lage der Somata erstellt. Nach Identifikation der Neurone innerhalb des STG konnte so zu der für das spezielle Projekt gewünschten Zelle zurückgekehrt werden. In einzelnen Experimenten wurden bis zu zwei intrazelluläre Ableitungen simultan durchgeführt. Für die intrazellulären Ableitungen wurden Mikroelektroden mit einem Gemisch aus 0,6 M K_2SO_4 und 20mM KCl gefüllt. Die Mikroelektroden wurden mit einem Puller (Model P-97, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) aus speziellen Glaskapillaren (GB100/TF-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) gezogen. Die Elektroden besaßen einen Widerstand zwischen 15-25 MΩ. Sie wurden unter optischer Kontrolle über den entsprechenden Somata im STG bzw. den CoGs platziert und dann mit dem Feintrieb des Mikromanipulators (Leitz, Leica McHenry, IL, USA) auf die Zellmembran aufgesetzt und eingestochen. Die so abgeleiteten intrazellulären Signale wurden mit einem Intrazellulärverstärker (NPI NEC 10L, NPI Electronic GmbH, Tamm, Deutschland bzw. AxoClamp-2B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) zehnfach verstärkt (siehe Abbildung 26). Die so verstärkten Signale wurden zusammen mit den zugehörigen Stromkanälen (Applikation von benutzerdefinierten

Strömen) mit dem A/D-Wandlersystem (micro 1401 mkII, Cambridge Electronics Design, Cambridge, UK) aufgezeichnet. Die Identifizierung der intrazellulären Ableitungen erfolgte mit Hilfe der extrazellulären Ableitungen. Durch eine Strominjektion konnte das Neuron sowohl de- als auch hyperpolarisiert werden. Bei Übereinstimmung der Aktivität des Neurons mit der extrazellulären Ableitung konnte das Neuron eindeutig identifiziert werden. Dabei musste jedoch beachtet werden, dass die Aktivität der Neurone auf den extrazellulären Ableitungen mit einer gewissen Verzögerung auftritt, bedingt durch die Laufzeit der Aktionspotentiale zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Ableitort.

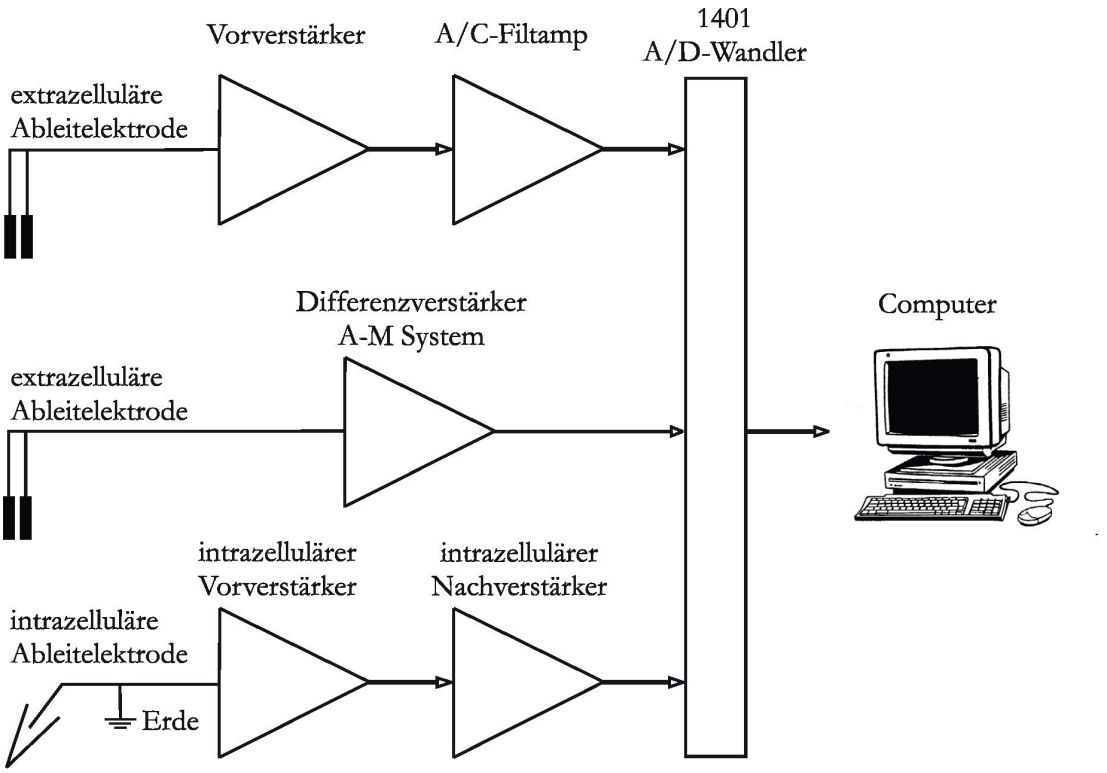


Abbildung 26: Schaltbild des Versuchsaufbaus für extra- und intrazelluläre Ableitungen.

3.7 Stimulationen

3.7.1. Extrazelluläre Stimulation des *ivn*s *in vitro* und *in vivo*

Der *ivn* wurde zur Aktivierung der IV Neurone extrazellulär stimuliert. Dazu diente, wie schon in Abschnitt 3.6 beschrieben, *in vitro* und *in vivo* die extrazelluläre *ivn* Ableitung. Über ein Spike2 (Version 5.03-6.04; CED, Cambridge, England) Stimulationsskript (Wolfgang Stein; www.neurobiologie.de/spike2) wurde ein Reizgerät angewählt (Master8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel). In diesem Skript konnten verschiedene Reizparameter ausgewählt werden, wie zum

Beispiel Reizfrequenz, Reizdauer, Interpulsintervall, Wiederholung der Reize. Bei den Reizen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, betrug die Reizfrequenz jeweils 10, 15, 20, oder 40 Hz. Bei Standardreizen betrug die Reizdauer 6 s, das Interpulsintervall ebenfalls 6 s. Für weitere Versuche wurden sowohl Reizdauer als auch Interpulsintervall variiert. Für die *ivn* Stimulationen *in vivo* betrug die Reizfrequenz 20 oder 40 Hz, Reizdauer sowie Interpulsintervall jeweils 6 s. Die einzelnen Reize werden im Folgenden auch als Pulse bezeichnet. Während dieser Reizungen wurde die Aktivität der pylorischen und gastrischen Neurone und der Projektionsneurone in den CoGs beobachtet. Die Aktivität der Projektionsneurone wurde dabei ausschließlich während Standardreizen mit 6 s Dauer und 6 s Interpulsintervall beobachtet.

3.7.2. Sensorische Stimulation *in vivo*

Um die Aktivierung der IV Neurone *in vivo* zu untersuchen, wurden verschiedene sensorische Reize getestet. Den Tieren wurden visuelle, taktile und chemosensorische Reize präsentiert. Die Stimulationen konnten dabei nicht eindeutig zwischen ausschließlich olfaktorischer Reizung bzw. chemosensorischer Reizung unterschieden werden.

In Fleischer, (1981) wurde beschrieben, dass gastrische Mühlenrhythmen verstärkt bei den Tieren auftraten, die im Dunkeln gehalten wurden. Eine Beleuchtung der Tiere führte zu einer Unterdrückung der gastrischen Rhythmen. Um zu testen, ob die IV Neurone durch visuelle Reizung aktiviert werden und so die Mustergeneratoren im STG beeinflussen, wurden in dieser Arbeit einfache Stimulationsprogramme verwendet. Dem Tier wurden durch An- und Ausschalten einer Kaltlichtquelle in Augennähe Hell-Dunkel-Reize präsentiert. Taktile Reize wurden sowohl durch eine mechanische Reizung der Antennulae (1. Antennen, Abbildung 27) und Antennen (2. Antennen, Abbildung 27) als auch des Schlundbereichs mit einer Pinzette oder einem Pinsel präsentiert. Chemosensorisch gereizt wurde durch Zugabe einer Mischung aus Ringerlösung und Krebs- oder Garnelenstücke auf die Antennulae (siehe Abbildung 27), die für die Duftwahrnehmung verantwortlich sind (Brock, 1930), und auf den Bereich der Mundwerkzeuge, in dem sich ebenfalls Chemorezeptoren befinden (Garm et al., 2005). Als Kontrolle hierfür wurde ausschließlich Ringer auf die Antennulae getropft. Die Beteiligung von Futteraufnahme auf eine mögliche Aktivierung der IV Neurone wurde in Fütterungsversuchen gestestet. Dafür wurde ein Schlauch in den Schlund eingeführt (siehe Abbildung 21B) und mit Hilfe einer Spritze Nahrung direkt in den Magen appliziert.

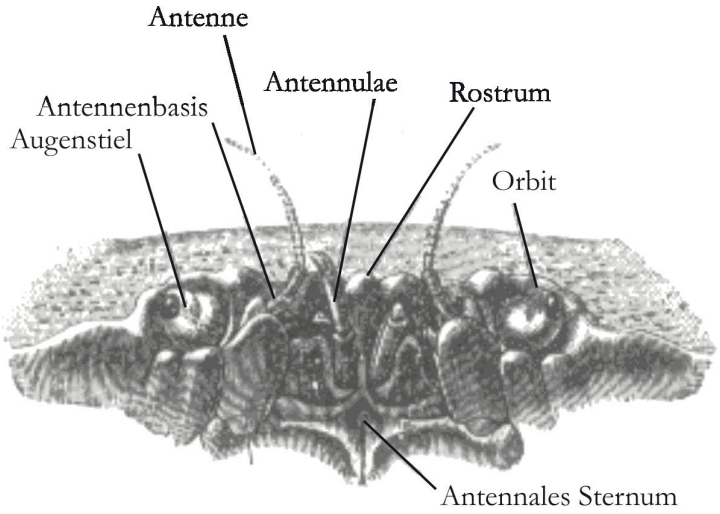


Abbildung 27: Frontalbereich von *Cancer pagurus* (verändert nach Huxley (1880)). In den chemosensorischen Experimenten wurden die Antennulae (1. Antennen) gereizt.

3.8 Auswertung und statistische Verfahren

Über einen A/D-Wandler (micro 1401 mkII, Cambridge Electronics Design, Cambridge, England) wurden die gemessenen Signale zusammen mit der Reizspur mit 10kHz Abtastrate über die Software Spike2 (Version 5.03-6.04, Cambridge Electronics Design, Cambridge, England) aufgezeichnet und auf einem Pentium Computer gespeichert. Durch die extrazelluläre Stimulation des *ivn*s waren sowohl auf extra- als auch auf intrazellulären Ableitspuren Reizartefakte zu erkennen. Diese wurden mit Hilfe eines Spike2-Skripts (Kill artefacts, www.neurobiologie.de/spike2) entfernt. Die Aktionspotentiale der IV Neurone wurden am *ivn*, sowohl *in vivo* als auch *in vitro,* mit zwei extrazellulären Elektroden abgeleitet. Über die Laufzeitunterschiede konnten die Aktionspotentiale, die vom Gehirn zum STNS liefen und diejenigen, die zum Gehirn aufstiegen, identifiziert werden. Des Weiteren konnten mit Hilfe des in Spike2 integrierten Tools „Spike Template Matching" die verschiedenen Aktionspotentiale anhand ihrer Amplitudengröße und Form unterschieden werden.

Die Aktivität von PD wurde als Anfang eines Zyklus im pylorischen Rhythmus definiert, da es sich hierbei um ein pylorisches Schrittmacherneuron handelt (Weimann et al., 1991; Weimann and Marder, 1994). Die pylorische Periode wurde also als Intervall zwischen dem Beginn eines Bursts (Feuersalve von Aktionspotentialen) von PD und dem Beginn des darauf folgenden PD-Bursts definiert. Zur weiteren Quantifizierung wurden folgende Parameter mit einem

Spike2-Skript (Crab Analyzer, www.neurobiologie.de/spike2) ausgewertet: Anzahl der Spikes pro Burst, Feuerfrequenz der Spikes innerhalb eines Bursts, Burstdauer und Phasenlage. Die Phasenlage gibt dabei den Anteil der Aktivität eines Neurons während eines standardisierten Zyklus wieder. Der Anfang der Aktivität von PD wurde als Phase 0 gesetzt. Die Phase jedes weiteren Neurons wurde von Beginn des PD Bursts bis zum Beginn des Bursts des jeweiligen Neurons gemessen und anschließend durch die Periode dividiert. Auf diese Weise kann man die Aktivität der verschiedenen pylorischen und gastrischen Motoneurone verschiedener Tiere unabhängig von der Zeit vergleichen. Der gastrische und der oesophageale Rhythmus wurden in gleicher Weise quantifiziert, als Anfang eines gastrischen Zyklus wurde der Beginn eines LG Bursts definiert, als Anfang eines oesophagealen Rhythmus der Burstanfang der oesophagealen Motoneurone.

Sowohl die Projektionsneurone in den CoGs als auch das oesophageale Motoneuron (OMN) wurden intrazellulär abgeleitet und mit Hilfe von programmierten Spike2 Skripten (Wolfgang Stein, www.neurobiologie.de/spike2) und in Spike2 integrierten Skripten ausgewertet. Die Aktivität der Projektionsneurone und von OMN wurde als Anzahl der Aktionspotentiale jeweils 3 s vor, 6 s während und 3 s nach *ivn* Stimulation gezählt. Anschließend wurde ein Peri-Stimulus-Time-Histogramm (PSTH) erstellt. Für ein solches Histogramm wurde die Frequenz der Aktionspotentiale in einer BIN Weite von 50 ms berechnet, über 10 *ivn* Stimuli gemittelt und anschließend als PSTH dargestellt. Diese PSTHs konnten anschließend für mehrere Tiere gemittelt werden. Des Weiteren konnte die Frequenz der abgeleiteten Neurone vor, während und nach Reizung berechnet werden. Ein weiteres Spike2 Skript, das für die Auswertung der Projektionsneurone und OMN verwendet wurde, ist das Multisweep-Skript (www.neurobiologie.de/spike2). Mit Hilfe dieses Skripts kann die Korrelation zweier Ereignisse, z.B. dem Auftreten von Aktionspotentialen während *ivn* Stimulation, optisch dargestellt werden. Dabei werden in einem definierte Zeitbereich Ableitspuren (Sweeps) so übereinandergelegt, dass sie einen gemeinsamen Ausgangspunkt haben (Trigger), z.B. der Anfang eines *ivn* Stimulus oder eines gemeinsamen Ereignisses (siehe Abbildung 28). Auf diese Weise können z.B. intra- und extrazellulär auftretende Aktionspotentiale auf Übereinstimmung überprüft werden (siehe Abbildung 28).

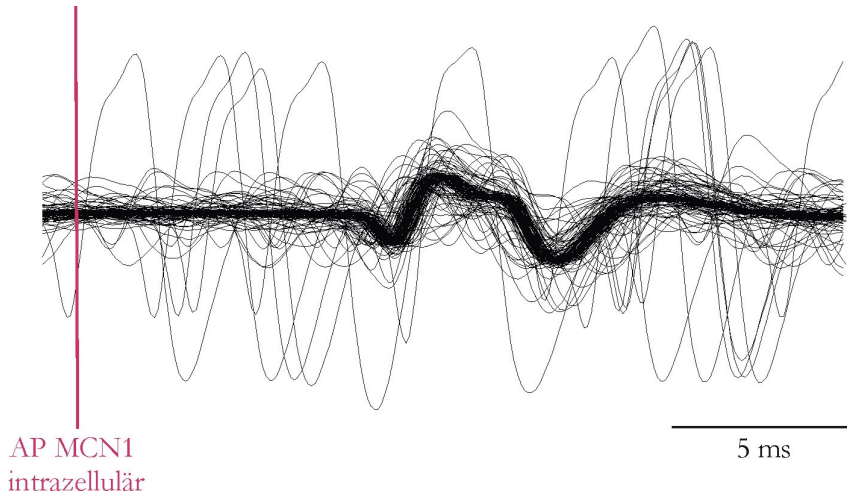


Abbildung 28: Multisweep der MCN1 Aktionspotentiale auf der extrazellulären *ion* Ableitung. Die rote Linie kennzeichnet das Auftreten von intrazellulären MCN1 Aktionspotentialen, auf die getriggert wurde. n=156 Sweeps.

Die Projektionsneurone MCN1 und MCN5 wurden mit Hilfe von Multisweeps identifiziert. Die Axone beider Neurone projizieren über den *ion* zum STG. Die Axone von OMN projizieren ebenfalls über den *ion* (Stein et al., 2005). Die großen OMN Aktionspotentiale erschwerten die extrazelluläre Auswertung von MCN1 und MCN5 während der FLRFamid-Applikation und wurden deswegen mit Hilfe eines Spike 2 Skripts (Kill_Artefacts, www.neurobiologie.de/spike2) entfernt.

Das Projektionsneuron CPN2, welches jeweils ein Soma in einem CoG besitzt, wurde folgendermaßen identifiziert: Jede CPN2-Kopie besitzt eine direkte erregende Synapse auf die gastrischen Motoneurone GM (Norris et al., 1994; Stein et al., 2005). Die einzelnen Aktionspotentiale - im Weiteren auch als Spikes bezeichnet - von CPN2 sind also in GM als exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs) zu erkennen. Mit Hilfe der Multisweep-Darstellung konnte CPN2 so eindeutig identifiziert werden (siehe Abbildung 29). Die EPSPs in GM konnten gezählt werden, um die Aktivität von CPN2 darzustellen. Diese Art der Aktivitätsauswertung wurde bei der FLRFamid-Applikation durchgeführt.

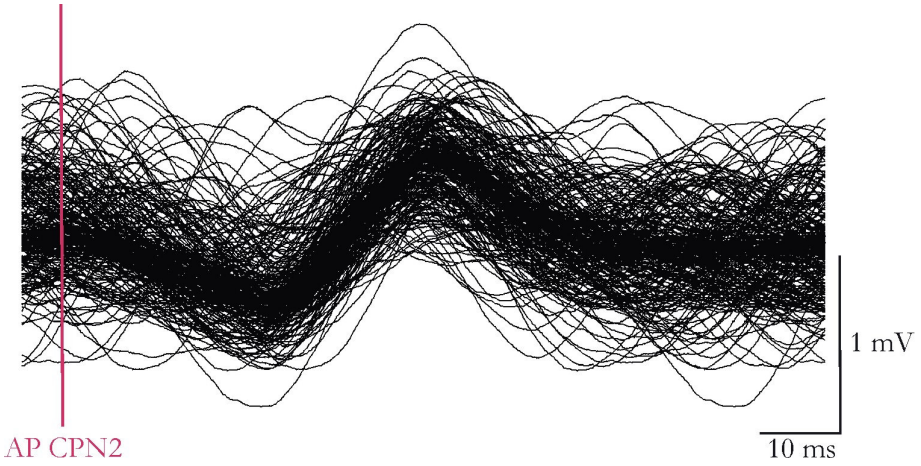


Abbildung 29: Multisweep der PSPs der CPN2 Aktionspotentiale in GM. Die rote Linie kennzeichnet das Auftreten der intrazellulär abgeleiteten CPN2 Aktionspotentiale, auf die getriggert wurde. Die intrazelluläre Ableitung von GM wurde in Spike2 „geglättet" (für Details siehe Spike2 Hilfe). n=246 Sweeps.

Die ausgewerteten Daten wurden im Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Version 2000, für Windows, Microsoft) und Plotit (Version 3.2, Scientific Programming Enterprises, Haslett, MI, USA) als Diagramme dargestellt. Alle Ergebnisse wurden mit dem One-way-ANOVA für wiederholte Messungen (SigmaStat for Windows Version 2.0; Systat Software Inc., San Jose, Kalifornien, USA) bzw. dem Wilcoxon signed-rank Test auf Signifikanz überprüft. Für Signifikanzüberprüfung vor, während und nach *ivn* Stimulation wurde der One-Way-ANOVA benutzt. Dies ist bei den durchgeführten Experimenten ein notwendiger Test, da sich die einzelnen Tiere teilweise stark in ihrer Ausgangslage unterschieden. Für die Überprüfung von zwei Situationen wurde der Wilcoxon signed-rank Test verwendet. Die signifikanten Werte wurden folgendermaßen gekennzeichnet: *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. Angegeben sind immer Mittelwerte und Standardabweichung (mit ± gekennzeichnet). Die Anzahl der Experimente ist mit „N" gekennzeichnet, die Anzahl der Versuche innerhalb eines Tieres mit „n".

3.9 Bildmaterial

Die Originalableitungen aus den Experimenten wurden aus Spike2 (Version 5.03-6.04, Cambridge Electronics Design, Cambridge, UK) in CorelDRAW (Version 12, Corel Corporation, Ottawa, ON, Canada) exportiert und bearbeitet. Die ausgewerteten Daten und Diagramme wurden aus Excel (OfficeXP, für Windows, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) oder Plotit (Version 3.2, Scientific Programming Enterprises, Haslett, MI, USA) in

CorelDRAW exportiert, dort bearbeitet und anschließend in Word (OfficeXP, für Windows, Microsoft) importiert. Originalphotos von den verschiedenen Präparationen sowie dem Versuchsaufbau wurden mit einer Digitalkamera (IXUS 55, Canon Europe, Amstelveen, Niederlande) aufgenommen und in CorelDRAW 12 weiterbearbeitet.

Abbildungen aus Büchern und wissenschaftlichen Publikationen wurden eingescannt und in CorelDRAW weiterbearbeitet. Die Dissertation wurde in Word (OfficeXP, für Windows, Microsoft) angefertigt.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologische Eigenschaften der *ivn* Axone

4.1.1. Lokalisation der IV Somata

Der inferiore Ventrikularnerv (*ivn*) stellt, neben den circumoesophagealen Kommissuren (*cocs*), die einzige Verbindung zwischen dem Gehirn und dem stomatogastrischen Nervensystem (STNS) dar. Die inferioren Ventrikularneurone (IV Neurone), die über diesen Nerv projizieren, wurden bisher bereits in verschiedenen Astacidea und Palinura Arten, z.B. *Homarus gammarus*, *Orconectes limosus* oder *Panulirus vulgaris*, und in einer Brachyura Art, *Cancer borealis*, untersucht (Dando and Selverston, 1972; Sigvardt and Mulloney, 1982a; Claiborne and Selverston, 1984; Cazalets et al., 1987; Böhm et al., 2001; Christie et al., 2004). Dabei wurden sowohl die morphologischen Eigenschaften der IV Neurone als auch die Einflüsse auf die beiden Mustergeneratoren im stomatogastrischen Ganglion analysiert. In *Homarus gammarus* werden die IV Neurone aufgrund der hemmenden Einflüsse auf den pylorischen Rhythmus als „pyloric supressor" (PS) Neurone bezeichnet. In den bisher untersuchten Astacidea und Palinura Arten waren die Somata der IV bzw. PS Neurone direkt im *ivn* lokalisiert, in *C. borealis* dagegen im Gehirn. Die genaue Lage der IV Somata in *C. borealis* wurde dabei allerdings nicht eindeutig identifiziert. Weder die Lokalisation der IV Somata noch die Projektionen der anderen *ivn* Axone wurden bisher in *Cancer pagurus* untersucht.

Zur Überprüfung der Übereinstimmungen und Unterschiede zwischen *C. pagurus* und den bereits untersuchten Krustazeenarten, habe ich zunächst die genaue Lage der IV Neurone sowie die Anzahl der Projektionen im *ivn* untersucht. Dazu fertigte ich retrograde Färbungen des *ivn*s mit $NiCl_2$ und Lucifer Yellow (LY) an (N=33). Die $NiCl_2$ Backfills zeigten, dass die Somata, wie auch bei *C. borealis* (Christie et al., 2004), im Gehirn lokalisiert sind (siehe Abbildung 30). Die Zellkörper hatten eine durchschnittliche Länge von 119,48 ± 28.8 µm und eine Breite von 90,89 ± 19,3 µm (gemessen an der breitesten Stelle der Somata; N=21). Im Gehirn wurden keine Verzweigungen der IV Neurone gefunden.

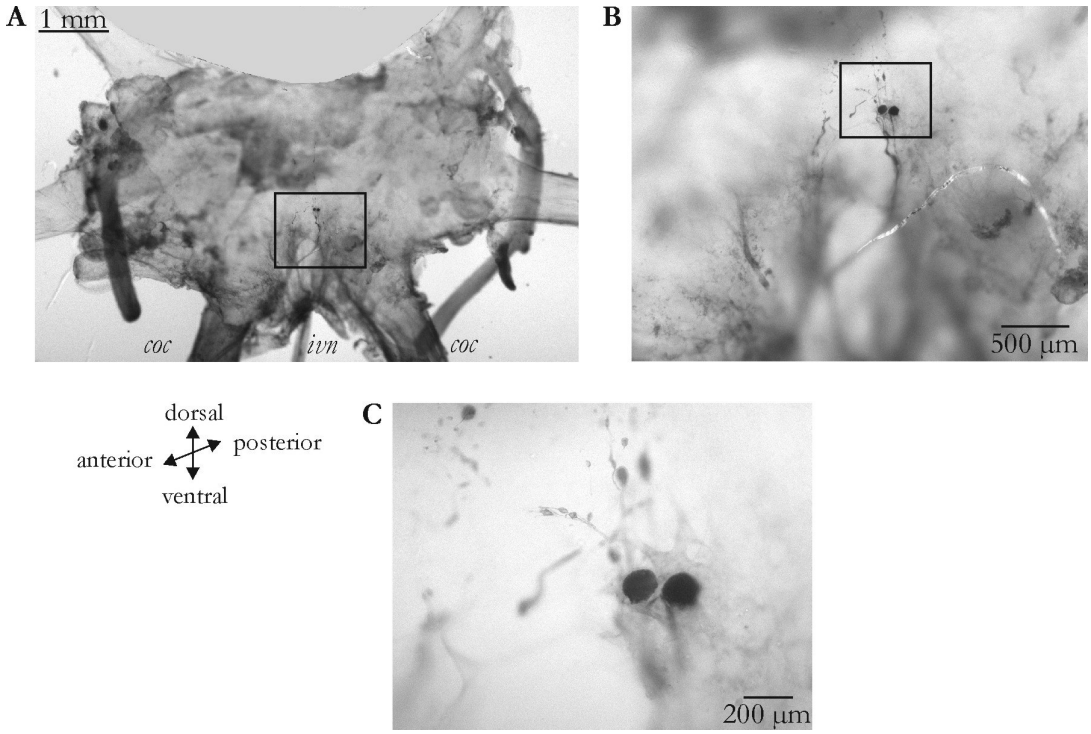


Abbildung 30: Die Somata der IV Neurone befinden sich in Zellcluster 17. $NiCl_2$ Backfill des *ivn*s. Die Somata der IV Neurone wurden über den *ivn* retrograd gefüllt. Die Somata befinden sich im Gehirn im Zellcluster 17 (Sandeman et al., 1992). **A:** Gehirn mit IV Somata und circumoesophagealen Kommissuren (*coc*s). **B:** Ausschnittsvergrößerung des in A markierten Bereichs. **C:** Ausschnittsvergrößerung des in B markierten Bereichs.

Zur Bestimmung der exakten Lage der IV Neurone im Gehirn wurden von den mit LY gefärbten Gehirnen Schnitte angefertigt (N=11). In neun von elf Färbungen befanden sich acht Axone im *ivn*, von denen nur zwei Somata im Gehirn enthielten (siehe Abbildung 31A, B). In zwei Tieren waren sieben Axone gefärbt, wovon zwei in Somata im Gehirn endeten. Beide Somata waren im dorso-medialen Bereich des Gehirns lokalisiert, dieser Bereich wird nach Sandeman et al., 1992 als Zellcluster 17 bezeichnet (siehe Abbildung 36). Zelle 1 befand sich durchschnittlich 178,57 ± 47,1 µm von der Referenzschnittebene entfernt (siehe Abbildung 18), Zelle 2 durchschnittlich 221,43 ± 48,5 µm (Gesamtdicke: 575 ± 67,7 µm).

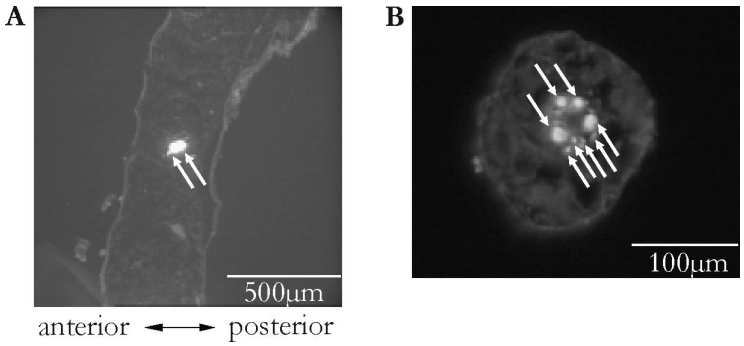


Abbildung 31: Gehirnschnitt. Die IV Somata wurden retrograd mit LY gefüllt. **A:** Gehirnschnitt durch die Region, in der sich die IV Somata befinden. Die beiden IV Somata sind mit Pfeilen markiert. **B:** Querschnitt des *ivn*s. Die acht Axone sind durch Pfeile gekennzeichnet.

4.1.2. Projektionen der IV Neurone

Die Projektionen der IV Neurone wurden mit Hilfe von retrograden $NiCl_2$ und $CoCl_2$ Färbungen des stomatogastrischen Nervs (*stn*), der inferioren Oesophagealnerven (*ions*) und der superioren Oesophagealnerven (*son*s) in Richtung des Gehirns ermittelt. Dabei wurden bei jeder Färbung die Somata der IV Neurone im Gehirn gefüllt. Diese Färbungen zeigten also, dass die IV Neurone sowohl über die *ion*s (N=9) als auch über die *son*s (N=5) zu den Kommissuralganglien (CoGs) projizieren und direkt über den *stn* (N=4) zum stomatogastrischen Ganglion (STG; siehe Abbildung 32). Bei den retrograden *ion* Färbungen wurden jeweils drei Axone im *ivn* gefärbt, von denen zwei in den Somata der IV Neurone im Gehirn endeten. Die *son* und *stn* Färbungen zeigten, dass sowohl vom *son* als auch vom *stn* nur jeweils zwei Axone in den *ivn* projizierten, die in den IV Somata im Gehirn endeten.

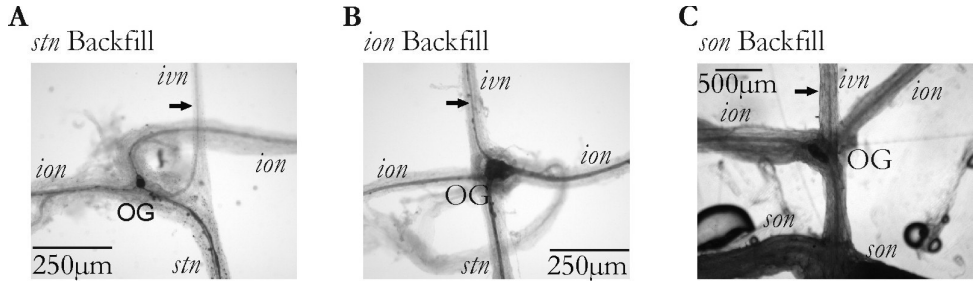


Abbildung 32: Projektionen der IV Neurone. A: retrograde Färbung des *stn*s. Im *ivn* sind zwei Axone gefärbt (Pfeil), die zu den IV Somata im Gehirn ziehen. **B:** *ion* Backfill. Im *ivn* befinden sich drei gefärbte Axone (Pfeil), zwei davon enden in den Somata im Gehirn. **C:** Beim s*on* Backfill sind im *ivn* zwei Axone zu erkennen (Pfeil), die in den IV Somata im Gehirn enden.

Die Projektionen der IV Neurone im stomatogastrischen Nervensystem sind in Abbildung 33 schematisch dargestellt. Weitere Verzweigungen im Gehirn wurden nicht beobachtet.

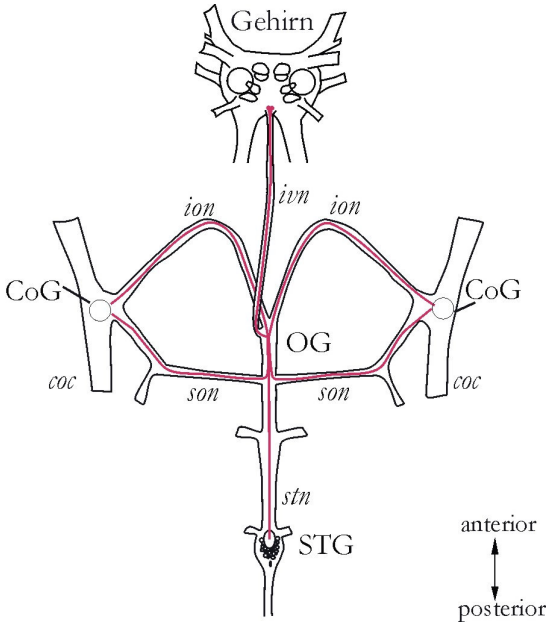


Abbildung 33: Schematische Darstellung des STNS mit den Projektionen der IV Neurone über die *ion*s und *son*s zu den CoGs und über den *stn* direkt zum STG.

4.1.3. Projektionen der anderen *ivn* Fasern

Die Neurone, deren Axone ebenfalls durch den *ivn* projizieren, wurden anhand retrograder $NiCl_2$ Färbungen des *ivn*s in Richtung STNS untersucht (N=8). Es waren keine weiteren Somata im Gehirn zu erkennen, demzufolge handelt es sich dabei um Projektionen vom STNS zum Gehirn. Somata der anderen Projektionen waren im STNS lokalisiert. Die *ivn* Backfills zeigten, dass sich die Somata dieser aufsteigenden Neurone im Oesophagealganglion (OG, N=7) und in den Kommissuralganglien (CoGs; N=3) befanden. In fünf von sieben Tieren lagen zwei Somata im OG, in zwei Tieren dagegen drei Somata (siehe Abbildung 34A). In drei von fünf Tieren mit intakten Kommissuralganglien wurde jeweils ein Soma in den CoGs gefärbt (siehe Abbildung 34B). Im *ion* wurden dabei jeweils zwei Axone gefärbt (N=3). Da in den Kommissuralganglien keine weiteren Somata gefärbt wurden und in Abschnitt 4.1.2 gezeigt wurde, dass die IV Neurone über den *ivn* zu den Kommissuralganglien projizieren, handelt es sich bei dem zweiten im *ion* gefärbten Axon wahrscheinlich um ein Axon der IV Neurone.

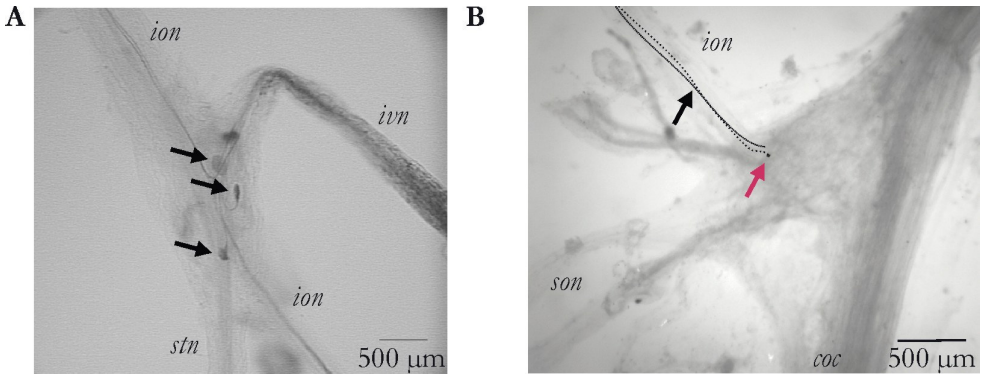


Abbildung 34: Die IV Neurone projizieren über die *ion*s und *son*s zu den CoGs und über den *stn* zum STG. Retrograde $NiCl_2$ Färbung des *ivn*s in Richtung STNS. **A:** Im OG wurden drei Somata gefärbt, die durch Pfeile gekennzeichnet sind (N=2). **B:** Im linken CoG ist ein Soma gefärbt (roter Pfeil; N=3). Im *ion* sind zwei gefärbte Axone zu erkennen, die mit gestrichelten Linien nachgezeichnet wurden (schwarzer Pfeil).

Die Projektionen der ins Gehirn aufsteigenden Neurone wurden ebenfalls durch retrograde Färbungen des *ivn*s in Richtung Gehirn untersucht. Diese fünf bis sechs Axone projizierten im Gehirn in zwei verschiedene Bereiche: Es wurden sowohl Projektionen in Richtung circumoesophagealer Kommissuren (*coc*s) gefunden (N=13), als auch in Richtung der anterioren medialen protocerebralen Neuropile (AMPNs) (N=11; siehe Abbildung 35 und Abbildung 36).

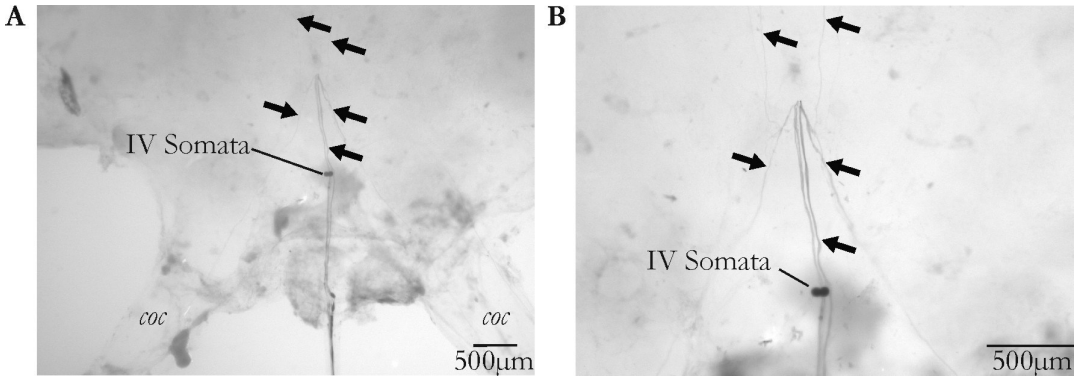
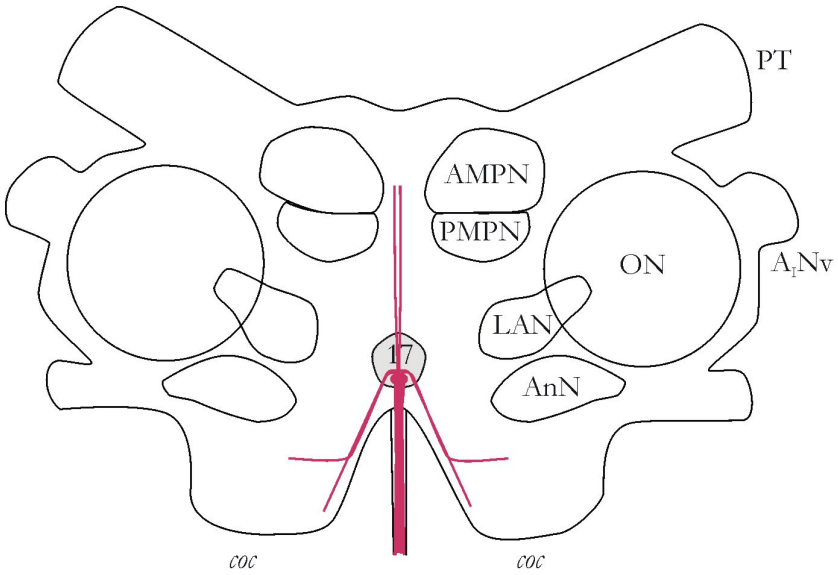


Abbildung 35: Retrograde $NiCl_2$ Färbung des *ivn*s in Richtung Gehirn. **A:** Somata der IV Neurone gefärbt, zwei Axone ziehen jeweils in Richtung *coc*s, zwei Axone in Richtung AMPNs. Pfeile deuten die Axone an. **B:** Vergrößerung aus A. Die Axone sind durch Pfeile gekennzeichnet.

In Abbildung 36 sind die Projektionen der Axone im *ivn* schematisch dargestellt. Zwei der zum Gehirn aufsteigenden Neurone projizierten dabei jeweils in Richtung der *coc*s, zwei weitere Neurone projizierten in Richtung der anterioren protocerebralen Neuropile.



AMPN	anteriores mediales protocerebrales Neuropil
AnN	Antenna II Neuropil
A_INv	Antennalnerv I
coc	circumoesophageale Kommissuren
LAN	laterales Antenna I Neuropil
ON	olfaktorischer Lobus
PMPN	posteriores mediales protocerebrales Neuropil
PT	protocerebraler Trakt
17 (grau)	posteriore Zellen (Zellcluster 17)

Abbildung 36: Schematische Darstellung des Gehirns mit verschiedenen Gehirnbereichen. Die Projektionen der *ivn* Axone sind in rot dargestellt. Die Somata der IV Neurone liegen im Zellcluster 17 (grau unterlegt). Die weiteren Axone des *ivn*s projizieren in Richtung *coc*s (jeweils zwei Axone) und AMPNs (zwei Axone). Der protocerebrale Trakt (PT) verbindet das Gehirn mit dem lateralen Protocerebrum, einer Erweiterung des Gehirns in den Augenstielen. Verändert nach Kirby and Nusbaum (2007).

Zusammenfassung:

Durch retrograde Färbungen wurden die genaue Lokalisation sowie die axonalen Projektionen der IV Neurone bestimmt. Durch den *ivn* projizierten sieben bis acht Axone. Die IV Neurone waren dabei die einzigen Neurone, deren Somata im Gehirn lokalisiert waren, und zwar im Zellcluster 17 (nach Sandeman et al., 1992). Sie projizierten sowohl über die *son*s als auch über die *ion*s zu den Kommissuralganglien und zusätzlich über den *stn* direkt zum stomatogastrischen Ganglion.

Die vom STNS zum Gehirn aufsteigenden Neurone projizierten im Gehirn in Richtung circumoesophageale Kommissuren (je zwei Axone) sowie in Richtung anteriore mediale

protocerebrale Neuropile (zwei Axone). Zwei bis drei Somata dieser Neurone waren im OG lokalisiert, ein anderes im CoG.

4.2 Aktivierung der IV Neurone im intakten Tier

Bisher war es unklar, ob und welche Art von Informationen die IV Neurone vom Gehirn zum STNS übertragen. Daten des Flusskrebses *Orconectes limosus* zeigen, dass die Aktivität auf dem *ivn* während Futteraufnahme erhöht wird (Böhm et al., 2001). Dabei bleibt allerdings unklar, ob die Aktivität der absteigenden IV Neurone erhöht wird oder ob es sich dabei um die vom STNS aufsteigenden Neurone handelt, die durch den *ivn* projizieren. Es ist also nicht bekannt, ob die gemessene Aktivität vom Gehirn zum STNS oder in umgekehrter Richtung läuft. Allerdings korreliert die Aktivitätserhöhung mit der aufgenommenen Futtermenge. Des Weiteren ist nicht bekannt, welche sensorischen Modalitäten während der Futteraufnahme stimuliert werden.

Daher habe ich in dieser Arbeit die Einflüsse verschiedener sensorischer Reize auf die IV Neurone im intakten Tier analysiert. Die Aktivität des *ivn*s wurde im intakten Tier extrazellulär mit zwei Hakenelektroden abgeleitet (siehe Abbildung 19). Dabei konnte über die zeitliche Verzögerung der einzelnen Aktionspotentiale die Laufrichtung untersucht und so die Aktionspotentiale der absteigenden und aufsteigenden Neurone differenziert werden. Gleichzeitig wurde der *dvn* extrazellulär mit einer Hakenelektrode abgeleitet, um mögliche Änderungen im pylorischen und gastrischen Rhythmus beobachten zu können. Den Färbungen entsprechend (siehe 4.1.1) gab es nur zwei Arten von Aktionspotentialen, die vom Gehirn über den *ivn* zum STNS projizierten (siehe Abbildung 37). Möglicherweise könnte es sich bei diesen vom Gehirn zum STNS laufenden Aktionspotentialen um Aktionspotentiale der IV Neurone handeln. Bei allen anderen Aktionspotentialen handelte es sich um Aktionspotentiale, die vom STNS zum Gehirn aufsteigen.

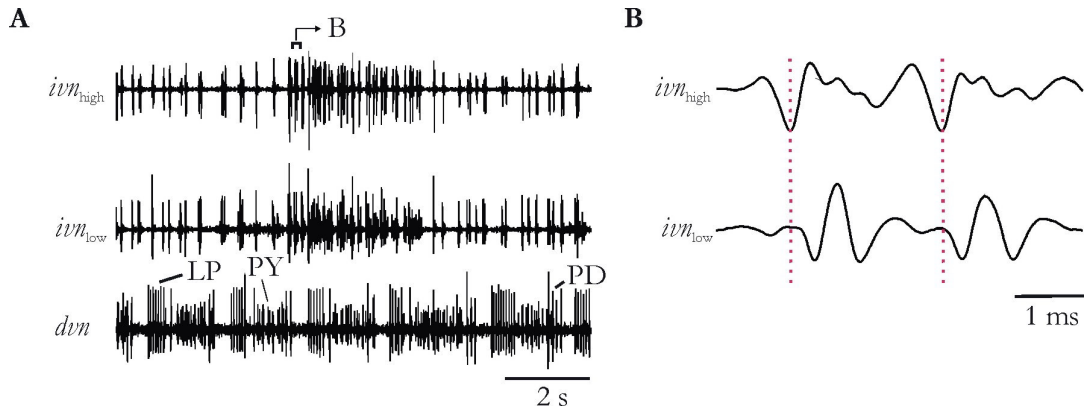


Abbildung 37: A: Extrazelluläre Ableitungen von *dvn* (untere Spur), ivn_{high} (Ableitung näher am Gehirn; obere Spur) und ivn_{low} (Ableitung näher am STNS; mittlere Spur). Auf dem *dvn* ist die Aktivität des pylorischen Rhythmus zu erkennen. Auf dem *ivn* befinden sich Aktionspotentiale vom Gehirn absteigender Neurone und vom STNS aufsteigender Neurone. **B:** Vergrößerung zweier der in A dargestellten *ivn* Ableitungen. Die rot gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt des Aktionspotentials, das zuerst auftrat. Die dargestellten Aktionspotentiale laufen also vom Gehirn zum STNS.

4.2.1. Fütterungsversuche

In Fütterungsversuchen wurde die Nahrung direkt über einen Schlauch im Oesophagus in den Kaumagen injiziert (siehe Abbildung 20A, B). Die injizierte Futtermenge war dabei abhängig von der Magengröße des jeweiligen Tieres und betrug durchschnittlich zwischen 3 und 6 ml. Die Aktivität des *ivn*s wurde im Tier an zwei Stellen gleichzeitig abgeleitet, um aufsteigende und absteigende Aktionspotentiale unterscheiden zu können. Über eine extrazelluläre Ableitung am *dvn* konnten gleichzeitig die Aktivitäten des pylorischen und gastrischen Rhythmus beobachtet werden. Die Originalableitungen des *ivn*s und *dvn*s in Abbildung 38 zeigen, dass sich die Aktivität der Aktionspotentiale auf den beiden *ivn* Ableitungen nach der Futterinjektion nicht veränderte. Der pylorische Rhythmus dagegen wurde beeinflusst, was sich z.B. anhand der Periodendauer zeigte (siehe Abbildung 38). Diese Originalableitung zeigt, dass sich die Periode des pylorischen Rhythmus von 1,06 s vor Fütterung auf 0,77 s direkt nach der Futterinjektion verkürzte.

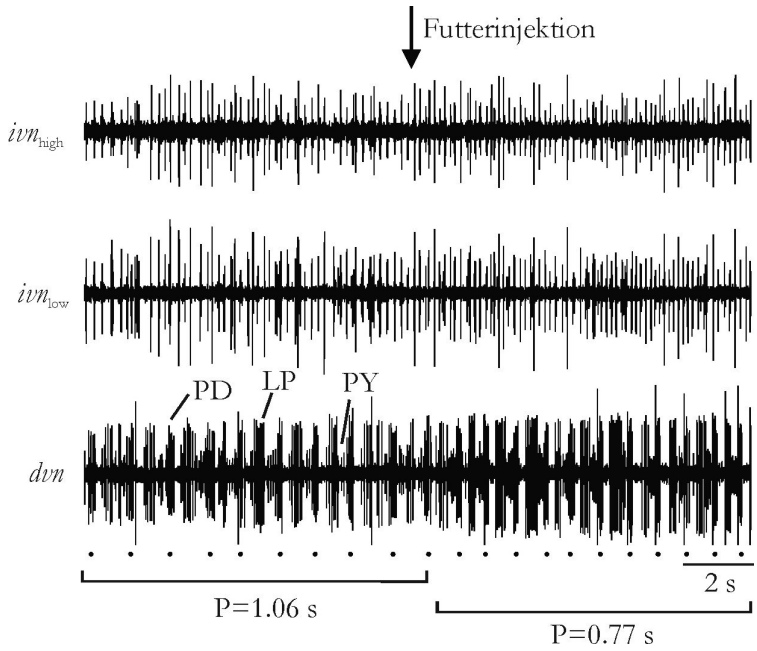


Abbildung 38: Futterinjektion verkürzt die pylorische Periode und beeinflusst die Aktivität der IV Neurone nicht. Extrazelluläre Ableitung des *dvn*s (untere Spur), ivn_{low} (mittlere Spur) und ivn_{high} (obere Spur) vor und nach Futterinjektion in den Magen. Die Periode des pylorischen Rhythmus verkürzte sich aufgrund der Fütterung von 1,06 s auf 0,77 s. Die Punkte unterhalb der *dvn* Ableitungen signalisieren dabei einen PD Burst, also den Anfang eines pylorischen Zyklus.

Zur Quantifizierung der *ivn* Aktivität wurde in Abbildung 39 die gemittelte Anzahl der Spikes pro 250 ms BIN vor und direkt nach der Futterinjektion aufgetragen. Die Anzahl der Spikes wurde dabei über 20 s (entspricht 80 BINs) gemittelt. Die BIN-Weite von 250 ms wurde gewählt, um eine mögliche Zu- bzw. Abnahme der Spikeanzahl innerhalb des gesamten Messbereichs feststellen zu können. Dies war allerdings nicht der Fall. Für diese Quantifizierung wurden alle auf dem *ivn* auftretenden Aktionspotentiale ohne Berücksichtigung von absteigenden und aufsteigenden Aktionspotentialen gezählt. Es zeigte sich, dass sich die Aktivität der Neurone, die durch den *ivn* projizieren, nicht veränderte wie man auch in der Originalableitung in Abbildung 38 erkennen kann.

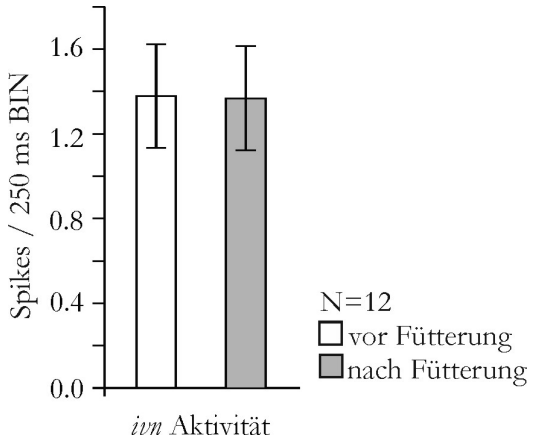


Abbildung 39: Gesamtaktivität der *ivn* Neurone vor Fütterung (weißer Balken) und direkt nach Fütterung (grauer Balken). Die Aktivität veränderte sich nach der Fütterung nicht signifikant (N=12).

Der Einfluss einer Futterinjektion auf den pylorischen Rhythmus war in den Originalableitungen in Abbildung 38 anhand der pylorischen Periode zu erkennen. Eine Mittelung der pylorischen Periode über 12 Tiere ergab, dass die Periodendauer signifikant von 1,79 ± 0,7 s vor auf 1,36 ± 0,4 s nach Fütterung ($p<0,0001$; N=12; Abbildung 40A) abnahm.

Die Anzahl der Spikes pro Burst der pylorischen Neurone PD und LP veränderte sich nach Futterinjektion im Vergleich zu vor der Fütterung dagegen nicht signifikant (Abbildung 40A.). Trotzdem änderte sich die Phasenlage von LP signifikant. Sowohl der Phasenanfang als auch das Phasenende von LP verzögerte sich nach der Futterinjektion (Abbildung 40B). Der Phasenanfang stieg von 0,35 ± 0,07 auf 0,38 ± 0,05 (N=12; $p<0,04$; Abbildung 40B), das Ende der Phase erhöhte sich von 0,64 ± 0,08 auf 0,68 ± 0,07 (N=12; $p<0,01$; Abbildung 40B). Die Phasenlage von PD war hingegen unverändert.

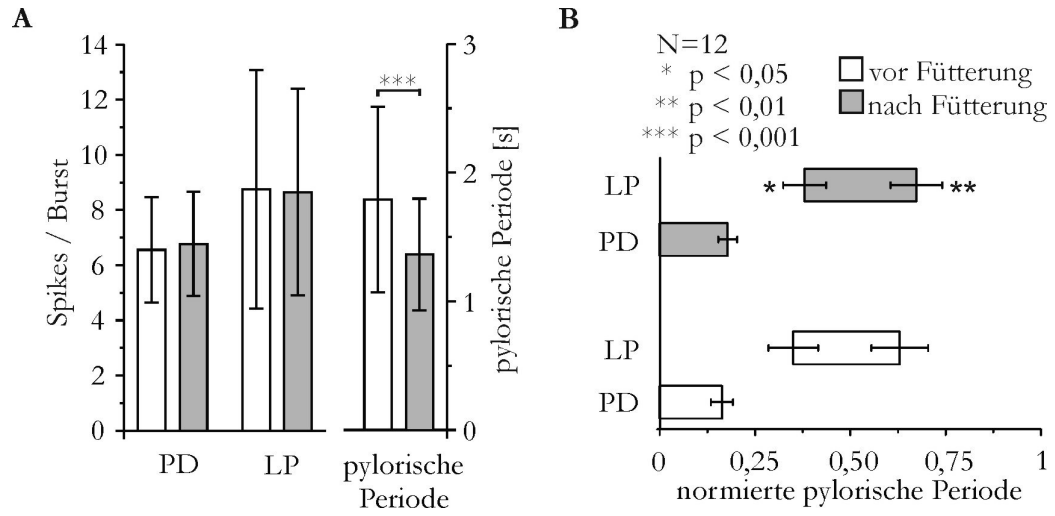


Abbildung 40: Statistische Auswertung des pylorischen Rhythmus 20 s vor und 20 s nach Futterinjektion. **A:** Anzahl der Spikes pro Burst der pylorischen Neurone PD und LP sowie die pylorische Periode vor Fütterung (weiße Balken) und nach Fütterung (graue Balken). Die Anzahl der Spikes pro Burst von PD und LP veränderten sich nicht signifikant (N=12). Die pylorische Periode verkürzte sich nach Futterinjektion signifikant. **B:** Phasendiagramm des pylorischen Rhythmus vor (weiße Balken) und nach Fütterung (graue Balken). Die Phasenlage des pylorischen Neurons PD änderte sich nach der Fütterung nicht. Phasenanfang und Phasenende von LP verzögerten sich dagegen nach Fütterung im Vergleich zu vor Fütterung signifikant.

4.2.2. Visuelle Stimulation

In Fleischer, (1981) wurde gezeigt, dass eine Beleuchtung von Tieren (*Panulirus interruptus*) einen zuvor aktiven gastrischen Rhythmus unterdrückte. Daher wurden in den folgenden Versuchen einfache visuelle Stimuli gegeben, um zu testen, ob Neurone auf dem *ivn* an der Vermittlung visueller Information beteiligt sind. Um einen möglichen Einfluss auf die IV Neurone sowie auf die Mustergeneratoren im STG zu untersuchen, wurden sowohl *ivn* als auch *dvn* extrazellulär abgeleitet. Dabei wurden über eine Kaltlichtquelle Lichtreize in Augennähe präsentiert (An- und Ausschalten der Kaltlichtquelle) und simultan die Aktivität der Neurone auf dem *ivn* und dem *dvn* aufgezeichnet. Die Dauer der Lichtreize betrug dabei jeweils ca. 5 s. In Abbildung 41 sind extrazelluläre Ableitungen des *dvn*s mit dem pylorischen Rhythmus und des *ivn*s vor und nach visueller Stimulation, die durch einen Pfeil gekennzeichnet ist, dargstellt. Es ist zu erkennen, dass weder die Gesamtaktivität der durch den *ivn* projizierenden Neurone noch die Aktivität des pylorischen Rhythmus (sichtbar auf dem *dvn*) durch die einfachen visuellen Stimuli beeinflusst wurde.

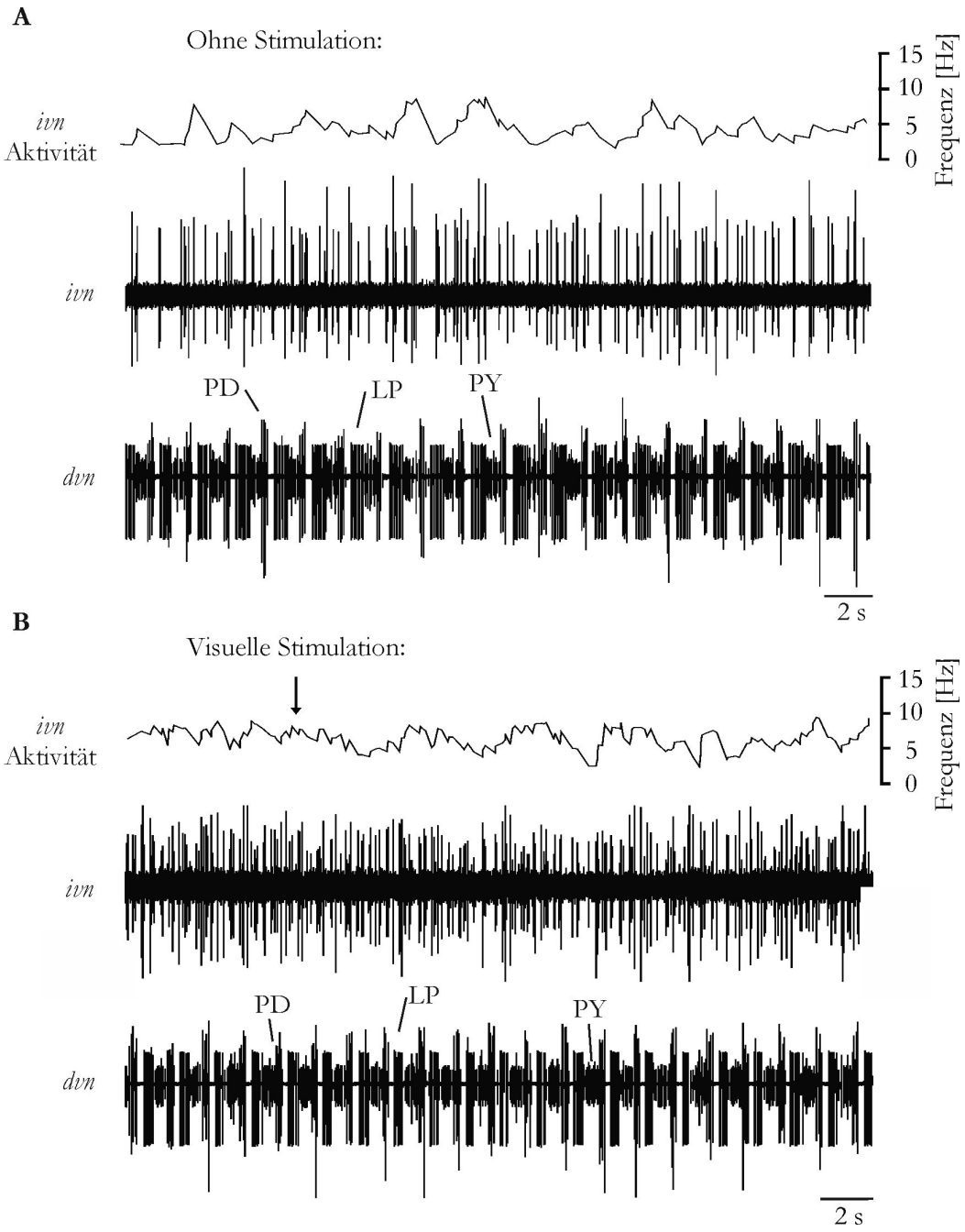


Abbildung 41: Visuelle Stimulation im intakten Tier beeinflusst weder die Aktivität der *ivn* Axone noch die beiden Netzwerke im STG. A: Extrazelluläre Ableitungen des *dvn*s (untere Spur) und des *ivn*s (mittlere Spur) mit Gesamtaktivität des *ivn*s (obere Spur) vor visueller Stimulation. **B:** Extrazelluläre Ableitungen des *dvn*s (untere Spur) und des *ivn*s (mittlere Spur) mit Gesamtaktivität des *ivn*s (obere Spur) während visueller Stimulation (Pfeil). Die Aktivität auf dem *ivn* sowie der pylorische Rhythmus veränderten sich nach der visuellen Stimulation durch einen Lichtreiz nicht.

Für die Quantifizierung der *ivn* Aktivität vor und nach visueller Stimulation wurde, wie auch schon bei den Fütterungsversuchen, die Gesamtaktivität der durch den *ivn* projizierenden Neurone pro 250 ms BIN ermittelt und über 20 s jeweils vor und direkt nach der Stimulation gemittelt (siehe Abbildung 42). Hierbei wurde ebenfalls eine BIN-Weite von 250 ms gewählt, um mögliche Veränderungen feststellen zu können. In Abbildung 42 ist zu erkennen, dass sich die Gesamtaktivität der Neurone, die durch den *ivn* projizieren, nach der visuellen Stimulation im Vergleich zu vorher nicht veränderte. Eine visuelle Stimulation durch Präsentation von Lichtreizen konnte also die Aktivität aller durch den *ivn* ziehenden Neurone nicht beeinflussen.

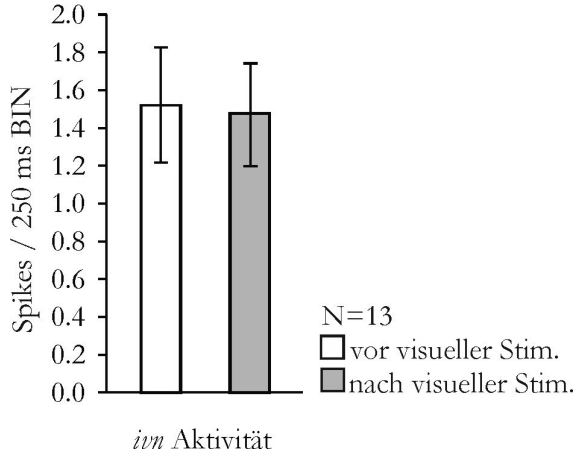


Abbildung 42: Gesamtaktivität der *ivn* Neurone vor visueller Stimulation (weißer Balken) und direkt nach visueller Stimulation (grauer Balken). Die Aktivität veränderte sich nach der Reizung nicht signifikant (N=13).

In diesen Experimenten konnte auch keine Veränderung des pylorischen Rhythmus beobachtet werden. Abbildung 43 zeigt, dass weder Spikeaktivität (Abbildung 43A) und Phasenlagen (Abbildung 43B) von PD und LP noch die pylorische Periode (Abbildung 43B) durch die visuelle Reizung beeinflusst wurde. Eine Präsentation von Lichtreizen hatte also weder einen Effekt auf die Aktivität der *ivn* Neurone noch auf das pylorische Netzwerk.

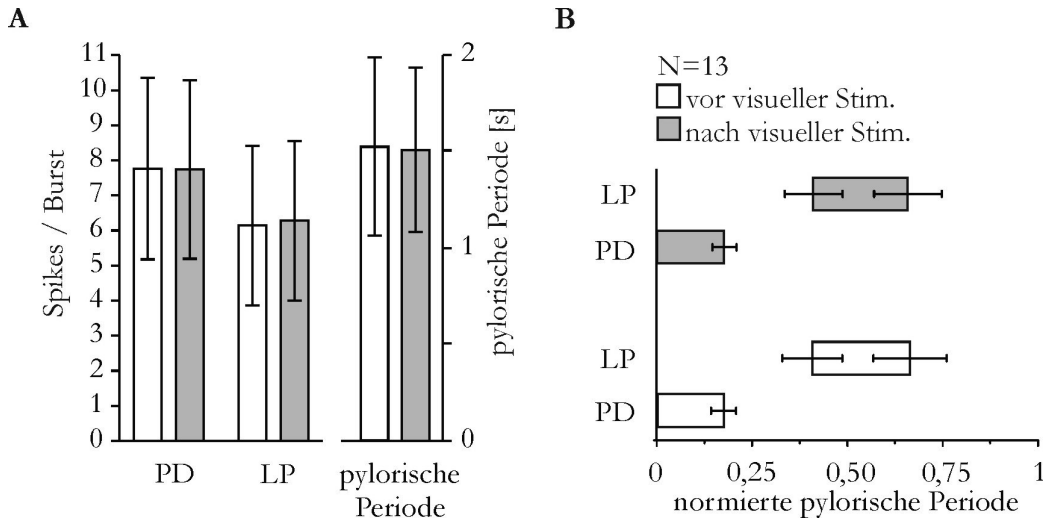


Abbildung 43: Statistische Auswertung des pylorischen Rhythmus vor (weiße Balken) und während (graue Balken) visueller Stimulation. **A:** Anzahl der Spikes pro Burst der pylorischen Neurone PD und LP sowie die pylorische Periode vor und nach visueller Reizung veränderten sich nicht signifikant (N=13). **B:** Phasendiagramm des pylorischen Rhythmus vor und während visueller Stimulation. Die Phasenlagen der pylorischen Neurone PD und LP änderten sich nach der visuellen Reizapplikation nicht.

4.2.3. Taktile Stimulation

Der Einfluss taktiler Reize auf die Aktivität der IV Neurone wurde bisher ebenfalls noch nicht untersucht. In diesen Experimenten wurden daher die Antennulae, die Antennen und die Mundwerkzeuge taktil mit einer Pinzette oder einem Pinsel stimuliert. Die Reizdauer betrug dabei zwischen 1 und 5 s. In Abbildung 44 sind extrazelluläre Originalableitungen des *dvn*s mit dem pylorischen Rhythmus, sowie des *ivn*s vor und direkt nach einer taktilen Stimulation dargestellt. Weder die Gesamtaktivität der durch den *ivn* projizierenden Neurone (obere Spur in Abbildung 44) noch der pylorische Rhythmus wurden durch die taktilen Stimuli beeinflusst.

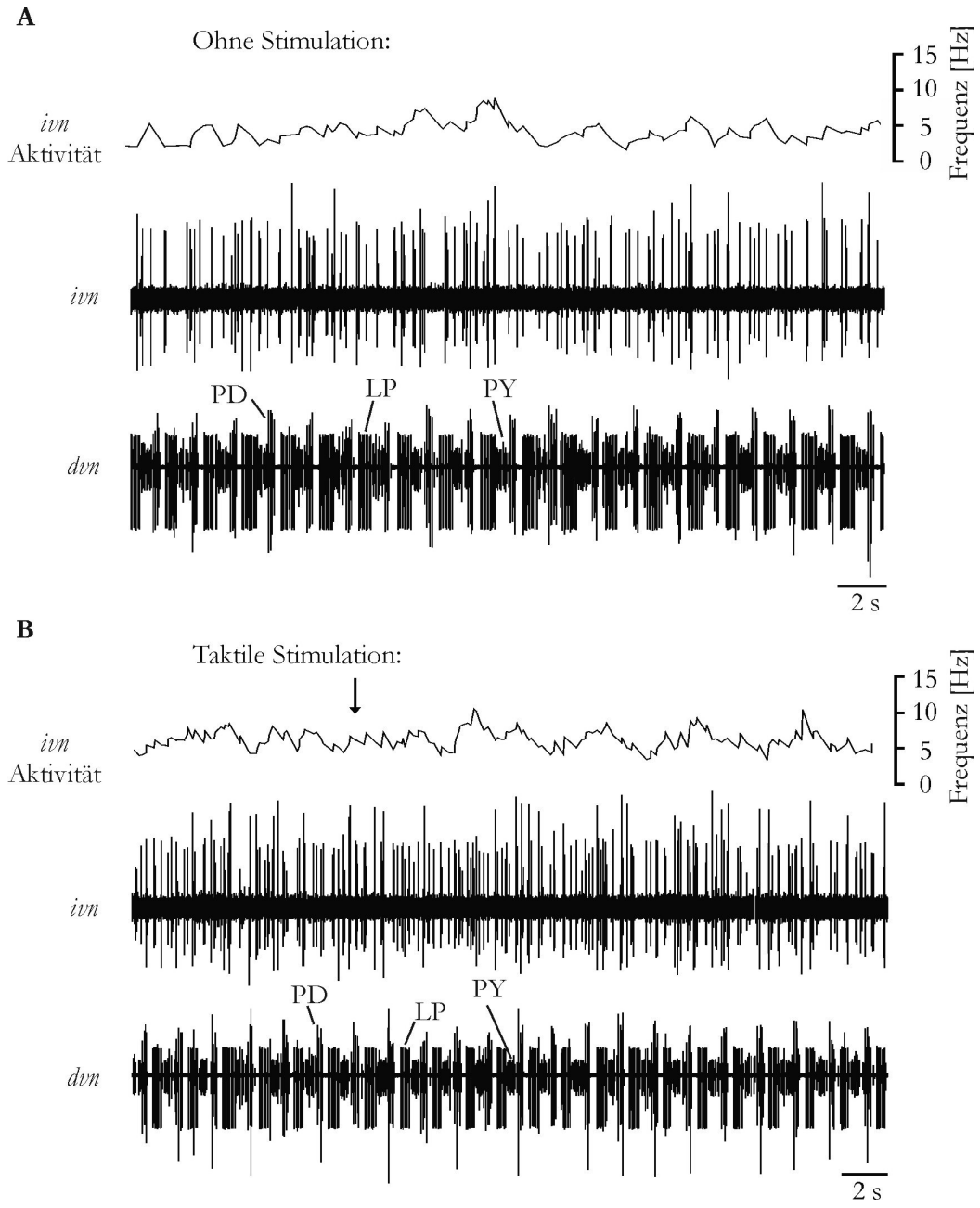


Abbildung 44: Taktile Stimulation im intakten Tier beeinflusst weder die Aktivität der *ivn* Axone noch die beiden Netzwerke im STG. A: Extrazelluläre Ableitungen des *dvn*s (untere Spur) und des *ivn*s (mittlere Spur) mit Gesamtaktivität des *ivn*s (obere Spur) vor taktiler Stimulation. **B:** Extrazelluläre Ableitungen des *dvn*s (untere Spur) und des *ivn*s (mittlere Spur) mit Gesamtaktivität des *ivn*s (obere Spur) während taktiler Stimulation (Pfeil). Die Aktivität auf dem *ivn* sowie der pylorische Rhythmus veränderten sich nach der taktilen Stimulation nicht.

Der Einfluss einer taktilen Reizung auf die Aktivität der durch den *ivn* projizierenden Neurone wurde, wie auch schon für Futterinjektion und visuelle Stimulation beschrieben, jeweils vor

und direkt nach der Reizung untersucht. Dafür wurde die Gesamtaktivität der Neurone auf dem *ivn* pro 250 ms BIN jeweils 20 s vor und nach Stimulation ermittelt. Die Anzahl der Aktionspotentiale pro BIN wurden anschließend jeweils vor und nach Reizapplikation gemittelt (siehe Abbildung 45). Abbildung 45 zeigt deutlich, dass sich die Aktivität der Neurone, die durch den *ivn* projizieren, nicht signifikant veränderte. Keines dieser über den *ivn* projizierenden Neurone konnte durch taktile Stimulation aktiviert werden.

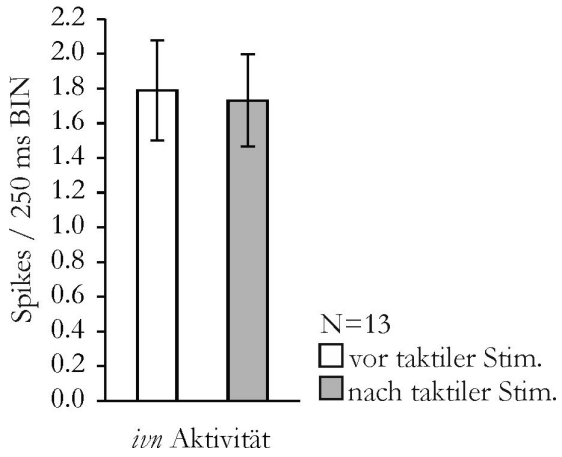


Abbildung 45: Gesamtaktivität der *ivn* Neurone vor taktiler Stimulation (weißer Balken) und direkt nach taktiler Stimulation (grauer Balken). Die Aktivität veränderte sich nach der Reizung nicht signifikant (N=13).

Bei der Auswertung des pylorischen Rhythmus ergab die statistische Auswertung ebenfalls keine signifikanten Änderungen. Sowohl die pylorische Periode (Abbildung 46A) als auch die Spikeaktivität für PD und LP (Abbildung 46A) sowie die Phasenlagen der beiden pylorischen Neurone (Abbildung 46B) wiesen keine signifikante Änderung auf. Der pylorische Rhythmus wurde folglich nicht durch eine taktile Stimulation beeinflusst.

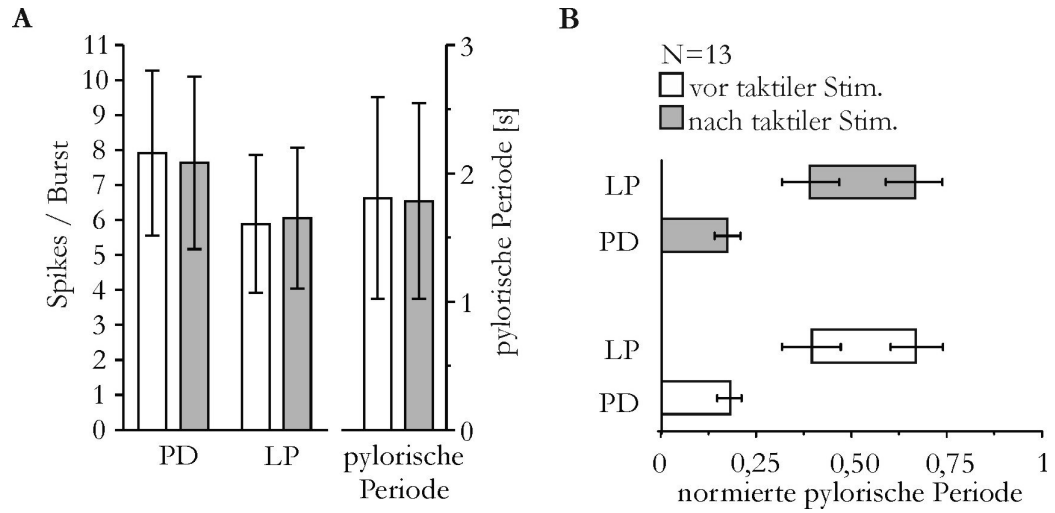


Abbildung 46: Statistische Auswertung des pylorischen Rhythmus vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) taktiler Stimulation. **A:** Anzahl der Spikes pro Burst der pylorischen Neurone PD und LP sowie die pylorische Periode vor und nach taktiler Reizung veränderten sich nicht signifikant (N=13). **B:** Phasendiagramm des pylorischen Rhythmus vor (weiße Balken) und nach taktiler Stimulation (graue Balken). Die Phasenlagen von PD und LP änderten sich nach der Reizung nicht.

4.2.4. Chemosensorische Stimulation

Neben visuellen und taktilen sensorischen Eingängen spielen chemosensorische Eingänge eine wichtige Rolle bei verschiedenen Verhaltensweisen, vor allem bei der Orientierung und der erfolgreichen Nahrungssuche. Daher wurde im Folgenden ein möglicher Einfluss chemosensorischer Reize auf die Aktivität der IV Neurone untersucht. Dafür wurde eine Mischung aus Ringerlösung und Krebs- bzw. Garnelenfleisch für mehrere Sekunden (zwischen 5 und 10 s) auf die Antennulae bzw. auf die Chemorezeptoren an den Mundwerkzeugen appliziert. Als Kontrolle wurde reine Ringerlösung verwendet, um zu überprüfen, ob eine mechanische Reizung alleine denselben Effekt erzielt.

Während der chemosensorischen Stimulation konnten auf den beiden *ivn* Ableitungen Bursts von Aktionspotentialen beobachtet werden (siehe Abbildung 47), die nach Entfernen der chemosensorischen Stimulationslösung durch Spülen mit Ringerlösung wieder aufhörten. Mittels beider extrazellulärer *ivn* Ableitungen konnte festgestellt werden, dass diese Aktionspotentiale vom Gehirn zum stomatogastrischen Nervensystem liefen. Dies deutet darauf hin, dass es sich dabei um Aktionspotentiale der IV Neurone handeln könnte. Die *ivn* Aktionspotentiale, die im STNS gebildet wurden, also vom STNS zum Gehirn aufstiegen, zeigten weder rhythmische Aktivität noch eine Erhöhung der Spikefrequenz. Ihre Aktivität

wurde daher durch eine chemosensorische Stimulation nicht beeinflusst. In 3 Tieren trat gleichzeitig mit den *ivn* Bursts ein GMR auf, was sich in einer rhythmischen Aktivität des LG Neurons auf der *dvn* Ableitung zeigte. In diesen Tieren lag die durchschnittliche Frequenz der absteigenden Aktionspotentiale über 30 Hz. Die mittlere Frequenz der absteigenden Neurone wurde dabei mit Hilfe eines Zeitfensters mit einer BIN-Weite von 1 s in Spike2 bestimmt.

In den Kontrollexperimenten mit Ringerlösung dagegen konnten keine rhythmischen Bursts auf den beiden *ivn* Ableitungen beobachtet werden. Des Weiteren trat kein GMR auf (N=13).

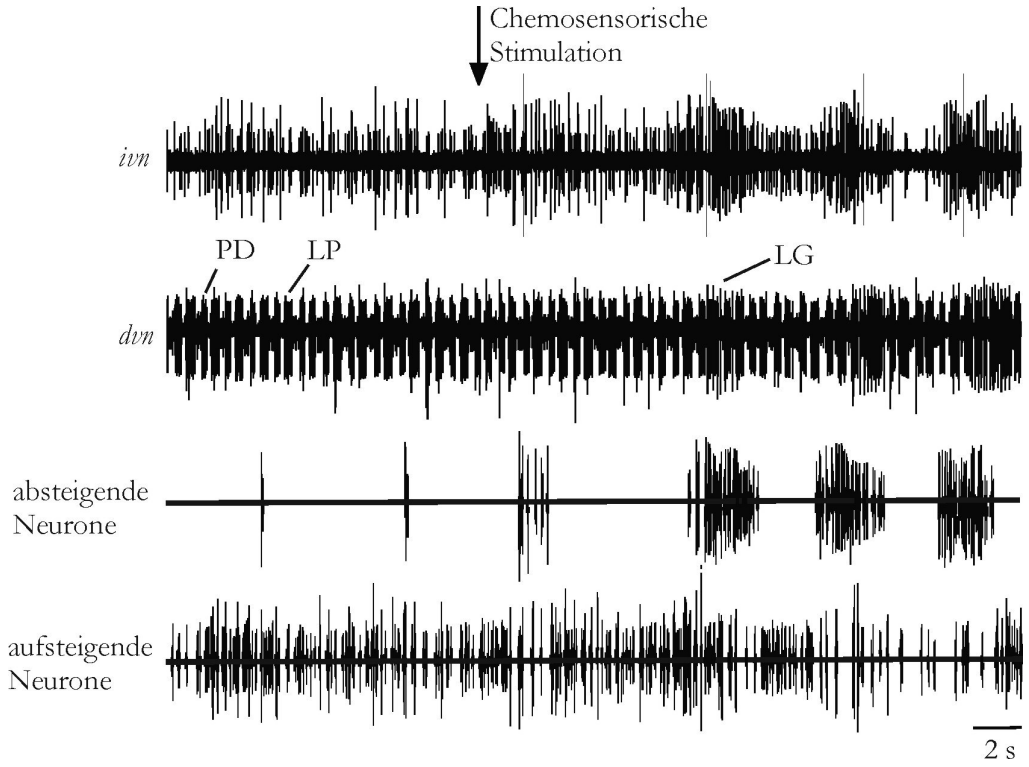


Abbildung 47: Chemosensorische Stimulation der ersten Antennen aktiviert vom Gehirn absteigende Neurone. Extrazelluläre Ableitung des *ivn*s (obere Spur) und des *dvn*s (zweite Spur von oben) vor und während chemosensorischer Reizung (Pfeil). Die Aktivität der vom Gehirn absteigenden Neurone (dritte Spur von oben) und die der vom STNS aufsteigenden Neurone (untere Spur) auf dem *ivn* wurden in den zwei unteren Spuren getrennt. Nach Stimulation begannen die absteigenden Neurone zu bursten, gleichzeitig fing LG (extrazellulär auf dem *dvn* abgeleitet) an, rhythmisch aktiv zu werden.

In den Experimenten, in denen gleichzeitig mit den rhythmischen Bursts auf dem *ivn* gastrische Rhythmen auftraten, betrug die Verzögerung vom Anfang eines *ivn* Bursts bis zum Anfang eines LG Bursts im Mittel 1,91 ± 0,7 s (N=3; siehe Abbildung 48). Abbildung 48 zeigt auch, dass die LG Bursts immer gleichzeitig mit den *ivn* Bursts auftraten, und zwar nur dann,

wenn deren Spikefrequenz über 30 Hz lag. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der LG Bursts von der Spikeaktivität der über den *ivn* projizierenden Neurone hin.

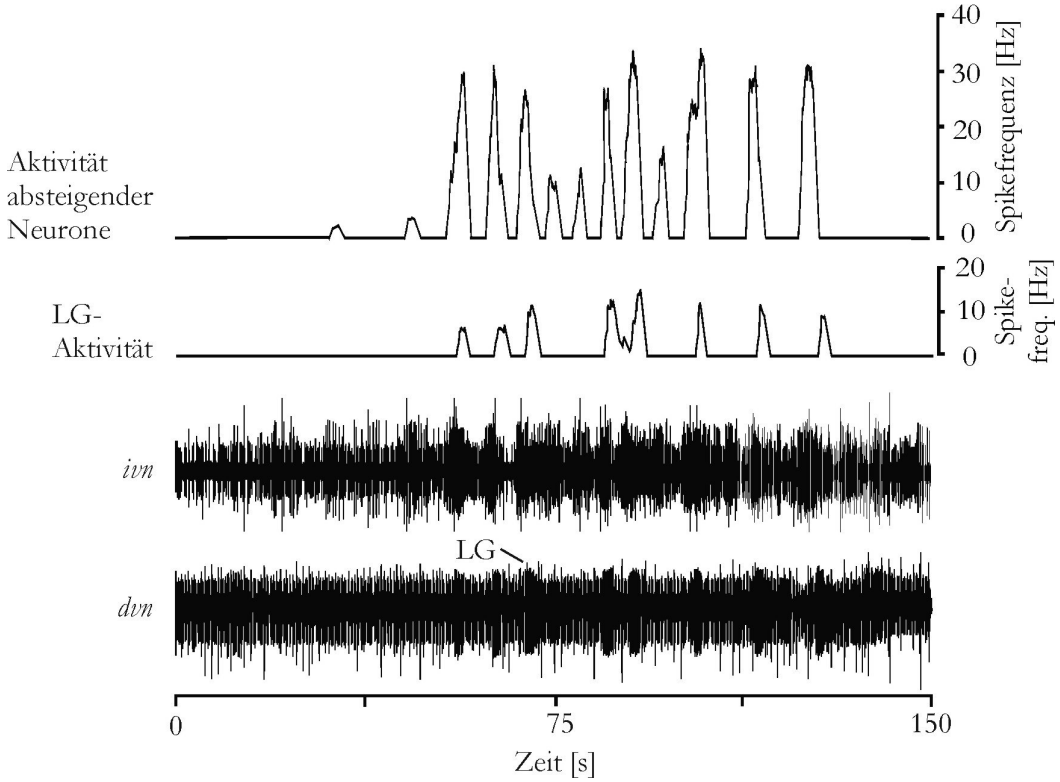


Abbildung 48: Kopplung der Aktivität von absteigenden Neuronen und LG Bursts *in vivo*. Extrazelluläre Ableitungen des *dvn*s (untere Spur) und *ivn*s (zweite Spur von unten). Die Aktivitäten von LG und den vom Gehirn absteigenden Neuronen sind in der zweiten Spur von oben bzw. in der oberen Spur gezeigt („sliding average" mit einer BIN-Weite von 1 s). Lag die Spikefrequenz der *ivn* Neurone über 30 Hz so traten mit leichter Verzögerung LG Bursts auf.

Zur graphischen Darstellung dieser rhythmisch auftretenden Bursts auf dem *ivn* wurden Box Plots mit Median, den oberen und unteren Quartilen sowie den beiden Extremwerten für Periode, Burstdauer und Spikefrequenz der Bursts erstellt (N=13; siehe Abbildung 49), um die zentrale Tendenz (hier durch den Median dargestellt) und die Streuung dieser Bursts in einem Diagramm zusammenzufassen. Die maximale Periode der Bursts betrug 37,66 s und das Minimum 4,43 s (Abbildung 49A), die Burstdauer der absteigenden Neurone reichte von 11,39 s bis 1,13 s (Abbildung 49B). Die mittlere Feuerfrequenz der Bursts ereichte maximal 40,23 Hz und betrug minimal 9,23 Hz (Abbildung 49C).

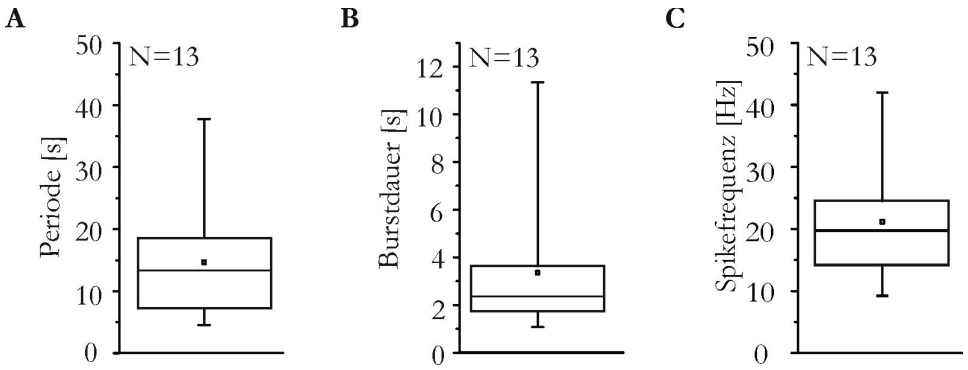


Abbildung 49: Auswertung der im intakten Tier auftretenden *ivn* Bursts. Box Plots (Minimum, 25 %, Median, 75 %, Maximum und Mittelwert (▫)). **A:** der Periode, **B:** der Burstdauer sowie **C:** der Spikefrequenz der rhythmischen Aktivität auf dem *ivn*.

Zusammenfassung:

Visuelle oder taktile Stimuli sowie Futterinjektion in den Magen hatten keinen Einfluss auf die Aktivität der Neurone, die durch den *ivn* projizieren. Durch chemosensorische Reizung konnten jedoch Aktionspotentiale ausgelöst werden, die vom Gehirn zum STNS liefen. Diese ausgelösten Aktionspotentiale traten dabei in rhythmischen Bursts auf. In drei Tieren zeigte sich zur gleichen Zeit rhythmische Aktivität des LG Neurons, d.h. ein gastrischer Mühlenrhythmus trat auf. Da die rhythmischen Aktionspotentiale auf dem *ivn* vom Gehirn zum STNS liefen, könnte es sich um Aktionspotentiale der IV Neurone handeln. Um diese Hypothese zu testen, führte ich anschließend Experimente im isolierten Nervensystem durch.

4.3 *in vitro* Oszillationen der IV Neurone

Um den Ursprung der vom Gehirn absteigenden Aktionspotentiale zu ermitteln, wurde an verschiedenen Nerven im STNS extrazellulär abgeleitet. Dazu wurde das STNS zusammen mit dem Gehirn isoliert. Das STNS und das Gehirn waren im Gegensatz zum intakten Tier ausschließlich über den *ivn* verbunden, die *coc*s waren durchtrennt. Der *ivn* wurde extrazellulär an zwei Stellen abgeleitet, um die vom Gehirn zum STNS laufenden Aktionspotentiale anhand ihrer Laufrichtung identifizieren zu können (Abbildung 50). In 19 von 34 Präparaten mit intaktem Gehirn wurde eine spontane rhythmische Aktivität zweier vom Gehirn absteigender Neurone beobachtet (siehe Abbildung 52). Bei der Präparation wurde darauf geachtet, dass die ophthalmische Arterie, in welcher Hämolymphe zum Gehirn transportiert wird, für 5 bis 10

min mit gekühlter Ringerlösung perfundiert wurde, um die neuronale Aktivität im Gehirn zu erhalten. In Präparationen ohne intaktes Gehirn konnte zu keinem Zeitpunkt eine solche rhythmische Aktivität beobachtet werden (N=64). Dass es sich dabei um die Spikes der IV Neurone handelt, konnten anhand zweier weiterer extrazellulärer Ableitungen festgestellt werden. Auf den extrazellulären Ableitungen des *son*s und *stn*s konnten mit Hilfe von Multisweep-Darstellungen dieselben Aktionspotentiale wie auf den beiden *ivn* Ableitungen ermittelt werden, jeweils mit entsprechender Zeitverzögerung aufgrund der Laufzeiten der Aktionspotentiale zum jeweiligen Ableitort. Meine retrograden Färbungen hatten bereits gezeigt, dass ausschließlich die IV Neurone über den *ivn*, *son* und *stn* projizieren (siehe Abschnitt 4.1.2). Das bedeutet, dass es sich bei den Aktionspotentialen auf den *ivn*, *son* und *stn* Ableitungen um Aktionspotentiale der IV Neurone handelt. Interessanterweise konnten diese Aktionspotentiale der IV Neurone nicht auf dem *ion* beobachtet werden, obwohl durch retrograde Färbungen gezeigt werden konnte, dass die IV Neurone auch über den *ion* projizieren (siehe Abschnitt 4.1.2).

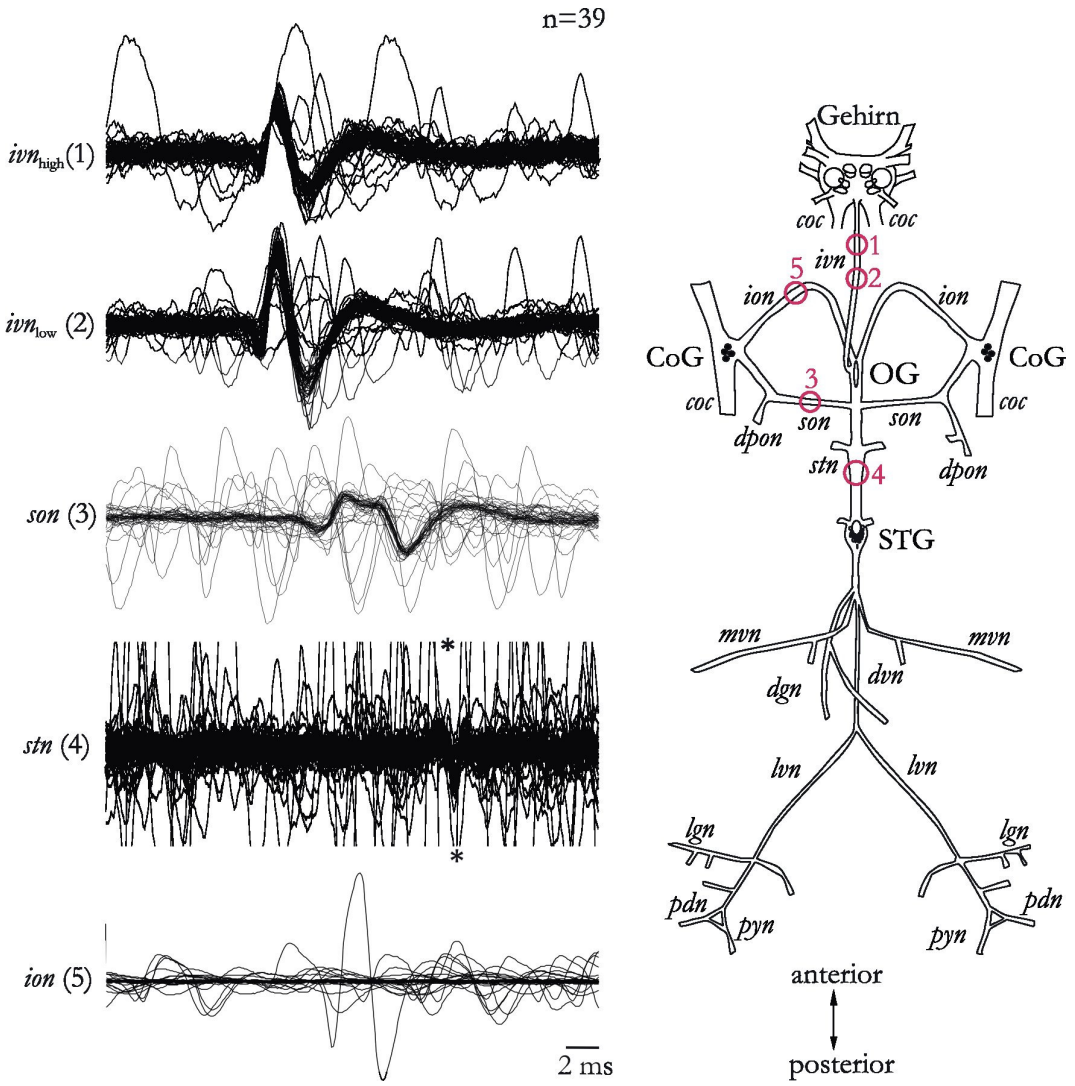


Abbildung 50: Multisweep-Darstellung der Aktionspotentiale (n=39) auf ivn_{high}, ivn_{low}, *son*, *stn* und *ion*, getriggert auf die vom Gehirn absteigenden Aktionspotentiale auf dem ivn_{high}. Die Aktionspotentiale traten dabei in rhythmischen Bursts auf. Die verschiedenen Ableitungsorte sind mit Zahlen im STNS rechts gekennzeichnet. Die Aktionspotentiale liefen vom Gehirn über den *ivn* zum *son* und zum *stn*. Auf dem *ion* konnten keine zeitlich korrelierten Spikes identifiziert werden. Die Amplituden der größten Einheiten der *stn* Ableitung sind nicht erkennbar, da der Multisweep im unteren und oberen Bereich beschnitten wurde (*).

Bei der beobachteten rhythmischen Aktivität auf dem *ivn* handelte es sich dementsprechend eindeutig um die Bursts der IV Neurone. Die rhythmische Aktivität auf dem *ivn* wurde als Box Plots graphisch dargestellt. Im isolierten Nervensystem reichte die Periodedauer der rhythmischen Aktivität der IV Neurone von 47,85 s bis zu 2,99 s (Abbildung 51A). Für die Burstdauer ergab sich ein Maximalwert von 4,75 s und ein Minimalwert von 0,43 s (Abbildung 51B). Die mittlere Feuerfrequenz innerhalb eines Bursts reichte von 42,19 Hz bis hin zu 10,59

Hz (Abbildung 51C). Es zeigte sich, dass sich Periode, Burstdauer und Spikefrequenz der im isolierten STNS auftretenden IV Bursts nicht signifikant von denen unterschieden, die im intakten Tier beobachtet wurden (vergleiche Abbildung 51 und Abbildung 49).

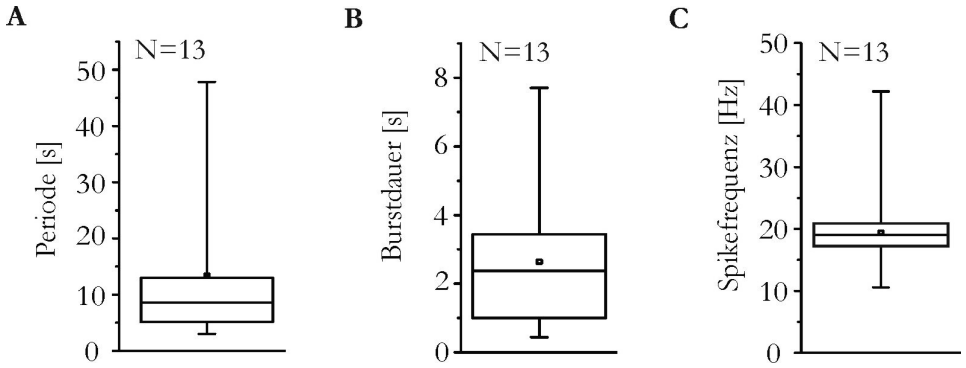


Abbildung 51: Auswertung der *in vitro* auftretenden IV Bursts. Box Plots (Minimum, 25 %, Median, 75 %, Maximum und Mittelwert (▫)). **A:** der Periode, **B:** der Burstdauer sowie **C:** der Spikefrequenz der rhythmischen IV Aktivität.

Die Originalableitung des *lgn*s und *ivn*s in Abbildung 52 zeigt das simultane Auftreten von IV Bursts und Bursts des gastrischen Neurons LG. Ein zeitlicher Zusammenhang von IV Neuronen und LG Bursts konnte in drei Tieren beobachtet werden. Es traten dabei nur LG Bursts auf, wenn die Spikefrequenz der IV Bursts, auf die ein LG Burst folgte, mehr als 30 Hz betrug (siehe Abbildung 52). Die Frequenz wurde dabei über einen „sliding average“ mit einer BIN-Weite von 1 s ermittelt. Ein solcher zeitlicher Zusammenhang von Bursts auf dem *ivn* und dem gastrischen Neuron LG konnte auch schon in den *in vivo* Experimenten während chemosensorischer Stimulation beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.2.4). Im Gegensatz zu den Versuchen im intakten Tier war das Gehirn im isolierten Nervensystem ausschließlich über den *ivn* mit dem STNS verbunden, die *coc*s waren durchtrennt. Es konnte keine rhythmische Aktivität von aufsteigenden Neuronen beobachtet werden, die zeitlich gekoppelt waren mit gastrischen Neuronen. Eine Übertragung der gastrischen Information über Neurone aus dem STNS kann somit also ausgeschlossen werden. Die IV Neurone waren die einzig aktiven Neurone, deren Aktivität mit der von LG zeitlich gekoppelt war und die stets kurz vor LG aktiv waren. Die Aktivität der IV Neurone scheint daher die Aktivität des gastrischen Neurons LG zu beeinflussen und damit einen gastrischen Rhythmus zu starten. Um ein besseres Verständnis der Mechanismen zu erlangen, durch welche die IV Neurone einen Einfluss auf die motorischen Zentren im STNS ausüben, wurde deren Einfluss auf den gastrischen und pylorischen Rhythmus im Detail charakterisiert.

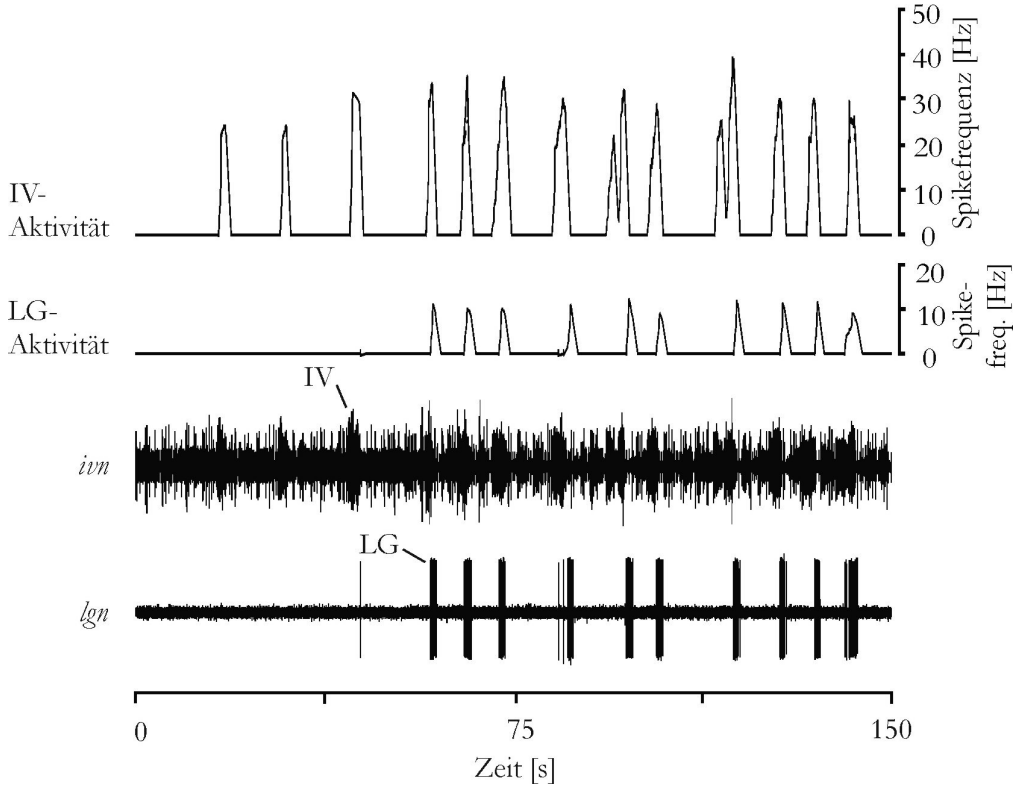


Abbildung 52: Kopplung von IV und LG Bursts *in vitro*. Extrazelluläre Ableitungen des *lgn*s (untere Spur) und *ivn*s (zweite Spur von unten). Aktivitäten von LG und den IV Neuronen sind in der zweiten Spur von oben bzw. in der oberen Spur gezeigt („sliding average" mit einer BIN-Weite von 1 s). Lag die Spikefrequenz der *ivn* Neurone über 30 Hz so traten mit leichter Verzögerung LG Bursts auf.

Zusammenfassung:

Anhand extrazellulärer Ableitungen konnten die Aktionspotentiale der IV Neurone auf verschiedenen Nerven ermittelt und eindeutig identifiziert werden. Die Aktionspotentiale liefen sowohl über *ivn* und *son* als auch über den *stn*. Auf dem *ion* konnten dagegen die Aktionspotentiale der IV Neurone nicht beobachtet werden. Da die IV Neurone die einzigen Neurone mit Axonen in *ivn*, *son* und *stn* sind, können die beobachteten Aktionspotentiale trotzdem den IV Neuronen zugeordnet werden. Die IV Neurone feuerten in mehr als der Hälfte der Experimente, in denen das Gehirn mit dem STNS verbunden war, rhythmische Bursts von Aktionspotentialen. In Tieren, in denen gleichzeitig gastrische Rhythmen aufgezeichnet wurden, waren die IV Bursts mit den LG Bursts zeitlich gekoppelt. Im Folgenden habe ich den Einfluss der IV Neurone auf die Mustergeneratoren im STNS genauer untersucht.

4.4 Effekte der IV Neurone auf den pylorischen Rhythmus

Zur Untersuchung der Effekte der IV Neurone auf die motorischen Netzwerke in *C. pagurus* wurde der *ivn* extrazellulär stimuliert. Auf den extrazellulären Ableitungen des *ivn*s waren die Aktionspotentiale der IV Neurone meist diejenigen mit den größten Amplituden, d.h. die IV Neurone besitzen entsprechend die Axone mit dem größten Durchmesser im *ivn*. Bei der extrazellulären Reizung des *ivn*s wurde daher immer die niedrigste Spannung verwendet, bei der ein Effekt auf die Mustergeneratoren im STNS beobachtet werden konnte. Diese Experimente wurden im isolierten Nervensystem sowohl mit als auch ohne Gehirn durchgeführt. Es wurden Stimulationsfrequenzen zwischen 10 und 40 Hz benutzt, d.h. die Stimulationsfrequenzen entsprachen den Feuerfrequenzen der IV Neurone im intakten Tier (Abschnitt 4.2.4) und im isolierten Nervensystem (Abschnitt 4.3). Während dieser *ivn* Stimulationen wurden die Effekte auf den pylorischen Rhythmus charakterisiert. Da es schwierig ist, die Aktionspotentiale einiger pylorischer Neurone auf extrazellulären Ableitungen zu separieren, wurden zur Untersuchung der Effekte auf pylorische Neurone ausschließlich intrazelluläre Ableitungen verwendet (siehe Abbildung 53). Stimulationsfrequenzen von 10 und 15 Hz (10 Hz: N=2; 15 Hz: N=5) ergaben dabei keine signifikanten Änderungen im pylorischen motorischen Muster.

Eine *ivn* Stimulation mit höheren Stimulationsfrequenzen konnte das pylorische Muster dagegen beeinflussen. Die Effekte auf den pylorischen Rhythmus während 20 und 40 Hz Stimulation waren dabei qualitativ ähnlich. Wie in Abbildung 53 dargestellt, wurde die Aktivität des lateralen pylorischen Neurons (LP) während 40 Hz *ivn* Stimulation deutlich verringert. Die Anzahl der Spikes pro Burst des pylorischen Dilatorneurons (PD) nahm ebenfalls ab.

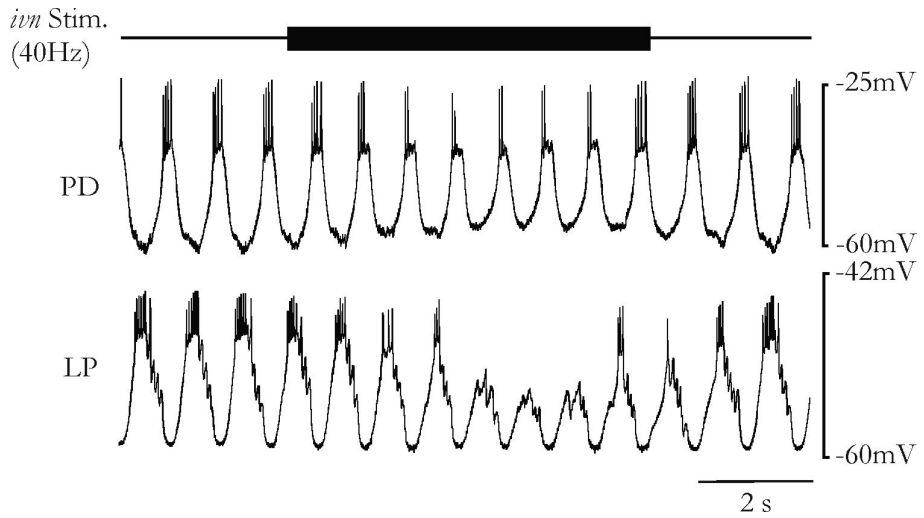


Abbildung 53: Die IV Neurone beeinflussen den pylorischen Rhythmus. Simultane intrazelluläre Ableitung der pylorischen Neurone PD (obere Spur) und LP (untere Spur) während 40 Hz *ivn* Stimulation. Die Aktivität beider Neurone nahm während der *ivn* Stimulation ab.

Zur Quantifizierung der Aktivität des pylorischen Rhythmus wurden die pylorische Periode, sowie die Aktivitäten verschiedener pylorischer Neurone jeweils vor, während und nach *ivn* Stimulation mit dem Spike2 Skript Crab_Analyzer bestimmt. Eine *ivn* Stimulation bewirkte eine kleine, aber signifikante Abnahme der pylorischen Periode von 1,08 ± 0,4 s vor Reizung auf 1,04 ± 0,3 s (N=11; $p<0,005$; Abbildung 54) während 20 Hz *ivn* Stimulation und von 1,05 ± 0,3 s auf 0,95 ± 0,3 s (N=14; $p<0,05$; Abbildung 55) während 40 Hz *ivn* Stimulation.

In Abbildung 53 ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität von PD und LP während *ivn* Stimulation abnimmt. Die Aktivität von PD, welches elektrisch gekoppelt ist mit dem Schrittmacherneuron AB (anteriorer Burster; Maynard and Selverston, 1975; Miller and Selverston, 1982; Eisen and Marder, 1982) verringerte sich im Mittel von 4,3 ± 2,6 Spikes pro Burst vor Stimulation auf 3,96 ± 2,5 Spikes pro Burst (N=11; $p<0,002$; Abbildung 54) während 20 Hz *ivn* Stimulation und von 4,12 ± 1,9 Spikes pro Burst auf 3,47 ± 1,6 Spikes pro Burst (N=14; $p<0,001$; Abbildung 55) während 40 Hz *ivn* Stimulation.

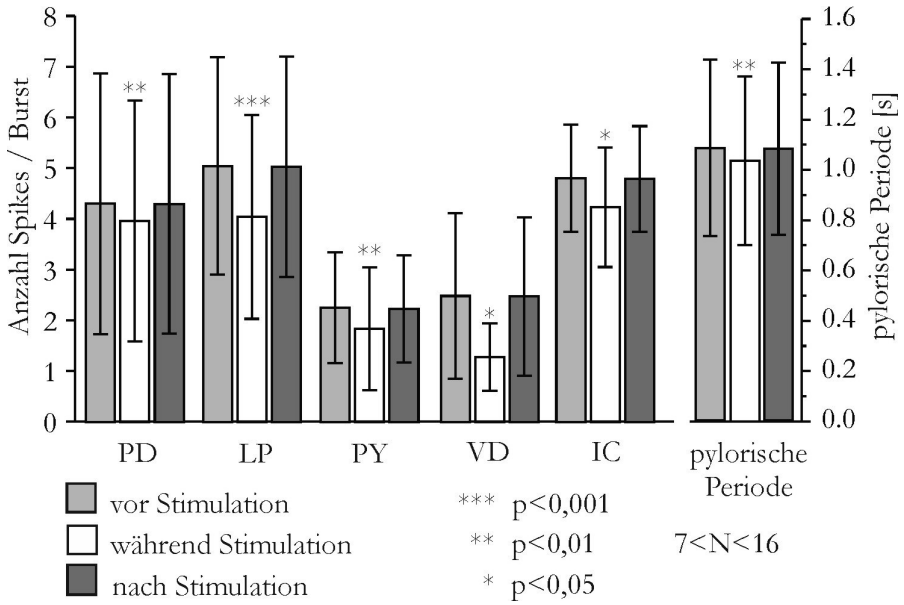


Abbildung 54: Effekte auf den pylorischen Rhythmus vor (hellgraue Balken), während (weiße Balken) und nach (dunkelgraue Balken) 20 Hz *ivn* Stimulation. Die Aktivität von PD, LP, PY, VD und IC nahm während der *ivn* Stimulation im Vergleich zu Vor- und Nachkontrolle signifikant ab. Außerdem wurde die pylorische Periode signifikant verkürzt. 7<N<16.

Die Originalableitung in Abbildung 53 zeigt, dass die Aktivität des pylorischen Neurons LP während der *ivn* Stimulation ebenfalls abnahm. Die Aktivität von LP verringerte sich durchschnittlich von 5,04 ± 2,1 Spikes pro Burst vor *ivn* Stimulation auf 4,04 ± 2,0 Spikes pro Burst (N=15; p<0,001; Abbildung 54) während 20 Hz *ivn* Stimulation und von 4,82 ± 2,2 Spikes pro Burst auf 2,88 ± 2,1 Spikes pro Burst (N=17; p<0,001; Abbildung 55) während 40 Hz Stimulation.

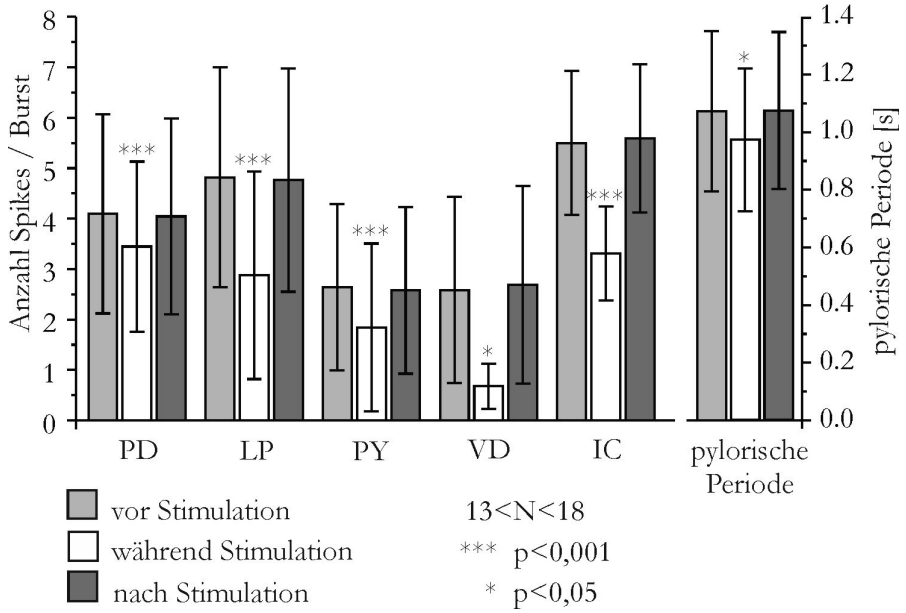


Abbildung 55: Effekte auf den pylorischen Rhythmus vor (hellgraue Balken), während (weiße Balken) und nach (dunkelgraue Balken) 40 Hz *ivn* Stimulation. Die Aktivität von PD, LP, PY, VD und IC nahm während der *ivn* Stimulation im Vergleich zu Vor- und Nachkontrolle signifikant ab. Außerdem wurde die Periodendauer des pylorischen Rhythmus signifikant verkürzt. 13<N<18.

Während eine *ivn* Reizung immer denselben Effekt auf PD und LP hatte, wurden unterschiedliche Effekte der *ivn* Stimulation auf die pylorischen Konstriktormotoneurone (PYs) beobachtet. Wie in der Originalableitung in Abbildung 56A zu erkennen ist, wurde die Aktivität von PY während der *ivn* Reizung verringert. In 14 Tieren nahm die Aktivität von PY von 2,25 ± 1,1 Spikes pro Burst vor *ivn* Stimulation auf 1,84 ± 1,2 Spikes pro Burst ($p<0,005$; Abbildung 54) während 20 Hz *ivn* Reizung und von 2,60 ± 1,6 Spikes pro Burst auf 1,76 ± 1,6 Spikes pro Burst ($p<0,001$; Abbildung 55) während 40 Hz Stimulation ab. Im Gegensatz dazu wurde in 3 von 17 Tieren die PY Aktivität von 1,64 ± 0,4 Spikes pro Burst auf 2,17 ± 0,4 Spikes pro Burst während 40 Hz *iv*n Reizung erhöht (Abbildung 56B). Die Originalableitung in Abbildung 56B zeigt die Erhöhung der PY Aktivität während der *ivn* Reizung deutlich. Des Weiteren wurde in vier Tieren beobachtet, dass PY während einer *ivn* Stimulation nicht beeinflusst wurde (Abbildung 56C). Diese beiden zuletzt beschriebenen Effekte auf die PYs wurden in die Quantifizierung aus Abbildung 54 und Abbildung 55 nicht mit einbezogen.

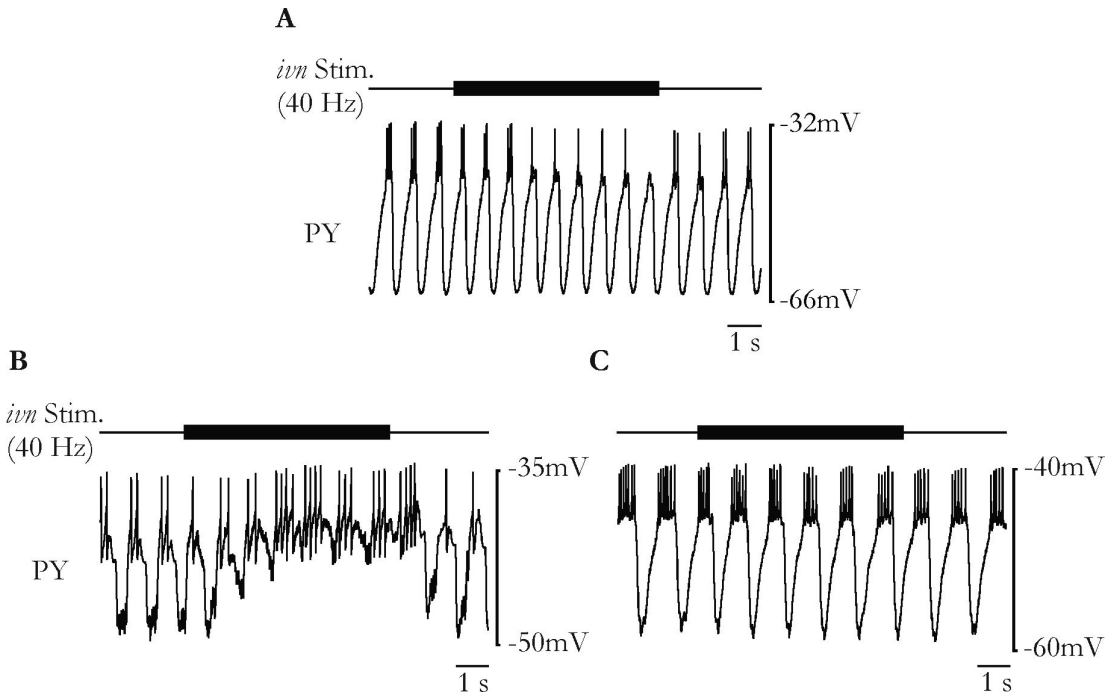


Abbildung 56: Einflüsse der IV Neurone auf die pylorischen Konstriktorneurone (PYs). Intrazelluläre Ableitungen von PY in drei verschiedenen Tieren. **A:** Die Aktivität von PY wurde während der *ivn* Stimulation verringert. **B:** Die Aktivität von PY wurde während der 40 Hz *ivn* Reizung erhöht. **C:** Die Aktivität von PY wurde während der 40 Hz *ivn* Reizung nicht beeinflusst.

Der Einfluss einer *ivn* Reizung auf das ventrale Dilatorneuron (VD) und das inferiore kardiale Neuron (IC) war dagegen in allen Tieren sehr ähnlich. Die Aktivitäten von VD und IC nahmen während *ivn* Stimulation ab. Für VD nahm die Anzahl der Spikes pro Burst während 20 Hz Stimulation von 2,48 ± 1,6 Spikes pro Burst auf 1,28 ± 0,7 Spikes pro Burst ab (N=11; $p<0,05$; Abbildung 54) und verringerte sich während 40 Hz Stimulation von 3,03 ± 1,8 Spikes pro Burst auf 0,82 ± 0,6 Spikes pro Burst (N=13; $p<0,05$; Abbildung 55). Die Aktivität von IC verringerte sich von 4,80 ± 1,1 Spikes pro Burst auf 4,23 ± 1,2 Spikes pro Burst (N=7; $p<0,05$; Abbildung 54) während 20 Hz Stimulation und von 5,48 ± 1,3 Spikes pro Burst auf 3,16 ± 1,0 Spikes pro Burst (N=10; $p<0,001$; Abbildung 55) während 40 Hz *ivn* Stimulation.

In anderen Krustazeenarten wird der pylorische Rhythmus durch eine hochfrequente IV Aktivität inhibiert.

Während der pylorische Rhythmus ähnlich beeinflusst wurde wie in anderen Krustazeenarten (Dando and Selverston, 1972; Sigvardt and Mulloney, 1982a; 1982b; Marder and Eisen, 1984a; Christie et al., 2004) konnten in *C. pagurus* keine postsynaptischen Potentiale in den untersuchten pylorischen Neuronen beobachtet werden, die mit den *ivn* Stimuli zeitlich korrelierten.

Zusammenfassung:

Die *ivn* Reizungen mit 20 und 40 Hz hatten jeweils einen ähnlichen Effekt auf den pylorischen Rhythmus: die pylorische Periode wurde verkürzt und die Aktivität der pylorischen Neurone PD, LP, VD und IC wurde verringert. Für PY wurden dagegen unterschiedliche Effekte beobachtet: 1. Verringerung der Aktivität während *ivn* Stimulation (N=14). 2. Erhöhung der Aktivität während *ivn* Reizung (N=3) und 3. keine Aktivitätsbeeinflussung durch die IV Neurone (N=4).

4.5 Effekte der IV Neurone auf den gastrischen Mühlenrhythmus

Der gastrische Mühlenrhythmus (GMR) hat üblicherweise eine zehnmal längere Periodendauer als der pylorische Rhythmus (Weimann et al., 1991; Weimann and Marder, 1994; Bartos et al., 1999). Meine Ergebnisse aus Abschnitt 4.3 zeigen, dass gleichzeitig mit einer rhythmischen IV Aktivität ein LG Burst auftreten kann (N=3). Auch im intakten Tier konnte eine ähnliche rhythmische Aktivität auf dem *ivn* mit gleichzeitig auftretenden LG Bursts beobachtet werden (N=3). Die Aktionspotentiale liefen dabei vom Gehirn zum STNS. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den beobachteten Bursts ebenfalls um Aktionspotentiale der IV Neurone handelt. *In vitro* und *in vivo* lag die Frequenz der Aktionspotentiale auf dem *ivn* bei gleichzeitigem Auftreten eines GMR über 30 Hz.

Zur Untersuchung der Effekte einer solchen rhythmischen IV Aktivität auf den gastrischen Mühlenrhythmus im isolierten Nervensystem wurde der *ivn* jeweils zehnmal rhythmisch mit unterschiedlichen Frequenzen (20 oder 40 Hz) und Pulsdauern zwischen 2 und 6 s gereizt. Die Interpulsintervalle reichten von 1 bis 20 s. Aus diesen Stimulusparametern resultierte also eine Periodendauer zwischen 3 und 26 s.

4.5.1. *ivn* Stimulation löst einen gastrischen Mühlenrhythmus aus

In allen Präparaten ohne spontanaktive gastrische Rhythmen löste eine *ivn* Reizung mit 40 Hz einen gastrischen Rhythmus aus, solange die Reizperiode größer als 4 s war (N=31; Abbildung 57). Stimuli mit Reizdauern von weniger als 3 s konnten dabei keine gastrischen Rhythmen auslösen. Die durch *ivn* Reizung ausgelösten gastrischen Mühlenrhythmen hielten dabei nur für die Dauer der Stimulation an. In Abbildung 57 sind extrazelluläre Ableitungen des *lgn*s mit der

Aktivität des lateralen gastrischen Neurons (LG) und des *dgn*s mit der Aktivität des dorsalen gastrischen Neurons (DG) und den gastrischen Motoneuronen (GM) sowie eine intrazelluläre Ableitung eines gastrischen Motoneurons (GM) während 40 Hz *ivn* Reizen mit unterschiedlicher Reizperiode dargestellt. Die Stimulationen fanden dabei im gleichen Tier statt, in Abbildung 57A betrug die Reizperiode 8 s und in Abbildung 57B 21 s. Die Ableitungen zeigen, dass ein gastrischer Mühlenrhythmus, welcher durch die alternierende Aktivität von LG und DG charakterisiert wird, bei beiden Reizen ausgelöst wurde. Die LG Bursts traten dabei stets während der *ivn* Reize auf, GM war annähernd gleichzeitig mit LG aktiv. Die Periode der ausgelösten gastrischen Rhythmen entsprach also der vorgegebenen Stimulusperiode (siehe auch Abbildung 58).

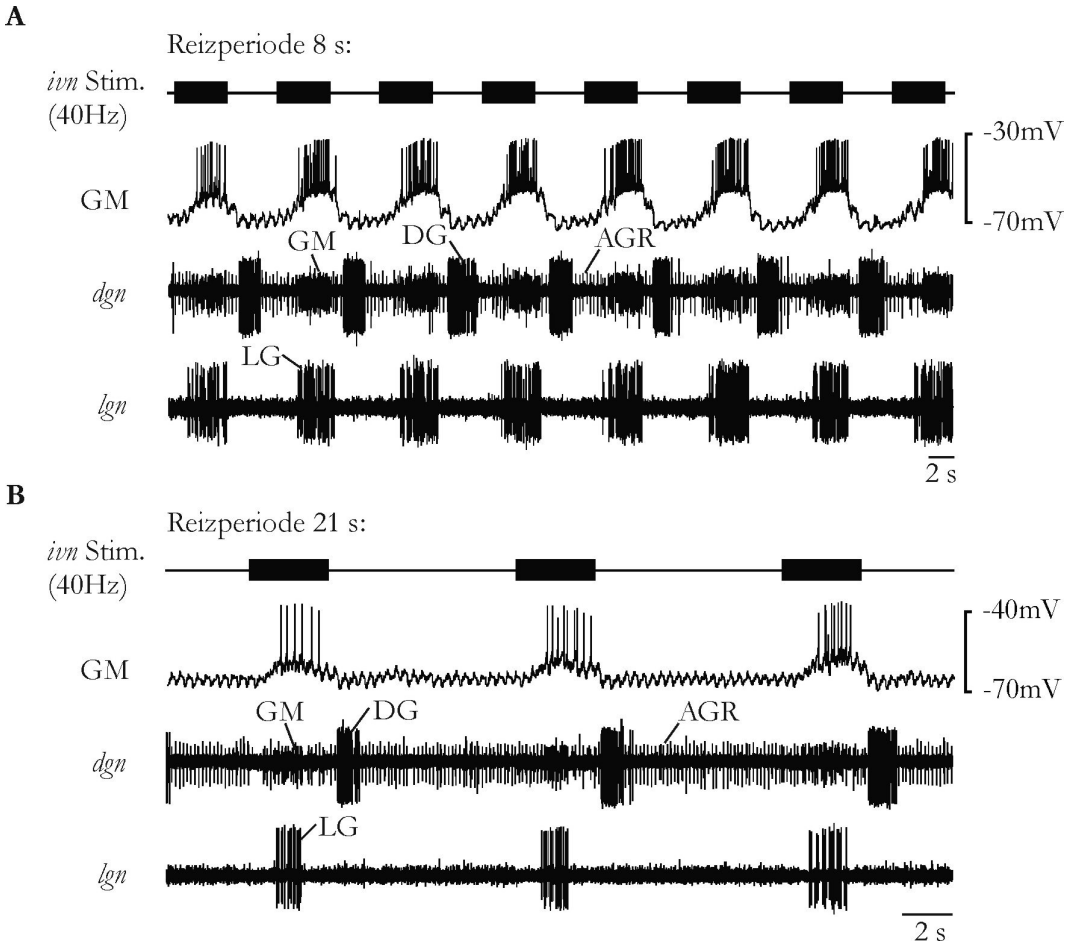


Abbildung 57: Eine 40 Hz *ivn* Stimulation löste einen gastrischen Mühlenrhythmus aus. Extrazelluläre Ableitung des *lgn*s (untere Spur) mit der Aktivität von LG und des *dgn*s (zweite Spur von unten) mit der Aktivität von DG und den GMs sowie eine intrazelluläre Ableitung einer GM (dritte Spur von unten). In der oberen Spur ist der *ivn* Reiz dargestellt. **A:** Ein durch *ivn* Stimulation ausgelöster GMR. Die Reizperiode betrug dabei 8 s. **B:** Gastrischer Mühlenrhythmus, der durch eine *ivn* Reizung mit einer Reizperiode von 21 s ausgelöst wurde.

In Abbildung 58 wurde die Periode des gastrischen Rhythmus über die Stimulusperiode aufgetragen (Regressionsgerade: Steigung 1,137, R^2=0,978). Mit Reizperioden zwischen 5 und 26 s konnten dabei dem Reiz entsprechende gastrische Perioden ausgelöst werden. Bei Reizen mit einer Periodendauer von weniger als 4 s und einer Reizdauer von weniger als 3 s konnten dagegen keine gastrischen Rhythmen ausgelöst werden.

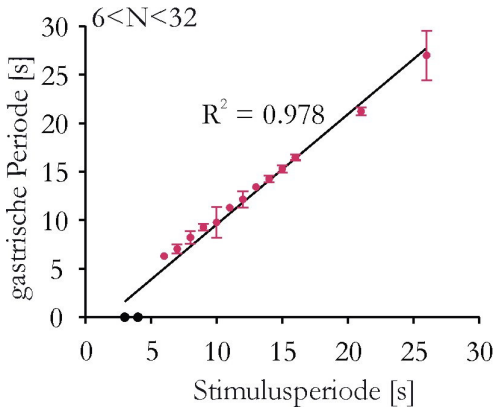


Abbildung 58: Periode des gastrischen Mühlenrhythmus aufgetragen über der Stimulusperiode. Die gastrische Periode folgte der Reizperiode (rote Punkte). In Experimenten, in denen die Reizperiode weniger als 4 s betrug, konnte kein GMR ausgelöst werden (schwarze Punkte). Regressionsgerade: Steigung der Geraden=1,137; R^2=0,978; 6<N<32.

Während der rhythmischen *ivn* Reizung waren die Stimuli zwar zeitlich mit den LG Bursts gekoppelt, LG begann allerdings erst kurz nach dem Stimulus zu bursten. Die Verzögerung vom Anfang des Reizes bis zum Anfang des jeweiligen LG Bursts betrug in Abbildung 57A durchschnittlich 1,97 ± 0,26 s (n=10). In allen Tieren betrug die Verzögerung im Mittel 3,65 ± 1,1 s (N=31).

In den Palinura Arten *P. argus* und *P. interruptus* wurde die Aktivität der gastrischen Motoneurone (GM) während der *ivn* Stimulation gehemmt (Dando and Selverston, 1972; Sigvardt and Mulloney, 1982b). Im Gegensatz dazu wurden die GMs in *C. pagurus* während *ivn* Stimulation erregt (siehe Abbildung 57 & Abbildung 59). Die GMs begannen gleichzeitig mit LG zu bursten (Abbildung 59A). In den GMs wurden zwar zahlreiche PSPs beobachtet, die nur während der Reizung auftraten, allerdings korrelierten keine davon mit einzelnen *ivn* Stimuli. Diese Beobachtung deutet an, dass GM durch ein zwischengeschaltetes Interneuron aktiviert wird. Auch in den gastrischen Neuronen LG und DG konnten keine PSPs festgestellt werden, die mit den *ivn* Reizen zeitlich gekoppelt waren, obwohl beide Neurone sichtbare Depolarisationen zeigten, die durch die rhythmische *ivn* Reizung verursacht wurden.

In Abbildung 59 sind Phasenlage, Burstdauer und mittleren Feuerfrequenz innerhalb eines Bursts (Spikefrequenzen) der gastrischen Neurone LG, DG und GM während einer zehnmaligen *ivn* Stimulation mit einer Dauer und einem Interpulsintervall von jeweils 6 s dargestellt. Die Abbildung macht deutlich, dass die durch *ivn* Reizung ausgelösten gastrischen Rhythmen sehr ähnlich waren, die Phasenbeziehungen einzelner Neurone wiesen nur kleine Variabilitäten auf (Abbildung 59A). In Abbildung 59A wurde der Anfang eines LG Bursts als Anfang eines gastrischen Zyklus definiert. Das Phasenende des LG Bursts lag durchschnittlich bei 0,22 ± 0,09 (N=31). Der Phasenanfang von GM lag bei 0,04 ± 0,02 und das Phasenende bei einem Wert von 0,20 ± 0,03 (N=13). Diese Phasenlagen zeigen, dass die gastrischen Neurone LG und GM gleichzeitig aktiv waren. Der Burst des Antagonisten DG begann bei einer Phase von 0,34 ± 0,09 und endete bei 0,51 ± 0,13 (N=29).

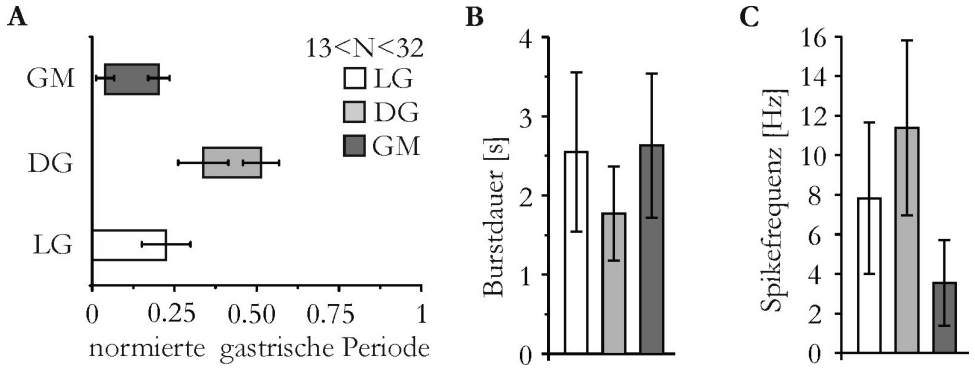


Abbildung 59: Gastrischer Mühlenrhythmus während 40 Hz *ivn* Stimulation mit einer Reizdauer und einem Interpulsintervall von jeweils 6 s (13<N<32). **A:** Phasendiagramm der gastrischen Neurone LG (weißer Balken), DG (hellgrauer Balken) und GM (dunkelgrauer Balken). **B:** Burstdauer von LG (weißer Balken), DG (hellgrauer Balken) und GM (dunkelgrauer Balken) während *ivn* Reizung. **C:** Spikefrequenz, gemessen als mittlere Feuerfrequenz innerhalb eines Bursts, von LG (weißer Balken), DG (hellgrauer Balken) und GM (dunkelgrauer Balken) während *ivn* Stimulation.

Zusätzlich wurden Burstdauer und Spikefrequenz (mittlere Feuerfrequenz eines Bursts) von LG, DG und GM während *ivn* Reizen mit 6 s Dauer und 6 s Interpulsintervall gemessen (Abbildung 59B, C). Die Burstdauer bzw. die Spikefrequenz betrug im Mittel für LG 2,55 ± 1,0 s bzw. 7,83 ± 3,8 Hz (N=31), für DG 1,77 ±0,6 s bzw. 11,39 ± 4,4 Hz (N=29) und für GM 2,63 ± 0,9 s bzw. 3,55 ± 2,2 Hz (N=13).

Im Gegensatz zu den 40 Hz *ivn* Stimulationen wurde während der 20 Hz *ivn* Reizungen kein gastrischer Mühlenrhythmus ausgelöst. Das Membranpotential von LG und GM wurde während der Reizung leicht depolarisiert, d.h. die Zellen wurden erregt, allerdings konnten beide Zellen nicht über die Spikeschwelle depolarisiert werden (LG: N=31; GM: N=13).

4.5.2. *ivn* Stimulation entrained einen spontanaktiven gastrischen Mühlenrhythmus

In Abschnitt 4.5.1 wurde beschrieben, dass in Präparaten ohne spontanaktiven gastrischen Mühlenrhythmus eine 40 Hz *ivn* Stimulation einen gastrischen Mühlenrhythmus auslöst. In ungefähr der Hälfte der Präparate ist der gastrische Mühlenrhythmus aber spontanaktiv. Um zu klären, welchen Einfluss eine *ivn* Reizung auf einen solchen spontanaktiven gastrischen Mühlenrhythmus hat, wurden während dieser Rhythmen zehn rhythmische *ivn* Pulse (n=10) mit unterschiedlichen Frequenzen (20 und 40 Hz), unterschiedlichen Dauern (zwischen 2 und 6 s) und Interpulsintervallen (zwischen 1 und 20 s) gegeben. In Abbildung 60A ist ein spontanaktiver gastrischer Mühlenrhythmus anhand der extrazellulären Originalableitungen des *lgn*s mit der Aktivität von LG und des *dgn*s mit den Aktivitäten von DG und den GMs dargestellt. Die Periodendauer des GMR betrug in diesem Tier 8,43 ± 0,3 s (n=10). Anschließend wurde der *ivn* extrazellulär mit einer Reizfrequenz von 40 Hz und einer Reizperiode von 12 s (Pulsdauer und Interpulsintervall jeweils 6 s) gereizt. Die Stimulusperiode war also länger als die des spontanaktiven gastrischen Rhythmus. Nach ein bis zwei Zyklen passte sich die Periode des GMR der Stimulusperiode an. Die gastrische Periode betrug während der Reizung 12,2 ± 0,6 s (n=10; Abbildung 60B). Nach Ende der Stimulation wurde die gastrische Periode wieder kürzer und entsprach der Periode vor dem Reiz. Eine solche Synchronisation eines biologischen Rhythmus mit einem externen Rhythmus, in diesem Fall einer rhythmischen *ivn* Stimulation, bezeichnet man als Entrainment.

Die Experimente mit spontanen gastrischen Rhythmen wurden in N=23 Tieren durchgeführt, insgesamt wurde in diesen 23 Tieren der *ivn* 45 Mal gereizt (n=45). In 4 Tieren konnte die Periode des spontanaktiven gastrischen Mühlenrhythmus nicht mit der Reizperiode synchronisiert werden, die Werte wurden daher nicht in die Auswertung einbezogen.

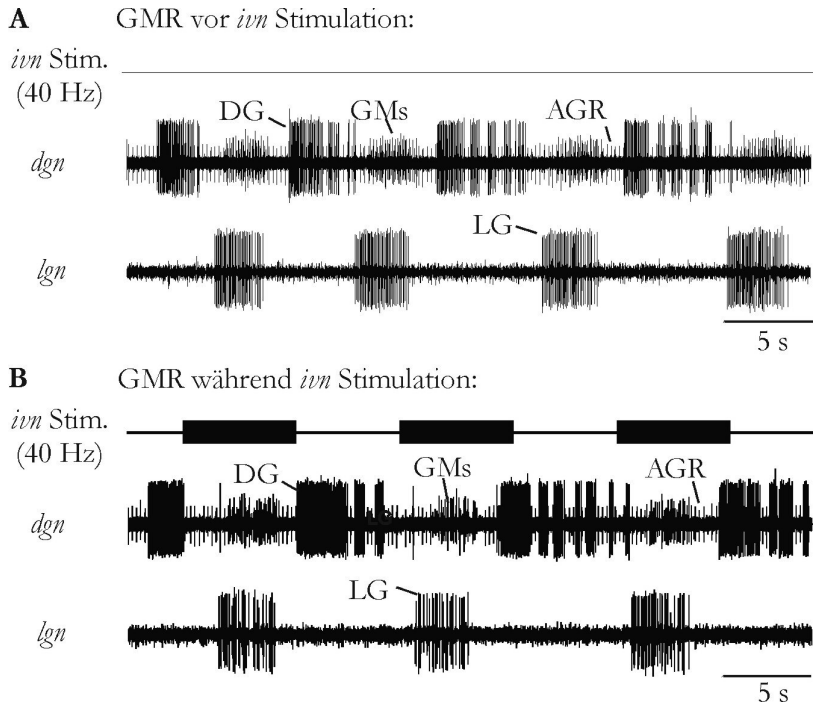


Abbildung 60: Entrainment des gastrischen Mühlenrhythmus (GMR) während 40 Hz *ivn* Stimulation. Extrazelluläre Ableitungen des *lgn*s (untere Spur) mit LG Aktivität und des *dgn*s (mittlere Spur) mit der Aktivität von DG und den GMs. Der gastrische Rhythmus ist gekennzeichnet durch die abwechselnde Aktivität von LG und DG. **A:** Spontanaktiver GMR mit der alternierenden Aktivität von LG und DG. **B:** Rhythmische 40 Hz *ivn* Stimulation (obere Spur) während eines spontanaktiven gastrischen Rhythmus. Die Periode des GMR wurde dabei mit der Periode des *ivn* Reizes synchronisiert, also entrained.

Da die Perioden der spontanen gastrischen Rhythmen stark schwankten, wurden die Werte normiert und so ein Vergleich untereinander ermöglicht. Dazu wurden sowohl die Periode des GMR während *ivn* Reizung als auch die Stimulationsperiode auf die Periode des zuvor spontanaktiven GMR normiert. Stimmten die normierten Werte überein, wurde der Rhythmus entrained. Ergab die Normierung des gastrischen Rhythmus und der Reizperiode den Wert 1, so entsprach die Reizperiode der Periode des gastrischen Rhythmus. Waren die errechneten Werte kleiner als 1, so konnte die gastrische Periode durch die Stimulation verkürzt werden, der Rhythmus wurde schneller. Bei Werten größer 1 wurde der GMR langsamer. Die normierte gastrische Periode wurde in Abbildung 61 über die normierte Stimulusperiode aufgetragen. Im Bereich von ca. 0,4 bis 2,5 stiegen die Werte direkt proportional an, die Steigung der Geraden betrug 0,99 ($N=19$; $R^2=0{,}977$; $p<0{,}0001$). Das bedeutet, dass in diesem Bereich die gastrische Periode der Reizperiode entsprach und der Rhythmus entrained wurde. Die rot gestrichelten Linien in Abbildung 61 zeigen, dass die gastrische Periode um bis zu 60 % verkürzt bzw. um bis zu 150 % verlängert werden konnte.

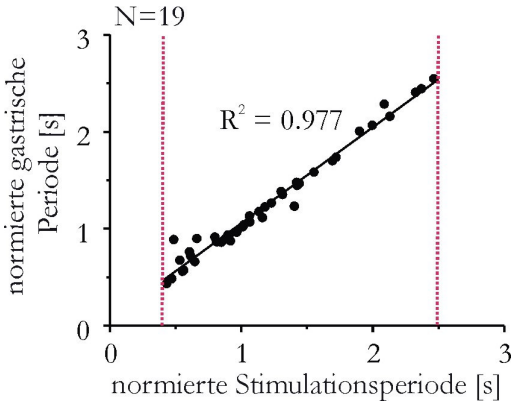


Abbildung 61: Entrainment des GMR durch rhythmische *ivn* Reizung. Die normierte gastrische Periode wurde über die normierte Reizperiode aufgetragen. Sowohl gastrische Periode als auch Stimulationsperiode wurden auf die Periode des spontanaktiven GMR normiert. Im Bereich zwischen 0,4 und 2,5 konnte der gastrische Rhythmus durch die Reizung entrained werden. D.h. der Rhythmus konnte um bis zu 60 % verkürzt bzw. um bis zu 150 % verlängert werden (rot gestrichelte Linien). Steigung der Geraden 0,99. N=19; n=45.

4.5.3. Die Effekte der IV Neurone auf den gastrischen Rhythmus sind indirekt

Die extrazelluläre Reizung des *ivn*s beeinflusste die gastrischen Motoneurone im stomatogastrischen Ganglion. War kein GMR spontanaktiv, so konnte durch eine *ivn* Reizung ein GMR ausgelöst werden, die gastrische Periode synchronisierte sich mit der Stimulationsperiode. In den gastrischen Motoneuronen LG, DG und GM konnten keine PSPs beobachtet werden, die zeitlich mit einzelnen *ivn* Stimuli korrelierten (siehe 4.5.1), obwohl, wie z.B. in GM, zahlreiche PSPs beobachtet wurden, die nur während der *ivn* Reizung auftraten. Das deutet an, dass GM durch ein zwischengeschaltetes Interneuron aktiviert wird.

Durch retrograde Färbungen konnte gezeigt werden, dass die IV Neurone nicht nur über den *stn* zum STG projizieren, sondern auch über die *son*s und *ion*s zu den Kommissuralganglien. Um den Beitrag der Neurone in den Kommissuralganglien zu überprüfen, wurden in den folgenden Versuchen die CoGs komplett entfernt (*ion*s und *son*s durchtrennt) und erneut eine rhythmische *ivn* Stimulation durchgeführt.

In Abbildung 62 sind die extrazellulären Ableitungen des *lgn*s und *dgn*s während einer 40 Hz *ivn* Reizung mit (Abbildung 62A) und ohne CoGs (Abbildung 62B) dargestellt. Mit CoGs wurde während der 40 Hz Stimulation ein GMR ausgelöst (siehe Abbildung 62A). LG war zeitlich gekoppelt mit den *ivn* Reizen. Nach Entfernen der CoGs konnte hingegen kein GMR ausgelöst werden (siehe Abbildung 62B). Sowohl LG als auch die GMs wurden in keinem der durchgeführten Versuche während einer *ivn* Reizung ohne CoGs überschwellig depolarisiert

(N=10). DG war zwar durchgehend aktiv, konnte aber durch die Reizung nicht beeinflusst werden. Dies deutet darauf hin, dass zur Vermittlung der Wirkung der IV Neurone auf den gastrischen Mühlenrhythmus Neurone in den CoGs benötigt werden. Die auftretenden Effekte scheinen vollkommen von Projektionsneuronen in den CoGs vermittelt zu werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden in Abschnitt 4.7 die Einflüsse der IV Neurone auf vier identifizierte Projektionsneurone in den CoGs genauer untersucht.

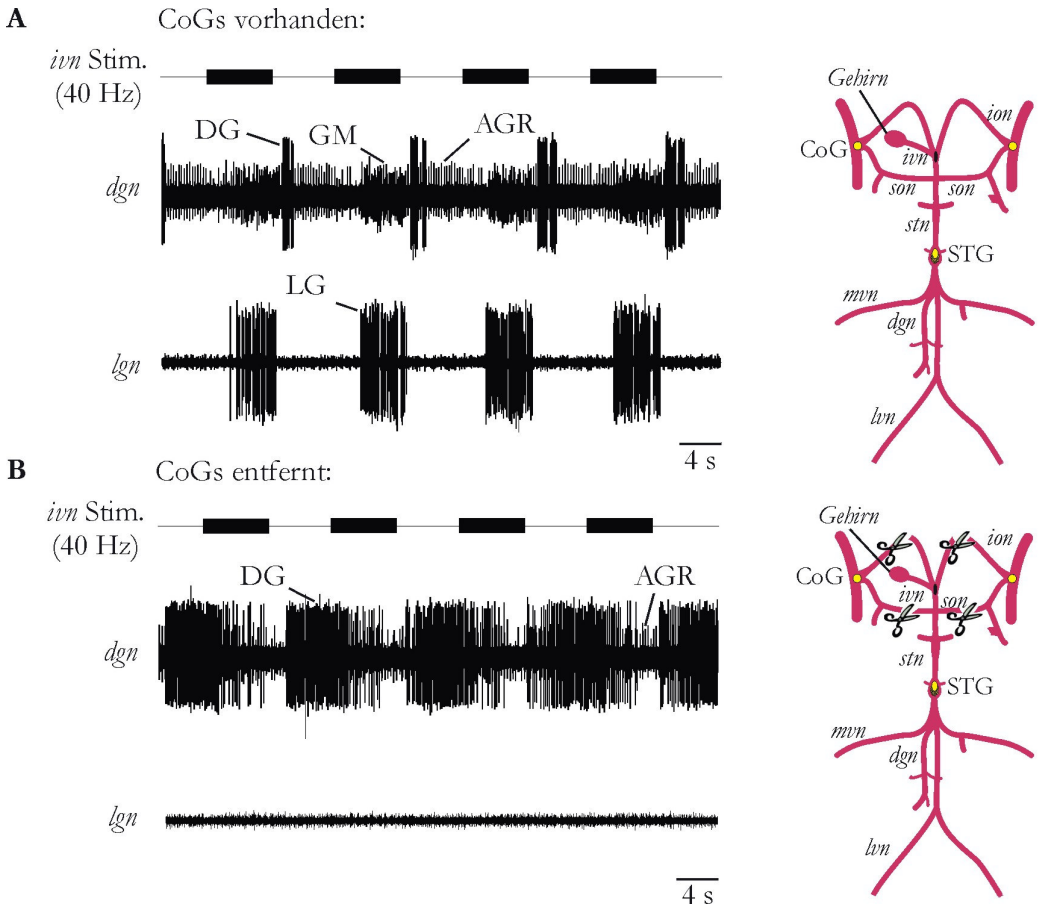


Abbildung 62: Zum Auslösen eines GMR werden die Neurone in den Kommissuralganglien benötigt. Extrazelluläre Ableitungen von *lgn* (untere Spur) mit der Aktivität von LG und *dgn* (mittlere Spur) mit der Aktivität von DG, den GMs und dem anterioren gastrischen Rezeptor (AGR). **A:** Eine *ivn* Reizung (obere Spur) löste einen GMR aus, wenn die CoGs vorhanden waren. Während des GMR waren LG und DG alternierend aktiv, GM nahezu gleichzeitig mit LG. **B:** Beide CoGs wurden entfernt. DG wurde dadurch spontanaktiv. Eine *ivn* Stimulation (obere Spur) konnte keinen GMR auslösen.

Zusammenfassung:

Eine extrazelluläre 40 Hz *ivn* Reizung mit einer Periode von mehr als 4 s löste in Präparaten ohne spontanaktiven gastrischen Rhythmus einen GMR aus, der für die Dauer der Stimulation anhielt. Die ausgelöste gastrische Periode entsprach dabei der vorgegebenen Stimulationsperiode.

Spontanaktive GMR wurden während einer *ivn* Stimulation entrained, d.h. die gastrische Periode synchronisierte sich mit der Stimulationsperiode.

Läsionsversuche (Entfernen der CoGs) zeigten, dass die IV Neurone die gastrischen Motoneurone indirekt über Neurone in den CoGs beeinflussen. Um diese Hypothese zu stärken, wurden die Einflüsse der IV Neurone auf Projektionsneurone in den CoGs genauer analysiert (siehe Abschnitt 4.7).

4.6 Einflüsse der IV Neurone auf den oesophagealen Rhythmus

Meine retrograden Färbungen zeigten, dass die IV Neurone nicht nur über den *stn* zum STG projizieren, sondern auch über die *ion*s und *son*s zu den COGs projizieren (siehe Abschnitt 4.1.2). In den CoGs ist unter anderem der Mustergenerator für den oesophagealen Rhythmus lokalisiert. Dieser Rhythmus steuert die Bewegungen des Oesophagus (Spirito, 1975). Er kann anhand der Aktivität des oesophagealen Motoneurons (OMN) beobachtet werden und ist ähnlich wie der pylorische Rhythmus spontanaktiv. OMN ist bilateral symmetrisch mit je einem Soma in jedem CoG. Das Axon von OMN projiziert über den *ion* zum oesophagealen Ganglion. In der Nähe des OG innerviert OMN oesophageale Muskulatur (D. M. Blitz, M.P. Nusbaum und W. Stein; unveröffentlichte Ergebnisse). Die Aktivität von OMN kann extrazellulär vom *ion* abgeleitet werden (größte Aktionspotentiale) oder mit intrazellulären Ableitungen des Somas. Um zu testen, ob der oesophageale Rhythmus ebenfalls durch die zu den CoGs projizierenden IV Neurone beeinflusst wird, wurde der oesophageale Rhythmus anhand der Aktivität von OMN während einer *ivn* Stimulation untersucht.

Die Aktivität von OMN wurde während rhythmischer 40 Hz *ivn* Stimulation mit einer Pulsdauer und einem Interpulsintervall von jeweils 6 s beobachtet. Die Originalableitung aus dem Soma von OMN in Abbildung 63 zeigt, dass die Aktivität von OMN während der Reizung deutlich anstieg. Während den *ivn* Reizen war die OMN Burstdauer länger als zwischen den

Reizen, OMN war annähernd tonisch aktiv. Die zeitliche Verzögerung vom Anfang des *ivn* Stimulus bis zum Anfang eines OMN Bursts war, wie auch schon für die LG Bursts, sehr kurz. Sie betrugen im Mittel 0,7 ± 0,4 s (N=22). Zwischen den einzelnen *ivn* Pulsen entsprach die OMN Aktivität in etwa wieder der ursprünglichen Aktivität. Während den Reizen war OMN meist tonisch aktiv, zwischen den Reizen dagegen rhythmisch.

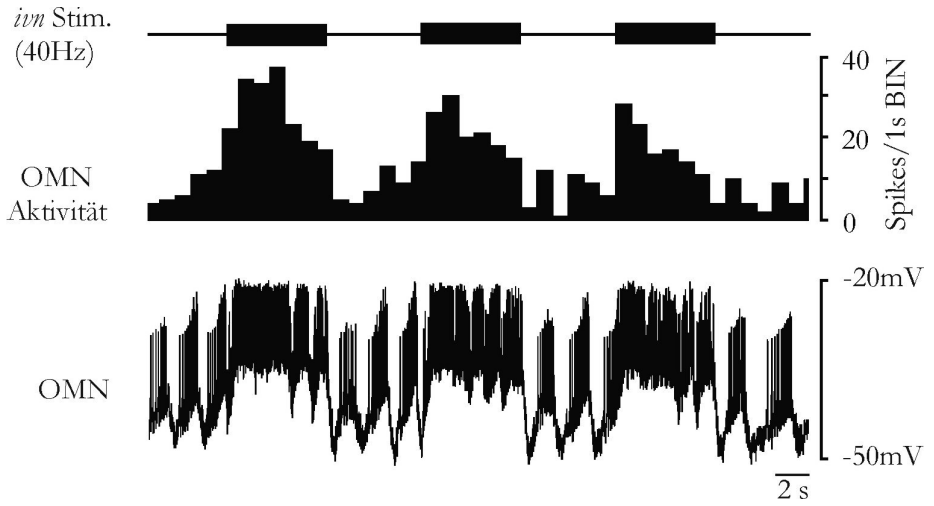


Abbildung 63: Die IV Neurone erregen OMN. Intrazelluläre Ableitung von OMN (untere Spur) während 40 Hz *ivn* Stimulation (obere Spur). OMN depolarisierte während der Reizung, die Aktivität erhöhte sich (mittlere Spur). Die Bursts waren während den Reizen länger als diejenigen, die zwischen den Reizen auftraten.

Um die synaptische Verbindung zwischen den IV Neuronen und OMN als mono- oder polysynaptische Verbindung charakterisieren zu können, wurde die Petrischale mit Vaseline in zwei Bereiche unterteilt (siehe Abschnitt 3.5). Durch eine Applikation einer Ringerlösung mit hoher Konzentration an divalenten Kationen (HiDi-Ringerlösung) auf die Kommissuralganglien, wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, wurden polysynaptische Verbindungen zwischen den Neuronen in den CoGs und auch zwischen Neuronen, die in die CoGs projizieren, durch Erhöhung der Aktionspotentialschwelle blockiert. Abbildung 64 zeigt eine intrazelluläre OMN Ableitung während einer *ivn* Reizung in HiDi-Ringerlösung. Dabei konnte weiterhin eine Depolarisation von OMN während den einzelnen Pulsen beobachtet werden (N=3; siehe Abbildung 64). Dies deutet darauf hin, dass die IV Neurone OMN direkt erregen.

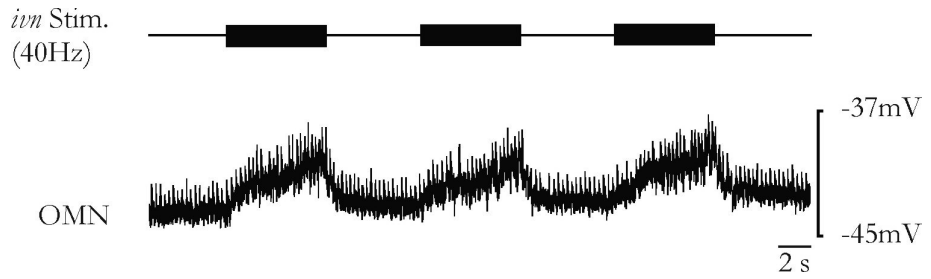


Abbildung 64: Die IV Neurone erregn OMN monosynaptisch. Intrazelluläre Ableitung von OMN in Ringerlösung mit hoher Konzentration an divalenten Kationen. Beim Blockieren von indirekten Verbindungen depolarisierte OMN während der *ivn* Stimulation trotzdem. N=3.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die drei im STNS generierten Rhythmen, der pylorische, gastrische und oesophageale Rhythmus, durch eine *ivn* Stimulation zeitlich synchronisiert wurden. In Abbildung 65 sind intrazelluläre Originalableitungen des ventralen Dilatorneurons (VD) und des lateralen gastrischen Neurons (LG) dargestellt, sowie eine extrazelluläre Ableitung des *ion*s mit der Aktivität von OMN vor und während einer 40 Hz *ivn* Reizung. Vor der Stimulation der IV Neurone waren der pylorische sowie der oesophageale Rhythmus spontanaktiv (Abbildung 65, links). Im isolierten Nervensystem sind pylorischer und oesophagealer Rhythmus meist spontanaktiv. Bisher konnte keine zeitliche Kopplung zwischen diesen beiden Rhythmen festgestellt werden. Der gastrische Mühlenrhythmus ist nur in etwa der Hälfte der Präparate spontanaktiv und es konnte eine Interaktion mit dem pylorischen Rhythmus beschrieben werden. Zwischen dem lateralen gastrischen Neuron (LG) und den pylorischen Neuronen gibt es eine starke Interaktion (Bartos and Nusbaum, 1997), wobei vor allem die Aktivität von VD und IC während eines gastrischen Rhythmus stark abnimmt. Während der *ivn* Reizung war ein GMR aktiv, mit jedem einzelnen *ivn* Reiz trat ein LG Burst auf. Gleichzeitig wurde durch die einzelnen *ivn* Pulse das pylorische Neuron VD inhibiert. Des Weiteren war OMN während der einzelnen *ivn* Reize stark aktiv (Abbildung 65, rechts). Die zeitliche Charakteristik der IV Neuron-Stimulation wurde daher auf alle drei im STNS vorkommenden Rhythmen übertragen.

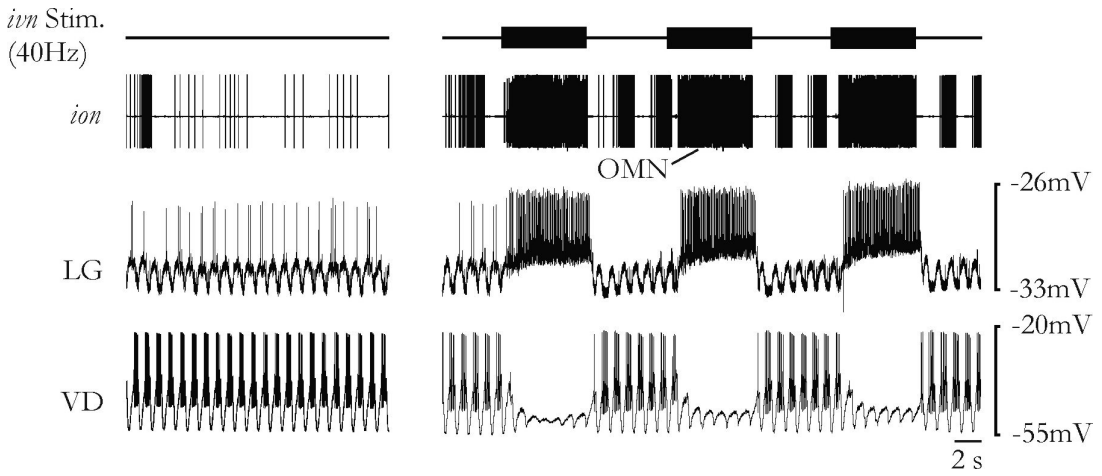


Abbildung 65: Extrazelluläre 40 Hz *ivn* Reizung koppelt den pylorischen, gastrischen und oesophagealen Rhythmus zeitlich. Intrazelluläre Ableitung des ventralen Dilatorneurons (VD; untere Spur) und des lateralen gastrischen Neurons (LG, zweite Spur von unten) sowie eine extrazelluläre Ableitung des inferioren Ventrikularnerven (*ion*; zweite Spur von oben) mit der Aktivität von OMN jeweils vor (links) und während 40 Hz *ivn* Stimulation (rechts). Obere Spur: 40 Hz *ivn* Stimulation. Bei der extrazellulären *ion* Ableitung wurden die Aktionspotentiale von OMN mit einem Skript (Bigify; www.neurobiologie.de/spike2) vergrößert. Durch die 40 Hz *ivn* Pulse wurde VD inhibiert, LG begann dagegen während den *ivn* Reizen zu bursten. Die Aktivität von OMN wurde während der *ivn* Reizung ebenfalls erhöht.

Eine Quantifizierung der OMN Aktivität ist in Abbildung 66 dargestellt. Dabei wurde die Aktivität von OMN vor, während und nach *ivn* Stimulation untersucht. Die Anzahl der Spikes pro Burst wurde dabei jeweils in 6 s BINs gemessen. Die Aktivität von OMN erhöhte sich signifikant von 20,93 ± 20,3 Spikes pro 6 s BIN auf 62,01 ± 34,9 Spikes pro 6 s BIN während einer *ivn* Stimulation (N=14; $p<0{,}001$; Abbildung 66A). Nach Ende der Reizung fiel die Aktivität im Vergleich zu während der Reizung auf 30 ± 17,6 Spikes pro 6 s BIN ab (N=14; $p<0{,}001$; Abbildung 66A). Die Maximale Feuerfrequenz von OMN wurde für den letzten Burst vor der Stimulation sowie für den ersten OMN Burst nach der Stimulation bestimmt. Die maximale OMN Frequenz wurde dabei für den gesamten Zeitraum der Stimulation ermittelt. Während der Reizung des *ivn*s wurde dabei die OMN Frequenz im Vergleich zu vor der Stimulation nicht verändert. Nach der Reizung konnte dagegen ein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Die Maximalfrequenz von OMN fiel von 53,36 ± 10,9 Hz während den einzelnen Reizen auf 38,6 ± 12,8 Hz nach den *ivn* Reizen ab (N=11; $p<0{,}009$; Abbildung 66B). Die *ivn* Reizung hatte dabei einen über den Reiz hinaus anhaltenden Effekt auf OMN.

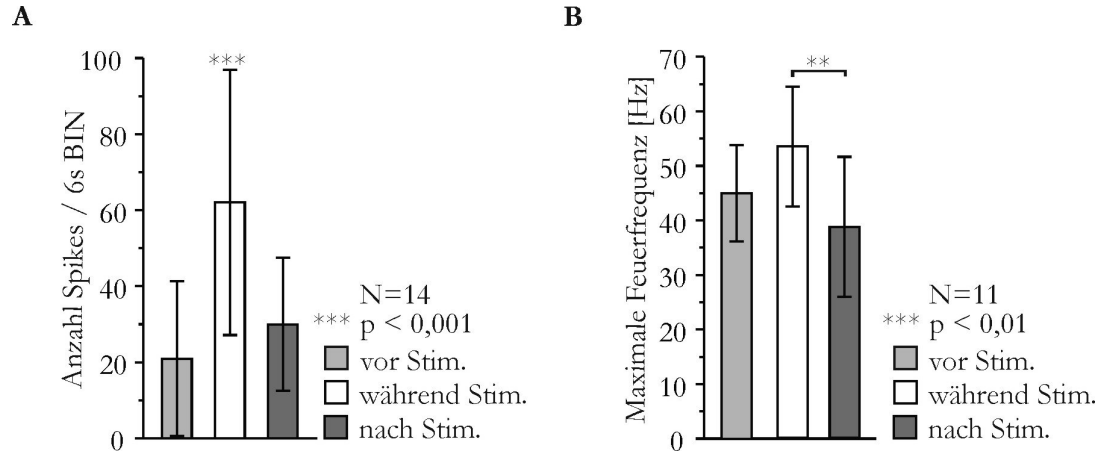


Abbildung 66: Einfluss einer 40 Hz *ivn* Stimulation auf das oesophageale Motoneuron (OMN). **A:** Aktivität des oesophagealen Motoneurons vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) sowie nach *ivn* Reizung (dunkelgraue Balken). Die Aktivität nahm während 40 Hz *ivn* Stimulation signifikant zu und sank nach der Reizung wieder ab (N=14). **B:** Maximale Feuerfrequenz vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach (dunkelgrauer Balken) *ivn* Stimulation. Die maximale Feuerfrequenz nahm nach dem Reiz im Vergleich zu während dem Reiz signifikant ab (N=11).

Bisher ist nicht bekannt, ob OMN ein Mitglied des oesophagealen Mustergenerators ist. Da keine einheitlichen Effekte der *ivn* Stimulation auf die unmittelbar auf einen Reiz folgende Phasenlage von OMN beobachtet werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die IV Neurone nur das Motoneuron OMN erregen und nicht den oesophagealen Mustergenerator selbst. Bei einem Vergleich der OMN Aktivität vor und nach der extrazellulären Stimulation der IV Neurone konnte allerdings, im Gegensatz zum pylorischen und gastrischen Rhythmus, ein anhaltender Effekt beobachtet werden. Die Anzahl der Spikes pro Burst erhöhte sich signifikant von 15,49 ± 14,3 Spikes pro Burst vor der Stimulation auf 23,46 ± 10,5 Spikes pro Burst nach der Reizung (N=22; $p<0{,}005$; Abbildung 67). Der oesophageale Rhythmus wurde durch die *ivn* Stimulation schneller, die Periode wurde von 4,51 ± 2,3 s auf 3,16 ± 1,1 s nach der Reizung verkürzt (N=22; $p<0{,}01$; Abbildung 67). Zusätzlich verkürzte sich die Burstdauer von OMN von 2,26 ± 1,5 s auf 1,42 ± 0,6 s nach Stimulation (N=22; $p<0{,}02$; Abbildung 67). Die Spikefrequenz von OMN wurde nach Stimulation im Vergleich zu vor dem Reiz signifikant erhöht (vor Reizung: 6,42 ± 4,3 Hz; nach Reizung: 16,33 ± 6,2 Hz; N=22; $p<0.0001$; Abbildung 67). Im Gegensatz dazu wurde die relative OMN Aktivität nicht beeinflusst (N=22; Abbildung 67). Diese relative Aktivitätsdauer gibt dabei die Dauer eines Bursts innerhalb eines Zyklus an, also das Verhältnis aus Burstdauer und Periode. Diese über den Reiz hinaus andauernden Effekte deuten auf einen Einfluss auf den zentralen Mustergenerator hin.

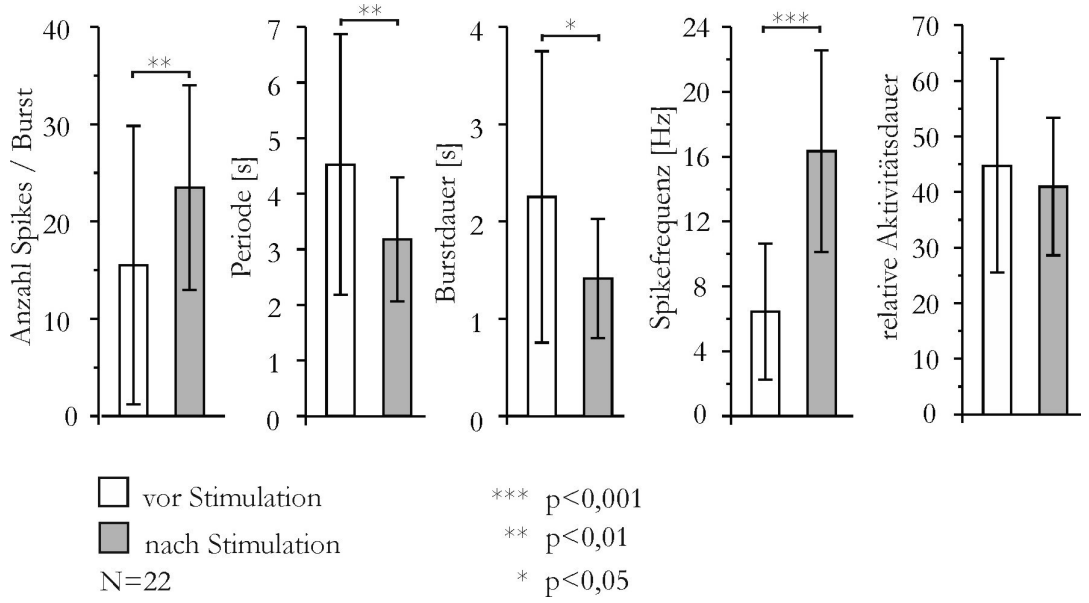


Abbildung 67: Statistische Auswertung von OMN vor (weiße Balken) und nach Ende der *ivn* Reizung (graue Balken). Die Anzahl der Spikes pro Burst stieg nach dem Reiz signifikant an (N=22; p<0,01). Der oesophageale Rhythmus wurde schneller, die Periode nahm ab (N=22; p<0,01). Auch die Burstdauer verringerte sich nach dem Reiz signifikant (N=22; p<0,02). Die Spikefrequenz von OMN erhöhte sich nach der Stimulation (N=22; p<0,001). Die relative Aktivitätsdauer von OMN blieb unverändert.

4.7 Effekte der IV Neurone auf die Projektionsneurone

Meine Ergebnisse aus Abschnitt 4.5.3 deuten an, dass Neurone in den CoGs an der Vermittlung der Wirkung der IV Neurone auf den gastrischen Rhythmus beteiligt sind. In den CoGs sind rund 500 Neurone lokalisiert, wovon etwa 20 zum STG projizieren (Coleman et al., 1992). Diese 20 Neurone werden daher als Projektionsneurone bezeichnet. In früheren Arbeiten wurden die Einflüsse von vier Projektionsneuronen auf die beiden Mustergeneratoren im STG genauer untersucht. Dies sind das modulatorische Kommissuralneuron 1 (MCN1; Nusbaum et al., 1992), das modulatorische Kommissuralneuron 5 (MCN5; Norris et al., 1996), das modulatorische Kommissuralneuron 7 (MCN7; Blitz and Nusbaum, 1999) und das kommissurale Projektionsneuron 2 (CPN2; Norris et al., 1994). Diese Projektionsneurone haben einen starken modulatorischen Einfluss auf die Mustergeneratoren im STG. Zum Beispiel können durch die Aktivität verschiedener Projektionsneurone unterschiedliche gastrische Rhythmen ausgelöst werden (Coleman et al., 1992; Norris et al., 1994; Beenhakker and Nusbaum, 2004). Diese vier identifizierten Projektionsneurone habe ich intrazellulär abgeleitet und ihre Aktivität während extrazellulärer *ivn* Stimuli analysiert. Die Reizung erfolgte dabei

erneut zehnmal hintereinander mit einer Pulsdauer und einem Interpulsintervall von je 6 s; die Reizfrequenz betrug 40 Hz. Die Konnektivität zwischen den IV Neuronen und den Projektionsneuronen wurde in unterschiedlichen Ringerlösungen untersucht (siehe Abschnitt 3.5.1). Dabei konnte sowohl zwischen direkten und indirekten Verbindungen unterschieden werden, als auch zwischen chemischen und elektrischen Synapsen. Wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, wurde die Petrischale mit dem STNS in zwei Bereiche unterteilt, um ausschließlich die CoGs mit den unterschiedlichen Ringerlösungen perfundieren zu können. Es wurden Ringerlösungen mit einer hohen Konzentration an divalenten Kationen (HiDi-Ringerlösung) zum Blockieren von indirekten Verbindungen verwendet, oder Ringerlösungen mit einer niedrigen Kalziumionenkonzentration (LowCa^{2+}-Ringerlösung), um chemische Synapsen zu blockieren.

4.7.1. Effekte der IV Neurone auf das Projektionsneuron MCN1

MCN1 hat sowohl einen starken Einfluss auf den gastrischen Mühlenrhythmus als auch auf den pylorischen Rhythmus. Die Zellkörper der beiden MCN1 Kopien sind jeweils in einem CoG lokalisiert. Von dort projiziert MCN1 über den *ion* und den *stn* zum STG. Intrazellulär konnte MCN1 anhand seiner Aktivität auf dem *ion* identifiziert werden. Im *ion* verlaufen die Axone von MCN1 und MCN5. MCN1 kann dabei eindeutig mittels seiner Aktionspotentiale auf dem *ion* und aufgrund seiner Inhibition durch PD identifiziert werden.

Die intrazelluläre Ableitung von MCN1 in Abbildung 68 zeigt, dass MCN1 während der 40 Hz *ivn* Stimulation depolarisierte. Die Aktivität von MCN1 erhöhte sich während dem Reiz deutlich. Dabei konnten auch bei niederfrequenten *ivn* Reizen keine PSPs beobachtet werden, die zeitlich mit einzelnen *ivn* Stimuli korrelierten.

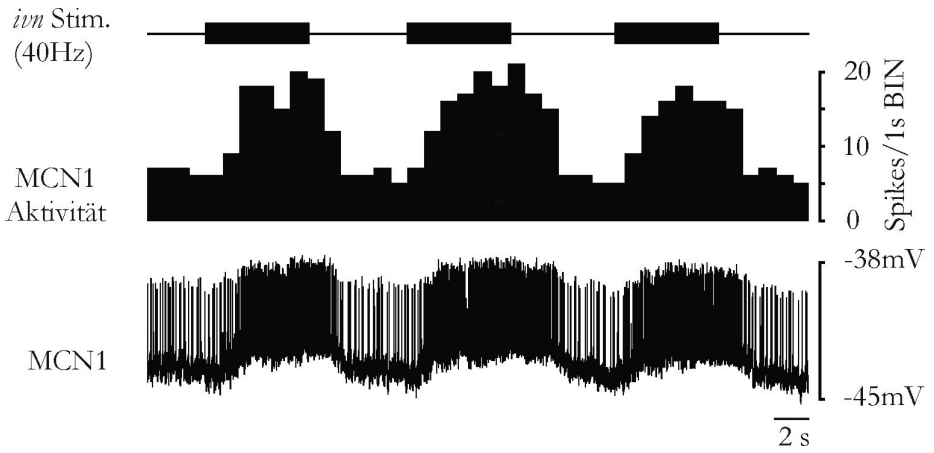


Abbildung 68: Die IV Neurone erregen MCN1. Intrazelluläre Ableitung des Projektionsneurons MCN1 (untere Spur). MCN1 depolarisierte während 40 Hz *ivn* Stimulation und seine Aktivität, gemessen als Spikes pro 1 s BIN, erhöhte sich (mittlere Spur). Obere Spur: *ivn* Reiz.

In Abbildung 69 ist die MCN1 Aktivität 3 s vor, 6 s während und 3 s nach dem *ivn* Puls (Dauer 6 s) in einem Peri-Stimulus-Time-Histogramm (PSTH) dargestellt. Die Aktivität von MCN1, angegeben in Anzahl Spikes pro 50 ms BIN, stieg mit Beginn der Stimulation langsam an und erreichte erst nach ca. 3 s Stimulation ein Plateau. Die MCN1 Aktivität fiel erst ca. 1 s nach Ende der *ivn* Stimulation wieder ab (siehe Abbildung 69, roter Pfeil) und war nach Reizende im Gegensatz zu vor der Stimulation leicht erhöht.

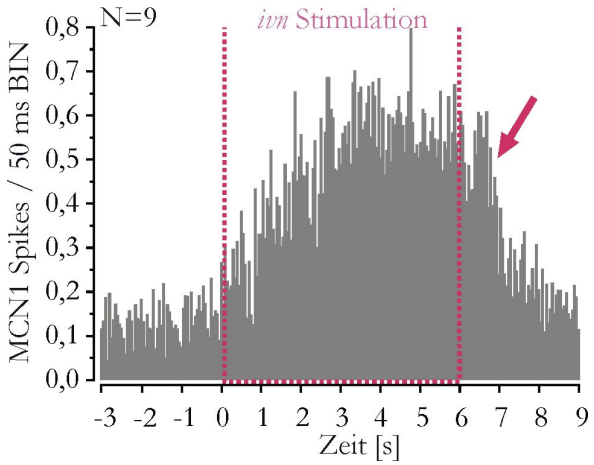


Abbildung 69: Gemitteltes Peri-Stimulus-Time-Histogramm von MCN1: 3 s vor, während (0-6 s) und 3 s nach 40 Hz *ivn* Puls (N=9). Die rot gestrichelten Linien kennzeichnen die *ivn* Stimulation. Die Aktivität von MCN1 stieg während der Reizung an und nahm erst ca. 1 s nach Reizende wieder ab (roter Pfeil).

Eine statistische Auswertung der MCN1 Aktivität, wie in Abbildung 70 dargestellt, zeigt, dass die Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN vor, während und nach Aktivierung der IV Neurone

signifikant verschieden war. Dabei wurde die Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN 3 s vor, 6 s während und 3 s nach *ivn* Reizung gemittelt. Die MCN1 Aktivität stieg dabei von 0,14 ± 0,04 Spikes pro 50 ms BIN vor dem Reiz auf 0,48 ± 0,14 Spikes pro 50 ms BIN während *ivn* Reizung (N=9; p<0,001). Nach der Reizung fiel die Aktivität im Vergleich zu während der Stimulation auf 0,30 ± 0,15 Spikes pro 50 ms BIN ab (N=9; p<0,015). Die Aktivität war aber trotz leichtem Abfall nach Ende der Reizung im Gegensatz zu vor dem Reiz signifikant erhöht (N=9; p<0,023).

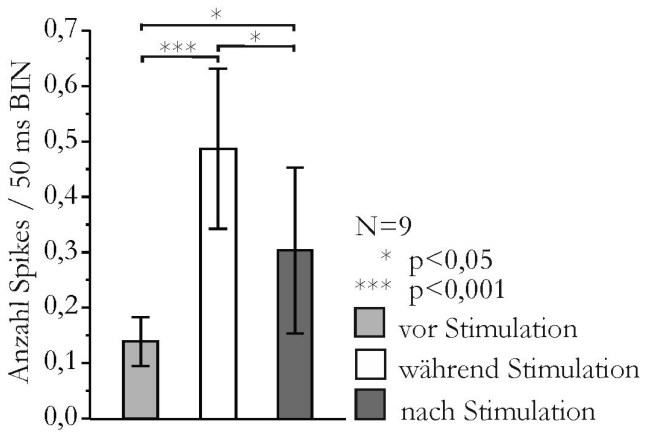


Abbildung 70: Gemittelte Anzahl der MCN1 Spikes pro 50 ms BIN vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach (dunkelgrauer Balken) *ivn* Stimulation. Die Anzahl der Aktionspotentiale nahm während *ivn* Stimulation signifikant zu (N=9; p<0,001). Nach der Reizung war die Anzahl der Spikes pro BIN signifikant höher als vor der Stimulation (N=9; p<0,023).

Die Tatsache, dass keine zeitliche Korrelation zwischen einzelnen *ivn* Reizen und den PSPs bzw. Aktionspotentialen in MCN1 gefunden wurde (s.o.) könnte entweder auf einen metabotropen, und damit langsamen Einfluss der IV Neurone auf MCN1 hinweisen, oder aber auf eine polysynaptische Verbindung zwischen beiden. Zur Untersuchung der Konnektivität zwischen IV Neuronen und MCN1 wurden daher unterschiedliche Ringerlösungen ausschließlich auf den anterioren Teil des STNS (welches die CoGs enthält, siehe Abbildung 24) appliziert. Durch Applikation einer Ringerlösung mit einer hohen Konzentration an divalenten Kationen (HiDi-Ringerlösung) wurden polysynaptische Verbindungen sowohl zwischen den Neuronen in den CoGs als auch zu Projektionen in die CoGs durch Erhöhen der Aktionspotentialschwelle blockiert (siehe Abschnitt 3.1.2). Eine Wirkung dieser Ringerlösung ist daran zu erkennen, dass Neurone spontan keine Aktionspotentiale mehr bilden können. In Abbildung 71 ist eine intrazelluläre MCN1 Ableitung sowie eine extrazelluläre Ableitung des *ion*s, durch den das Axon dieser MCN1 Zelle verläuft, in HiDi-Ringerlösung dargestellt.

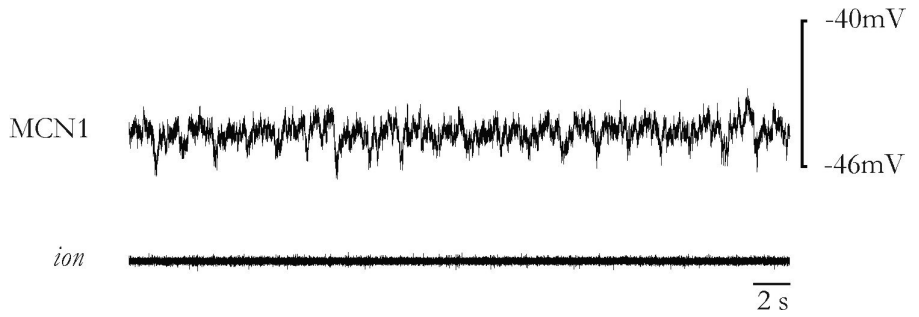


Abbildung 71: Intrazelluläre Ableitung von MCN1 mit zugehöriger *ion* Ableitung in Ringerlösung mit hoher Konzentration an divalenten Kationen. Es können spontan keine Aktionspotentiale gebildet werden.

In dieser Situation zeigte sich, dass bei erneuter 40 Hz *ivn* Reizung das Membranpotential von MCN1 nicht mehr depolarisierte, sondern von der Reizung nicht beeinflusst wurde (N=6; Abbildung 72). Das deutet darauf hin, dass die IV Neurone das Projektionsneuron MCN1 über ein zwischengeschaltetes Interneuron erregen.

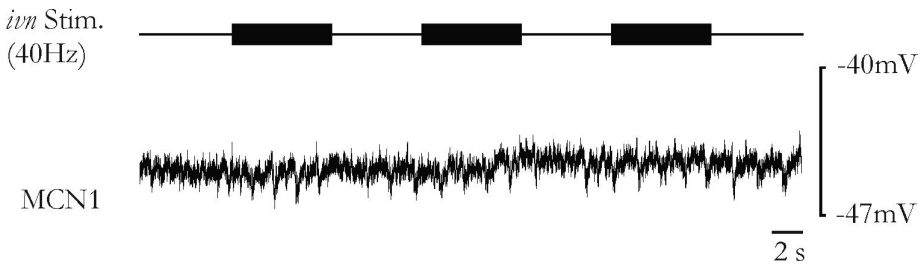


Abbildung 72: Die IV Neurone und MCN1 sind polysynaptisch gekoppelt. Intrazelluläre Ableitung von MCN1 in Ringerlösung mit hoher Konzentration an divalenten Kationen. Während dem Blockieren von indirekten Verbindungen depolarisierte das Membranpotential von MCN1 während der *ivn* Reizung nicht mehr, was darauf hindeutet, dass die IV Neurone und MCN1 indirekt gekoppelt sind.

Um zu testen, ob die IV Neurone MCN1 über chemische oder elektrische Synapsen erregen, wurde eine Ringerlösung mit einer niedrigen Konzentration an Kalziumionen (LowCa^{2+}-Ringerlösung) auf den anterioren Bereich des STNS appliziert, um dort chemische Synapsen zu blockieren. Durch die niedrige Kalziumionenkonzentration können keine Transmitter mehr ausgeschüttet werden (siehe Abschnitt 3.1.3). MCN1 konnte in LowCa^{2+}-Ringer, wie auch schon in HiDi-Ringer, nicht durch eine 40 Hz *ivn* Reizung depolarisiert werden (N=4; siehe Abbildung 73). Die IV Neurone erregen MCN1 indirekt über ein zwischengeschaltetes Neuron. Dabei muss die Erregungsübertragung zwischen den IV Neuronen und MCN1 über mindestens eine chemische Synapse verlaufen.

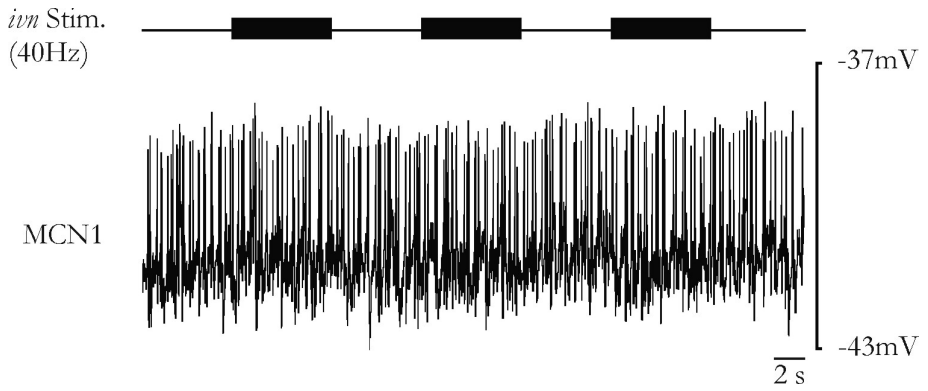


Abbildung 73: Die IV Neurone und MCN1 sind über mindestens eine chemische Synapse gekoppelt. Intrazelluläre Ableitung von MCN1 in Ringerlösung mit niedriger Konzentration an Kalziumionen. Während dem Blockieren von chemischen Synapsen depolarisierte das Membranpotential von MCN1 während der *ivn* Reizung nicht mehr, was darauf hindeutet, dass die IV Neurone und MCN1 über mindestens eine chemische Synapse gekoppelt sind.

4.7.2. Effekte der IV Neurone auf das Projektionsneuron MCN5

MCN5 hat vor allem einen starken Einfluss auf den pylorischen Rhythmus (Norris et al., 1996) im STG, der gastrische Rhythmus wird von diesem Projektionsneuron aber auch beeinflusst (D. M. Blitz, persönliche Mitteilung). Die Zellkörper der beiden MCN5 Neurone sind, wie die Somata von MCN1, jeweils in einem CoG lokalisiert. Von dort projiziert MCN5 über den *ion* und den *stn* zum STG. Die intrazellulären Ableitungen von MCN5 konnten daher ebenfalls anhand der extrazellulären Aktionspotentiale auf dem *ion* identifiziert werden, sowie durch die bekannten Einflüsse auf den pylorischen Rhythmus. Die Amplitude der MCN5 Aktionspotentiale auf dem *ion* war dabei in allen Versuchen etwa halb so groß wie die der MCN1 Spikes, wie es auch in Norris et al. (1996) beschrieben wurde.

In Abbildung 74 ist eine Originalableitung von MCN5 während rhythmischer 40 Hz *ivn* Stimulation dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die MCN5 Aktivität während den Reizen stark zunahm. MCN5 begann mit Anfang des *ivn* Stimulus zu bursten. Die Bursts endeten direkt nach dem *ivn* Stimulus.

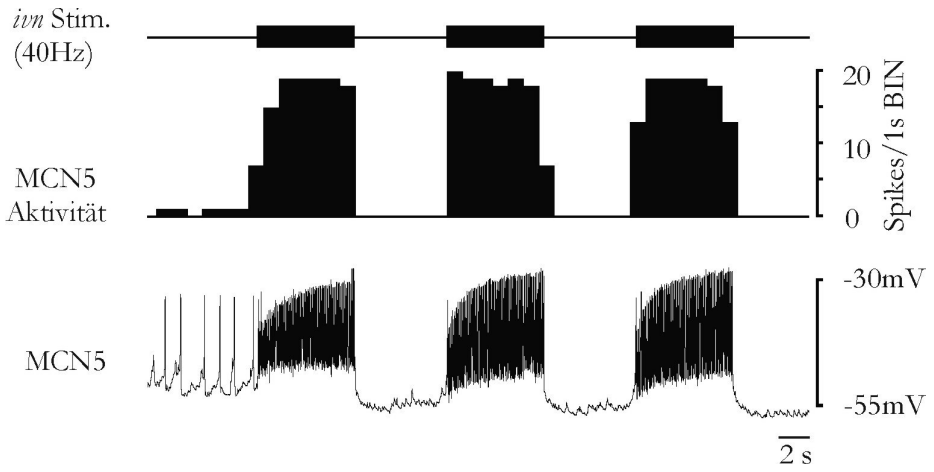


Abbildung 74: Die IV Neurone erregen MCN5. Intrazelluläre Ableitung des Projektionsneurons MCN5. Das Membranpotential von MCN5 (untere Spur) depolarisierte während 40 Hz *ivn* Stimulation und die Aktivität erhöhte sich (mittlere Spur). Obere Spur: *ivn* Reiz.

Die durch eine *ivn* Stimulation ausgelösten MCN5 Aktionspotentiale korrelierten zeitlich mit den einzelnen Reizen. Dies kann man auch in der Multisweep Darstellung in Abbildung 75 erkennen, in der 63 Spuren der intrazellulären MCN5 Ableitung übereinandergelegt wurden. Die MCN5 Ableitung wurde dabei jeweils auf die einzelnen *ivn* Stimuli getriggert (gestrichelte rote Linie in Abbildung 75). Nach einer Latenz von ca. 35 ms konnten in MCN5 verlässlich Aktionspotentiale ausgelöst werden. Die blaue Spur in Abbildung 75 zeigt das gemittelte Aktionspotential (Average) aller 63 Durchläufe.

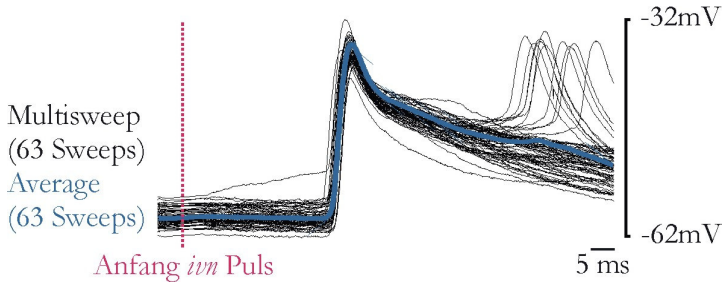


Abbildung 75: Multisweep der MCN5 Aktionspotentiale ausgelöst durch *ivn* Stimuli in MCN5. Dabei wurden 63 Spuren der MCN5 Ableitung übereinandergelegt, jeweils auf den *ivn* Stimulus getriggert (gestrichelte rote Linie). Bei einer Reizfrequenz von 20 Hz konnte in MCN5 bei jedem Reiz nach ca. 35 ms ein Aktionspotential ausgelöst werden. Blau: Average aller 63 Durchläufe.

Die Aktionspotentiale wurden dabei durch zeitlich an die IV Reize gekoppelte postsynaptische Potentiale (PSPs) ausgelöst, wie man bei einer Hyperpolarisation von MCN5 durch Strominjektion in das Soma erkennen konnte. Jeder Reiz löste dabei einzelne PSPs aus, die mit

den einzelnen *ivn* Stimuli zeitlich korrelierten. Für die Multisweep-Darstellung in Abbildung 76, die diese zeitliche Korrelation deutlich zeigt, wurden 30 Spuren der intrazellulären MCN5 Ableitung übereinandergelegt. Die MCN5 Ableitung wurde wie beim Multisweep der Aktionspotentiale auf die *ivn* Stimuli getriggert (gestrichelte rote Linie in Abbildung 76). Nach einer Latenz von ca. 35 ms konnten bei jedem Reiz in MCN5 PSPs ausgelöst werden. Die blaue Spur in Abbildung 76 zeigt das gemittelte PSP (Average) aller 30 Durchläufe.

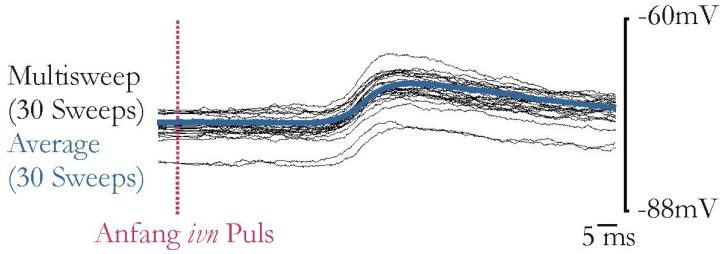


Abbildung 76: Multisweep der PSPs ausgelöst durch *ivn* Stimuli in MCN5 (auf ca. -85 mV hyperpolarisiert). Dabei wurden 30 Spuren der MCN5 Ableitung übereinandergelegt, jeweils auf den *ivn* Stimulus getriggert (gestrichelte rote Linie). Nach einer Latenz von ca. 35 ms konnten PSPs in MCN5 beobachtet werden. Blau: Average aller 30 Durchläufe.

Im Peri-Stimulus-Time-Histogramm in Abbildung 77 ist die Aktivität von MCN5 jeweils 3 s vor und nach *ivn* Stimulation sowie während einem *ivn* Puls mit einer Dauer von 6 s dargestellt. Die Aktivität von MCN5, angegeben als Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN, stieg direkt bei Beginn der Stimulation stark an, blieb dann auf einem Niveau bis zum Ende des Reizes, und nahm direkt nach dem Reizende wieder ab. Die Aktivität nach dem Reiz entsprach dabei wieder der Aktivität vor Reizbeginn.

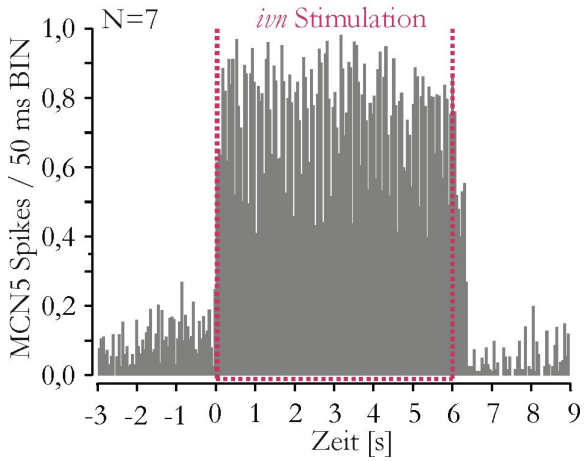


Abbildung 77: Gemitteltes Peri-Stimulus-Time-Histogramm von MCN5: 3 s vor, 6 s während und 3 s nach 40 Hz *ivn* Puls (N=7). Die rot gestrichelten Linien kennzeichnen die *ivn* Stimulation. Die Aktivität von MCN5 stieg

während der Reizung deutlich an. Direkt nach Ende der Stimulation sank die Aktivität wieder auf den Ausgangswert ab.

In Abbildung 78 wurde die MCN5 Aktivität gemessen als Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN jeweils 3 s vor und nach Reiz sowie 6 s während *ivn* Stimulation gemittelt. Die Anzahl der Spikes pro BIN betrug dabei 0,11 ± 0,06 Spikes pro Burst vor der Stimulation und 0,75 ± 0,15 Spikes pro BIN während der Reizung (N=7; p<0,001). Nach dem Reizende fiel die Aktivität im Vergleich zu während dem Reiz auf 0,10 ± 0,02 Spikes pro BIN ab (N=7; p<0,001). Die Aktivität vor und nach Reizung unterschied sich für MCN5 nicht signifikant. Die mittlere MCN5 Feuerfrequenz betrug also mit ca. 15 Hz deutlich unter 40 Hz. Jeder ausgelöste Spike korrelierte dabei zeitlich mit den einzelnen *ivn* Reizen. Obwohl bei jedem IV Spike ein PSP in MCN5 ausgelöst wurde, konnte nicht jedes PSP ein Aktionspotential in MCN5 erzeugen. Ein Grund dafür, dass MCN5 dem Reiz nicht schnell genug folgen kann, könnten die intrinsischen Eigenschaften von MCN5 sein.

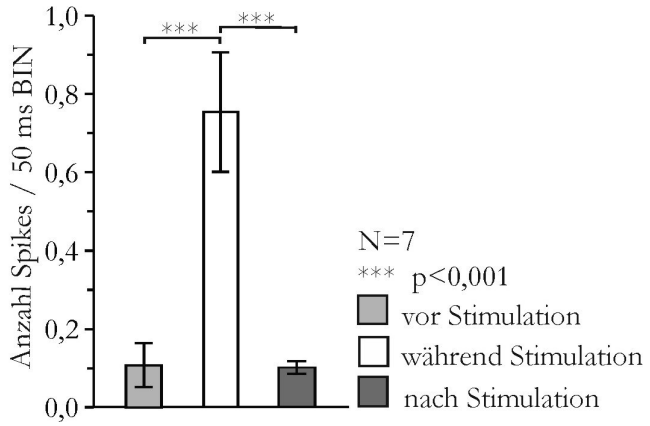


Abbildung 78: Gemittelte Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN von MCN5 vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach (dunkelgrauer Balken) *ivn* Stimulation. Die Anzahl der Aktionspotentiale nahm während den Reizen im Vergleich zu vor und nach dem Reiz signifikant zu (N=7; p<0,001).

Die Verlässlichkeit des Auftretens der PSPs in MCN5 deutet auf eine starke monosynaptische Synapse zwischen IV Neuronen und MCN5 hin, oder aber auf eine elektrische Synapse. Um dies zu untersuchen wurde zunächst eine Ringerlösung mit hoher Konzentration an divalenten Kationen (HiDi-Ringerlösung) auf den anterioren Teil des STNS appliziert, um polysynaptische Verbindungen zu blockieren (siehe auch 4.7.1). In dieser Situation wurde MCN5 weiterhin durch die 40 Hz *ivn* Stimulation depolarisiert (siehe Abbildung 79). Trotz einer Erhöhung der Aktionspotentialschwelle wurden in MCN5 Aktionspotentiale gebildet,

was auf eine sehr starke monosynaptische Kopplung zwischen den IV Neuronen und MCN5 hindeutet (siehe auch Diskussion).

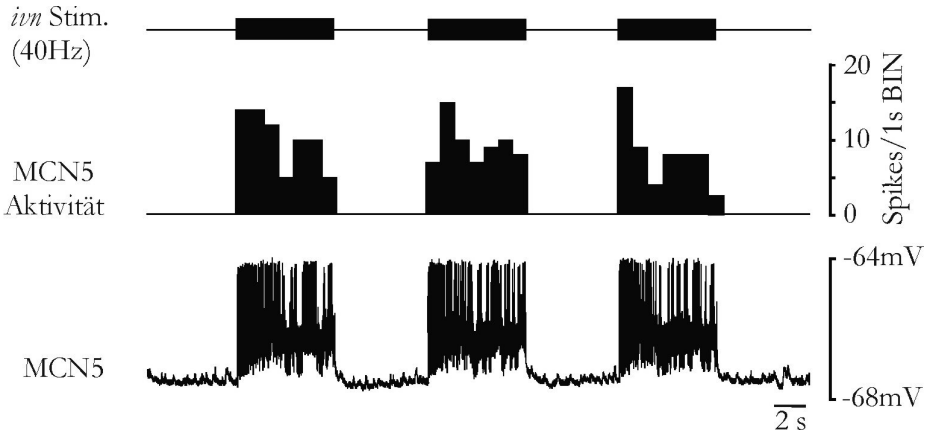


Abbildung 79: Die IV Neurone erregen MCN5 direkt. Intrazelluläre Ableitung von MCN5 in Ringerlösung mit hoher Konzentration an divalenten Kationen. Trotz des Fehlens chemischer Synapsen wurde MCN5 noch durch IV Neuron Reizung depolarisiert. Dies weist auf eine elektrische Kopplung zwischen den IV Neuronen und MCN5 hin.

Die monosynaptische Verbindung zwischen den IV Neuronen und dem Projektionsneuron MCN5 wurde anschließend genauer untersucht. Dafür wurde eine Ringerlösung mit einer niedrigen Konzentration an Kalziumionen (LowCa^{2+}-Ringerlösung) auf die CoGs appliziert, um alle chemischen Synapsen zu blockieren. Wie in Abbildung 80 zu erkennen ist, wurde MCN5 auch in LowCa^{2+}-Ringerlösung durch die *ivn* Reizung depolarisiert und bildete Aktionspotentiale (N=7). Die IV Neurone und MCN5 sind also über elektrische Synapsen miteinander gekoppelt.

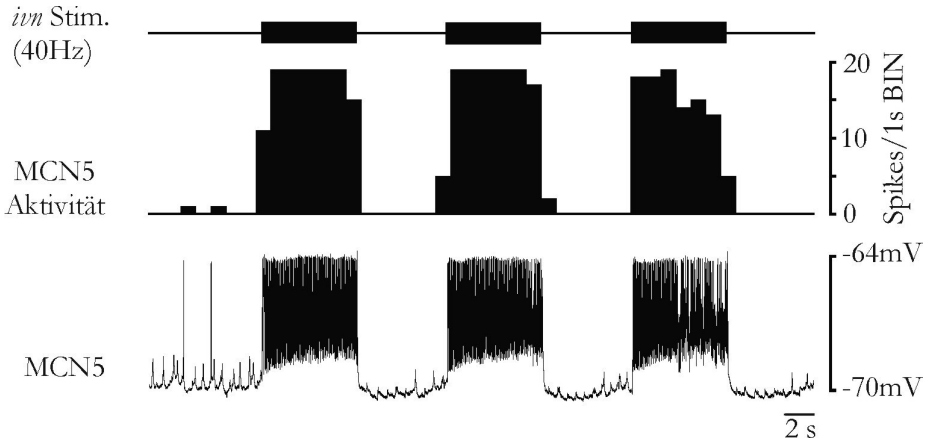


Abbildung 80: Die IV Neurone und MCN5 sind über eine elektrische Synapse verbunden. Intrazelluläre Ableitung von MCN5 in Ringerlösung mit niedriger Konzentration an Kalziumionen. Während chemische Ver-

bindungen blockiert wurden, konnte MCN5 trotzdem noch depolarisiert werden. Dies weist auf eine elektrische Kopplung zwischen den IV Neuronen und MCN5 hin.

4.7.3. Effekte der IV Neurone auf das Projektionsneuron MCN7

Ein Einfluss der IV Neurone auf die Projektionsneurone MCN1 und MCN5 konnte im Abschnitt 4.7.1 und 4.7.2 nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde der Einfluss der absteigenden IV Neurone auf ein weiteres Projektionsneuron untersucht. Die Axone des modulatorischen Kommissuralneurons 7 (MCN7; Blitz et al., 1999) projizieren über den *son* und den *stn* zum STG. Da ca. 20 Axone durch den *son* projizieren, konnte die Aktivität von MCN7 nur anhand seiner bekannten Einflüsse auf die Mustergeneratoren im STG identifiziert werden. Ein charakteristischer Effekt von MCN7 ist z.B., dass bei erhöhter MCN7 Aktivität die pylorischen Neurone VD und IC auch während eines LG Bursts aktiv sind (Blitz et al., 1999), im Gegensatz zu einem gastrischen Rhythmus, der z.B. durch die simultane Aktivität von MCN1 und CPN2 ausgelöst wird (Beenhakker and Nusbaum, 2004).

Wie bei MCN1 und 5 wurde die Aktivität von MCN7 während extrazellulärer 40 Hz *ivn* Stimulation untersucht. Ähnlich wie MCN1 und 5 depolarisierte das Membranpotential von MCN7 während der Reizung und MCN7 begann zu spiken. Die Originalableitung von MCN7 in Abbildung 81 zeigt, dass MCN7 jeweils während der *ivn* Pulse zu bursten begann. Die MCN7 Aktivität blieb dabei auch nach der Reizung erhöht (N=3).

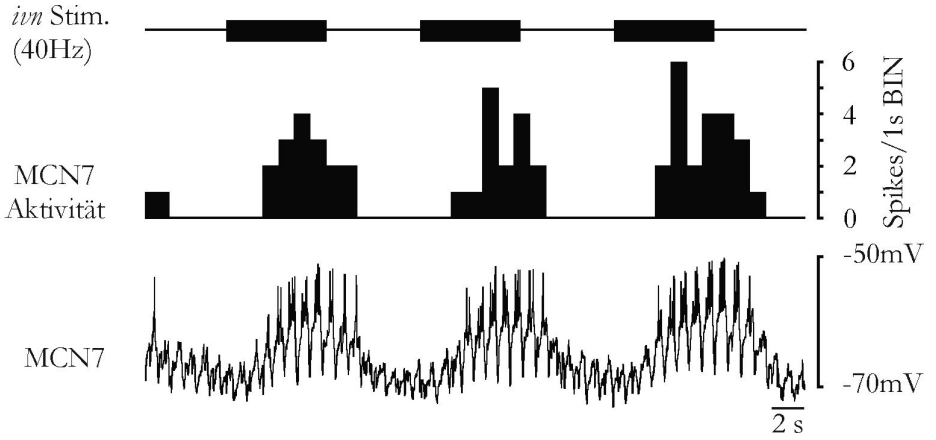


Abbildung 81: Die IV Neurone erregen MCN7. Intrazelluläre Ableitung des Projektionsneurons MCN7 (untere Spur). MCN7 wurde durch die 40 Hz *ivn* Reizung depolarisiert und begann während den Pulsen zu bursten (mittlere Spur). Die Aktivität blieb dabei auch nach dem Reiz erhöht. Obere Spur: *ivn* Reiz.

Eine Auftragung der MCN7 Aktivität in einem Peri-Stimulus-Time-Histogramm jeweils 3 s vor und nach *ivn* Reizung sowie 6 s während der Stimulation (N=3; siehe Abbildung 82) zeigt, dass die MCN7 Aktivität während des Reizes langsam anstieg und nach dem Reiz erhöht blieb (roter Pfeil in Abbildung 82).

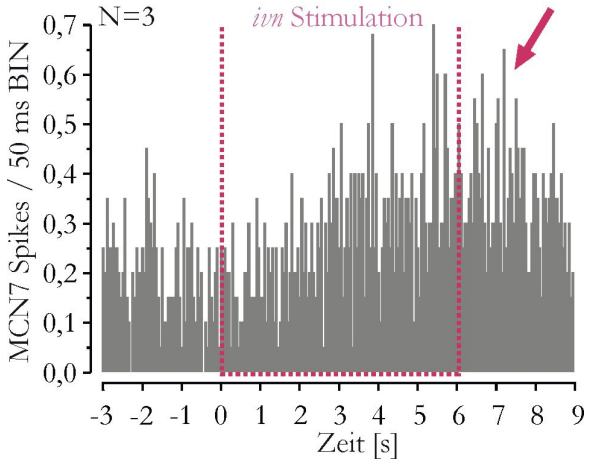


Abbildung 82: Gemitteltes Peri-Stimulus-Time-Histogramm von MCN7: 3 s vor, 6 s während und 3 s nach 40 Hz *ivn* Stimulation (N=3). Die rot gestrichelten Linien kennzeichnen die *ivn* Stimulation. Die Aktivität von MCN7 stieg während der *ivn* Stimulation langsam an. Nach Ende der Stimulation blieb die Aktivität weiterhin erhöht (roter Pfeil).

Die statistische Auswertung der Peri-Stimulus-Histogramme dargestellt in Abbildung 83 ergab keine signifikanten Unterschiede, da die Anzahl der Versuche zu gering war (N=3), zeigt jedoch einen Trend hin zu höheren Feuerfrequenzen während und nach der Stimulation. Für die Auswertung der PSTHs wurde die MCN7 Aktivität als Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN jeweils 3 s vor und nach Reiz sowie 6 s während der Reizung gemittelt. Das Diagramm in Abbildung 83 zeigt, dass die gemittelte Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN während der Stimulation im Vergleich zu vor der Simulation leicht erhöht war. Die Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN betrug vor dem Reiz 0,2 ± 0,09, während der Stimulation dagegen 0,28 ± 0,13 (N=2; Abbildung 83). Die Aktivität von MCN7 blieb nach dem Reiz weiterhin erhöht und fiel nicht auf den Wert vor der Stimulation ab (0,35 ± 0,11; N=3; Abbildung 83).

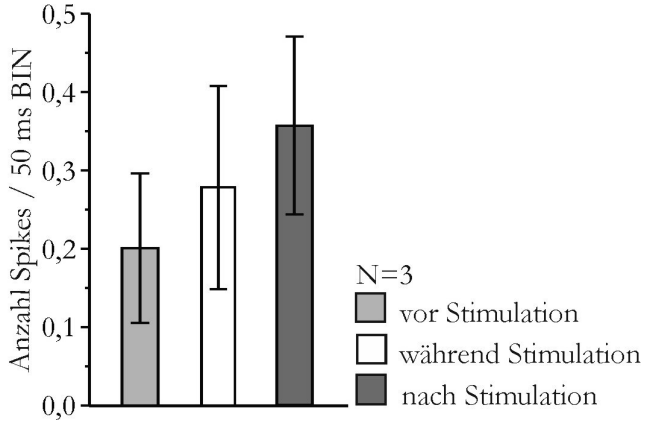


Abbildung 83: Gemittelte Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN von MCN7 vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach (dunkelgrauer Balken) *ivn* Stimulation. Die Anzahl der Aktionspotentiale nahm während dem Reiz zu. Die Aktivität erhöhte sich nach dem Reizende weiter und blieb im Vergleich zur Anzahl der Spikes vor und während Stimulation erhöht (N=3).

Aufgrund der geringen Anzahl an Ableitungen konnte die synaptische Verbindung zwischen den IV Neuronen und MCN7 nicht genauer untersucht werden. Lediglich in einem Tier wurde HiDi-Ringerlösung zum Blockieren polysynaptischer Verbindungen auf die CoGs appliziert. In diesem Fall wurde MCN7 durch die *ivn* Stimulation nicht depolarisiert, was auf eine polysynaptische Verbindung hindeutet.

4.7.4. Effekte der IV Neurone auf das Projektionsneuron CPN2

Ein weiteres identifiziertes Projektionsneuron ist das kommissurale Projektionsneuron 2 (CPN2; Norris et al., 1994). CPN2 projiziert wie MCN7 über den *son* und den *stn* zum STG und beeinflusst dort wiederum sowohl den gastrischen als auch den pylorischen Mustergenerator. Dieses Projektionsneuron kann anhand der Tatsache identifiziert werden, dass es die gastrischen Motoneurone (GMs) direkt über eine elektrische Synapse erregt (Stein et al., 2005). Jedes CPN2 Aktionspotential löst in den GMs ein zeitlich korreliertes PSP aus.

In Abbildung 84 ist eine Originalableitung von CPN2 während einer *ivn* Stimulation dargestellt. Während der Stimulation depolarisierte das Membranpotential von CPN2 und seine Aktivität nahm deutlich zu. Da in der Darstellung aus Abbildung 84A keine einzelnen Aktionspotentiale zu erkennen sind, wurde der rot markierte Bereich in Abbildung 84B vergrößert dargestellt. In dieser Vergrößerung sind einzelne Aktionspotentiale in CPN2 zu erkennen.

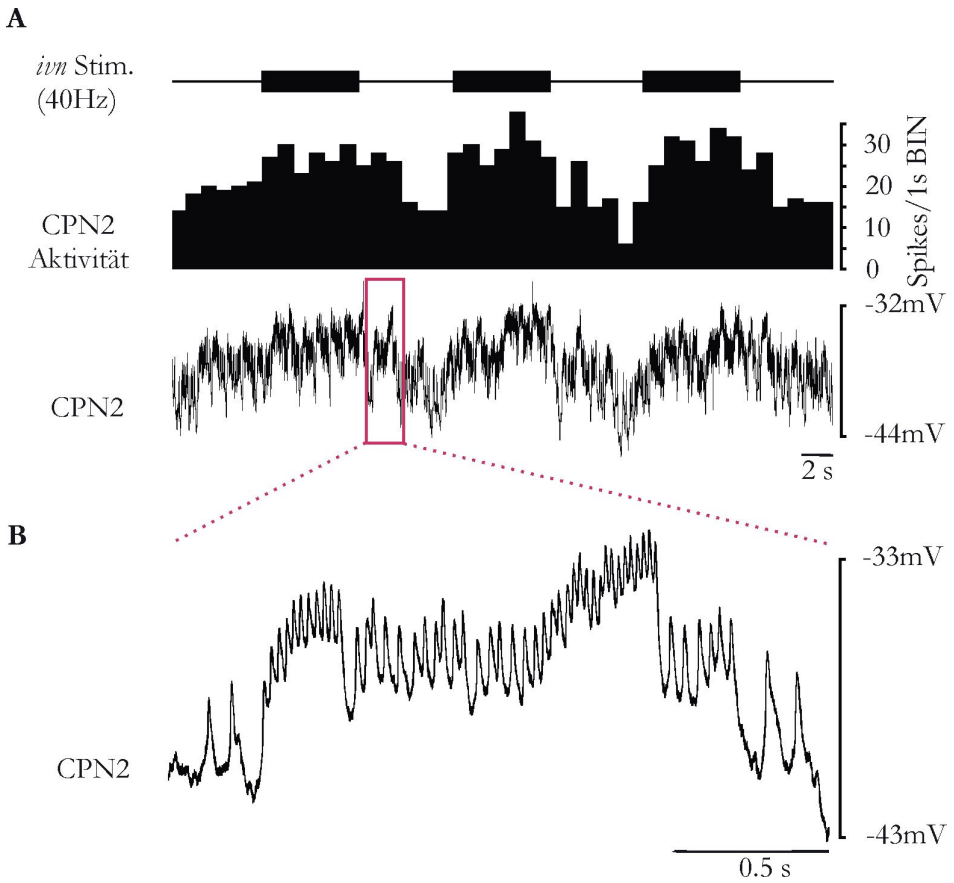


Abbildung 84: Die IV Neurone erregen CPN2. Intrazelluläre Ableitung des Projektionsneurons CPN2. **A:** Das Membranpotentiale von CPN2 (untere Spur) depolarisierte während 40 Hz *ivn* Reizung und die Aktivität (mittlere Spur) erhöhte sich. Obere Spur: *ivn* Reiz. **B:** Ausschnittsvergrößerung der in A dargestellten intrazellulären CPN2 Ableitung (rot markierter Bereich).

Für CPN2 wurde, wie auch schon für MCN1, 5 und 7, ein PSTH erstellt. Dabei wurde die CPN2 Aktivität jeweils 3 s vor und nach Stimulation sowie während der *ivn* Stimulation mit einer Pulsdauer von 6 s in 50 ms BINs aufgetragen. Die Anzahl der CPN2 Spikes pro 50 ms BIN stieg dabei während der Stimulation langsam an und fiel nach Ende der Reizung wieder auf den Ausgangswert ab (N=9; siehe Abbildung 85).

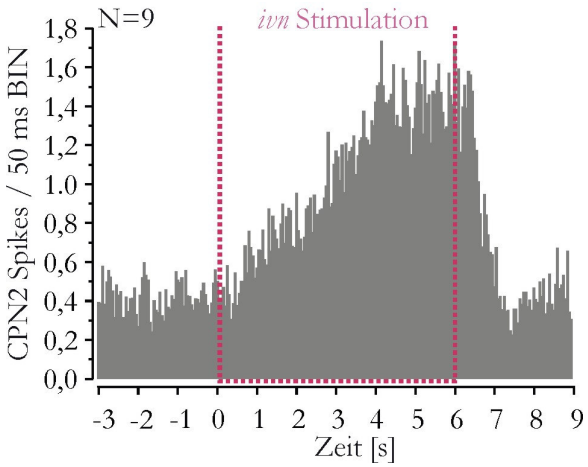


Abbildung 85: Gemitteltes Peri-Stimulus-Time-Histogramm von CPN2: 3 s vor, 6 s während und 3 s nach 40 Hz *ivn* Stimulation (N=9). Die rot gestrichelten Linien kennzeichnen die i*vn* Stimulation. Die Aktivität von CPN2 stieg während dem Reiz langsam an und fiel innerhalb von einer Sekunde nach Ende der Stimulation wieder ab.

Für das Diagramm in Abbildung 86 wurde die Anzahl der CPN2 Spikes pro 50 ms BIN jeweils 3 s vor und nach sowie 6 s während der Reizung gemittelt. Das Diagramm zeigt, dass sich die Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN signifikant von 0,42 ± 0,4 Spikes pro BIN vor Reizung auf 1,04 ± 0,4 Spikes pro BIN nach der Reizung erhöhte (N=9; p<0,003). Nach dem Reiz nahm die CPN2 Aktivität im Vergleich zu während der Reizung wieder signifikant ab (0,66 ± 0,4; N=9; p<0,043).

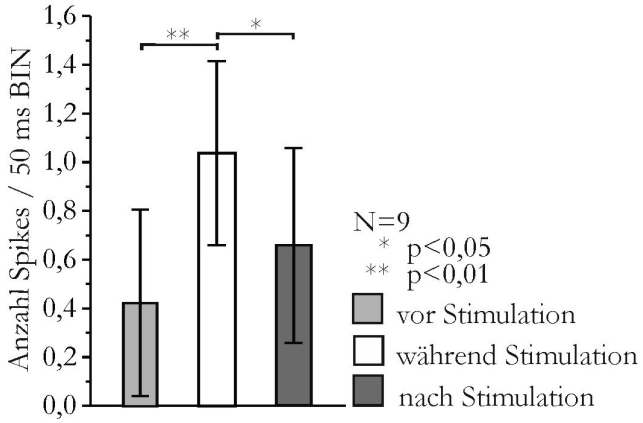


Abbildung 86: Gemittelte Anzahl der Spikes pro 50 ms BIN von CPN2 vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach (dunkelgrauer Balken) *ivn* Stimulation. Die Anzahl der Aktionspotentiale nahm während *ivn* Stimulation signifikant zu (N=9; p<0,003). Die Aktivität blieb nach Reizende im Vergleich zu vor der Stimulation leicht erhöht. Die Aktivität nach Stimulation war im Vergleich zu während der Stimulation signifikant niedriger (N=9; p<0,043).

Während der *ivn* Stimulation konnten weder PSPs noch Aktionspotentiale beobachtet werden, die zeitlich mit der Reizung korrelierten. Zur Untersuchung der Konnektivität zwischen den IV Neuronen und dem Projektionsneuron CPN2 wurde analog zur Untersuchung der anderen Projektionsneurone zunächst HiDi-Ringerlösung auf die CoGs appliziert, um polysynaptische Verbindungen zu blockieren.

Entsprechend der Erwartung zeigte CPN2 in HiDi spontan keine Aktionspotentiale mehr (siehe Abbildung 87). Auch eine 40 Hz *ivn* Reizung konnte CPN2 nicht erregen und daher auch dessen Aktivität nicht erhöhen, im Gegensatz zur Situation in Normalringer. Das heißt die IV Neurone erregen CPN2 nicht direkt, sondern indirekt über ein oder mehrere zwischengeschaltete Interneurone.

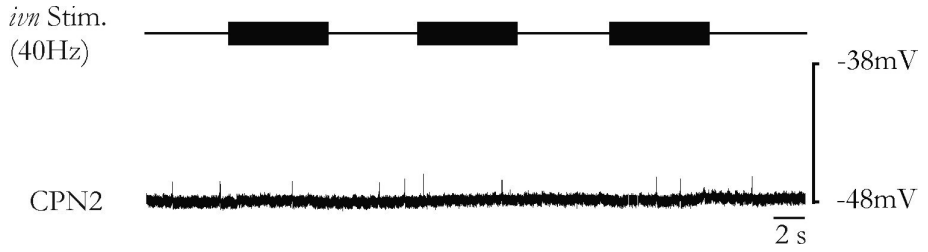


Abbildung 87: **Die IV Neurone und CPN2 sind polysynaptisch gekoppelt.** Intrazelluläre Ableitung von CPN2 in Ringerlösung mit hoher Konzentration an divalenten Kationen. Ein Blockieren polysynaptischer Verbindungen verhinderte die Depolarisation des CPN2 Membranpotentials während der *ivn* Reizung (N=6).

Zusammenfassung:

Alle vier bisher identifizierten Projektionsneurone MCN1, MCN5, MCN7 und CPN2 mit ihren Zellkörpern in den CoGs wurden von den IV Neuronen beeinflusst. MCN1, MCN7 und CPN2 wurden indirekt, also über Interneurone, von den IV Neuronen erregt. MCN5 ist dagegen direkt und elektrisch mit den IV Neuronen gekoppelt. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 88 dargestellt.

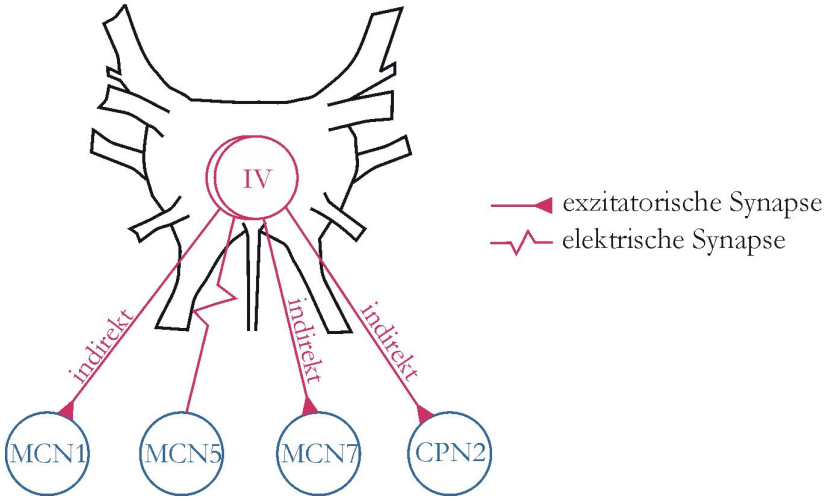


Abbildung 88: Konnektivität der IV Neurone mit den Projektionsneuronen MCN1, MCN5, MCN7 und CPN2.

4.8 Beitrag der Projektionsneurone zu dem durch *ivn* Stimulation ausgelösten gastrischen Mühlenrhythmus

Die im vorangegangenen Kapitel untersuchten Projektionsneurone haben einen starken Einfluss auf den gastrischen Rhythmus (Nusbaum et al., 1992; D. M. Blitz, persönliche Mitteilung; Norris et al., 1994; Blitz et al., 1999). Es liegt daher nahe anzunehmen, dass sie einen Beitrag zu dem durch *ivn* Stimulation ausgelösten GMR leisten. Dazu wurden verschiedene Läsionsexperimente durchgeführt (N=8). Um diese Versuche durchführen zu können, war es notwendig, die Projektionen der verschiedenen Projektionsneurone zu kennen. Die Projektionsneurone MCN1 und 5 projizieren über den inferioren oesophagealen Nerv (*ion*), die Projektionsneurone MCN7 und CPN2 dagegen über den superioren oesophagealen Nerv (*son*) zu den zentralen Mustergeneratoren im STG.

In Christie et al. (2004) wurde beschrieben, dass das Projektionsneuron MCN1 ausschließlich über das IV Axon im *son* aktiviert wird. Die Aktivität von MCN1 wurde dabei ausschließlich extrazellulär am *ion* abgeleitet. Für diese Untersuchungen wurde vor einer *ivn* Reizung entweder *son* oder *ion* durchtrennt, um die möglichen Aktivierungswege zu durchtrennen. Als Kontrolle diente dabei immer die Situation mit intakten *son*s und *ion*s, im Folgenden als "intaktes STNS" bezeichnet. Nach Durchtrennen des *son*s erhöhte sich die Aktivität von MCN1 während dem Reiz nicht mehr. Gleichzeitig mit Entfernen der MCN1 Aktivität durch die *son* Durchtrennung, konnte durch *ivn* Reizung kein GMR ausgelöst werden. Im Gegensatz dazu konnte ein Durchtrennen des *ion*s die Erhöhung der MCN1 Aktivität nicht verhindern.

In den Versuchen, in denen der *ion* durchtrennt war, konnte eine *ivn* Reizung keinen GMR auslösen. Obwohl sich die MCN1 Aktivität durch den Reiz erhöhte, konnte diese Aktivität das STG nicht erreichen. Diese Ergebnisse von Christie et al. (2004) zeigen, dass die IV Neurone MCN1 über ihr *son* Axon und nicht über das im *ion* erregen.

Im Folgenden wurde daher zunächst der *son* auf der linken Seite des bilateralsymmetrischen STNS durchtrennt, um somit die Aktivierung von MCN1 im linken CoG zu unterbinden und die Projektionen von CPN2 und MCN7, deren Axone im *son* verlaufen, zu durchtrennen. Die Projektionsneurone im rechten CoG konnten dabei weiterhin durch die IV Neurone aktiviert werden. In Abbildung 89 sind extrazelluläre Ableitungen des *lgn*s mit der Aktivität von LG und des *dgn*s mit der Aktivität von DG und GM sowie eine intrazelluläre GM Ableitung im intakten STNS und mit durchtrenntem *son* dargestellt. Durch die intrazelluläre GM Ableitung konnte die Aktivität des rechten CPN2 während der *ivn* Stimulation beobachtet werden, da CPN2 eine direkte erregende Synapse auf die gastrischen Motoneurone besitzt, sichtbar als PSPs in GM (siehe Abschnitt 4.7.4).

Vor Durchtrennen des *son*s konnte, wie in den Ergebnissen in Abschnitt 4.5.1 beschrieben, durch *ivn* Reizung ein GMR ausgelöst werden, charakterisiert durch die alternierende Aktivität von LG und DG (siehe Abbildung 89A). Nach *son* Durchtrennung auf der linken Seite konnte trotz fehlender Aktivität der Projektionsneurone im linken CoG weiterhin ein GMR hervorgerufen werden (siehe Abbildung 89B). Das bedeutet also, dass eine Aktivierung der Projektionsneurone in einem CoG ausreicht, um einen GMR auszulösen. Während der Stimulation wurde sowohl im intakten STNS als auch bei durchtrenntem *son* GM depolarisiert und das Projektionsneuron CPN2 aktiviert, was man an der erhöhten EPSP Anzahl in GM erkennen kann. Nach der *son* Durchtrennung konnte allerdings nur die CPN2 Kopie im rechten CoG aktiviert werden, CPN2 im linken CoG konnte aufgrund des durchtrennten *son*s nicht mehr ins STG projizieren.

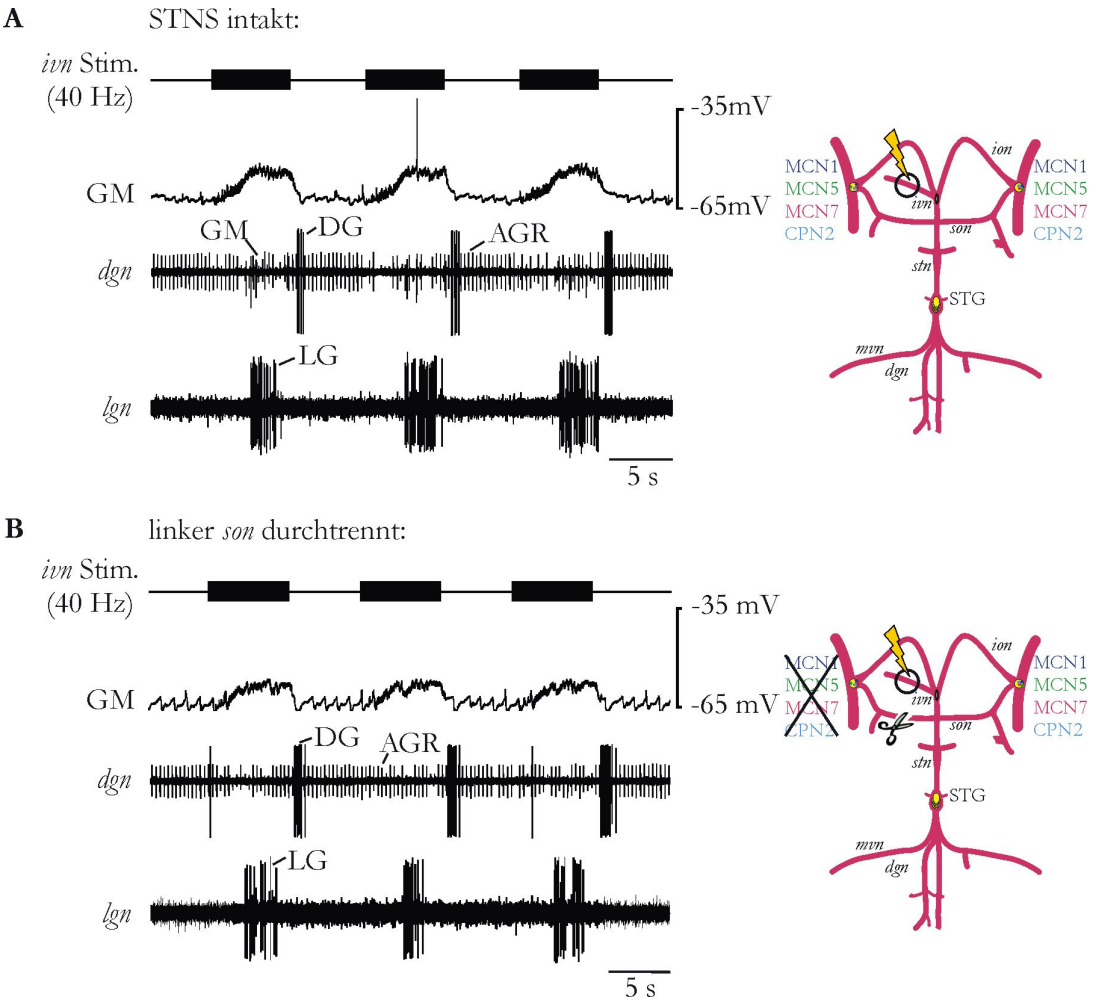


Abbildung 89: Beteiligung der Projektionsneurone am Auslösen eines gastrischen Rhythmus während *ivn* Stimulation. Extrazelluläre Ableitungen des *lgn*s (untere Spur) mit der Aktivität von LG und des *dgn*s (zweite Spur von unten) mit den Aktivitäten von DG, GM und AGR sowie die intrazelluläre Ableitung von GM (zweite Spur von oben) während einer *ivn* Reizung (obere Spur). **A:** Intaktes STNS. Während einer *ivn* Stimulation wurde ein GMR ausgelöst. **B:** Nach Durchtrennen des linken *son*s konnte während *ivn* Reizung ein GMR ausgelöst werden, obwohl die Projektionsneurone im linken CoG nicht mehr durch die IV Neurone aktiviert werden konnten bzw. deren Projektionen zum STG durchtrennt waren.

Anschließend wurde zusätzlich zum durchtrennten *son* auf der linken Seite der *ion* auf der rechten Seite des STNS durchtrennt (siehe Abbildung 90A, rechts). Durch den *ion* projizieren MCN1 und MCN5 zum STG. In diesem Experiment war also der Einfluss von MCN1 und MCN5 auf den GMR ausgeschlossen. Durch diese Läsion des *ion*s wurde untersucht, ob MCN1 und MCN5 während einer *ivn* Stimulation einen Beitrag leisten zum Auslösen des GMR (siehe Abbildung 90A).

Ohne die Beteiligung dieser beiden Projektionsneurone, also bei durchtrenntem linkem *son* und rechtem *ion*, konnte während der Reizung kein GMR ausgelöst werden (Abbildung 90A). Da das rechte CoG weiterhin über den *son* mit dem STNS und den IV Neuronen verbunden war, konnte das Projektionsneuron CPN2 nach wie vor aktiviert werden und zum STG projizieren, was an der erhöhten Anzahl an PSPs in GM während der *ivn* Stimulation zu erkennen ist (siehe Abbildung 90A). In diesem Versuch war also der Einfluss der Projektionsneurone MCN1 und MCN5 auf den GMR ausgeschlossen. Die Aktivität der Projektionsneurone MCN7 und CPN2 im rechten CoG, die über den *son* zum STG projizieren, war nicht hinreichend, um während der *ivn* Reizung einen GMR auszulösen (siehe Abbildung 90A).

Wie in Bartos and Nusbaum, (1997) beschrieben, kann das Projektionsneuron MCN1 durch eine *ion* Reizung aktiviert werden. Daher wurde anschließend der *ivn* gleichzeitig mit dem rechten *ion* stimuliert, um das Projektionsneuron MCN1 zusammen mit CPN2 und MCN7 (durch *ivn* Reizung erregt) zu aktivieren. Beide Nerven, *ivn* und *ion*, wurden dabei mit einer Reizfrequenz von 40 Hz und einer Pulsdauer und einem Interpulsintervall von jeweils 6 s stimuliert. Während der simultanen *ivn* und *ion* Stimulation konnte erneut ein GMR ausgelöst werden, charakterisiert durch die alternierende Aktivität von LG und DG (siehe Abbildung 90B). Das Projektionsneuron MCN1 scheint also essentiell für das Auslösen eines GMR während *ivn* Stimulation zu sein.

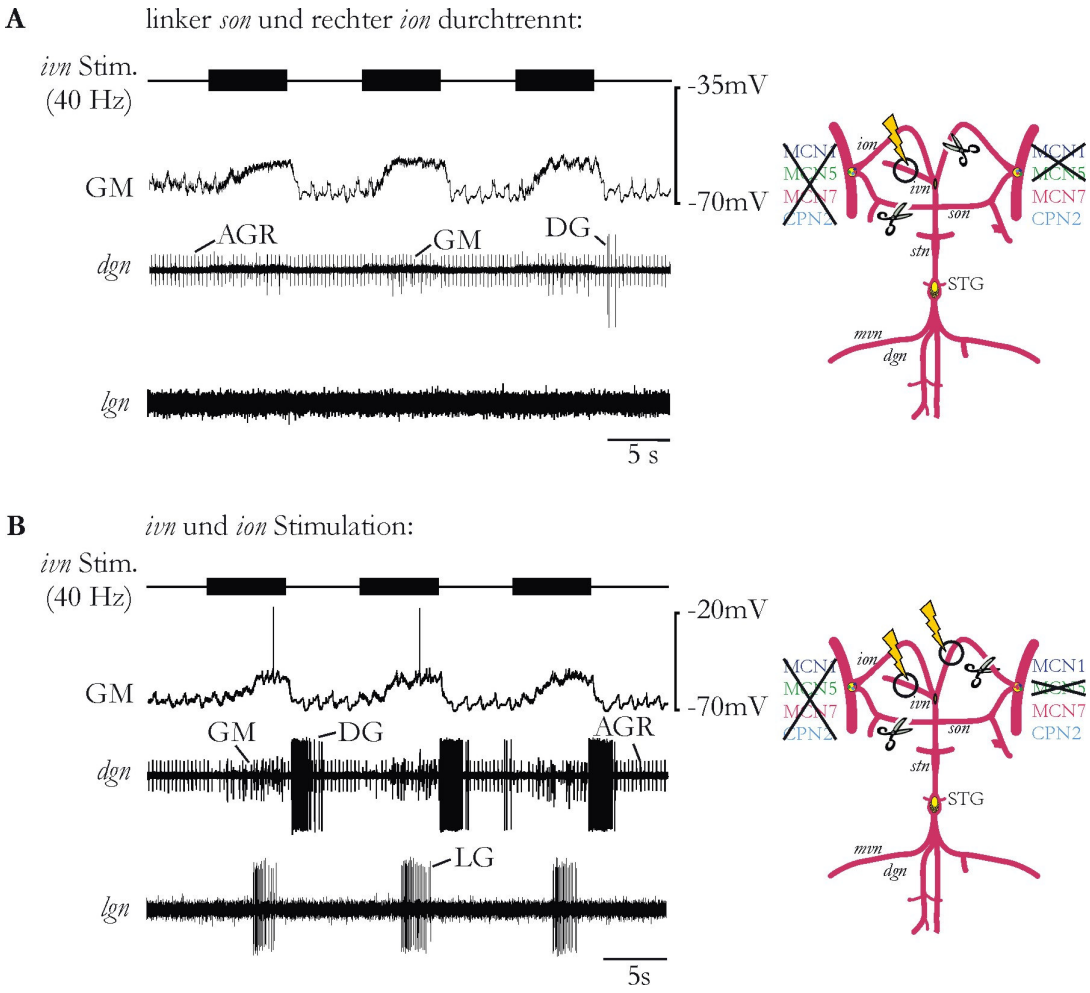


Abbildung 90: MCN1 ist notwendig zum Auslösen eines gastrischen Mühlenrhythmus durch *ivn* Stimulation. Extrazelluläre Ableitungen des *lgn*s (untere Spur) mit der Aktivität von LG und des *dgn*s (zweite Spur von unten) mit den Aktivitäten von DG, GM und AGR sowie die intrazelluläre Ableitung von GM (zweite Spur von oben) während einer *ivn* Reizung (obere Spur). **A:** Nach Durchtrennen des linken *son*s und des rechten *ion*s konnte während einer *ivn* Reizung kein GMR mehr ausgelöst werden. **B:**. Bei gleichzeitiger Stimulation von *ivn* und rechtem MCN1 (*ion* Reizung) konnte wieder ein GMR ausgelöst werden.

4.9 Mögliche Neuromodulatoren der IV Neurone

Die IV Neurone haben einen starken Einfluss auf die Mustergeneratoren des stomatogastrischen Nervensystems. Wie in Abschnitt 4.8 gezeigt wurde, werden die Effekte auf den gastrischen Mustergenerator über Projektionsneurone in den CoGs getragen. In welcher Weise die IV Neurone den pylorischen Mustergenerator in *C. pagurus* beeinflussen, ob beispielsweise über die Projektionsneurone in den CoGs oder direkt über einen

Neuromodulator, ist unklar. Im Folgenden wurde daher der Einfluss möglicher Neuromodulatoren der IV Neurone auf die beiden Mustergeneratoren im STG untersucht.

In Christie et al., 2004 wurde durch Antikörperfärbungen gezeigt, dass die IV Neurone in *C. borealis* (einem nahen Verwandten von *C. pagurus*) mindestens zwei Kotransmitter enthalten, das Neuropeptid FLRFamid und den Neurotransmitter Histamin. Mit Hilfe gezielter Histamin Applikation auf das isolierte STG wurde gezeigt, dass Histamin einen ähnlichen direkten Effekt auf den pylorischen Rhythmus hat wie eine Reizung des *ivn*s.

4.9.1. Einfluss von Histamin auf die Mustergeneratoren im STG

In Christie et al. (2004) wurde gezeigt, dass die IV Neurone den inhibitorischen Neurotransmitter Histamin enthalten. Auch im Flusskrebs *Pacifastacus leniusculus*, im Hummer *H. americanus* (Mulloney and Hall, 1991) und der Languste *P. interruptus* (Claiborne and Selverston, 1984) konnte Histamin als Neurotransmitter der IV Neurone identifiziert werden. Eine direkte Histamin Applikation auf das isolierte STG hat dabei in *C. borealis* denselben Effekt wie eine *ivn* Stimulation (Christie et al., 2004). Die pylorischen Neurone PD, LP, VD und IC werden dabei während dem Reiz inhibiert. Die PYs beginnen dagegen während Reiz und Applikation vermehrt zu feuern. Auch der gastrische Mühlenrhythmus wird in *C. borealis* durch Applikation von Histamin kurzzeitig gehemmt, oszilliert aber nach Ende der Applikation weiter.

Um einen möglichen Einfluss des inhibitorischen Transmitters Histamin im intakten Nervensystem von *C. pagurus* zu untersuchen, wurde der kompetitive, reversible Antagonist des Histamin-(H_2)-Rezeptors Cimetidin in einer Konzentration von $5x10^{-3}$ M (nach Christie et al., 2004) ausschließlich auf den posterioren Bereich des Nervensystems, also STG und motorische Nerven, appliziert (siehe Abbildung 24). Die CoGs wurden weiterhin mit normaler Ringerlösung perfundiert. Während der Applikation wurde der *ivn* gereizt, um zu überprüfen, ob die IV Neurone auch in *C. pagurus* Histamin benutzen, um die Motoneurone im STG zu beeinflussen. Eine Vor- und Nachkontrolle fand dabei jeweils in Ringerlösung statt.

Der gastrische Mühlenrhythmus, der, wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben, durch eine *ivn* Stimulation ausgelöst wird, wurde durch eine Hemmung der Histamin-Wirkung durch Applikation des H_2-Rezeptor-Antagonisten Cimetidin nicht beeinflusst (N=8). Wie in den Originalableitungen in Abbildung 91 zu erkennen ist, war sowohl während einer *ivn* Reizung in Ringer als auch in Cimetidin jeder LG Burst zeitlich mit dem *ivn* Puls korreliert.

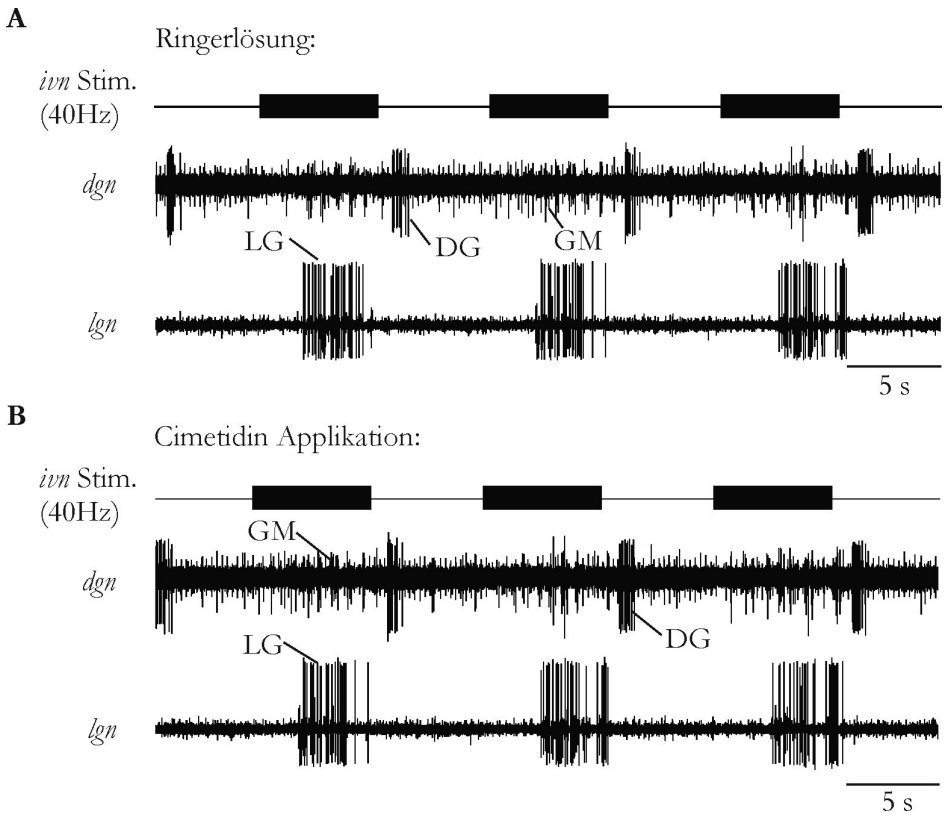


Abbildung 91: Histamin hat keinen Einfluss auf den gastrischen Mühlenrhythmus (GMR). Extrazelluläre Ableitung des *lgn*s (untere Spur) mit der Aktivität von LG und des *dgn*s (mittlere Spur) mit der Aktivität von DG und GM während *ivn* Reizung (obere Spur). **A:** Während der *ivn* Reizung in Ringerlösung wurde ein GMR mit der alternierenden Aktivität von LG und DG ausgelöst. **B:** Während Applikation des Histamin Antagonisten Cimetidin wurde durch *ivn* Stimulation ebenfalls ein GMR ausgelöst.

Um zu überprüfen, ob Histamin eine Wirkung auf Neurone in den CoGs hat, wurde $5x10^{-3}$M Cimetidin ausschließlich auf den anterioren Teil des STNS mit den CoGs appliziert. Diese Applikation hatte weder einen Einfluss auf die Projektionsneurone in den CoGs noch auf die Mustergeneratoren im STG (N=3).

Im Gegensatz zum GMR konnte eine Applikation des Histamin Antagonisten Cimetidin auf das STG den pylorischen Rhythmus beeinflussen. Für die Quantifizierung der verschiedenen pylorischen Neurone wurde die Anzahl der Spikes pro Burst jeweils vor, während und nach dem *ivn* Reiz bestimmt. Diese Werte wurden jeweils für Vorkontrolle, Cimetidin Applikation und Nachkontrolle ermittelt. In Abbildung 92 sind intrazelluläre Ableitungen von PD und LP in Ringerlösung (A) sowie während Cimetidin Applikation (B) dargestellt. Die Aktivität von PD und LP verringerte sich während der *ivn* Reizung in Ringerlösung deutlich. In Cimetidin hingegen veränderte sich die Anzahl der Spikes in PD nicht während dem *ivn* Reiz. Die

Aktivität von LP verringerte sich aber weiterhin während der Reizung. Die Depolarisation von PD während dem Reiz kommt dabei vermutlich durch den Wegfall der LP Inhibition zustande.

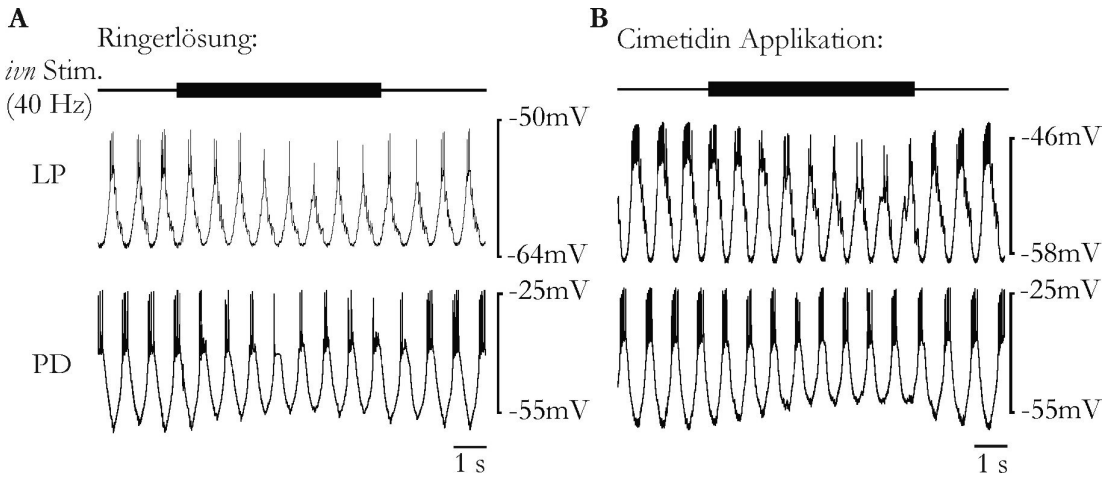


Abbildung 92: Intrazelluläre Ableitungen von PD und LP. **A:** Während *ivn* Stimulation in Ringerlösung nahm die Aktivität von PD und LP ab. **B:** Bei Applikation von Cimetidin veränderte sich die Aktivität von PD nicht, die Aktivität von LP nahm während dem *ivn* Reiz dagegen weiterhin ab.

Zur Quantifizierung des Einflusses von Histamin auf die pylorischen Neurone wurde die Anzahl der Spikes pro Burst ermittelt. Die Aktivität von PD nahm während *ivn* Stimulation in Ringerlösung signifikant ab. Die Anzahl der Spikes pro Burst verringerte sich während der Stimulation von 3,41 ± 1,4 Spikes pro Burst vor dem Reiz auf 2,58 ± 1,6 Spikes pro Burst (N=8; $p<0,013$; Abbildung 93) während der Reizung. Nach dem Reiz stieg die Aktivität im Vergleich zu während der Stimulation auf 3,39 ± 1,4 Spikes pro Burst an (N=8; $p<0,015$; Abbildung 93). Während einer Applikation des Histamin Blockers Cimetidin hatte eine *ivn* Stimulation keinen Einfluss mehr auf PD, die Aktivität von PD veränderte sich nicht (vor Reiz: 4,18 ± 1,39 Spikes pro Burst; während Reiz: 4,06 ± 1,17 Spikes pro Burst; nach Reiz: 4,09 ± 1,4 Spikes pro Burst; N=8, siehe Abbildung 93). Dieser Effekt war reversibel: nach einem Auswaschen mit Ringerlösung für 45 bis 60 min nahm die PD Aktivität während dem Reiz wieder ab (von 3,43 ± 1,5 Spikes pro Burst vor dem Reiz auf 2,39 ± 1,5 Spikes pro Burst während dem Reiz; N=8; $p<0,001$; Abbildung 93) und stieg nach Reizung auf 3,38 ± 1,4 Spikes pro Burst an (N=8; $p<0,001$; Abbildung 93). Histamin hat also eine inhibitorische Wirkung auf PD und scheint von den IV Neuronen verwendet zu werden, um die PD Aktivität zu verringern.

Die Anzahl der Spikes pro Burst von PD in Cimetidin war während dem *ivn* Reiz signifikant verschieden zu den entsprechenden Werten in Vor- und Nachkontrolle (N=8; Vorkontrolle: p<0,018; Nachkontrolle: p<0,008; siehe Abbildung 93). Obwohl auch die Anzahl der Spikes pro Burst vor und nach dem Reiz im Vergleich zu Vor- und Nachkontrolle leicht erhöht sind, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

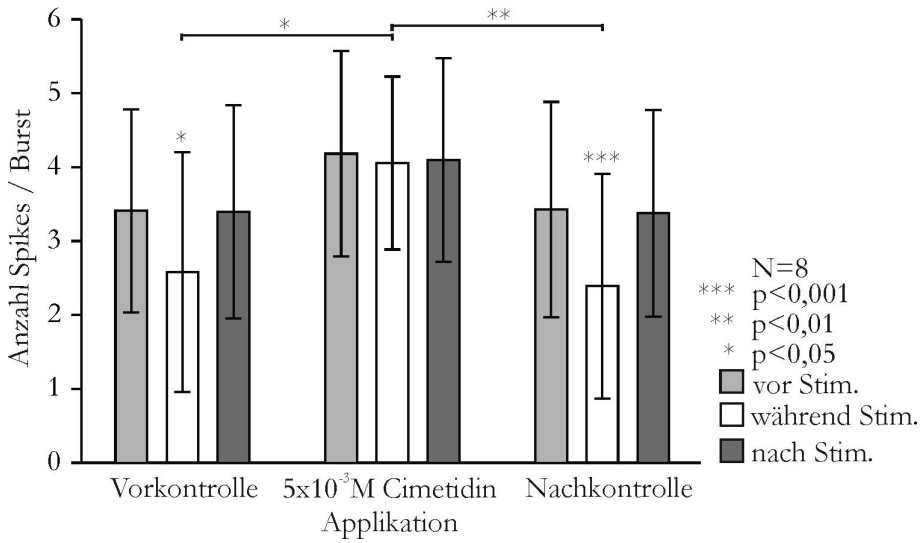


Abbildung 93: Die IV Neurone hemmen PD über den Transmitter Histamin. Aktivität des pylorischen Dilatorneurons (PD) vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach *ivn* Reizung (dunkelgrauer Balken) in Ringerlösung (Vor- und Nachkontrolle) und während $5x10^{-3}$M Cimetidin Applikation. In Ringerlösung verringerte sich die PD Aktivität während einem *ivn* Reiz signifikant (N=8; p<0,05). In Cimetidin hatte ein *ivn* Reiz keinen Einfluss auf PD. Nach Auswaschen mit Ringerlösung nahm die Aktivität von PD während dem Reiz wie in der Vorkontrolle signifikant ab (N=8; p<0,001).

Die Aktivität von LP wurde durch eine Aktivierung der IV Neurone, wie schon in Abschnitt 4.4 beschrieben, signifikant verringert. In der Vorkontrolle wurde die Anzahl der Spikes pro Burst von 5,2 ± 3,1 vor dem *ivn* Reiz auf 2,55 ± 2,0 Spikes pro Burst während dem Reiz verringert (N=9; p<0,001; Abbildung 94). Die Aktivität von LP stieg nach dem Reiz im Vergleich zu während der Stimulation auf 5,15 ± 3,1 Spikes pro Burst an (N=9; p<0,001; Abbildung 94). Während der Cimetidin Applikation war die Anzahl der Spikes pro Burst vor und nach *ivn* Stimulation im Vergleich zu Vor- und Nachkontrolle leicht erniedrigt, allerdings konnten keine signifikanten Änderungen festgestellt werden. Während der Reizung wurde die Anzahl der Spikes pro Burst auch in Cimetidin von 3,57 ± 1,9 Spikes pro Burst vor der Reizung auf 1,31 ± 1,1 Spikes pro Burst während dem Reiz verringert (N=9; p<0,05; Abbildung 94). Nach extrazellulärer Stimulation des *ivn*s stieg die Anzahl der Spikes pro Burst im Vergleich zu

während der Cimetidin Applikation auf 3,54 ± 1,9 Spikes pro Burst an (N=9; p<0,001; Abbildung 94).

Nach Auswaschen von Cimetidin fand sich das gleiche Ergebnis: Die Anzahl der Spikes pro Burst sank signifikant von 4,37 ± 1,6 Spikes pro Burst vor dem Reiz auf 1,51 ± 1,1 Spikes pro Burst während dem Reiz (N=9, p<0,001; Abbildung 94), nach der Stimulation stieg die Aktivität im Vergleich zu während der Stimulation auf 4,34 ± 1,7 Spike pro Burst an (N=9; p<0,001; Abbildung 94). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass die IV Neurone die LP Aktivität verringern, hierzu aber nicht Histamin verwenden

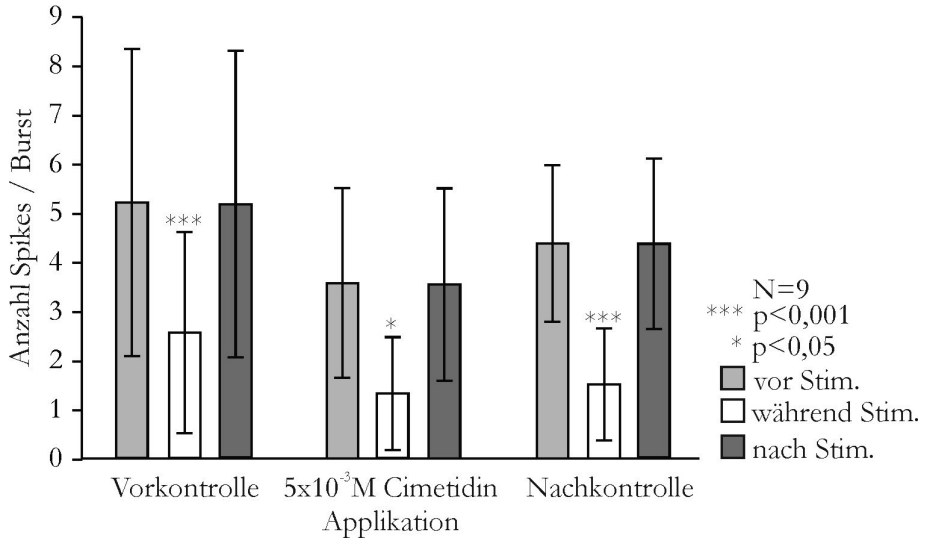


Abbildung 94: Die IV Neurone hemmen LP nicht über den Transmitter Histamin. Aktivität des lateralen pylorischen Neurons (LP) vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach *ivn* Reizung (dunkelgrauer Balken) in Ringerlösung (Vor- und Nachkontrolle) und in 5x10^{-3}M Cimetidin. Die Aktivität von LP nahm in allen Situationen während *ivn* Reizung signifikant ab (N=9).

Während einer *ivn* Reizung konnten unterschiedliche Effekte auf die PYs beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.4). Für die Applikation des Histamin Blockers Cimetidin wurden ausschließlich Ableitungen von PYs verwendet, deren Aktivität während der *ivn* Stimulation abnahm, nämlich durchschnittlich von 3,39 ± 1,4 Spikes pro Burst vor dem Reiz auf 1,88 ± 1,3 Spikes pro Burst während dem Reiz (N=5; p<0,027; Abbildung 95). Die Aktivität stieg nach Ende der Stimulation im Vergleich zu während dem Reiz auf 3,39 ± 1,4 Spikes pro Burst an (N=5; p<0,027; Abbildung 95). Während der Cimetidin Applikation auf das STG hatte eine Reizung des *ivn*s keinen Einfluss auf die Aktivität von PY (vor Reiz: 4,24 ± 2,7 Spikes pro Burst; während Reiz: 3,73 ± 2,4 Spikes pro Burst; nach Reiz: 4,33 ± 2,8). Nach dem Auswaschen verringerte sich die Aktivität von PY während der *ivn* Stimulation wie auch schon in der Vor-

kontrolle. Die Aktivität nahm dabei von 2,91 ± 1,0 Spikes pro Burst vor dem Reiz auf 0,60 ± 0,57 Spikes pro Burst während dem Reiz ab (N=5; p<0,006; Abbildung 95) und stieg danach auf 2,89 ± 1,0 Spikes pro Burst (N=5; p<0,006; Abbildung 95) an. Ähnlich wie die PD Neurone werden daher die PYs, deren Aktivität durch die IV Neurone in Ringerlösung verringert wurde, von Histamin inhibiert.

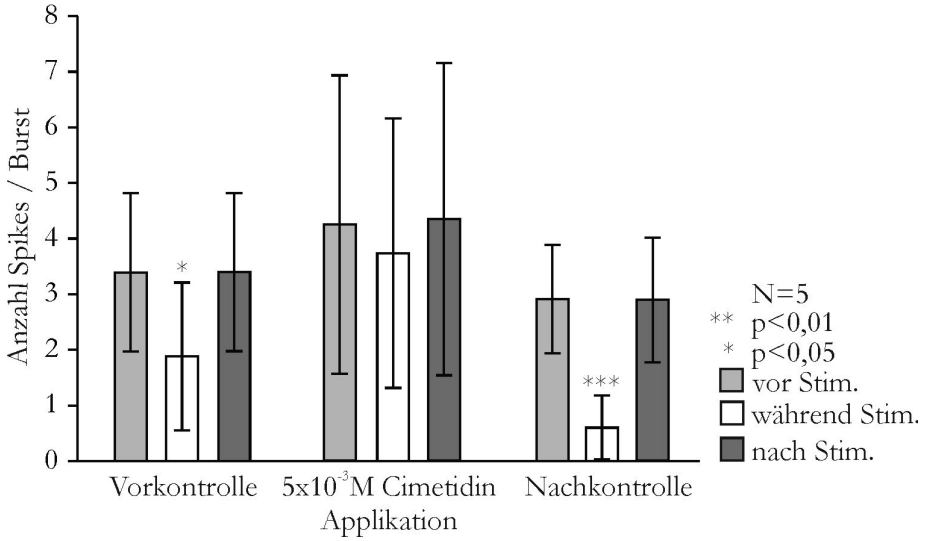


Abbildung 95: Die IV Neurone hemmen PY über den Transmitter Histamin. Aktivität der pylorischen Konstriktorneurone (PYs) vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach *ivn* Reizung (dunkelgrauer Balken) in Ringerlösung (Vor- und Nachkontrolle) und während $5x10^{-3}$M Cimetidin Applikation. Die Aktivität von PY verringerte sich in der Vorkontrolle während *ivn* Stimulation signifikant (N=5; p<0,027). Während einer Cimetidin Applikation wurde PY nicht durch die *ivn* Reizung beeinflusst. Nach Auswaschen mit Ringerlösung nahm die Aktivität von PY während *ivn* Reizung signifikant ab (N=9; p<0,001).

In Abschnitt 4.4 konnte ich zeigen, dass die Aktivität von VD und IC während einer *ivn* Stimulation signifikant abnimmt. Daher wurde auch für VD und IC die Beteiligung von Histamin an dieser Aktivitätsverringerung untersucht. Wie schon in Abschnitt 2.3.2 erwähnt, gibt es zwischen dem lateralen gastrischen Neuron (LG) und den pylorischen Neuronen eine starke Interaktion (Bartos and Nusbaum, 1997), wobei vor allem die Aktivität von VD und IC während eines gastrischen Rhythmus stark abnimmt. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung des Histamin Einflusses auf VD und IC diese gastropylorische Interaktion durch Injektion hyperpolarisierenden Stroms in LG unterbunden. Während der *ivn* Reizung depolarisierte das Membranpotential von LG zwar leicht, es wurden aber keine Aktionspotentiale gebildet. In Abbildung 96 sind die intrazellulären Ableitungen von VD und LG während *ivn* Stimulation in Ringerlösung und während Applikation von Cimetidin dargestellt. LG wurde

durch Strominjektion in die Zelle hyperpolarisiert. Die Aktivität von VD nahm dabei während dem *ivn* Reiz sowohl in Ringerlösung als auch in Cimetidin deutlich ab.

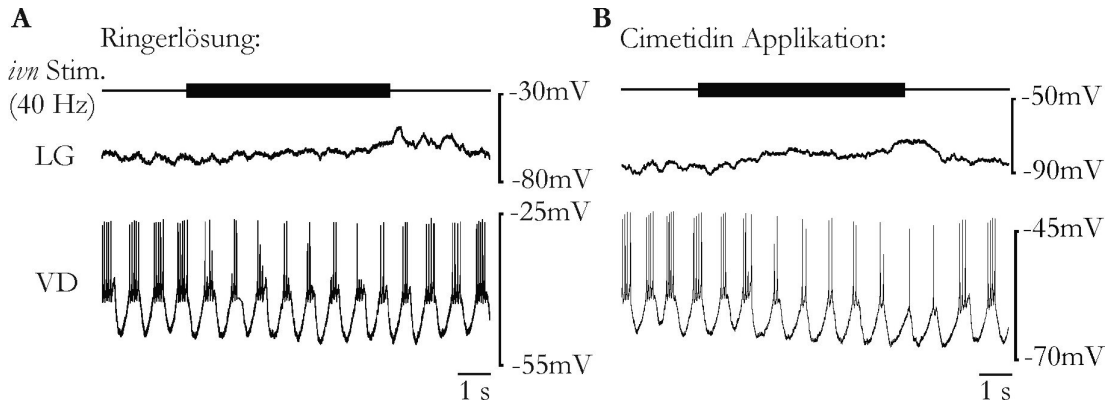


Abbildung 96: Intrazelluläre Ableitungen von VD und LG. LG wurde durch Strominjektion hyperpolarisiert. **A:** Während *ivn* Stimulation in Ringerlösung nahm die Aktivität von VD ab. **B:** Auch bei Applikation von Cimetidin verringerte sich die Aktivität von VD während dem Reiz.

Zur Quantifizierung wurde die Anzahl der Spikes pro Burst in Ringerlösung und während Cimetidin Applikation gezählt. Trotz des fehlenden LG Einflusses nahm die VD Aktivität in Ringerlösung durch den *ivn* Reiz signifikant von 3,65 ± 1,4 Spikes pro Burst vor dem Reiz auf 1,23 ± 0,9 Spikes pro Burst während dem Reiz ab (N=7; p<0,001; Abbildung 97) und stieg danach im Vergleich zu während dem Reiz auf 3,64 ± 1,4 Spikes pro Burst an (N=7; p<0,001; Abbildung 97). In Cimetidin wurde VD durch die extrazelluläre *ivn* Stimulation weiterhin beeinflusst. Die Aktivität sank von 3,03 ± 0,6 Spikes pro Burst vor dem Reiz auf 2,49 ± 0,6 Spikes pro Burst während dem Reiz (N=7; p<0,01; Abbildung 97) und stieg nach dem Reiz im Vergleich zur Reizung auf 3,06 ± 0,9 Spikes pro Burst an (N=7; p<0,01; Abbildung 97). Allerdings nahm die VD Aktivität in Cimetidin nicht so stark ab wie in der Vorkontrolle. Dies zeigt sich daran, dass die VD Aktivität im Vergleich zur Vorkontrolle signifikant höher war (N=7; p<0,049; Abbildung 97). Der Einfluss der IV Neurone auf VD war also während der Blockierung der Histamin-Rezeptoren nicht mehr so stark, allerdings noch erkennbar. In der Nachkontrolle wurde die VD Aktivität wieder stärker verringert. Die Anzahl der Spikes pro Burst sank von 3,79 ± 1,2 Spikes pro Burst vor der Reizung auf 1,53 ± 1,1 Spikes pro Burst während dem *ivn* Reiz (N=7; p<0,001; Abbildung 97) und stieg anschließend nach dem Reiz auf 3,91 ± 1,3 Spikes pro Burst an (N=7; p<0,001; Abbildung 97). Die Tatsache, dass die VD Aktivität in Cimetidin nicht so stark beeinflusst wurde, deutet an, dass Histamin eine Rolle bei der Wirkung der IV Neurone auf VD besitzt. Da der inhibitorische Effekt auf VD aber noch

detektierbar war, könnten die IV Neurone noch weitere Mechanismen verwenden, um VD zu hemmen.

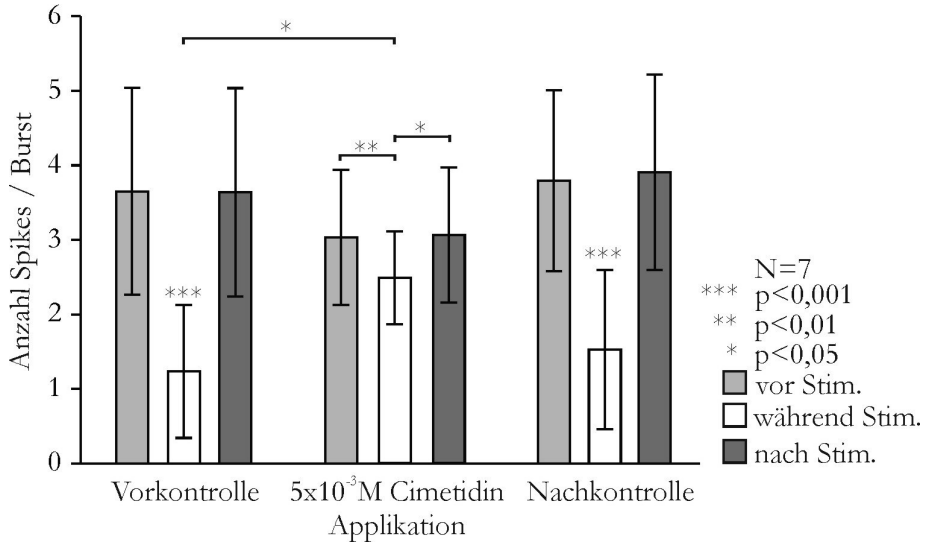


Abbildung 97: Die IV Neurone hemmen VD nicht über den Transmitter Histamin. Aktivität des ventralen Dilatorneurons (VD) vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach *ivn* Reizung (dunkelgrauer Balken) in Ringerlösung (Vor- und Nachkontrolle) und während $5x10^{-3}$M Cimetidin Applikation. Das gastrische Neuron LG wurde in diesen Versuchen hyperpolarisiert, um die gastropylorische Interaktion zu unterbinden. Die Aktivität von VD verringerte sich in Ringer während *ivn* Reizung signifikant (N=7; p<0,001). In Cimetidin nahm die Aktivität während einer *ivn* Stimulation ebenfalls signifikant ab. Die VD Aktivität war während dem Reiz in Cimetidin signifikant erhöht im Vergleich zur Vorkontrolle. Nach Auswaschen mit Ringerlösung nahm die Anzahl der Spikes pro Burst während *ivn* Stimulation wieder stärker ab (N=7; p<0,001).

Die Aktivität des inferioren kardialen Neurons (IC) wurde, wie auch schon in Abschnitt 4.4 beschrieben, durch eine *ivn* Reizung verringert. Wenn die gastropylorische Interaktion durch Hyperpolarisation von LG unterbunden wurde, nahm die Anzahl der Spikes pro Burst in Ringerlösung von 4,88 ± 2,2 Spikes pro Burst vor dem Reiz auf 1,74 ± 1,0 Spikes pro Burst während der *ivn* Reizung ab (N=5; p<0,001; Abbildung 98). Nach dem Ende des Reizes nahm sie wieder auf 5,10 ± 2,3 Spikes pro Burst zu (N=5; p<0,002; Abbildung 98). Die IC Aktivität war vor und nach der *ivn* Reizung in $5x10^{-3}$M Cimetidin im Vergleich zur Vor- und Nachkontrolle in Ringerlösung erniedrigt, im Vergleich zur Nachtkontrolle in Ringerlösung sogar signifikant verringert. Die Aktivität betrug in Cimetidin vor dem Reiz 3,83 ± 2,3 Spikes pro Burst, in Ringerlösung dagegen 5,70 ± 1,52 Spikes pro Burst (N=5; p<0,036; Abbildung 98). Insgesamt wurde die Aktivität von IC in Cimetidin während einer *ivn* Stimulation allerdings nicht signifikant verändert. In Abbildung 98 ist aber eine Tendenz zur Aktivitätsverringerung während der Reizung in Cimetidin zu erkennen. In der Nachkontrolle

nahm die IC Aktivität während *ivn* Stimulation signifikant von 5,70 ± 1,52 Spikes pro Burst vor dem Reiz auf 1,96 ± 0,7 Spikes pro Burst während der *ivn* Reizung ab (N=5; p<0,001; Abbildung 98) und erhöhte sich nach dem Reiz auf 5,74 ± 1,5 Spikes pro Burst im Vergleich zu während dem Reiz (N=5; p<0,001; Abbildung 98). Die Inhibition von IC während der *ivn* Reizung scheint also durch Histamin vermittelt zu werden. Da aber eine tendenzielle Abnahme der Spikeaktivität von IC in Cimetidin zu erkennen ist, könnten die IV Neurone IC noch über weitere Mechanismen hemmen.

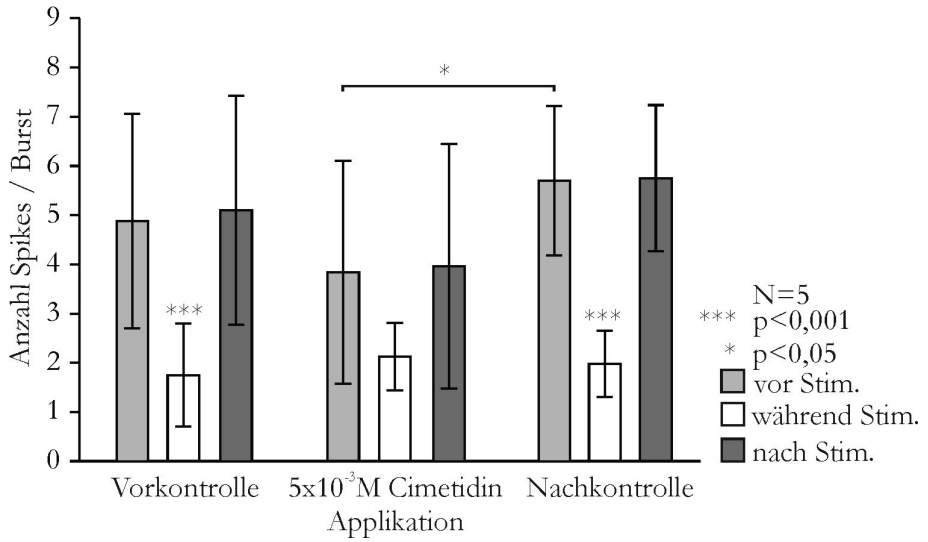


Abbildung 98: Die IV Neurone hemmen IC über den Transmitter Histamin. Aktivität des inferioren kardialen Neurons (IC) vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach *ivn* Reizung (dunkelgrauer Balken) in Ringerlösung (Vor- und Nachkontrolle) und während $5x10^{-3}$M Cimetidin Applikation. Das gastrische Neuron LG wurde dabei hyperpolarisiert, um die gastropylorische Interaktion zu unterbinden. Die Aktivität von IC nahm in Ringerlösung während *ivn* Stimulation signifikant ab im Vergleich zu ohne Reizung (N=5; p<0,001). In Cimetidin war dies nicht zu erkennen. In der Nachkontrolle nahm die Anzahl der Spikes pro Burst von IC während *ivn* Stimulation im Vergleich zu vor dem Reiz wieder signifikant ab (N=5; p<0,001). Die Anzahl der Spikes pro Burst von IC vor der Reizung war in Cimetidin im Vergleich zur Nachkontrolle signifikant verschieden (N=5; p<0,036).

Meine Ergebnisse zeigen, dass die IV Neurone Histamin benutzen, um den pylorischen Rhythmus zu beeinflussen, nicht aber den GMR. Histamin hatte auch im anterioren Teil des STNS, in dem sich die CoGs befinden, weder Einfluss auf die Aktivität der Projektionsneurone noch auf die beiden Mustergeneratoren im STG. Die IV Neurone verwenden Histamin, um einige pylorische Neurone zu hemmen. Dazu zählen die PD Neurone, die PY Neurone sowie IC. LP und VD wurden nicht durch Histamin beeinflusst.

4.9.2. FLRFamid Applikation auf die Kommissuralganglien löst einen gastrischen Mühlenrhythmus aus

In Weimann et al. (1993) wurde der Effekt des Peptids FLRFamid auf die beiden Mustergeneratoren im STG beschrieben. Sie untersuchten dafür sowohl isolierte STGs als auch intakte STNS. Um das STG zu isolieren, wurden die Eingänge der Projektionsneurone in den CoGs blockiert. In diesem Zustand sind sowohl der gastrische als auch der pylorische Rhythmus nicht spontanaktiv, da der modulatorische Einfluss der Projektionsneurone fehlt. Es zeigte sich, dass durch FLRFamid Applikation auf das STG ein pylorischer Rhythmus ausgelöst werden kann, aber kein gastrischer Mühlenrhythmus. Eine FLRFamid Applikation auf ein intaktes STNS ohne spontanaktiven gastrischen Mühlenrhythmus löst dagegen einen GMR aus.

In den folgenden Versuchen wollte ich daher untersuchen, ob das Peptid FLRFamid auch in *C. pagurus* einen Einfluss auf die Projektionsneurone in den Kommissuralganglien hat und ob dies wiederum die gastrische Mühle aktivieren kann. Dazu wurde mit Hilfe einer in zwei Bereiche geteilten Petrischale (siehe Abbildung 24) 10^{-6} M FLRFamid (nach Weimann et al., 1993) ausschließlich auf den anterioren Bereich des STNS mit den CoGs appliziert. Um eine direkte Wirkung von FLRFamid auf STG zu verhindern, wurde der posteriore Teil des STNS mit STG und den motorischen Nerven weiterhin mit Ringerlösung perfundiert. In Abbildung 99 sind die Originalableitungen des *lgn*s, *dgn*s und des *ion*s vor, während und nach der FLRFamid Applikation dargestellt. Vor der Applikation war kein GMR spontanaktiv (siehe Abbildung 99A), LG, GM und DG waren nicht aktiv. MCN1, dessen Aktivität extrazellulär auf dem *ion* abgeleitet wurde, war zwar aktiv, seine Aktivität reichte aber nicht aus, um einen gastrischen Mühlenrhythmus auszulösen. Dies änderte sich während der FLRFamid Applikation. Ein GMR wurde ausgelöst, charakterisiert durch die alternierende Aktivität der gastrischen Neurone LG auf dem *lgn* und DG auf dem *dgn* (siehe Abbildung 99B). GM burstete etwa zeitgleich mit LG. Des Weiteren stieg die Aktivität von MCN1 deutlich an (siehe Abbildung 99B). Der Effekt von FLRFamid war reversibel: Nachdem 45 bis 60 min lang mit normaler Ringerlösung perfundiert wurde, um das Peptid aus der Schale zu waschen, nahm die MCN1 Aktivität wieder ab und der GMR wurde beendet (siehe Abbildung 99C).

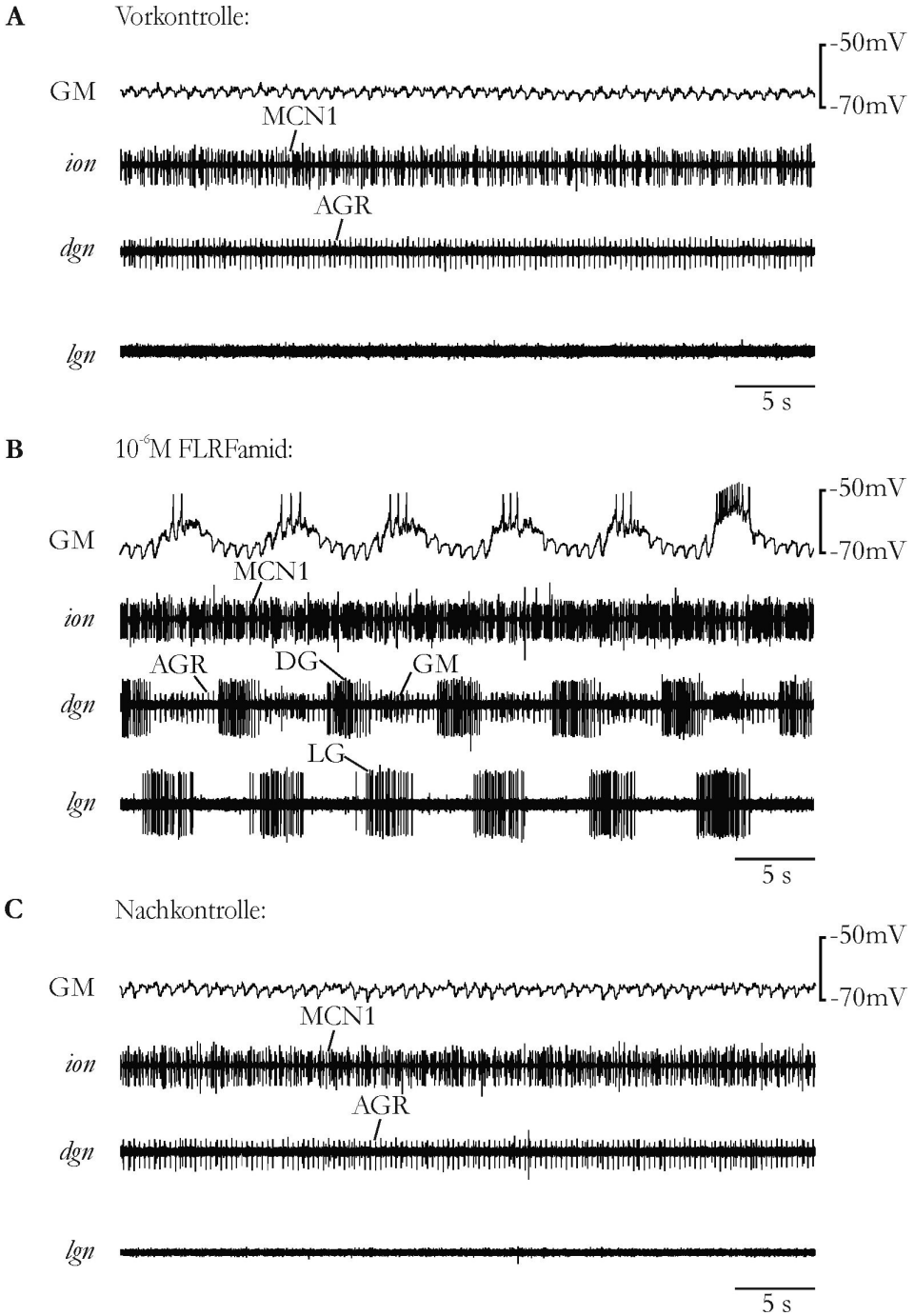


Abbildung 99: FLRFamid erhöht die Aktivität von MCN1 und löst einen GMR aus. Intrazelluläre Ableitung von GM (obere Spur). Extrazelluläre Ableitungen des *ion*s (zweite Spur von oben) mit den Aktivitäten von MCN1, des *dgn*s (zweite Spur von unten) mit den Aktivitäten von DG, GM und AGR und des *lgn*s (untere Spur) mit der Aktivität von LG. **A:** Vorkontrolle. In Ringerlösung war kein GMR aktiv. **B:** Während der Applikation von 10^{-6}M FLRFamid ausschließlich auf die CoGs erhöhte sich die MCN1 Aktivität und ein GMR wurde aktiviert. **C:** Nachkontrolle. Nach einstündigem Auswaschen des Neuropeptids FLRFamid war kein GMR mehr aktiv.

Dabei wurde nicht nur der Einfluss von FLRFamid auf die Aktivität von MCN1 untersucht, sondern auch auf die Aktivität der Projektionsneurone CPN2 und MCN5. Um die Aktivität von CPN2 bestimmen zu können, wurde eines der vier GM Neurone, welche monosynaptisch von CPN2 erregt werden, intrazellulär abgeleitet (siehe Abschnitt 3.8). Die Aktivität beider CPN2 Kopien konnte daher gleichzeitig anhand der PSPs in GM bestimmt werden. In Abbildung 100 ist eine intrazelluläre Ableitung von GM mit den EPSPs von CPN2 sowie eine extrazelluläre Ableitung des *ion*s mit der Aktivität von MCN1 in Ringerlösung und während FLRFamid Applikation dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität beider Projektionsneurone (MCN1 anhand der Aktionspotentiale auf dem *ion*, CPN2 anhand der Anzahl der PSPs in GM) während der FRLFamid Applikation zunahm.

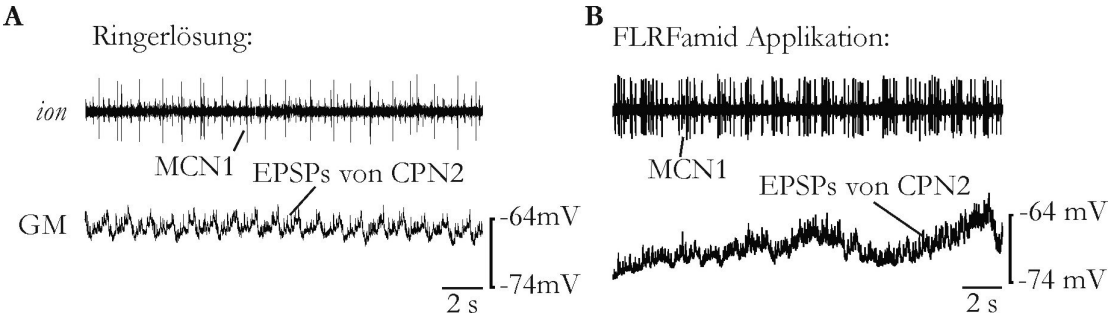


Abbildung 100: FLRFamid erregt CoG Projektionsneurone. Extrazelluläre Ableitung des *ion*s (obere Spur) mit der Aktivität von MCN1. Intrazelluläre Ableitung eines gastrischen Motoneurons (GM) mit den PSPs von CPN2. **A:** In Ringerlösung war MCN1 nur schwach aktiv, in GM sind einige CPN2 PSPs zu erkennen. **B:** In FLRFamid war die Aktivität von MCN1 im Vergleich zu A erhöht und GM erhielt mehr PSPs von CPN2.

Die Quantifizierung der Aktivitäten von CPN2, MCN1 und MCN5 während FLRFamid Applikation ist in Abbildung 101 dargestellt. Aufgrund der Bilateralsymmetrie des STNS gibt es jeweils eine Kopie von MCN1 und MCN5 in einem CoG. Beide Projektionsneurone projizieren über den rechten und linken inferioren Ventrikularnerv (*ion*) und über den stomatogastrischen Nerv (*stn*) zum STG. Daher wurde die Aktivität von MCN1 und MCN5 extrazellulär jeweils auf dem rechten und linken *ion* abgeleitet.

In Abbildung 101 wurde die Anzahl der Spikes pro BIN (BIN Weite=1 s) der Projektionsneurone vor, während und nach FLRFamid Applikation (10^{-6}M; nach Weimann et al., 1993) aufgetragen. Die Aktivität wurde als Anzahl der Spikes pro 1 s BIN gemessen und über einen Zeitraum von 50 s jeweils vor, während und nach Applikation gemittelt. Die Aktivität von CPN2 stieg, wie schon in Abbildung 100 zu erkennen war, in FLRFamid signifikant an, und zwar von 7,77 ± 1,7 Spikes pro BIN in Ringerlösung auf 12,78 ± 2,6 Spikes

pro BIN in FLRFamid (N=6; p<0,003). Nach Waschen mit Ringerlösung für 45 bis 60 min nahm die Aktivität wieder signifikant ab auf 7,79 ± 1,6 Spikes pro BIN (N=6; p<0,003; Abbildung 101), und erreichte damit das Niveau der Vorkontrolle. Ähnlich verhielt es sich für MCN1: Wie schon in Abbildung 99 und Abbildung 100 zu erkennen war, stieg die Aktivität von MCN1 während der FLRFamid Applikation an. Die Quantifizierung zeigte für beide MCN1 Kopien signifikante Aktivitätserhöhungen. Die Anzahl der MCN1 Spikes pro BIN im rechten CoG stieg von 5,89 ± 2,1 Spikes pro BIN in der Vorkontrolle auf 15,23 ± 8,7 Spikes pro BIN in FLRFamid (N=7; p<0,012; Abbildung 101). Der Effekt von FLRFamid auf MCN1 war reversibel. In der Nachkontrolle fiel die Aktivität auf 5,43 ± 2,9 Spikes pro BIN ab, war somit signifikant verschieden zur Applikation (N=7; p<0,016; Abbildung 101) und entsprach der Vorkontrolle. Auch die Aktivität der MCN1 Kopie im linken CoG stieg während einer FLRFamid Applikation signifikant an (von 6,71 ± 2,6 Spikes pro BIN in Ringer auf 19 ± 2,2 Spikes pro BIN während der Applikation; N=7; p<0,003; Abbildung 101). In der Nachkontrolle nahm die Aktivität im Vergleich zur Applikation signifikant ab (5 ± 1,5 Spikes pro BIN; N=7; p<0,01; Abbildung 101).

Im Gegensatz zu MCN1 und CPN2 wurde MCN5 durch die FLRFamid Applikation nicht beeinflusst. Die Aktivität beider MCN5 Kopien änderte sich nicht in Abhängigkeit von der FLRFamid Applikation (N=7; Abbildung 101). Diese Ergebnisse sind stimmig mit der Aussage der Experimente in Abschnitt 4.7.2, die zeigen, dass die IV Neurone MCN5 zwar aktivieren, diese Erregung aber über eine elektrische Synapse vermitteln und nicht durch die Wirkung von Neuromodulatoren. MCN1 und CPN2 werden dagegen indirekt über ein oder mehrere Interneurone von den IV Neuronen erregt, welche für diese Erregung den Neuromodulator FLRFamid benutzen könnten, um dadurch einen GMR auszulösen.

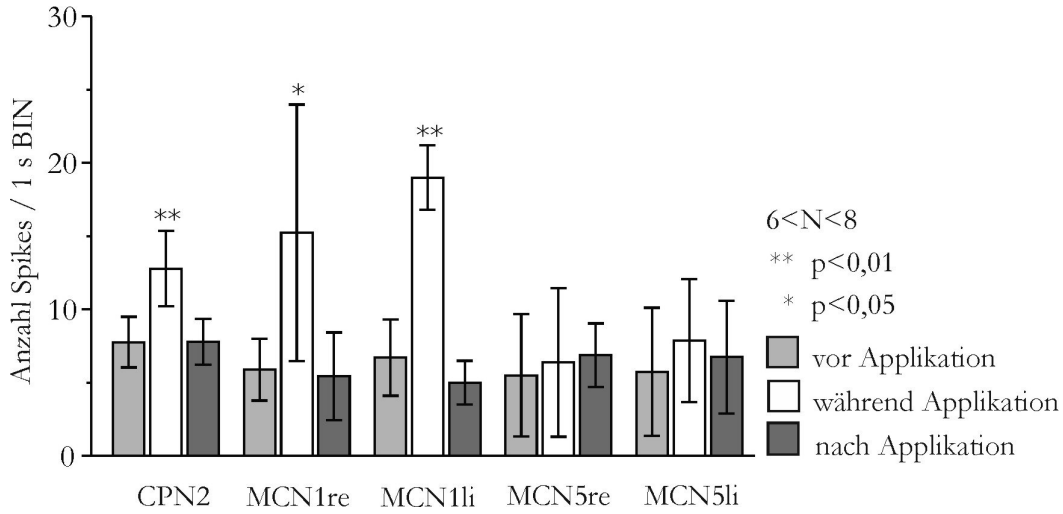


Abbildung 101: Aktivität der Projektionsneurone CPN2, MCN1 und MCN5 vor (hellgrauer Balken), während (weißer Balken) und nach 10^{-6}M FLRFamid Applikation (dunkelgrauer Balken) in Anzahl Spikes pro 1 s BIN. Die Aktivität von MCN1 und MCN5 wurde jeweils auf dem rechten (re) und linken (li) *ion* extrazellulär abgeleitet und unabhängig voneinander ausgewertet. Die Aktivität von CPN2 und MCN1 erhöhte sich während der Applikation, MCN5 wurde nicht beeinflusst.

Zusammenfassung:

Der Einfluss der möglichen Kotransmitter der IV Neurone, Histamin und das Peptid TNRNFLRFamid (Christie et al., 2004), auf die Mustergeneratoren im STG wurde durch Badapplikation des Peptids und des Histamin Antagonisten Cimetidin genauer untersucht.

Durch Applikation von $5x10^{-3}$M Cimetidin wurden dort Histamin-Rezeptoren blockiert. Dadurch konnte ich zeigen, dass die pylorischen Neurone PD und PY während einem *ivn* Reiz von Histamin beeinflusst werden. Die Aktivität von LP und VD wurde während der *ivn* Reizung weiterhin gehemmt, Histamin war dabei aber nicht an der Hemmung beteiligt.

Eine Applikation von 10^{-6}M FLRFamid auf die Kommissuralganglien erhöhte die Aktivität der Projektionsneurone MCN1 und CPN2 und löste einen gastrischen Mühlerhythmus aus. MCN5 hingegen wurde nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse sind stimmig mit der Hypothese, dass FLRFamid von den IV Neuronen ausgeschüttet wird, um somit die Aktivität der Projektionsneurone zu erhöhen und dadurch einen GMR auszulösen (siehe Diskussion).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die inferioren Ventrikularneurone (IV Neurone) im Taschenkrebs *Cancer pagurus* untersucht. Diese Neurone projizieren über den inferioren Ventrikularnerv (*ivn*) zum stomatogastrischen Nervensystem (STNS). Ich habe sowohl die Projektionen der im *ivn* enthaltenen Axone, die morphologischen Eigenschaften der IV Neurone, deren Aktivierung im intakten Tier sowie die Einflüsse der IV Neurone auf die Mustergeneratoren im STNS untersucht.

Durch retrograde Färbungen des inferioren Ventrikularnervs (*ivn*) konnte ich zeigen, dass im Mittel die Axone von acht Neuronen durch diesen Nerv projizieren. Nur zwei Axone endeten dabei in Somata im supraoesophagealen Ganglion (Gehirn). Dabei handelte es sich um die paarigen inferioren Ventrikularneurone (IV Neurone), die im Zellcluster 17 lokalisiert waren. Retrograde Färbungen unterschiedlicher Nerven sowie elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die Axone der IV Neurone über den inferioren Ventrikularnerv (*ivn*) zum STNS projizierten und dort sowohl über die inferioren Oesophagealnerven (*ion*s), als auch über die superioren Oesophagealnerven (*son*s) zu den paarigen Kommissuralganglien (CoGs) zogen. Des Weiteren projizierten die IV Neurone über den stomatogastrischen Nerven (*stn*) zum stomatogastrischen Ganglion (STG). Extrazelluläre Ableitungen zeigten, dass die Aktionspotentiale der IV Neurone auf allen erwarteten Nerven nachweisbar waren, mit Ausnahme des *ion*s. Dort konnten zu keiner Zeit Aktionspotentiale der IV Neurone festgestellt werden.

Die Aktivität der IV Neurone wurde während Futterinjektion in den Kaumagen sowie durch visuelle und taktile Stimulationen nicht beeinflusst. Durch eine chemosensorische Stimulation der Antennulae mit einer Mischung aus Ringerlösung und Krebs- oder Garnelenfleisch konnten hingegen Neurone aktiviert werden, deren Aktionspotentiale vom Gehirn zum STNS liefen. In drei Tieren konnten simultan zu der rhythmischen Aktivität dieser Neurone gastrische Mühlenrhythmen beobachtet werden. Ähnliches fand sich auch im isolierten Nervensystem, wenn das Gehirn mit dem STNS verbunden war. Es traten rhythmische Bursts auf dem *ivn* auf und in drei Experimenten wurde simultan ein gastrischer Rhythmus aktiviert.

Die Aktionspotentiale auf dem *ivn* konnten in dieser Situation eindeutig den IV Neuronen zugeordnet werden.

Der Einfluss der IV Neurone auf die Mustergeneratoren im STNS wurde mit Hilfe extrazellulärer *ivn* Stimulation untersucht. Dabei verringerte sich die Periode des pylorischen Rhythmus während einer extrazellulären Reizung des *ivn*s, der pylorische Rhythmus wurde also schneller. Die Aktivitäten des pylorischen Dilatorneurons (PD), des lateralen pylorischen Neurons (LP), des ventralen Dilatormotoneurons (VD) sowie die des inferioren kardialen Neurons (IC) nahmen ab. Für die pylorischen Konstriktorneurone (PYs) konnten verschiedene Effekte beobachtet werden: Die IV Neurone hatten einen hemmenden oder erregenden Effekt auf verschiedene PYs, in einigen Fällen wurden die PY Neurone nicht durch eine Stimulation der IV Neurone beeinflusst.

Des Weiteren hatten die IV Neurone einen Einfluss auf die Neurone des gastrischen Mühlenrhythmus. War kein GMR spontanaktiv, so konnte eine rhythmische 40 Hz *ivn* Stimulation einen GMR auslösen, dessen Periode der Reizperiode entsprach. Dabei trat mit jedem *ivn* Stimulus ein Burst des lateralen gastrischen Neurons (LG) auf. War bereits ein gastrischer Mühlenrhythmus spontanaktiv, so synchronisierte eine *ivn* Stimulation die gastrische Periode mit der Reizperiode. Die Effekte der IV Neurone auf den gastrischen Rhythmus wurden dabei indirekt über Projektionsneurone in den Kommissuralganglien vermittelt.

Die IV Neurone hatten zusätzlich einen Einfluss auf den oesophagealen Rhythmus, der die Bewegungen des Oesophagus steuert. Das oesophageale Motoneuron (OMN) war während einer *ivn* Stimulation stärker und dauerhaft aktiv. Da der *ivn* Reiz immer auch LG aktiviert, resultierte die Stimulation in einem Synchronisieren der OMN und LG Aktivität, während gleichzeitig die Neurone des pylorischen Rhythmus inhibiert wurden. Es konnte allerdings nicht geklärt werden, ob die IV Neurone dabei den oesophagealen Mustergenerator beeinflussen oder ob sie nur das Motoneuron OMN aktivieren, also nur postsynaptisch auf den Mustergenerator wirken.

Da die CoGs benötigt wurden, um einen GMR durch *ivn* Reizung auszulösen, wurden die synaptischen Eingänge der IV Neurone auf die vier identifizierten Projektionsneurone in den CoGs untersucht. Es zeigte sich, dass 1. die IV Neurone das Projektionsneuron MCN1 polysynaptisch erregen, 2. MCN5 und die IV Neurone elektrisch gekoppelt sind, 3. MCN7 (wahrscheinlich polysynaptisch) von den IV Neuronen erregt wird und 4. CPN2 indirekt von den IV Neuronen erregt wird. Die Aktivitäten von CPN2 und MCN7 waren dabei nicht hin-

reichend, um einen gastrischen Rhythmus auszulösen. Das Vorhandensein von MCN1 war hingegen notwendig.

Das im nahe verwandten Krebs *Cancer borealis* als Transmitter der IV Neurone identifizierte Histamin beeinflusste die pylorischen Neurone im stomatogastrischen Ganglion, den gastrischen Mühlenrhythmus dagegen nicht. Im hier untersuchten *C. pagurus* wurden die Neurone PD, PY und IC von den IV Neuronen durch Histaminausschüttung gehemmt. Die Hemmung von LP und VD wurde dagegen nicht oder nicht ausschließlich von Histamin vermittelt, sondern könnte auch durch zwischengeschaltete Projektionsneurone, wie z.B. MCN5 ausgelöst werden (Abbildung 11).

Das in den IV Neuronen identifizierte Peptid TNRNFLRFamid (Christie et al., 2004) aktivierte bei Applikation auf die Kommissuralganglien die Projektionsneurone MCN1 und CPN2 und löste somit einen gastrischen Mühlenrhythmus aus.

In Abbildung 102 sind die Einflüsse der IV Neurone auf die Neurone im STNS zusammengefasst. Sie erregen die Projektionsneurone und das oesophageale Motoneuron (OMN) in den CoGs. Der Einfluss der IV Neurone auf das pylorische Netzwerk im STG wird zum einen über den Transmitter Histamin vermittelt, zum anderen möglicherweise über die Aktivität der Projektionsneurone in den CoGs. Durch eine Stimulation der IV Neurone wird ein GMR ausgelöst. Dieser gastrische Rhythmus wurde wiederum durch die erhöhte Aktivität der Projektionsneurone ausgelöst.

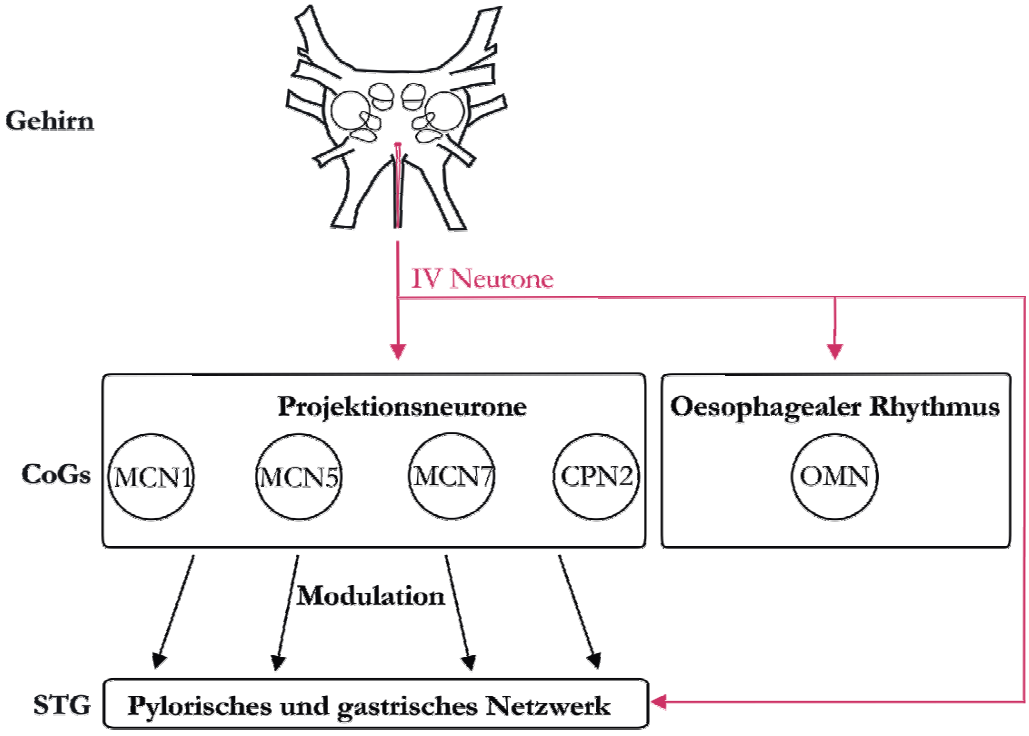


Abbildung 102: Zusammenfassung der IV Neuron Effekte. Einflüsse der IV Neurone auf die Projektionsneurone MCN1, MCN5, MCN7 und CPN2 in den Kommissuralganglien (CoGs), sowie auf die motorischen Mustergeneratoren im stomatogastrischen Ganglion (STG; pylorisches und gastrisches Netzwerk) und das oesophageale Motoneuron (OMN) in den CoGs. Die Aktivität der Motoneurone im STG wird zusätzlich von den Projektionsneuronen in den CoGs moduliert.

5.2 Morphologische Eigenschaften der Axone im *ivn*

Der inferiore Ventrikularnerv (*ivn*) stellt neben den circumoesophagealen Kommissuren (*coc*s) die einzige direkte Verbindung zwischen dem supraoesophagealen Ganglion (Gehirn) und dem STNS dar. Im Taschenkrebs *C. pagurus* wurden die Projektionen der im *ivn* enthaltenen Axone und die Lage der zugehörigen Somata bisher nicht untersucht.

Meine retrograden Färbungen haben gezeigt, dass der *ivn* durchschnittlich acht Axone enthält. Die Somata zweier dieser Axone waren dabei in Zellcluster 17 des Gehirns lokalisiert (Abbildung 35 und Abbildung 36). Diese Neurone wurden in früheren Arbeiten in verschiedenen Krustazeenarten bereits identifiziert (Dando and Selverston, 1972; Sigvardt and Mulloney, 1982a; Claiborne and Selverston, 1984; Cazalets et al., 1987; Böhm et al., 2001; Christie et al., 2004). Sie werden in Arten der Unterordnung Brachyura, Palinura und

Astacoidea als inferiore Ventrikularneurone (IV Neurone) bezeichnet, im Hummer dagegen als „pyloric supressor“ (PS) Neurone.

In meiner Arbeit habe ich mittels retrograder Färbungen die axonalen Projektionen der IV Neurone in *C. pagurus* ermittelt. Sie projizieren über den *ivn* zum STNS und dort über den stomatogastrischen Nerv (*stn*) zum STG, sowie über *ion*s und *son*s zu den Kommissuralganglien. Dies entspricht den IV Projektionen im nah verwandten *C. borealis* (Christie et al., 2004), in der Languste *Panulirus interruptus* (Claiborne and Selverston, 1984) sowie den PS Projektionen in *Homarus gammarus* (Cazalets et al., 1990a). Die Anzahl der Axone, die im *ivn* identifiziert wurden, stimmt dabei mit den Untersuchungen von *P. argus* (Dando and Selverston, 1972) und *Orconectes limosus* (Böhm et al., 2001) überein. Die IV Neuron Projektionen in Richtung CoGs wurden in diesen beiden Arten nicht untersucht. In den Krustazeenarten, in denen das Verzweigungsmuster dem des Taschenkrebses entspricht, wurde die Anzahl der Axone, die durch den *ivn* projizieren, bisher nicht genauer untersucht. Es ist allerdings bekannt, dass in allen bisher untersuchten dekapoden Krustazeenarten die Zellkörper der IV bzw. PS Neurone entweder im Gehirn oder im *ivn* lokalisiert sind und dass deren Axone durch den *ivn* verlaufen.

Die Somata der IV Neurone waren in *C. pagurus* im Zellcluster 17 des Gehirns zu finden (Nomenklatur nach Sandeman et al., 1992). Wahrscheinlich sind die IV Neurone in *C. borealis* (Christie et al., 2004) ebenfalls in diesem Bereich des Gehirns lokalisiert. Die Lage der IV Somata wurde in dieser Art allerdings nur grob angegeben, nämlich im dorsalen posterioren Bereich des Gehirns nahe der Eintrittsstelle des *ivn*s ins Gehirn. In den Langusten (Palinura) und Großkrebsen (Astacidea) zugehörigen Arten *P. interruptus* (Claiborne and Selverston, 1984), *P. argus* (Dando and Selverston, 1972), *H. gammarus* (Cazalets et al., 1987) sowie *O. limosus* (Böhm et al., 2001) waren die Somata der IV bzw. PS Neurone dagegen im *ivn* lokalisiert, nahe der Eintrittsstelle des *ivn*s ins Gehirn.

Meine Backfills zeigen, dass die weiteren Axone, die im *ivn* verlaufen, vom STNS zum Gehirn projizieren und im Gehirn hauptsächlich auf der Ventralseite des Gehirns zu finden waren (siehe Abbildung 36). Auf jeder Seite des Gehirns projizierten zwei Axone in die circumoesophagealen Kommissuren (*coc*s), die neben dem *ivn* eine weitere Verbindung zwischen Gehirn und STNS darstellen und Gehirn, STNS und Thorakalganglion verbinden. Da bei den Färbungen in *C. pagurus* das Gehirn ausschließlich über den *ivn* verbunden war und die *coc*s durchtrennt waren, konnten die Projektionen der *ivn* Neurone in die *coc*s nicht weiter verfolgt werden. Die zwei verbleibenden aufsteigenden *ivn* Axone zogen im Gehirn weiter in

Richtung der anterioren medialen protocerebralen Neuropile (AMPNs). Ähnliche Projektionen wurden auch im Flusskrebs *O. limosus* beschrieben. Im Gegensatz zu *O. limosus* (Böhm et al., 2001) konnten in *C. pagurus* allerdings keine weiteren Verzweigungen in den posterioren medialen protocerebralen Neuropilen (PMPNs) des Protocerebrums, in den lateralen (LANs) und medialen Neuropilen (MANs) der ersten Antennen sowie in den Neuropilen der zweiten Antennen im Tritocerebrum beobachtet werden.

5.3 Die IV Neurone übertragen exterozeptive Information

Bisher war es unklar, ob die IV Neurone Informationen vom Gehirn an das stomatogastrische Nervensystem übermitteln und falls sie solche Informationen übermitteln, welcher Art diese sind. Die Aktivität der Neurone, die durch den *ivn* projizieren, wurde bisher nur in einer Studie im intakten Tier untersucht (Böhm et al., 2001). Dabei wurde im freibeweglichen Tier gezeigt, dass in *O. limosus* die Aktivität während einer Futteraufnahme zunahm und von der Menge der aufgenommenen Nahrung abhängig war. Die Aktivität auf dem *ivn* nahm bereits kurz vor der Futteraufnahme zu. Es wurde allerdings nicht gezeigt, ob es sich dabei um Aktionspotentiale handelte, die vom Gehirn zum STNS liefen, oder ob nach der Fütterung Einheiten aktiviert wurden, die vom STNS zum Gehirn liefen. Es blieb also unklar, ob die Aktivität der IV Neurone durch die Futteraufnahme erhöht wurde, oder ob es sich dabei um die Aktivität der vom STNS aufsteigenden Neurone handelte. Da den Tieren in diesen Versuchen das Futter in einem großen Becken präsentiert wurde, ist ebenso unklar, welche sensorischen Reize (taktile, chemosensorische, visuelle Reize usw.) die Aktivitätserhöhung auslösten.

In meinen Versuchen konnte ich die Aktionspotentiale der IV Neurone eindeutig identifizieren. Eine Futterinjektion direkt in den Magen aktivierte dort selektiv sensorische Organe. Die Aktivität der durch den *ivn* projizierenden Neurone wurde in meinen Versuchen jedoch durch die Futterinjektion nicht beeinflusst. Trotzdem zeigte sich bei Futterinjektion eine Abnahme der pylorischen Periode, der pylorische Rhythmus wurde also schneller. Die Phasenlage von LP wurde außerdem beeinflusst: sowohl der Phasenanfang als auch das Phasenende von LP war nach der Futterinjektion verzögert. Der beobachtete Effekt auf den pylorischen Rhythmus muss also ohne die Beteiligung der IV Neurone vermittelt werden. Im Kaumagen dekapoder Krebse befinden sich beispielsweise Mechanosensoren, die eine Ausdehnung des Magens z.B. durch Futteraufnahme messen können. Die ventralen kardialen

Neurone (VCNs) wurden von Beenhakker et al. (2004) als solche Mechanosensoren charakterisiert. Sie beeinflussen unter anderem den pylorischen Rhythmus.

Weder taktile Stimuli der Mundwerkzeuge und Antennen mit Pinzette oder Pinsel noch eine visuelle Stimulation durch Lichtreize beeinflusste die Aktivität der *ivn* Neurone. Durch chemosensorische Stimulation der Antennulae konnten dagegen Aktionspotentiale auf dem *ivn* ausgelöst werden, die in rhythmischen Bursts auftraten. Die Antennulae, auch als erste Antennen bezeichnet, sind für die olfaktorische und chemosensorische Wahrnehmung verantwortlich (Brock, 1930). Bei Applikation einer Mischung aus Krebs- oder Garnelenfleisch und Ringerlösung auf die Antennulae konnte nicht zwischen olfaktorischen und chemosensorischen Stimuli unterschieden werden. Im Folgenden wird diese Applikation daher ausschließlich als chemosensorische Reizung bezeichnet. Die durch diese Reizung ausgelösten Aktionspotentiale liefen vom Gehirn zum STNS. Kurz nach der Applikation trat in einigen Tieren zusätzlich ein gastrischer Mühlenrhythmus auf. Die *ivn* Aktionspotentiale, die vom Gehirn zum STNS liefen, konnten allerdings nicht eindeutig den IV Neuronen zugeordnet werden. Es könnte sich dabei ebenfalls um Aktionspotentiale anderer Neurone handeln, die über den *ivn* projizieren. Mehrere Ergebnisse sprechen aber dafür, dass es sich *in vivo* bei den durch chemosensorische Stimulation ausgelösten Aktionspotentialen um Spikes der IV Neurone handelt: 1. die Tatsache, dass es nur zwei Neurone mit Somata im Gehirn gibt, deren Axone über den *ivn* zum STNS projizieren, 2. die Laufrichtung der Aktionspotentiale, vom Gehirn zum STNS, 3. die vergleichbare Aktivität zu den IV Neuronen im isolierten STNS (siehe Abschnitt 4.3) und 4. dass in allen *in vitro* Versuchen ausschließlich die Aktionspotentiale zweier Neurone zum STNS liefen, nämlich die der IV Neurone, welche anhand extrazellulärer Ableitungen der *son*s und *stn*s eindeutig identifiziert werden konnten (siehe Abschnitt 4.3).

Da in drei Tieren kurz nach der Applikation von chemosensorischen Reizen ein GMR auftrat, stellt sich die Frage, ob die IV Neurone am Auslösen eines GMR beteiligt sind. Die Tatsache, dass die Bursts des gastrischen Protraktormotoneurons LG zeitlich an die Bursts der IV Neurone gekoppelt waren und dass die IV Bursts stets vor den LG Bursts auftraten, spricht für diese Hypothese. Außerdem zeigte sich eine Abhängigkeit des Auftretens eines GMR mit der IV Neuronen Feuerrate: Es traten nur LG Bursts auf, wenn die Spikefrequenz über 30 Hz betrug (siehe Abbildung 48). Auch die Experimente am isolierten Nervensystem (Abschnitt 4.3) sprechen für die Beteiligung der IV Neurone am Auslösen eines GMR. Bei diesen Experimenten waren die *coc*s durchtrennt, der *ivn* stellte also die einzige Verbindung zwischen Gehirn und STNS dar. Obwohl zu keiner Zeit eine rhythmische Aktivität aufsteigender Aktionspo-

tentiale auf dem *ivn* (und auch keine zeitlich gekoppelte rhythmische Aktivität im STG) beobachtet werden konnte, d.h. es konnte keine gastrische Information vom STNS an das Gehirn übermittelt werden, waren die IV Neurone in mehr als der Hälfte der Versuche rhythmisch aktiv. In drei Präparaten wurde zusätzlich das gastrische Neuron LG aktiviert und ein GMR wurde ausgelöst, wenn die Spikefrequenz der IV Neurone über 30 Hz betrug. Es konnte also im isolierten Nervensystem dieselbe Frequenzabhängigkeit und dieselbe Abfolge von Aktivität (LG Bursts folgten auf Bursts der IV Neurone) wie im intakten Tier beobachtet werden.

Dennoch kann ein indirektes Auslösen der gastrischen Rhythmen in *C. pagurus* nicht ausgeschlossen werden, da im intakten Tier das Gehirn und das STNS nicht nur über den *ivn* verbunden sind, sondern auch über die *coc*s. Es könnte also auch möglich sein, dass die IV Neurone über aufsteigende Bahnen des STNS mit dem GMR synchronisiert wurden. Dies scheint aber unwahrscheinlich, da in den meisten Experimenten die IV Neurone rhythmische Aktivität zeigten, ohne dass ein GMR aktiv war.

Ein Einfluss chemosensorischer Neurone auf zentrale Mustergeneratoren wurde auch in anderen Modellsystemen gezeigt. In der Meeresschnecke *Lymnea stagnalis* aktivieren chemosensorische Neurone, die durch Reizung der Lippen aktiviert werden, den zentralen Mustergenerator, der für das Fütterungsverhalten verantwortlich ist (Kemenes et al., 1986; Elphick et al., 1995; Nakamura et al., 1999). Dieser zentrale Mustergenerator wird durch modulatorische Interneurone im Zerebralganglion reguliert. Diese modulatorischen Interneurone werden wiederum über polysynaptische Verbindungen mit den Chemorezeptoren in der Lippe aktiviert und regulieren daraufhin den zentralen Mustergenerator (Nakamura et al., 1999).

Eine mögliche Ursache für die Frequenzabhängigkeit des GMR könnte der Besatz an Transmitter der IV Neurone sein. Die IV Neurone enthalten in *C. borealis* unter anderem auch das Peptid FLRFamid (Christie et al., 2004). Wenn auch in *C. pagurus* FLRFamid als Transmitter verwendet wird (die Tatsache, dass zumindest die postsynaptischen Neurone in den CoGs auf FLRFamid reagieren (Abbildung 100) ist ein Hinweis darauf), so könnte dies ein Grund für die Frequenzabhängigkeit des GMR sein. Da Peptide zur Ausschüttung häufig eine hochfrequente wiederholte Depolarisation der Präsynapse erfordern, tritt die postsynaptische Wirkung der Neuropeptide oft erst nach einer hochfrequenten Aktivität der präsynaptischen Zelle ein (Marder, 1998; siehe aber auch Stein at al. (2007) für gegenteilige Ergebnisse). Zusätzlich werden die meisten peptidergen Wirkungen metabotrop vermittelt (Cottrell, 1997), d.h. Peptide sind langsamer in ihrer Wirkung als klassische Neurotransmitter. Ein einzelnes prä-

synaptisches Aktionspotential reicht bei diesen oft aus, um Neurotransmitter in den synaptischen Spalt auszuschütten. Dies gilt allerdings zumeist nicht für Neuropeptide (Whim et al., 1997; Ohnuma et al., 2001; Nusbaum et al., 2001). Die Vesikel, die Neuropeptide enthalten, befinden sich nicht in der Nähe der Membran wie die Neurotransmittervesikel. Daher müssen sich die einströmenden Kalziumionen, die zur Exozytose der Vesikel benötigt werden, weiter in der Präsynapse ausbreiten, es wird mehr Kalzium benötigt, um die Peptide in den synaptischen Spalt zu entlassen. Eine solche erhöhte Konzentration an Kalziumionen kann z.B. durch einen Burst von Aktionspotentialen zustande kommen (für Zusammenfassung siehe Nusbaum, 2002).

In meinen Versuchen konnte ich nur eine geringe Anzahl an gastrischen Mühlenrhythmen beobachten. Fleischer (1981) zeigte an *Panulirus interruptus*, dass optische Information den gastrischen Rhythmus für bis zu 40 Stunden unterdrücken kann. Daher ist es möglich, dass sogar die Beleuchtung während der Präparation des Tieres und dem Anbringen der Elektroden ausreichend war, um das Auftreten von gastrischen Rhythmen zu verhindern. Dieser Effekt könnte über die gesamte Dauer der Experimente angehalten haben, möglicherweise wurde dies sogar über eine Reduktion der IV Neuron Aktivität vermittelt.

5.4 *In vitro* Identifikation der IV Neurone

Die extrazellulären Ableitungen im isolierten STNS zeigen, dass Aktionspotentiale, die im Gehirn erzeugt wurden, über den *ivn* zum STNS projizieren. Diese Aktionspotentiale traten entweder tonisch oder in rhythmischen Bursts auf und könnten von den IV Neuronen oder von einem der anderen sechs Neurone, deren Axon durch den *ivn* läuft, generiert werden. Würden die Aktionspotentiale von einem der sechs weiteren Neurone gebildet werden, so würden die Spikes antidrom, also in Richtung Soma laufen. Diese Art der Weiterleitung wurde im STNS schon beschrieben (Bucher et al., 2003; Goaillard et al., 2004; Le et al., 2006). So können z.B. in PD durch Applikation des Neurotransmitters Dopamin Aktionspotentiale im Axon ausgelöst werden, die zum einen antidrom in Richtung Soma und zum anderen orthodrom in Richtung Muskel laufen. Allerdings sprechen mehrere Tatsachen gegen diese Hypothese der antidromen Fortleitung. Im Hummer wurde durch intrazelluläre Ableitungen gezeigt, dass die rhythmischen Bursts auf dem *ivn* durch die PS Neurone generiert werden. Außerdem konnten in den Krustazeenarten, in denen die Somata der IV bzw. PS Neurone direkt im *ivn* lokalisiert sind, rhythmische Aktivität auch ohne Gehirn beobachtet werden

(Vedel and Moulins, 1977; Dickinson and Marder, 1989; Hooper et al., 1990; Meyrand et al., 1991). Im Gegensatz dazu konnte ich in meinen Versuchen, in denen das Gehirn entfernt war, zu keiner Zeit eine rhythmische Aktivität auf dem *ivn* beobachten. Ähnliches trifft auch auf *C. borealis* zu (Christie et al., 2004; Wolfgang Stein, persönliche Mitteilung). Das heißt also, sobald die Somata der IV bzw. PS Neurone mit ihren Axonen im *ivn* in Verbindung stehen, können Bursts gebildet werden, ohne die IV Somata aber nicht. Des Weiteren konnte ich anhand mehrerer extrazellulärer Ableitungen zeigen, dass die Aktionspotentiale, die vom Gehirn über den *ivn* zum STNS liefen, sowohl auf den *son*s als auch auf dem *stn* auftraten. Backfills belegen, dass jeweils nur zwei Axone über den *son* bzw. *stn* vom Gehirn zum STNS projizieren, nämlich die der IV Neurone (siehe Abbildung 32). Daher können die absteigenden Aktionspotentiale auf dem *ivn*, *son* und *stn* nur durch die IV Neurone generiert werden und nicht durch vom STNS zum Gehirn aufsteigende Neurone.

Interessanterweise konnte ich zu keiner Zeit Aktionspotentiale der IV Neurone auf den *ion*s beobachten (siehe Abbildung 50), obwohl meine Backfills zeigen, dass die Axone der IV Neurone auch in den *ion* projizieren. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen in *C. borealis*. Dort wird MCN1, welches sich in den Kommissuralganglien befindet, ausschließlich über die IV Neuron Axone des *son*s aktiviert (Christie et al., 2004). Auch im Hummer *H. gammarus* konnte mittels LY Färbungen gezeigt werden, dass die IV Neurone über den *ion* projizieren, allerdings konnten nie Aktionspotentiale auf dem *ion* beobachtet werden, die mit denen der PS Neurone korrelierten (Cazalets et al., 1990a). Durch Stimulation des *stn*s sowie der *son*s konnten in den PS Neuronen antidrome Aktionspotentiale ausgelöst werden, bei Stimulation des *ion*s hingegen nicht. Die Funktion der IV Neuron Axone ist also in keiner der bisher untersuchten Arten bekannt. Über die Funktion der *ion* Axone kann daher nur spekuliert werden. Es ist möglich, dass diese Axone solange inaktiviert sind, bis das entsprechende neuromodulatorische Milieu vorhanden ist. Goaillard et al. (2004) zeigte, dass die Region zwischen *son* und *stn*, in der sich die IV Neurone verzweigen, unter modulatorischem Einfluss steht. Neuromodulatoren können eine Vielzahl an Wirkungen ausüben. Zum Beispiel könnten sie eine funktionelle Kompartimentierung der IV Neurone bewirken, d.h. dass bestimmte Bereiche der IV Neurone in Abhängigkeit vom neuromodulatorischen Milieu funktionell aktiviert bzw. inaktiviert werden können. Ein Beispiel einer solchen Kompartimentierung wurde beim Fütterungsverhalten von *Aplysia californica* gezeigt. In dieser Meeresschnecke wurde beobachtet, dass das mechanosensorische Neuron B21 die Weiterleitung von Aktionspotentialen über das Membranpotential reguliert (Evans et al., 2003; Cropper et al., 2004). B21 ist ein bipolares Neuron, das sowohl

exterozeptive als auch propriozeptive Informationen verarbeitet. Es agiert als Exterozeptor, wenn ein Objekt die Radula, das Organ zur Nahrungsaufnahme bei Mollusken, berührt. Des Weiteren wird der Teil der Radula, der von B21 innerviert wird, auch von einem Motoneuron innerviert. Die Aktivität dieses Motoneurons kann wiederum B21 aktivieren. B21 wird also auch durch propriozeptive Stimuli aktiviert (Rosen et al., 2000). Bisherige Daten deuten darauf hin, dass B21 während dem Schließen/der Retraktion der Radula als Exterozeptor fungiert, während dem Öffnen/der Protraktion der Radula dagegen als Propriozeptor (Borovikov et al., 2000). Nur wenn das Motoneuron B21 während dem Öffnen der Radula, also während seiner Funktion als Propriozeptor, zentral depolarisiert ist, können Aktionspotentiale aktiv im lateralen Fortsatz generiert und an das Motoneuron B8, das die Radula schließt, weitergeleitet werden. So können Aktionspotentiale nur aktiv in Bereiche der synaptischen Übertragung fortgeleitet werden, wenn dies für das Verhalten notwendig ist. Ein ähnlicher Mechanismus könnte in den IV Neuronen ebenso vorliegen. Abhängig vom neuromodulatorischen Milieu könnte ein „Gating" der IV Neuron Aktionspotentiale zu den *ion*s auftreten. In Goaillard et al. (2004) wurde zum Beispiel ein Einfluss von Octopamin auf aktive Axoneigenschaften im Bereich der *stn-son*-Verzweigung im STNS sowie ein Einfluss auf die Weiterleitung von Aktionspotentialen beschrieben. Eine genauere Untersuchung der IV Projektionen in die beiden *ion*s unter der Wirkung verschiedener neuromodulatorischer Substanzen wäre daher ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Experimente.

5.5 Die IV Neurone beeinflussen die zentralen Mustergeneratoren im stomatogastrischen Nervensystem

Die Einflüsse der IV bzw. PS Neurone auf die drei zentralen Mustergeneratoren im stomatogastrischen Nervensystem wurde bisher in verschiedenen Krustazeenarten beschrieben (Dando and Selverston, 1972; Russell and Hartline, 1981; Sigvardt and Mulloney, 1982a; Marder and Eisen, 1984a; 1984b; Claiborne and Selverston, 1984; Hooper et al., 1990; Christie et al., 2004). Im Folgenden sollen daher die Effekte der IV Neurone auf den pylorischen und gastrischen Mustergenerator im stomatogastrischen Ganglion, als auch auf den oesophagealen Rhythmus in *C. pagurus* diskutiert und mit den Ergebnissen in anderen Krustazeenarten verglichen werden.

Effekte auf den pylorischen Rhythmus

Die Effekte der IV Neurone auf den pylorischen Rhythmus scheinen zwischen Arten der Brachyura ähnlicher zu sein als zwischen den Arten der Astacidea und Palinura. In *C. pagurus* konnten keine postsynaptischen Potentiale (PSPs) in den pylorischen Neuronen beobachtet werden, die mit den extrazellulären *ivn* Reizen korrelierten. Dies entsprach auch den Ergebnissen, die für *C. borealis* beschrieben wurden (Christie et al., 2004). In *P. interruptus* und *H. gammarus* konnten dagegen zum Beispiel EPSPs in PD beobachtet werden (*P. interruptus*: Russell and Hartline, 1981; Sigvardt and Mulloney, 1982b; Claiborne and Selverston, 1984; Marder and Eisen, 1984a; *H. gammarus*: Cazalets et al., 1987; Meyrand et al., 1991; 1994). In *C. pagurus* und *C. borealis* hemmen die IV Neurone VD und IC (siehe Abbildung 54 und Abbildung 55). In den Langustenarten *P. interruptus* und *P. vulgaris* wurde dagegen ein erregender Effekt der IV Neurone auf VD beschrieben (Russell and Hartline, 1981; Sigvardt and Mulloney, 1982b; Hooper et al., 1990). Für IC wurden in verschiedenen Arten unterschiedliche Effekte beobachtet. In *P. vulgaris* wurde IC während einer Reizung der IV Neurone gehemmt (Hooper et al., 1990), im Hummer *H. gammarus* konnte dagegen ein kurzer Reiz der PS Neurone IC über einen längeren Zeitraum aktivieren (Cazalets et al., 1990b). Eine weitere Übereinstimmung zwischen den beiden Brachyura Arten *C. pagurus* und *C. borealis* ist der Einfluss der IV Neurone auf LP, das in beiden Spezies während einer *ivn* Reizung inhibiert wird (siehe Abbildung 53).

In allen untersuchten Krustazeenarten, auch in *C. pagurus*, konnte beobachtet werden, dass die Aktivität von PD während einer hochfrequenten Reizung der IV Neurone abnahm (Dando and Selverston, 1972; Sigvardt and Mulloney, 1982b; Claiborne and Selverston, 1984; Hooper et al., 1990; Cazalets et al., 1990a; Christie et al., 2004). Im Gegensatz zu *P. interruptus* konnte in *C. pagurus* schon eine 20 Hz Reizung des *ivn*s die Aktivität von PD verringern. Der pylorische Rhythmus wurde dabei trotz Abnahme der PD Schrittmacheraktivität schneller. In *P. interruptus* wurde PD während einer 20 Hz Stimulation wenig beeinflusst, eine Reizung mit einer Frequenz von 30 Hz erregte PD, erst ab einem 40 Hz *ivn* Reiz wurde die Aktivität von PD stark verringert (siehe Abbildung 15; Sigvardt and Mulloney, 1982b).

Während die Effekte der IV Neurone auf die bisher angeführten pylorischen Neurone in allen meinen Experimenten übereinstimmten, zeigten die pylorischen Konstriktorneurone (PYs) drei verschiedene Antworten auf eine *ivn* Stimulation: die Aktivität von PY wurde 1. während

dem Reiz erhöht, 2. während der Stimulation gehemmt oder 3. nicht verändert (siehe Abbildung 56). In der Languste *P. vulgaris* konnten ebenfalls unterschiedliche Effekte einer Aktivierung der IV Neurone auf PY beobachtet werden (Hooper et al., 1990). Dabei löste eine *ivn* Stimulation entweder eine lang anhaltende Inaktivierung, eine lang anhaltende Depolarisation oder keine lang andauernde Antwort in verschiedenen PYs aus. Im nahen Verwandten *C. borealis* wurde dagegen dieser Effekt nicht beschrieben. Dort feuern die PYs während einem *ivn* Reiz tonisch Aktionspotentiale (Christie et al., 2004). Allerdings wurde in dieser Arbeit die Aktivität der PYs ausschließlich auf extrazellulären Ableitungen analysiert, so dass mögliche Unterschiede in der Aktivität der PY Population nicht ermittelt werden konnten. Bisher ist bekannt, dass die PYs über elektrische Synapsen miteinander verbunden sind (Maynard, 1972) und in welcher Phase des pylorischen Rhythmus sie aktiv sind (z.B. Stein et al., 2005). In *Panulirus* wurden die PYs anhand ihrer Antwort auf die Stimulation eines afferenten Pfades sowie aufgrund der Unterschiede hinsichtlich ihrer Konnektivität in zwei Gruppen unterteilt (Maynard, 1972; Hartline et al., 1987). Die unterschiedlichen Antworten der PYs auf einen *ivn* Reiz stützt daher die Hypothese, dass die PY Neurone im STG nicht ausschließlich dieselben Eigenschaften haben.

Effekte auf den gastrischen Mühlenrhythmus

In meinen Versuchen konnte ich eine rhythmische Aktivität der IV Neurone *in vivo* und *in vitro* beobachten, in drei Tieren trat gleichzeitig mit dieser rhythmischen IV Aktivität ein GMR auf. Daher wurde zur Untersuchung der IV Effekte auf den gastrischen Mühlenrhythmus der *ivn* zehnmal hintereinander mit unterschiedlichen Pulsdauern (2 bis 6 s) und unterschiedlichen Interpulsintervallen (1 bis 20 s) gereizt. Die Reizfrequenz betrug dabei 20 oder 40 Hz. Ohne spontanaktiven gastrischen Mühlenrhythmus konnte in *C. pagurus* durch eine rhythmische Aktivierung der IV Neurone (40 Hz) ein GMR ausgelöst werden (siehe Abbildung 57). Während der 40 Hz *ivn* Reizung war jeder ausgelöste LG Burst zeitlich mit den Reizen gekoppelt. Die gastrische Periode entsprach also der Stimulationsperiode (siehe Abbildung 58). Eine solche zeitliche Korrelation konnte auch im Hummer *H. gammarus* gefunden werden. Dabei war die Aktivität von LG stets zeitlich mit der Aktivität der PS Neurone korreliert (Meyrand et al., 1994). Im Gegensatz zu *C. borealis* dauerte der GMR in *C. pagurus* nur während der *ivn* Stimulation an. War ein GMR bereits spontanaktiv, so konnte dieser durch eine rhythmische *ivn* Reizung entrained werden (siehe Abbildung 60). Bei diesen Experimenten mit

spontanaktiven GMR konnte die gastrische Periode um bis zu 60 % verkürzt bzw. um bis zu 150 % verlängert werden. Auch während des Entrainments traten die LG Bursts stets gleichzeitig mit den *ivn* Reizen auf. Nach Ende der Reizung nahm der GMR wieder seine ursprüngliche Periode an.

Durch *ivn* Stimulationen mit einer Frequenz von 20 Hz konnten weder gastrische Mühlenrhythmen ausgelöst werden, noch konnten bereits spontanaktive entrained werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die geringe Erregung des gastrischen Mustergenerators durch den *ivn* Reiz sein. Eine Stimulationsfrequenz von 20 Hz könnte nicht ausreichen, einen GMR auszulösen oder zu entrainen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Beteiligung von Peptidtransmittern, wie sie schon in Abschnitt 5.3 beschrieben wurde. Das in *C. borealis* enthaltene Neuropeptid FLRFamid (Christie et al., 2004) könnte am Auslösen eines GMR beteiligt sein. Da solche Neuropeptide zur Ausschüttung häufig eine präsynaptische Depolarisation mit hoher Frequenz benötigen (Marder, 1998), könnte die niedrige Stimulationsfrequenz der Grund für das Ausbleiben eines GMR sein.

In Präparationen, in denen die *ion*s und *son*s mit den Projektionen der IV Neurone zu den CoGs durchtrennt wurden, konnte während einer *ivn* Reizung kein GMR mehr ausgelöst werden. Bei dieser Läsion wurden allerdings auch die Axone der CoG Projektionsneurone, die über *ion*s und *son*s projizieren, durchtrennt. Das bedeutet, dass auch die Erregung der pylorischen und gastrischen Netzwerke durch die Projektionsneurone wegfiel. Die IV Projektion über den *stn* zum STG war dagegen intakt. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben eines GMR während der *ivn* Stimulation ist daher, dass die IV Neurone die Projektionsneurone in den CoGs aufgrund der Läsion nicht mehr erregen können und die Projektionsneurone keine gastrischen Rhythmen mehr auslösen können. In *C. borealis* scheinen zwei Projektionsneurone, das modulatorische Kommissuralneuron 1 (MCN1; Coleman et al., 1992; Coleman and Nusbaum, 1994) und das kommissurale Projektionsneuron 2 (CPN2; Blitz and Nusbaum, 1997), am Auslösen des GMR beteiligt zu sein (Christie et al., 2004). Auch in meinen Versuchen fand ich einen Einfluss der IV Neurone auf CoG Projektionsneurone. Dass diese Projektionsneurone zum Auslösen des GMR beitragen, wird durch die Tatsache unterstützt, dass in allen untersuchten gastrischen Motoneuronen (LG, GM und DG) keine PSPs beobachtet werden konnten, die mit einzelnen *ivn* Reizen korrelierten. In GM nahm die Anzahl an PSPs zu, und zwar ausschließlich während der *ivn* Reizung, allerdings standen keine davon mit den einzelnen *ivn* Reizen in einem festen Zeitverhältnis. Diese PSPs stammten wahrscheinlich von CPN2 (Blitz and Nusbaum, 1999), der einzig bekannten Quelle für erregende Eingänge

auf GM (Stein et al., 2005). Die Erregung von GM durch die *ivn* Reizung wird also vermutlich indirekt über CPN2 vermittelt. Im Gegensatz dazu treten in den Langusten *P. interruptus* (Sigvardt and Mulloney, 1982b) und *P. argus* (Dando and Selverston, 1972) PSPs in GM auf, die mit den *ivn* Reizen korrelierten. Die IV Neurone scheinen in diesen Krustazeenarten also GM monosynaptisch zu erregen.

Effekte auf den oesophagealen Rhythmus

Während sowohl pylorisches als auch gastrisches Netzwerk im STG lokalisiert sind, ist das Netzwerk, das die Bewegungen des Oesophagus steuert, in den CoGs lokalisiert (Spirito, 1975). Meine retrograden Färbungen zeigen, dass die IV Neurone sowohl über *ion*s als auch *son*s zu den CoGs projizieren. Daher wurde der Effekt auf den oesophagealen Rhythmus anhand des oesophagealen Motoneurons (OMN) im CoG untersucht. In *C. borealis* konnte gezeigt werden, dass die IV Neurone den oesophagealen Rhythmus erregen, seine Periode wird nach einer *ivn* Reizung kürzer (Christie et al., 2004). Dies entspricht auch meinen Ergebnissen in *C. pagurus*. Durch eine extrazelluläre Reizung der IV Axone wurde OMN erregt und ich konnte zeigen, dass diese Erregung über eine direkte Verbindung zwischen den IV Neuronen und OMN vermittelt wird (siehe Abbildung 64). Die Aktivität wurde nur während den *ivn* Reizen erhöht, dabei war OMN meist tonisch aktiv. Im Gegensatz dazu oszillierte das OMN Membranpotential zwischen den *ivn* Reizen, ähnlich wie auch schon vor dem Reiz. Ähnliches wurde auch im Hummer *H. gammarus* beobachtet. Eine einmalige Reizung der PS Neurone löst dabei ebenfalls eine Erhöhung der Aktivität des oesophagealen Konstriktorneurons (OC) aus, welche aber nach Ende des Reizes wieder auf den Ausgangswert zurückkehrt (Meyrand et al., 1994).

Bisher ist nicht bekannt, ob OMN ein Mitglied des oesophagealen Mustergenerators ist. Wenn die IV Neurone nur das Motoneuron OMN erregen und dies nicht Teil des Mustergenerators ist, so wäre nur eine Änderung der OMN Aktivität während der *ivn* Pulse zu erwarten. Wenn die IV Neurone allerdings den zentralen Mustergenerator des oesophagealen Rhythmus erregen, so würde man erwarten, dass ein spontanaktiver oesophagealer Rhythmus mit dem Reiz synchronisiert, also entrained wird. Dies könnte allerdings auch der Fall sein, wenn OMN nicht Teil des Mustergenerators ist, sondern einen sehr starken Einfluss auf diesen hat.

Die OMN Aktivität vor und zwischen den Reizpulsen schien in diesen Versuchen immer sehr ähnlich zu sein, es konnte aber in keinem durchgeführten Experiment ein Zusammenhang

zwischen den OMN Aktivitäten vor und zwischen den Reizen festgestellt werden. Obwohl die Aktivität von OMN zwischen den Reizen eine ähnliche Aktivität wie vor den Reizen aufwies, konnte nach einem zehnmaligen *ivn* Reiz eine Veränderung der OMN Aktivität beobachtet werden. Die Anzahl der Spikes pro Burst nahm nach dem Reiz signifikant zu und sowohl Burstdauer als auch Periodendauer nahmen für OMN nach dem Reiz im Vergleich zu vor der Stimulation ab (siehe Abbildung 67). Die länger anhaltende Veränderung der OMN Aktivität deutet darauf hin, dass die IV Neurone einen eingeschränkten Einfluss auf den oesophagealen Mustergenerator haben. Für OMN wurde also im Gegensatz zum pylorischen und gastrischen Rhythmus ein auch nach der Stimulation der IV Neurone anhaltender Effekt beobachtet.

Synchronisation der drei Rhythmen durch die IV Neurone

Eine rhythmische Aktivierung der PS Neurone im Hummer *H. gammarus* bewirkt, dass aus pylorischem, gastrischem und oesophagealem Rhythmus ein einziges motorisches Muster entsteht. (Meyrand et al., 1991). Die PS Neurone bilden aus Neuronen der unterschiedlichen Netzwerke ein neues mustergenerierendes Netzwerk, dessen resultierendes Muster sich vollkommen von den ursprünglich generierten Mustern der verschiedenen Netzwerke unterscheidet. Dabei sind das pylorische Neuron VD sowie das oesophageale Konstriktorneuron (OC) in Phase mit den PS Neuronen aktiv, das gastrische Neuron LG ist dazu alternierend aktiv. Das Schrittmacherneuron PD folgt ebenfalls dem Rhythmus der PS Neurone, d.h. PD feuert vermehrt während der PS Aktivität und ist zwischen den PS Bursts nicht oder nur wenig aktiv. Die Aktivität anderer Neurone wie LP und GM wird dagegen während der PS Aktivität stark inhibiert.

In Abbildung 65 wurde gezeigt, dass pylorischer, gastrischer und oesophagealer Rhythmus in meinen Versuchen während einer rhythmischen IV Aktivierung zeitlich gekoppelt waren. Eine solche rhythmische Aktivierung der IV Neurone konnte allerdings nicht wie im Hummer *H. gammarus* einen einheitlichen Rhythmus aus pylorischem, gastrischem und oesophagealem Rhythmus auslösen. Es scheint viel mehr, dass die drei Rhythmen im STNS von *C. pagurus* durch exzitatorische und inhibitorische Einflüsse der IV Neurone synchronisiert werden. Während der gastrische Mühlenrhythmus durch die *ivn* Stimulation entweder ausgelöst oder entrained wurde, dauerte der pylorische Rhythmus zwischen den *ivn* Pulsen an (im Gegensatz zum Hummer), erhielt aber während den Reizpulsen phasische Inhibition. Dies traf zwischen den *ivn* Pulsen auch für das oesophageale Motoneuron zu, nur dass OMN während den *ivn*

Pulsen deutlich erregt wurde. Durch diese exzitatorischen und inhibitorischen Einflüsse bestimmen die IV Neurone das Aktivitätsmuster der Motoneurone im STNS (anscheinend aber nicht das der pylorischen und oesophagealen Mustergeneratoren).

In Abschnitt 5.5 wurden unter anderem Unterschiede zwischen den IV bzw. PS Neurone in verschiedenen Krustazeenarten dargelegt. Diese Beispiele der Unterschiede zwischen denselben Neuronen verschiedener Arten zeigen allerdings auf, dass man bei der Untersuchung und dem Vergleich von komplexeren Systemen, die auf zellulärer Ebene nicht so gut untersucht sind wie das stomatogastrische Nervensystem, vorsichtig sein muss. Homologe Neurone, wie die IV bzw. PS Neurone in den verschiedenen Krustazeenarten, könnten ihre unterschiedlichen Funktionen aufgrund eines Unterschieds in der evolutiven Entwicklung erhalten haben. In verschiedenen Gastropoda-Arten wurden z.B. homologe Neurone untersucht, die sich im Zerebralganglion befinden und Serotonin als Transmitter verwenden. In der Meeresschnecke *Tritonia diomedea* sind die dorsalen Interneurone (DSI) Mitglieder des zentralen Mustergenerators für das Schwimmverhalten. In weiteren untersuchten Gastropoda-Arten konnte teilweise die gleiche Funktion homologer Neurone beschrieben werden. In anderen, teilweise nicht schwimmenden Arten, wie z.B. *Aplysia californica*, sind diese homologen Neurone wiederum nicht an der zentralen Mustergenerierung beteiligt, sondern werden durch äußere mechanische Reize aktiviert und können dadurch den zentralen Mustergenerator beeinflussen. Die DSI in *Tritonia* scheinen sich dabei aus diesen nicht an der Mustergeneration beteiligten Zellen entwickelt zu haben (Katz et al., 2001).

5.6 Die IV Neurone beeinflussen die Projektionsneurone in den CoGs

Aufgrund der Projektionen der IV Neurone zu den Kommissuralganglien habe ich die Einflüsse der IV Neurone auf die Projektionsneurone in den CoGs untersucht. Im Folgenden möchte ich daher die Einflüsse der IV Neurone auf vier identifizierte Projektionsneurone diskutieren. Diese vier Projektionsneurone sind MCN1 (Nusbaum et al., 1992; Coleman and Nusbaum, 1994), MCN5 (Norris et al., 1996), MCN7 (Blitz et al., 1999) und CPN2 (Norris et al., 1994). Der Einfluss der IV Neurone auf CoG Projektionsneurone wurde, mit einer Ausnahme (MCN1; Christie et al., 2004), bisher in keiner Krustazeenart analysiert.

5.6.1. Einfluss der IV Neurone auf MCN1

Durch eine extrazelluläre Reizung des *ivn*s mit einer Reizfrequenz von 40 Hz wurde MCN1 depolarisiert und seine Aktivität erhöhte sich (siehe Abbildung 68). Das PSTH in Abbildung 69 zeigt den Verlauf der Erregung durch die IV Neurone. Es ist zu erkennen, dass die Aktivität mit Beginn des *ivn* Reizes langsam ansteigt und nach Reizende noch kurzzeitig erhöht bleibt. Auch in *C. borealis* wurde anhand extrazellulärer Ableitungen gezeigt, dass die IV Neurone MCN1 erregen. Der Einfluss der IV Neurone auf MCN1 wurde dabei allerdings nicht im Detail untersucht. Während der Aktivierung der IV Neurone konnte ich keine individuellen PSPs beobachten. In Experimenten, in denen ich polysynaptische Verbindungen blockierte, konnte ich zeigen, dass die IV Neurone das Projektionsneuron MCN1 indirekt, also über ein oder mehrere Interneurone erregen. Welche Interneurone die Information der IV Neurone an MCN1 vermitteln, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

5.6.2. Einfluss der IV Neurone auf MCN5

Die Aktivität von MCN5 erhöhte sich während der *ivn* Reizung (siehe Abbildung 74). In dem PSTH aus Abbildung 77 ist der Verlauf der MCN5 Aktivität dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität von MCN5 direkt zu Beginn der *ivn* Reizung erhöht wird. Nach Ende der Stimulation fällt die MCN5 Aktivität sehr schnell wieder auf den Ausgangswert ab. Einzelreize lösten in MCN5 jeweils ein PSP aus (siehe Abbildung 76). Dies deutet auf eine direkte Erregung von MCN5 durch die IV Neurone hin. Diese Hypothese konnte mit Hilfe einer Applikation von HiDi und LowCa^{2+} Ringerlösung bestätigt werden. Trotz der Erhöhung der Aktionspotentialschwelle in HiDi Ringerlösung konnten in MCN5 Spikes ausgelöst werden (siehe Abbildung 79), was 1. auf eine sehr starke Verbindung zwischen den IV Neuronen und MCN5 hindeutet und 2. auf eine monosynaptische Verbindung hinweist. Da auch in LowCa^{2+} Ringerlösung PSPs auftraten, sind die IV Neurone und MCN5 über eine elektrische Synapse direkt gekoppelt.

5.6.3. Einfluss der IV Neurone auf MCN7

Die Effekte der IV Neurone auf das Projektionsneuron MCN7 waren ähnlich wie die Effekte auf MCN1. MCN7 wurde von den IV Neuronen depolarisiert und seine Aktivität erhöhte sich (siehe Abbildung 81). Im PSTH in Abbildung 82 kann man erkennen, dass die Aktivität von

MCN7 während der *ivn* Stimulation langsam anstieg und erst nach Ende des Reizes wieder abfiel. Da das Projektionsneuron MCN7 nur in drei Tieren intrazellulär abgeleitet wurde und nur in einem Tier HiDi Ringerlösung zum Blockieren polysynaptischer Verbindungen benutzt wurde, kann nur wenig über die synaptische Verbindung zwischen den IV Neuronen und MCN7 gesagt werden. In HiDi konnte MCN7 nicht mehr durch die IV Neurone aktiviert werden, was auf eine polysynaptische Verbindung hindeutet.

5.6.4. Einfluss der IV Neurone auf CPN2

Auch das Projektionsneuron CPN2 wurde von den IV Neuronen depolarisiert, seine Aktivität erhöhte sich, wie man in der Originalableitung in Abbildung 84 erkennen kann. Im PSTH in Abbildung 85 kann man deutlich erkennen, dass die Aktivität mit Beginn des *ivn* Reizes zunimmt und nach Ende des Reizes wieder auf den Ausgangswert abfällt. Die IV Neurone erregen CPN2 dabei indirekt (siehe Abbildung 87).

Auch in *C. borealis* wird vermutet, dass die IV Neurone CPN2 erregen (Christie et al., 2004). Dies wurde indirekt daraus geschlossen, dass ein gastrischer Rhythmus auftrat, der einem GMR ähnelt, der durch die simultane Aktivität von MCN1 und CPN2 erzeugt wird.

5.6.5. Verarbeitung der IV Information auf Ebene der Kommissuralganglien?

Die Projektionsneurone in den CoGs leisten einen wichtigen Beitrag zur Generierung von pylorischem und gastrischem Rhythmus im STG. Während eine Unterbrechung der CoG Eingänge zum STG den pylorischen und gastrischen Rhythmus schwächt oder sogar ganz beendet, kann eine Aktivierung der Projektionsneurone die Eigenschaften der STG Netzwerke und deren Interaktion verändern (Katz and Harris-Warrick, 1991; Norris et al., 1994; Bartos and Nusbaum, 1997; Nadim et al., 1998; Bartos et al., 1999). Da die IV Neurone alle vier identifizierten Projektionsneurone erregen, stellt sich die Frage, welche Bedeutung ein mögliches Einbeziehen der Projektionsneurone für die Verarbeitung der IV Information hat. Die Tatsache, dass die IV Neurone vier Projektionsneurone aktivieren, die teilweise Kotransmitter enthalten, zeigt, dass es dadurch zu einer hohen Modulierbarkeit der motorischen Muster im STG kommen kann. Durch die zahlreichen Ausschüttungsstrategien auf die Zielneurone und verschiedene Rezeptorkombinationen in diesen Zielneuronen zeigt sich die hohe Flexibilität solcher Projektionsneurone (siehe auch Abschnitt 2.3.3). Des

Weiteren könnten die Kommissuralganglien der Ort sein, an dem die Synchronisation des pylorischen, gastrischen und oesophagealen Rhythmus ausgelöst wird. Durch Aktivierung verschiedener Projektionsneurone könnten Neurone der drei Mustergeneratoren aktiviert werden und deren Aktivität durch das Zusammenspiel von exzitatorischen und inhibitorischen Eingängen durch die Projektionsneurone synchronisiert werden.

Die Kommissuralganglien stehen zum einen über die *cov*s mit dem Gehirn in Verbindung, zum anderen aber auch mit dem Thorakalganglion. Kirby and Nusbaum (2007) konnten zeigen, dass es Zellen mit Somata in den CoGs gibt, die in Richtung Thorakalganglion projizieren. Es wäre daher auch denkbar, dass die Information der IV Neurone aus dem Gehirn in den CoGs weiterverarbeitet und von dort z.B. auch an das Thorakalganglion weitergeleitet wird (siehe auch Abschnitt 5.9).

5.7 Die IV Neurone beeinflussen die zentralen Mustergeneratoren im STG über Projektionsneurone und Kotransmitter

In meiner Arbeit konnte ich unter anderem zeigen, dass die Kotransmitter der IV Neurone in *C. borealis* (Christie et al., 2004), Histamin und FLRFamid, in *C. pagurus* einen Einfluss auf die Mustergeneratoren im STG haben (siehe Abschnitt 4.9). Des Weiteren wurden alle vier bisher identifizierten Projektionsneurone durch die IV Neurone beeinflusst. In früheren Arbeiten wurde ein Einfluss dieser vier Projektionsneurone auf die Mustergeneratoren im STG gezeigt und die synaptischen Verbindungen zwischen den Projektionsneuronen und den Nervenzellen im STG wurden identifiziert (Norris et al., 1994; Coleman and Nusbaum, 1994; Norris et al., 1996; Blitz et al., 1999; Beenhakker and Nusbaum, 2004). In Abbildung 103 sind die Verbindungen zwischen den Projektionsneuronen MCN1, MCN5, MCN7 und CPN2 und den pylorischen und gastrischen Neuronen im STG dargestellt. Die Aktivität der Projektionsneurone kann wiederum durch verschiedene andere Neurone, wie zum Beispiel sensorische Neurone, beeinflusst werden.

Im Folgenden soll daher der Einfluss dieser Projektionsneurone sowie beider Kotransmitter auf die zentralen Mustergeneratoren im STG diskutiert werden.

5.7.1. Einfluss der IV Neurone auf den pylorischen Mustergenerator über Projektionsneurone und den Kotransmitter Histamin

In Abschnitt 4.4 wurde gezeigt, dass der pylorische Rhythmus durch eine Aktivierung der IV Neurone schneller wurde und dass gleichzeitig die Aktivität der pylorischen Neurone PD, LP, der meisten PYs, VD und IC während der Reizung abnahm. Dieser hemmende Einfluss wurde zum Teil durch die hemmende Wirkung des Neurotransmitters Histamin ausgelöst (siehe Abschnitt 4.9.1). In Säugern wurden bisher vier verschiedene Histaminrezeptoren beschrieben (H_1, H_2, H_3 und H_4; für Zusammenfassung siehe Parsons and Ganellin, 2006). Zur Untersuchung der Histaminwirkung wurde der (H_2) Rezeptor-Antagonist Cimetidin appliziert. Dieser Antagonist bindet in Säugern an die (H_2) Rezeptoren und verhindert so ein Andocken von Histamin. In *C. borealis* und anderen Arthropoden konnte eine Cimetidinwirkung festgestellt werden, obwohl die Rezeptoren, an die Cimetidin bindet, in Arthropoden pharmakologisch unterschiedlich zu den (H_2) Rezeptoren in Säugern sind (Hashemzadeh-Gargari and Freschi, 1992; Gisselmann et al., 2002; Christie et al., 2004).

In meinen Versuchen habe ich Cimetidin ausschließlich auf den posterioren Bereich des STNS mit STG und motorischen Nerven appliziert und die Effekte einer *ivn* Stimulation beobachtet. Die CoGs waren dabei, im Gegensatz zu den Versuchen von Christie et al. (2004), vorhanden. Während der Effekt der *ivn* Reizung auf PD, die meisten PYs und IC durch Cimetidin aufgehoben werden konnte, d.h. sie wurden durch Histamin gehemmt, wurden LP und VD nicht signifikant von Histamin beeinflusst. In *C. borealis* wurde der Einfluss von Histamin ebenfalls untersucht. Dazu wurden die CoGs vom restlichen STNS entfernt. Christie et al. (2004) zeigten, dass sowohl eine Stimulation der IV Neurone als auch eine Applikation von Histamin auf das STG Neuropil dieselben Effekte auf den pylorischen Rhythmus haben. Die Aktivität der pylorischen Neurone PD, LP, VD und IC nimmt während einer *ivn* Stimulation oder einer Histamin Applikation ab. Der (H_2) Rezeptor-Antagonist Cimetidin hebt die Effekte von *ivn* Stimulation und Histamin auf den pylorischen Rhythmus auf, d.h. die IV Neurone hemmen die pylorischen Neurone über den Neurotransmitter Histamin.

Die IV Neurone benutzen also sowohl in *C. pagurus* als auch in *C. borealis* den Neurotransmitter Histamin, um die pylorischen Neurone im STG zu beeinflussen. Vergleicht man die Ergebnisse untereinander, so fällt auf, dass die Hemmung von LP durch die IV Neurone in *C. borealis* durch Cimetidin Applikation aufgehoben werden kann, in *C. pagurus* dagegen nicht. Eine Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass in meinen Versuchen, im Gegen-

satz zu denen von Christie et al. (2004), die CoGs mit den Projektionsneuronen vorhanden waren. Die IV Neurone konnten also nicht nur die Neurone im STG, sondern auch die CoG Projektionsneurone beeinflussen. Die Projektionsneurone in den CoGs haben wiederum einen modulatorischen Einfluss auf die beiden Netzwerke im STG. In meinen Versuchen konnten die IV Neurone also die beiden Mustergeneratoren sowohl direkt beeinflussen als auch indirekt über die CoG Projektionsneurone. Die Hemmung von LP in Cimetidin könnte beispielsweise durch die erhöhte Aktivität von MCN5 während der *ivn* Stimulation zustande kommen. Es ist also vorstellbar, dass die IV Neurone LP sowohl direkt über den Neurotransmitter Histamin beeinflussen, als auch indirekt über die Projektionsneurone. Dies stellt eine Absicherung dar: Wie in Abschnitt 4.2.4 und 4.3 beschrieben, können die IV Neurone auch aktiv sein, ohne dass ein GMR auftritt. In diesen Fällen könnte die Aktivität der IV Neurone nicht ausreichen, um die Projektionsneurone so stark zu erregen, dass sie einen GMR auslösen können. In diesen Fällen könnten die beiden Netzwerke im STG trotzdem direkt durch die IV Neurone beeinflusst werden. Außerdem könnten in verhaltensrelevanten Situationen die IV Neurone möglicherweise zusammen mit anderen sensorischen Bahnen aktiviert werden, die einen gegensätzlichen Einfluss auf die Projektionsneurone haben und daher die Wirkung der IV Neurone auf die Projektionsneurone aufheben. In solchen Situationen könnten die IV Neurone das pylorische Netzwerk ebenfalls weiterhin direkt beeinflussen.

In meinen Versuchen aus Abschnitt 4.4 konnte ich beobachten, dass der pylorische Rhythmus während der *ivn* Stimulation erregt wurde, erkennbar an der Verkürzung der pylorischen Periode. Allerdings wurde PD, Teil des Schrittmacherensembles, während der *ivn* Reizung gehemmt. Wie ist es also möglich, dass gleichzeitig PD gehemmt wird und der pylorische Rhythmus trotzdem erregt wird? Die Erregung des pylorischen Rhythmus könnte der anteriore Burster (AB), ebenfalls Teil des Schrittmacherensembles, bewirken. AB könnte entweder direkt von den IV Neuronen erregt werden, oder indirekt über die Aktivität von CoG Projektionsneuronen.

In meinen Versuchen aus Abschnitt 4.7 konnte ich zeigen, dass die IV Neurone einen Einfluss auf modulatorische Projektionsneurone haben. Es ist bekannt, dass z.B. MCN1 sowohl den gastrischen als auch den pylorischen Rhythmus erregt (siehe Abbildung 103; Bartos and Nusbaum, 1997; Blitz and Nusbaum, 1999; Bartos et al., 1999). Wenn die MCN1 Aktivität einen GMR aktiviert, wird die Erregung des pylorischen Rhythmus allerdings während der Protraktorphase des GMR vermindert, da das Protraktormotoneuron LG die MCN1

Terminale präsynaptisch inhibiert (siehe Abbildung 103; Coleman et al., 1995). Da LG bei jedem *ivn* Puls aktiv ist und somit die Terminale von MCN1 hemmt, wird der pylorische Rhythmus während dem *ivn* Puls von MCN1 weniger erregt.

MCN5 hat vor allem einen starken Einfluss auf die pylorischen Neurone im STG (siehe Abbildung 103). Durch die direkte Verbindung von MCN5 mit dem Schrittmacherneuron AB wird die pylorische Periode während einer erhöhten MCN5 Aktivität verkürzt, der Rhythmus wird schneller. Gleichzeitig werden die Neurone LP, PY, VD und IC durch MCN5 gehemmt, allerdings erst ab einer MCN5 Feuerfrequenz von mindestens 20 Hz (Norris et al., 1996). Die Verkürzung der pylorischen Periode könnte daher durch die hohe Aktivität von MCN5 während der *ivn* Stimulation zustande kommen. Da die Hemmung von LP und VD während der *ivn* Reizung nicht oder nicht ausschließlich von Histamin vermittelt wird (siehe Abschnitt 4.9.1), könnte die Aktivität beider Neurone zusätzlich durch die erhöhte MCN5 Aktivität während des *ivn* Pulses zustande kommen. Auch beim Einfluss der IV Neurone auf IC könnte MCN5 beteiligt sein. In Abbildung 98 ist zu erkennen, dass IC von den IV Neuronen durch Histamin gehemmt wird. Trotz der Aufhebung der Histaminwirkung durch den Histamin-Antagonisten Cimetidin konnte eine Tendenz von IC hin zur Abnahme der Aktivität während der *ivn* Reizung beobachtet werden.

Ein sehr charakteristischer Effekt von MCN7 auf die Mustergeneratoren im STG ist, dass VD und IC auch während eines LG Bursts aktiv sind und gleichzeitig PD gehemmt wird (Blitz et al., 1999). Dies zeigt sich allerdings nur bei MCN7 Feuerfrequenzen von mehr als 14 Hz (Blitz et al., 1999; siehe Abbildung 103). Im Gegensatz dazu zeigen meine Experimente, dass VD und IC während der *ivn* Stimulation gehemmt werden (siehe Abbildung 54 und Abbildung 55). Der Einfluss von MCN7 auf die pylorischen Neurone scheint daher eher einen geringeren Beitrag zu leisten oder er wird überdeckt von den Einflüssen anderer Projektionsneurone, wie z.B. durch MCN5 und CPN2 (siehe Abbildung 103). Die starke Erregung von IC durch MCN7 könnte zum Beispiel durch die Inhibition von IC durch CPN2 und MCN5 überdeckt werden.

CPN2 hat neben exzitatorischen und inhibitorischen Einflüssen auf gastrische Neurone zusätzlich eine hemmende Synapse auf das pylorische Neuron IC (siehe Abbildung 103). Es könnte daher auch an der Aktivitätsabnahme von IC in Cimetidin beteiligt sein.

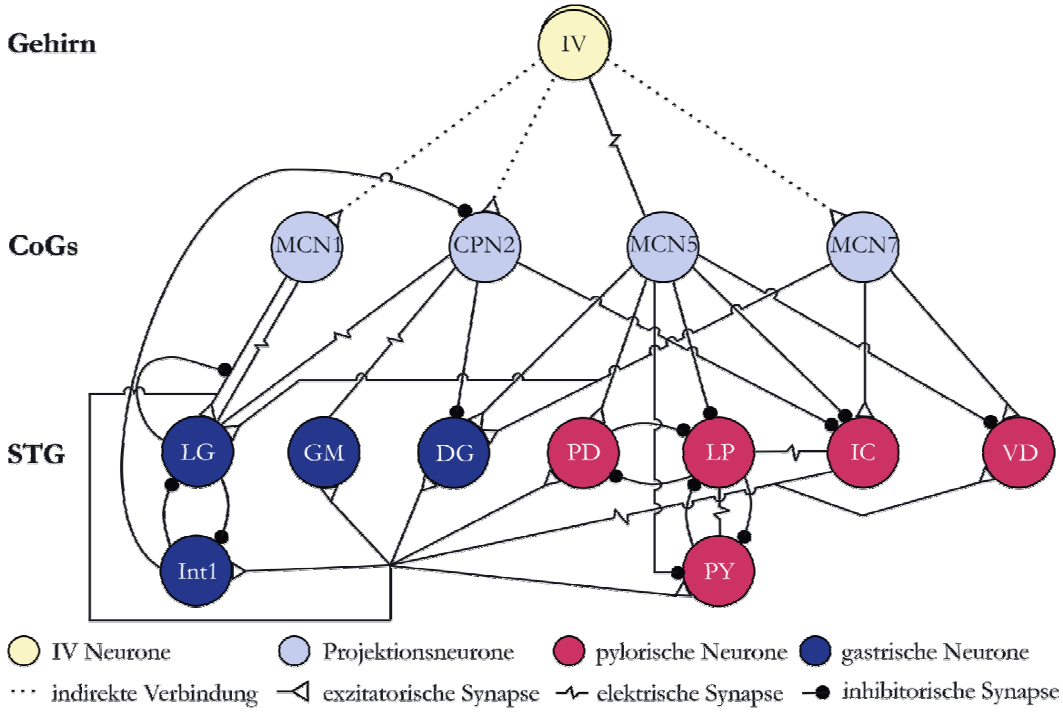


Abbildung 103: Effekte der IV Neurone auf die Projektionsneurone in den CoGs. Zusätzlich sind die Einflüsse der Projektionsneurone auf die Motoneurone im STG dargestellt. Die Daten dafür wurden entnommen aus Coleman and Nusbaum, 1994; Norris et al., 1994; , 1996; Bartos and Nusbaum, 1997; Wood et al., 2000; Blitz et al., 2004; Beenhakker et al., 2004.

5.7.2. Die IV Neurone beeinflussen den gastrischen Mustergenerator über Projektionsneurone und nicht über den Kotransmitter Histamin

In Abschnitt 4.5 und 4.8 wurde beschrieben, dass die IV Neurone indirekt über Projektionsneurone in den CoGs einen gastrischen Mühlenrhythmus auslösen bzw. einen spontanaktiven GMR entrainen können. Ich konnte zeigen, dass die Aktivität von MCN1 dabei notwendig war, um einen GMR auszulösen (siehe Abschnitt 4.8). In *C. borealis* wurde ein MCN1-GMR durch *ivn* Stimulation oder Histamin Applikation auf das STG Neuropil kurzzeitig inhibiert (Christie et al., 2004). Für diese Versuche waren die CoGs allerdings entfernt und der GMR wurde durch direkte MCN1 Stimulation ausgelöst. In meinen Versuchen konnte ich zu keiner Zeit eine Inhibition des GMR während *ivn* Stimulation beobachten. Im Generellen konnte ich in keinen Experimenten Hinweise auf eine Histaminwirkung auf den GMR finden (Abschnitt 4.9.1). Eine Cimetidin Applikation auf den posterioren Teil des STNS mit dem STG und den motorischen Nerven hatte keinen Einfluss auf spontanaktive gastrische Mühlerhythmen. Auch der durch *ivn* Stimulation ausgelöste GMR wurde nicht durch die

Cimetidin Applikation beeinflusst. Allerdings waren in allen meinen Experimenten im Gegensatz zu *C. borealis* die CoGs vorhanden. Aber auch eine Applikation von $5x10^{-3}$M Cimetidin auf den anterioren Teil des STNS mit den CoGs hatte keinen Einfluss auf den GMR, die Aktivität der Projektionsneurone wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Histamin scheint also keinerlei Effekte auf den GMR und die Projektionsneurone in den CoGs zu haben. Allerdings könnte ein Effekt von Histamin auch durch die hohe Aktivität der CoG Projektionsneurone überdeckt werden, wie auch für den pylorischen Rhythmus vermutet werden kann (siehe Abschnitt 5.7.1). Des Weiteren wurde im intakten Tier beobachtet, dass die IV Neurone zwar durch chemosensorische Stimulation aktiviert werden können, aber nur in drei Tieren traten gleichzeitig gastrische Mühlenrhythmen auf (siehe Abschnitt 4.2.4). Die IV Neurone mussten mit einer Frequenz von über 30 Hz aktiv sein, damit simultan ein GMR auftrat. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass in Tieren, in denen kein GMR aktiviert wurde, die Aktivität der Projektionsneurone nicht ausreichte, um einen GMR auszulösen. Die IV Neurone können in solchen Situationen die beiden Netzwerke im STG über den Neurotransmitter Histamin direkt beeinflussen.

Wie in Abschnitt 4.5.3 beschrieben, sind die Projektionsneurone in den CoGs notwendig, um einen GMR auszulösen. Ich konnte zeigen, dass die Aktivität von CPN2 und MCN7 nicht hinreichend war, um einen GMR durch *ivn* Reizung auszulösen (siehe Abschnitt 4.8). MCN1 war dagegen notwendig, um einen GMR durch *ivn* Reizung zu starten (siehe Abschnitt 4.8). In früheren Arbeiten wurde schon beschrieben, dass MCN1 einen starken Einfluss auf den gastrischen Mühlenrhythmus hat (Nusbaum et al., 1992). Es erregt alle gastrischen Neurone (Coleman and Nusbaum, 1994; Stein et al., 2007), unter anderem auch LG, welches zum gastrischen Mustergenerator gehört, und löst somit einen GMR aus. MCN1 könnte daher auch während der *ivn* Stimulation für das Auslösen des GMR verantwortlich sein. CPN2 besitzt ebenfalls einen starken Einfluss auf den gastrischen Mustergenerator, da es LG und GM über elektrische Synapsen erregt. Die Synapse zwischen CPN2 und GM ist dabei sehr stark, bei jedem CPN2 Aktionspotential entsteht ein diskretes PSP in GM. Dies führt dazu, dass über die erhöhte Aktivität von CPN2 GM stark erregt wird und Teil des GMR wird. Bei einem GMR, der ausschließlich durch die Aktivität von MCN1 ausgelöst wird, ist GM dagegen nicht so stark aktiv (Saideman et al., 2007; Wolfgang Stein, persönliche Mitteilung). Die Aktivität von DG wird dagegen durch CPN2 inhibiert. Dies scheint sich so auszuwirken, dass, wie in Abbildung 57 dargestellt, DG ausschließlich zwischen den *ivn* Pulsen (und damit alternierend zu LG) aktiv ist. Beim gastrischen Rhythmus, der durch die Aktivität der IV Neurone ausgelöst wird, sind LG und DG immer streng alternierend aktiv (siehe Abbildung 59). Bei einem

GMR, der ausschließlich durch die Aktivität von MCN1 ausgelöst wird, können sich Phasenanfang des Protraktormotoneurons LG und das Phasenende des Retraktormotoneurons DG dagegen überschneiden (Coleman and Nusbaum, 1994; Saideman et al., 2007). Dieser Effekt kommt durch die präsynaptische Hemmung der MCN1 Terminale durch LG zustande (Abbildung 103). Während der Protraktorphase des GMR hemmt LG die MCN1 Terminale und eliminiert so die Erregung auf DG. Da diese präsynaptische Hemmung erst bei der Aktivierung von LG einsetzt, können sich die Phasen von Protraktor und Retraktor leicht überschneiden. Eine Aktivierung von CPN2 durch die IV Neurone könnte also sowohl zum Auslösen eines gastrischen Mühlenrhythmus beitragen, als auch zur Phasenlage der einzelnen gastrischen Neurone und somit zur adäquaten Funktion des GMR im Tier. Der Beitrag von MCN7 zum Auslösen eines GMR ist unklar, da keine typischen Effekte von MCN7 auf die Mustergeneratoren beobachtet werden konnten.

MCN5 erregt das gastrische Neuron DG über eine chemische Synapse. Da aber DG während der erhöhten MCN5 Aktivität, also während den *ivn* Pulsen, nicht aktiv ist, scheint der Effekt von MCN5 möglicherweise durch die Aktivität anderer Projektionsneurone überdeckt zu sein. Erst das Zusammenspiel der Projektionsneurone bildet am Schluss das entstehende motorische Muster.

5.7.3. FLRFamid aktiviert die Projektionsneurone MCN1 und CPN2 und löst einen gastrischen Mühlenrhythmus aus

Weimann et al. (1993) zeigten, dass das Neuropeptid FLRFamid einen Einfluss auf den gastrischen und pylorischen Rhythmus hat. Während eine FLRFamid Applikation auf ein isoliertes STG ohne CoGs (also ohne spontanaktiven GMR und pylorischen Rhythmus) einen pylorischen Rhythmus auslöst, werden die gastrischen Neurone im STG nicht aktiviert. Eine Applikation auf ein intaktes STNS bewirkt dagegen, dass ein GMR gestartet wird. Eine mögliche Hypothese ist daher, dass die IV Neurone MCN1 und CPN2 über das Neuropeptid FLRFamid erregen und so einen gastrischen Mühlenrhythmus auslösen Daher habe ich den Peptidtransmitter FLRFamid, der in *C. borealis* als Kotransmitter der IV Neurone identifiziert wurde (Christie et al., 2004), ausschließlich auf die CoGs appliziert und den Effekt auf den GMR sowie auf die Aktivität der Projektionsneurone beobachtet. Durch die FLRFamid Applikation wurde ein GMR ausgelöst (siehe Abbildung 99), gleichzeitig erhöhte sich die Aktivität der beiden Projektionsneurone MCN1 und CPN2 (siehe Abbildung 99 und

Abbildung 100). Die Aktivität von MCN5 veränderte sich dabei nicht. Dies ist stimmig mit der Hypothese, dass die IV Neurone FLRFamid in den CoGs ausschütten, um die Projektionsneurone zu erregen und so einen GMR auszulösen, da MCN1 und CPN2 durch FLRFamid erregt wurden, wie auch während einer *ivn* Stimulation. Ebenso stimmig ist, dass MCN5 von FLRFamid nicht aktiviert wurde, und es von den IV Neuronen über eine elektrische Synapse aktiviert wird.

Da eine Badapplikation allerdings nicht den realen Verhältnissen im intakten Tier entspricht (Stein et al., 2007), muss diese Hypothese mit Vorsicht betrachtet werden. Das Auftreten von Kotransmittern, die Kompartimentierung der Peptidwirkung, lokale Interaktionen mit Neuronen des Netzwerks sowie Interaktionen zwischen parallelen Eingängen müssen dabei beachtet werden (Blitz et al., 1999). Dies alles erhöht die Komplexität der Transmitterwirkung und zeigt die Mannigfaltigkeit an Reaktionen, die beim Auftreten eines einzigen Neurotransmitters entstehen kann. Ob die IV Neurone in *C. pagurus* tatsächlich FLRFamid als Neuromodulator verwenden, um MCN1 und CPN2 zu aktivieren (und damit auch den GMR), muss daher noch nachgewiesen werden.

5.8 Chemosensorische Verarbeitung bei Invertebraten

In den vorherigen Abschnitten wurde beschrieben, dass die IV Neurone durch chemosensorische Stimuli aktiviert werden. Des Weiteren konnte ich zeigen, dass die IV Neurone ihre Information an die CoG Projektionsneurone weiterleiten, die daraufhin die Mustergeneratoren im STNS beeinflussen. Wie gelangt aber die Information über die chemosensorischen Reize von den Antennulae zu den IV Neuronen? Welche Gehirnbereiche sind in diese Verarbeitung möglicherweise involviert? Die Antennulae besitzen zwei verschiedene Rezeptoren zur Aufnahme olfaktorischer und chemosensorischer Reize. Die sensorische Information wird von den olfaktorischen und chemosensorischen (nicht-olfaktorischen) Sensillen an den Antennulae aufgenommen und gelangt über den ersten Antennalnerv (A_1Nv) in den deutocerebralen Teil des Gehirns (siehe Abbildung 104). In den hier vorgestellten Versuchen, in denen eine Mischung aus Krebs- oder Garnelenfleisch und Ringerlösung direkt auf die Antennulae gegeben wurde, konnte nicht zwischen olfaktorischen und chemosensorischen Stimuli und die daraus resultierenden Antworten unterschieden werden. Das Deutocerebrum von dekapoden Krebsen ist in zwei Hauptbahnen differenziert, und in beide projizieren die sensorischen Neurone der Antennulae. Eine Bahn wird aus zwei kleineren Neuropilen ge-

bildet, den lateralen und medianen antennalen Neuropilen (LAN, MAN; Abbildung 104), und verarbeitet die mechanosensorischen und chemosensorischen (nicht-olfaktorischen) Eingänge der Antennulae (Sandeman et al., 1992; Schmidt and Ache, 1996; Schachtner et al., 2005). LAN und MAN enthalten außerdem große Bereiche, in denen sich antennale Motoneurone verzweigen, was darauf hindeutet, dass es sich bei diesen Neuropilen u.a. auch um die antennalen motorischen Zentren handelt (Schmidt and Ache, 1996). Olfaktorische Eingänge von den Antennulae projizieren dagegen zum olfaktorischen Neuropil (ON; Sandeman et al., 1992), welches glomeruläre Strukturen enthält, wie sie auch bei Insekten oder Vertebraten vorkommen (Lancet, 1986; Homberg et al., 1989). Die Sinneszellen projizieren im Glomerulus direkt auf Ausgangsneurone, sogenannte Projektionsneurone, und verschalten parallel auf hemmende Interneurone innerhalb des Glomerulus. Diese grundsätzliche Verschaltung ist bei Invertebraten und Vertebraten gleich (Lancet, 1986; Dudel et al., 2001). In Arthropoden projizieren die Ausgangsneurone zum lateralen Protocerebrum, in dekapoden Krustazeen in die Medulla terminalis. Die Medulla terminalis ist dabei vergleichbar mit dem Pilzkörper von Insekten. In beiden Regionen konvergieren z.B. olfaktorische, visuelle und mechanosensorische Informationen (Li and Strausfeld, 1997). Maynard und Dingle (1963) zeigten in der Languste *P. argus* durch verschiedene Läsionsexperimente, dass dekapode Krebse prinzipiell in der Lage sind, visuelle und olfaktorische Informationen zusammenhängend zu verarbeiten und dass dies im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme auch funktionell relevant ist. Eine durch chemotaktile Stimulation der Antennulae ausgelöste Futtersuche sowie das gesamte Fütterungsverhalten wurden durch eine Läsion des Augenstiels gestört, während andere Motorik, wie z.B. der Putzreflex der Antennulae erhalten blieb. Die meisten Ausgänge aus der Medulla terminalis projizieren in den Zentralkörper (CB) im medianen Protocerebrum (Utting et al., 2000). Welchen Weg die Information anschließend nimmt ist allerdings unklar, insbesondere auch, wie sie in den Bereich des Zellclusters 17 mit den Somata der IV Neurone gelangt. Im Generellen konnte die Funktion des Zentralkörpers bisher noch nicht genau geklärt werden. Für Zellcluster 17, in dem sich die Somata der IV Neurone von *C. pagurus* befinden, wird vermutet, dass es Motoneurone enthält, welche die Bewegungen der Antennulae koordinieren (Sandeman et al., 1992; Renate Sandeman, persönliche Mitteilung). Allerdings wurde dieser Bereich bisher nicht genauer untersucht. Es könnte daher sein, dass in Zellcluster 17 bereits vorverarbeitete chemosensorische Information konvergiert und dort sowohl antennale Motoneurone als auch die IV Neurone beeinflusst. Es wäre allerdings auch möglich, dass Zellen aus dem Zellcluster 17 Axone in andere Bereiche des Gehirns projizieren und von dort sensorische Informationen an die IV Neurone weiterleiten.

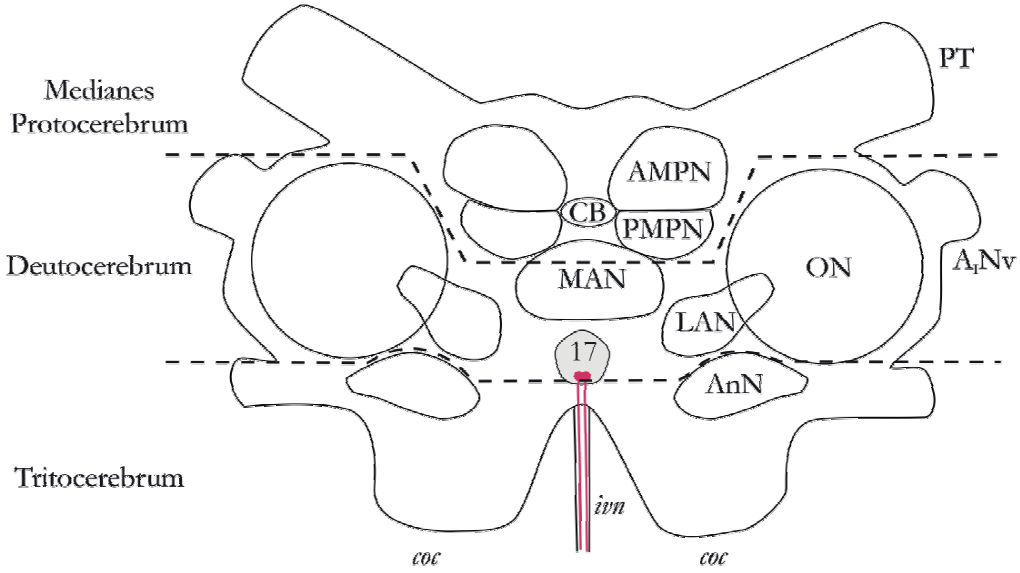


Abbildung 104: Schematische Darstellung des Gehirns mit medianem Protocerebrum, Deutocerebrum und Tritocerebrum mit verschiedenen Neuropilen. Die IV Neurone, deren Somata in Zellcluster 17 liegen (grau unterlegt) sind in rot dargestellt. AMPN: anteriores mediales protocerebrales Neuropil; AnN: Antenna II Neuropil; A_INv: Antennalnerv I; CB: Zentralkörper; *coc*:: circumoesophageale Kommissuren; *ivn*: inferiorer Ventrikularnerv; LAN: laterales Antenna I Neuropil; MAN: medianes Antenna I Neuropil; ON: olfaktorisches Neuropil; PMPN: posteriores mediales protocerebrales Neuropil; PT: protocerebraler Trakt; 17 (grau): posteriore Zellen (Zellcluster 17). Verändert nach Kirby and Nusbaum (2007) und Sandeman et al. (1992).

5.9 Verarbeitung von exterozeptiven und propriozeptiven Informationen im stomatogastrischen Nervensystem

Um ein Verhalten auslösen zu können, das an die entsprechende Situation angepasst ist, müssen zuerst die Informationen verschiedener Sinnesorgane verarbeitet und anschließend ein adäquates motorisches Muster generiert werden. Interessanterweise scheinen nicht nur sensorische Eingänge innerhalb des STNS, sondern auch Eingänge weiter entfernter Sinnesorgane die motorischen Zentren im STG zu beeinflussen. Chemosensorische Eingänge werden über die IV Neurone weiter an die STG Mustergeneratoren geleitet. Fleischer (1981) zeigte außerdem, dass optische Eingänge einen Einfluss auf den gastrischen Mühlenrhythmus haben können. Wie wird die Information vieler verschiedener Sinnesorgane und -modalitäten zusammengeführt und verarbeitet, so dass im Endeffekt ein an die Situation angepasstes Verhalten generiert werden kann? Die Verarbeitung könnte auf Ebene der CoG Projektionsneurone stattfinden. Die bekannten sensorischen Bahnen sowie die IV Neurone beeinflussen die STG Mustergeneratoren über diese modulatorischen CoG Projektionsneurone. Des

Weiteren haben Kirby and Nusbaum (2007) beschrieben, dass Neurone, die im Gehirn von *C. borealis* lokalisiert sind, über die *coc*s zu den CoGs projizieren und diese wahrscheinlich innervieren. Die Informationen höherer neuronaler Zentren und die verschiedener Sinnesmodalitäten konvergieren also möglicherweise auf Ebene der Projektionsneurone, bevor sie die motorischen Zentren erreichen. Die Projektionsneurone in den CoGs könnten daher eine entscheidende Rolle bei der Auswahl motorischer Muster darstellen. Die CoGs könnten dabei auch eine Schaltstelle zwischen dem Gehirn und dem Thorakalganglion darstellen. Nicht nur das Kauen der Nahrung im Kaumagen könnte durch die Projektionsneurone moduliert werden, sondern z.B. auch die Lokomotion des Krebses (Atwood and Wiersma, 1967; Bowerman and Larimer, 1974a; 1974b). Die CoG Projektionsneurone wären somit an der Verarbeitung verschiedener Sinnesmodalitäten und an der Ausführung wichtiger Entscheidungsprozesse beteiligt. So führt z.B. ein attraktiver chemosensorischer Reiz dazu, dass sich dekapode Krustazeen einem Duft annähern (Derby et al., 2001). Es wäre denkbar, dass gleichzeitig zur Orientierung hin zur Duftquelle der Verdauungstrakt als Vorbereitung auf eine mögliche Nahrungsaufnahme aktiviert wird.

Im stomatogastrischen Nervensystem wurden bisher mehrere sensorische Bahnen charakterisiert, die einen Einfluss auf die zentralen Mustergeneratoren im STNS haben. Dabei handelt es sich um die ventralen kardialen Neurone (VCNs; Beenhakker et al., 2004), den gastropylorischen Rezeptor 2 (GPR2; Blitz et al., 2004) und die anteriore gastrische Rezeptorzelle (AGR; Smarandache, 2007). Diese sensorischen Bahnen beeinflussen alle identifizierten Projektionsneurone und modulieren dadurch die motorische Mustergenerierung in den STG Netzwerken. Die ausgelösten Kaurhythmen sind dabei spezifisch und unterscheiden sich jeweils voneinander.

Die VCNs sind Mechanosensoren, die an der Innenseite der Magenwand des Magensacks lokalisiert und wahrscheinlich für die Messung des Füllzustandes des Magens verantwortlich sind. Eine VCN Stimulation kann einen lang anhaltenden GMR auslösen, der durch die simultane Aktivität von MCN1 und CPN2 bedingt ist (Beenhakker et al., 2004; Beenhakker and Nusbaum, 2004), obwohl auch MCN5 und MCN7 von den VCNs beeinflusst werden. GPR2 ist ein Streckrezeptor, der durch Kontraktion oder passive Dehnung eines Muskels aktiviert wird. Eine Stimulation von GPR2 löst einen GMR aus, der allerdings nur für die Dauer der Stimulation anhält. Dabei sind ebenfalls die Projektionsneurone MCN1 und CPN2 essentiell (Blitz et al., 2004). Die anteriore gastrische Rezeptorzelle (AGR) ist ein Muskelsehnenorgan, das durch die Kontraktion zweier gastrischer Muskeln aktiviert werden kann

(Smarandache, 2007). AGR kann durch rhythmische Aktivierung einen GMR auslösen, wobei hier die Aktivität von CPN2 wahrscheinlich hinreichend für das Auslösen des GMR ist. In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die IV Neurone ebenfalls alle vier identifizierten CoG Projektionsneurone beeinflussen. MCN1 war notwendig, um durch *ivn* Stimulation einen GMR auslösen zu können (siehe Abschnitt 4.8). Der ausgelöste GMR war dem VCN-GMR sehr ähnlich.

Die bisher charakterisierten Sinnesorgane lösen trotz Beeinflussung derselben modulatorischen CoG Projektionsneurone unterschiedliche, wenn auch zum Teil ähnliche gastrische Mühlenrhythmen aus. Wie können aber unterschiedliche gastrische Mühlenrhythmen ausgelöst werden, obwohl dieselben CoG Projektionsneurone von allen charakterisierten sensorischen Bahnen beeinflusst werden? Im Folgenden sollen daher vier mögliche Lösungsansätze vorgestellt werden: 1. eine unterschiedliche Kombination der verschiedenen Projektionsneurone, 2. eine unterschiedliche Aktivierung der Projektionsneurone, 3. ein direkter Einfluss auf Motoneurone und 4. ein Aktivieren aktiver Membraneigenschaften der Projektionsneurone.

1. Eine Möglichkeit ist, dass die sensorischen Bahnen die Aktivitäten unterschiedlicher CoG Projektionsneurone kombinieren, um differenzierte gastrische Rhythmen auszulösen. Die Eigenschaften der ausgelösten GMR, wie z.B. Periodendauer, Phasenlagen der gastrischen Neurone oder die Anzahl der Spikes pro Burst, könnten also von der Kombination der aktivierten Projektionsneurone abhängig sein. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass AGR im Gegensatz zu den VCNs, GPR2 und den IV Neuronen das Projektionsneuron MCN1 hemmt. Dadurch wird ein GMR ausgelöst, der sich vor allem von einem durch GPR2 Stimulation ausgelösten GMR unterscheidet. Während GPR2 die Retraktion fördert, unterstützt die AGR Aktivität eine Protraktion. Durch die unterschiedliche Beeinflussung von MCN1 kann es zum Auslösen dieser unterschiedlichen gastrischen Rhythmen kommen. Obwohl die VCNs, GPR2 und die IV Neurone dieselben Projektionsneurone erregen, sind die ausgelösten gastrischen Rhythmen trotzdem unterschiedlich. Im Gegensatz zu AGR benötigen die VCNs, GPR2 und die IV Neurone MCN1 und vermutlich auch CPN2 (bei den IV Neuronen nicht untersucht), um einen GMR auszulösen. Diese ausgelösten gastrischen Rhythmen könnten nicht nur von der Aktivität von MCN1 und CPN2 abhängen, sondern zusätzlich noch von der Aktivität weiterer Projektionsneurone, wie MCN5 und MCN7. In Blitz et al. (2004) wurde die Beteiligung von MCN5 und MCN7 nach einer VCN und während einer GPR2 Stimulation ausgeschlossen. Hierbei reichte die Aktivität von MCN5 und MCN7 während der Stimulation nicht aus, um die STG Neurone effektiv zu beeinflussen. Die

Aktivierung weiterer, bisher nicht identifizierter Projektionsneurone kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Auch für das Auslösen eines GMR durch die IV Neurone ist die Aktivierung von MCN1 essentiell (siehe Abschnitt 4.8). Obwohl die Aktivität von MCN5 während der Stimulation aufgrund der starken elektrischen Kopplung zwischen den IV Neuronen und MCN5 stark ansteigt, ist MCN5 scheinbar nicht am Auslösen eines GMR beteiligt (siehe Abbildung 90). Allerdings hat die hohe Aktivität wahrscheinlich einen Einfluss auf den pylorischen Rhythmus, der dadurch wiederum den gastrischen Rhythmus beeinflussen kann (siehe Abschnitt 2.3.2).

2. Die Projektionsneurone könnten außerdem unterschiedlich aktiviert werden. So wird MCN1 z.B. durch eine VCN Stimulation stärker aktiviert, als durch eine GPR2 Stimulation. Die MCN1 Frequenz ist bei einer VCN Stimulation höher als bei einer vergleichbaren GPR2 Stimulation. Aufgrund dieser stärkeren Aktivierung ist der durch VCN Stimulation ausgelöste GMR schneller, die Periodendauer ist verkürzt. Zusätzlich könnten die STG Terminalen der Projektionsneurone unterschiedlich von den sensorischen Neuronen beeinflusst werden. So hemmt GPR2 z.B. die STG Terminale von MCN1 präsynaptisch und kann so die Retraktorphase des GMR verlängern (Beenhakker et al., 2005). Eine präsynaptische Inhibition der VCNs und der IV Neurone ist bisher allerdings noch nicht untersucht worden. Da die STG Terminalen der Projektionsneurone durch GPR2 präsynaptisch gehemmt werden, GPR2 die Projektionsneurone also direkt im STG beeinflusst, wäre ein Einfluss der sensorischen Neurone auf die STG Neurone ebenfalls denkbar.

3. Ein weiterer Grund für das Auslösen unterschiedlicher gastrischer Rhythmen könnte also der Einfluss direkter Synapsen auf STG Neurone sein. Es ist bekannt, dass GPR2 selbst im isolierten STG starke, direkte erregende Einflüsse auf verschiedene gastrische Neurone hat (Blitz et al., 2004). Wenn die CoGs nicht vorhanden sind, haben die VCNs im Gegensatz dazu nur einen sehr schwachen, möglicherweise indirekten Einfluss auf die gastrischen STG Neurone (über den direkten erregenden Einfluss auf pylorische Neurone, siehe Abschnitt 2.3.2). In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die IV Neurone ohne vorhandene CoGs keinen GMR auslösen können (siehe Abbildung 62). Dies deutet darauf hin, dass die gastrischen Motoneurone nicht direkt beeinflusst werden. Die IV Neurone sind allerdings die einzigen der hier vorgestellten sensorischen Neurone, welche die Aktivität der STG Neurone hemmen, nämlich über den Neurotransmitter Histamin. Obwohl Histamin den GMR nicht hemmt (siehe Abbildung 91), könnte es die Eigenschaften (Phasenlage, Burstdauer, Spikefrequenzen o.ä.) beeinflussen. Dadurch, dass Histamin einzelne pylorische Neurone hemmt

(siehe Abschnitt 4.9.1), kann der GMR auch über die gastropylorische Interaktion beeinflusst werden.

4. Vergleicht man bei den verschiedenen sensorischen Bahnen die Dauer des ausgelösten GMR, so treten Unterschiede auf. Die gastrischen Rhythmen, die durch eine Stimulation von GPR2, AGR und den IV Neuronen ausgelöst werden, dauern nur für die Zeit der Stimulation an. Bei der Aktivierung der VCNs wird jedoch ein auch nach dem Reiz lang anhaltender GMR ausgelöst, da nach einer VCN Stimulation MCN1 und CPN2 weiterhin rhythmisch aktiv sind und damit für das Aufrechterhalten eines GMR sorgen. Die aktiven Membraneigenschaften von MCN1 und CPN2 scheinen also durch die Aktivierung der VCNs beeinflusst zu werden. Die VCNs aktivieren oder beeinflussen möglicherweise einen Strom, der Plateaueigenschaften in MCN1 und CPN2 auslöst. Die intrinsischen Eigenschaften der Zellen nach VCN Stimulation divergieren also von denen nach AGR-, GPR2- oder IV Neuronen Reizung. Solche Veränderungen der Membraneigenschaften einzelner Zellen können daher ebenfalls zum Auslösen unterschiedlicher GMR beitragen.

Wie schon oben erwähnt, beeinflussen die VCNs, AGR, GPR2 und die IV Neurone alle vier identifizierten Projektionsneurone. Bei den Effekten auf die STG Mustergeneratoren sind dabei hauptsächlich MCN1 und CPN2 beteiligt. Wie kommt es aber, dass gerade diese vier der 20 CoG Projektionsneurone beeinflusst werden? Sind die Projektionsneurone, die bisher nicht identifiziert wurden, auch involviert? Bisher wurden keine weiteren CoG Projektionsneurone charakterisiert, die einen Einfluss auf die Mustergeneration im STG haben. Die vier identifizierten Projektionsneurone beeinflussen die Mustergeneratoren im STG dagegen jeweils deutlich. Es wäre daher möglich, dass keine weiteren oder nur wenige Projektionsneurone an der Modulation der STG Netzwerke beteiligt sind. Diese bisher nicht identifizierten Projektionsneurone könnten z.B. zwei weitere Rhythmen, die im STNS generiert werden, beeinflussen: den oesophagealen Rhythmus und den Rhythmus, der die Bewegungen des Magensacks steuert. Letzterer tritt in Brachyura nicht spontan auf und wurde daher bislang nicht charakterisiert. Es wäre also möglich, dass die Aktivität der unbekannten Projektionsneurone diesen Rhythmus beeinflusst, und dass aufgrund zu geringer Aktivität der Projektionsneurone im isolierten STNS dieser Rhythmus nicht aktiv ist. Auffällig ist auch, dass am Auslösen eines GMR durch die sensorischen Neurone hauptsächlich MCN1 und CPN2 beteiligt sind. Es ist daher denkbar, dass diese beiden Neurone für das Auslösen des GMR verantwortlich sind, während weitere CoG Projektionsneurone die Eigenschaften der ausgelösten Rhythmen, wie z.B. die Phasenlage der gastrischen Neurone oder die Aktivität der

einzelnen gastrischen Neurone, beeinflussen. Außerdem könnten zusätzlich weitere Neurone der 500 CoG Zellen durch die sensorischen Eingänge beeinflusst werden und einen indirekten Effekt auf die Aktivität der vier Projektionsneurone haben. Diese Zellen könnten aber nicht nur durch die sensorischen Neurone im STNS beeinflusst werden, sondern auch eine Rolle in der Verarbeitung weiterer sensorischer Eingänge spielen. Da die *coc*s die CoGs sowohl mit dem Gehirn als auch mit dem Thorakalganglion verbinden, könnten diese Neurone auch eine Schaltinstanz zwischen Gehirn und Thorakalganglion darstellen. Auf diesem Weg können so möglicherweise verschiedene Reize (z.B. chemosensorische Eingänge vom Gehirn) verarbeitet werden und zum Auslösen eines Verhaltens führen, wie z.B. lokomotorische Bewegungen hin zu einer möglichen Nahrungsquelle.

5.10 Vergleich der IV Neurone mit höheren neuronalen Zentren in verschiedenen Invertebraten- und Vertebratenarten

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass chemosensorische Stimuli einen Einfluss auf die Aktivität vom Gehirn absteigender Bahnen haben, CoG Projektionsneurone aktivieren und dadurch motorische Muster modulieren. Um ein adäquates motorisches Muster generieren zu können, muss das Nervensystem aber verschiedene sensorische Modalitäten verarbeiten und gegeneinander abwägen. Die CoG Projektionsneurone in Krustazeen scheinen an der Verarbeitung verschiedener Sinnesmodalitäten und an der Entscheidungsfindung beteiligt zu sein (siehe Abschnitt 5.9). Ist diese Hypothese einer Konvergenz verschiedener sensorischer Informationen übertragbar auf andere Systeme? Wie kann das Zentralnervensystem entscheiden, ob bei zwei verschiedenen sensorischen Eingängen die gleiche Reaktion erfolgen soll bzw. ob bei gleichen Stimuli unterschiedliche motorische Muster generiert werden müssen?

Die Aktivität von motorischen Netzwerken wird sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten über sensorische Rückmeldungen und aufsteigende neuronale Strukturen reguliert (siehe Abbildung 105; Spirito, 1975; Fleischer, 1981; Brodfuehrer and Thorogood, 2001; Perrins et al., 2002). Die sensorischen Eingänge sorgen dafür, dass das resultierende Verhalten an die vorhandene Situation angepasst wird (für Zusammenfassung siehe Grillner, 2003; Rossignol et al., 2006). Die Prozesse der Entscheidungsfindung wurden dabei in verschiedenen Invertebraten- und Vertebratenarten untersucht.

Im Blutegel *Hirudo medicinalis* z.B. können abhängig von der Tiefe des Wassers, in dem sich das Tier befindet, durch dieselbe Stimulation am Hinterende des Tieres zwei verschiedene Fort-

bewegungsverhalten ausgelöst werden: Ist das Wasser tief genug, beginnt der Blutegel zu schwimmen, ist der Wasserstand dagegen niedrig, bewegt sich das Tier kriechend fort. Esch et al. (2002) identifizierten ein im Gehirn des Blutegels lokalisiertes Paar an Interneuronen, das daran beteiligt ist, eine Entscheidung hinsichtlich der Fortbewegungsart zu treffen. Diese in einem Zellcluster im dorsalen Bereich des Gehirns lokalisierten Interneurone werden als R3b1 bezeichnet und können entweder Schwimm- oder Kriechbewegungen auslösen. Welches Verhalten diese Interneurone letztendlich veranlassen, ist abhängig von sensorischen Eingängen und kann z.B. durch den Wasserstand beeinflusst werden. Wie die Information über die Tiefe des Wassers aufgenommen wird, ist bisher noch unklar. Sowohl die R3b1 als auch die sensorische Information über den Wasserstand konvergieren auf Ebene eines Netzwerks, das unter anderem eine Körperstreckung des Blutegels generiert, wodurch entweder Schwimm- oder Kriechbewegungen ausgelöst werden. Im Blutegel werden also ebenfalls verschiedene sensorische Eingänge auf einer Ebene verrechnet, um ein adäquates Verhalten auszulösen, in diesem Fall mechanosensorische Stimuli und Stimuli, die sich auf die Tiefe des den Blutegel umgebenden Mediums beziehen.

Ein weiteres Beispiel dafür, dass gleiche Stimuli unterschiedliche motorische Aktivitäten auslösen können, findet sich in der marinen Schnecke *Pleurobranchaea californica*. Eine Verhaltensstudie von Gillette et al. (2000) zeigt, dass der Sättigungszustand von *Pleurobranchaea californica* die Entscheidung zur Nahrungsaufnahme beeinflusst. Ein chemosensorischer Stimulus kann, abhängig vom Sättigungsgrad des Tieres, aversives oder appetitives Verhalten auslösen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sensorische Bahnen, die chemosensorische Informationen weiterleiten, mit dem Sättigungszustand des Tieres verrechnet werden und Zugang zu den neuronalen Netzwerken haben, die, je nach Sättigungsgrad, Fütterungs- oder Vermeidungsverhalten auslösen.

In Vertebraten findet man ein ähnliches Verarbeitungsmuster verschiedener Sinnesmodalitäten für das Auslösen eines adäquaten Verhaltens. Hierbei spielen die Basalganglien eine wichtige Rolle bei der Selektion verschiedener motorischer Muster (Grillner et al., 2005; Hikosaka et al., 2006). Die motorischen Netzwerke sind größtenteils in der Wirbelsäule lokalisiert, wie z.B. das für Lokomotion. Die spinalen Netzwerke werden durch retikulospinale Neurone der Retikularformation des Hirnstamms aktiviert, die wiederum Eingänge von einem der beiden übergeordneten Kommandozentren, der mesencephalen lokomotorischen Region (MLR) und der diencephalen lokomotorischen Region (DLR) erhalten. Diese Organisation blieb während der Evolution der Vertebraten erhalten (Grillner, 1985; , 2003). So löst eine Stimulation der

MLR ein aktives Schwimmverhalten in Neunaugen aus (Sirota et al., 2000). Bei Katzen hingegen löst dies ein fiktives Laufen aus (Shik et al., 1966). Die MLR wiederum steht unter inhibitorischer Kontrolle der Basalganglien (Grillner, 1985; Sirota et al., 2000; Grillner et al., 2000). Fällt diese Inhibition weg, so wird eine Fortbewegung ausgelöst, die allerdings noch nicht an die Situation angepasst ist. Dies geschieht anschließend über sensorische Kontrollsignale. Das motorische Muster muss an das jeweilige Terrain angepasst werden, um z.B. das Stolpern über einen Stein zu vermeiden. Diese Anpassung kann unter anderem über visuelle oder taktile Eingänge reguliert werden. Die verschiedenen Sinnesmodalitäten (auditorische, visuelle und vestibuläre Informationen) werden dabei hauptsächlich in den retikulospinalen Neuronen der Retikularformation des Hirnstamms verarbeitet (McClellan, 1986; Deliagina et al., 2000; Perrins et al., 2002). So erhalten die retikulospinalen Neurone im Neunauge z.B. somatosensorische und kutane Eingänge vom Körper (Dubuc et al., 1993a; 1993b; Di Prisco et al., 1995). Eine Berührung eines Neunauges an Kopf oder Körper löst dabei ein Schwimmverhalten aus, das es dem Tier erlaubt, sich vom Reiz wegzubewegen (McClellan, 1986). Da die retikulospinalen Neurone sensorische Informationen vieler verschiedener Modalitäten verarbeiten und die lokomotorischen Netzwerke im Rückenmark verbinden, sind sie unter anderem sehr wichtig für das Auslösen und das adäquate Ausführen (z.B. der Fluchtrichtung) solcher Fluchtverhalten (Di Prisco et al., 2000).

Die Konvergenz verschiedener Sinnesmodalitäten auf definierte Neurone und die Beteiligung dieser Neurone am Auslösen eines adäquaten Verhaltens zeigt sich also sowohl bei Invertebraten- als auch bei Vertebratensystemen. Wie entscheiden diese Neurone, in denen die verschiedenen Informationen zusammenlaufen, letztendlich, welches Verhalten ausgelöst wird? Der Entscheidungsprozess kann auf zellulärer Ebene nur in Invertebratensystemen untersucht werden. In meiner Arbeit konnte ich den Einfluss chemosensorischer Stimuli auf Mustergeneratoren in *C. pagurus* zeigen. Die IV Neurone werden durch solche chemosensorischen Stimuli aktiviert und beeinflussen die motorischen Muster im STG über die Aktivität verschiedener modulatorischer CoG Projektionsneurone. Wie in Abschnitt 5.9 beschrieben, unterstützen meine Ergebnisse die Hypothese, dass ein kombinatorischer Code benutzt wird, um ein motorisches Muster auszulösen.

Die Selektion motorischer Muster verläuft in den meisten untersuchten Invertebraten- und Vertebratensystemen in einer hierarchischen Folge von Verarbeitungsschritten, welche sich neuronalen Zentren zuordnen lassen. In Abbildung 105 sind diese neuronalen Zentren vereinfacht für Säuger und das stomatogastrische Nervensystem von Krustazeen dargestellt. Bei

Vertebraten werden die verschiedenen sensorischen Eingänge größtenteils im Hirnstamm verarbeitet, in Krustazeen in den Kommissuralganglien. Die sensorischen Informationen können aber auch direkt in den zentralen Mustergenerator eingespeist werden und die motorischen Muster direkt beeinflussen (z.B. GPR2 beim Krebs).

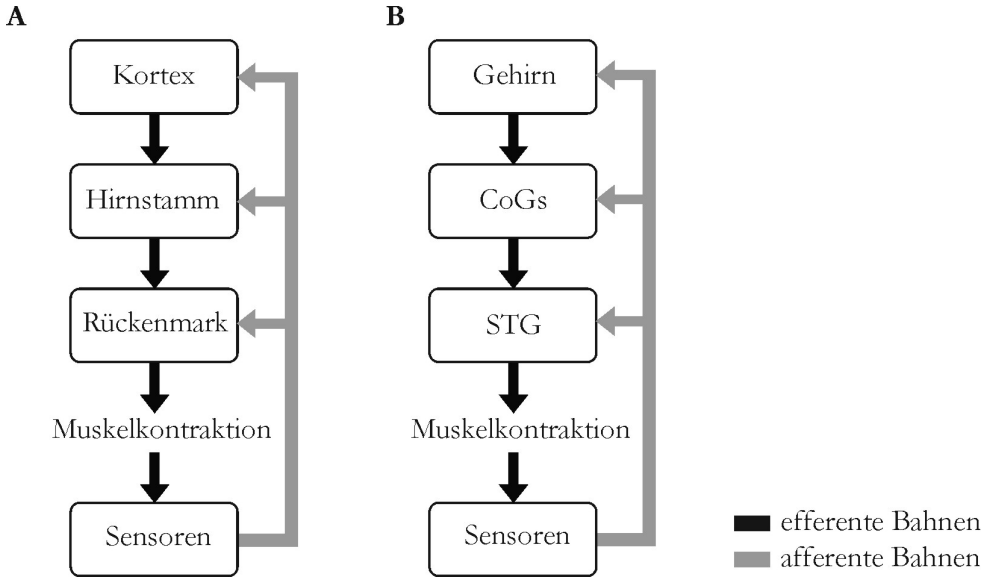


Abbildung 105: Vereinfachte Darstellung der Komponenten und Projektionen im Nervensystem von Säugern (A) sowie im STNS von Krustazeen (B). Die efferenten Bahnen (schwarz) durchlaufen in beiden Systemen eine hierarchische Abfolge von neuronalen Zentren. Die afferenten Fasern (grau) informieren über den Bewegungserfolg. A verändert nach Dudel et al., 2001.

Wie schon in Abschnitt 5.9 beschrieben kann z.B. die Konvergenz verschiedener Sinnesmodalitäten, die Verarbeitung der sensorischen Informationen und die anschließende Modulation der motorischen Zentren zu einem adäquaten Verhalten führen. Verschiedene andere Mechanismen können aber die Wirksamkeit der sensorischen Übertragung beeinflussen. So kann z.B. präsynaptische Inhibition eine bedeutende Rolle bei der Verarbeitung sensorischer Information spielen. Weitere Mechanismen, die an der Verarbeitung sensorischer Information und somit an der Selektion motorischer Muster beteiligt sein könnten, müssen in zusätzlichen Arbeiten untersucht werden, um unser Verständnis über sensorische Verarbeitung und Verhaltenskontrolle erweitern zu können.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die IV Neurone an der sensorischen Verarbeitung auf Ebene der CoG Projektionsneurone und somit an der Verhaltenskontrolle beteiligt sind. Die IV Neurone leiten chemosensorische Informationen an das STNS weiter und selektieren durch Kombination verschiedener Projektionsneurone ein neues motorisches Muster.

5.11 Ausblick

Die Kontrolle von Verhalten durch höhere neuronale Zentren, und insbesondere die von motorischen Netzwerken, ist komplex und erfordert die Interaktion vieler neuronaler Bereiche und die adäquate Verarbeitung vieler Sinnesmodalitäten. Meine Arbeit hat dabei die Verarbeitung chemorezeptiver Reize in höheren Zentren des Nervensystems als Grundlage für weiterführende Experimente untersucht. Im Zusammenhang mit früheren Ergebnissen deuten sich allgemeine Mechanismen der Selektion motorischer Muster aus multifunktionellen Netzwerken an. Um die Verarbeitung chemosensorischer Eingänge auf die motorische Mustergenerierung besser verstehen zu können, muss z.B. noch der Verarbeitungsweg zwischen Chemorezeptoren und den absteigenden IV Neuronen untersucht werden. In meinen Versuchen habe ich die Aktivität der IV Neurone ausschließlich extrazellulär abgeleitet und mögliche Eingänge aus Bereichen des Gehirns nicht untersucht. Um diese Eingänge zu charakterisieren, müssen die IV Neurone intrazellulär abgeleitet und die Effekte von Stimulationen der *coc*s oder der Antennalnerven untersucht werden. Zusätzlich könnten weitere Färbungen angefertigt werden, wie z.B. Dextran- oder Albuminfärbungen vom Zellcluster 17 aus, um die Projektionen der in diesem Zellcluster lokalisierten Neurone zu identifizieren. Zum anderen könnten die *coc*s oder die Antennalnerven retrograd gefüllt werden, um mögliche Projektionen in das Zellcluster 17 zu identifizieren.

Ein interessanter Aspekt des Einflusses der IV Neurone auf die STG Netzwerke zeigt sich in der selektiven Fortleitung von Aktionspotentialen nur in *sons* und im *stn*, obwohl meine retrograden Färbungen zeigen, dass die IV Neurone auch über die *ion*s zu den CoGs projizieren. Neuromodulatoren könnten diese Kompartimentierung der IV Neurone bewirken und somit eine zustandsabhängige Komponente zum Einfluss der IV Neurone hinzufügen. Ein Ansatzpunkt wäre daher, verschiedene Neuromodulatoren auf den Bereich zwischen *stn* und den *son*s zu applizieren (vergleiche hierzu Goaillard et al., 2004) und Veränderungen der IV Wirkung zu dokumentieren.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die IV Neurone, die durch chemosensorische Stimulation aktiviert wurden, die Projektionsneurone in den CoGs erregen. Da die CoGs anscheinend eine außerordentliche Rolle in der Verarbeitung von sensorischer Information innerhalb des STNS spielen (VCNs: Beenhakker and Nusbaum, 2004; GPR2: Blitz et al., 2004; AGR: Carmen Smarandache, persönliche Mitteilung), würde eine Untersuchung exterozeptiver Eingänge auf Ebene der CoGs unser Verständnis über sensorische Verarbeitung und

Verhaltenskontrolle erweitern. So könnte z.B. der *ion*, der die Axone der Projektionsneurone MCN1 und MCN5 enthält, im intakten Tier abgeleitet und der Einfluss verschiedener sensorischer Reizungen auf MCN1 und MCN5 untersucht werden. Erste Versuche dazu wurden bereits begonnen. In diesen Vorarbeiten habe ich *ion* und *dvn* simultan extrazellulär abgeleitet, und den Einfluss chemischer Signale auf MCN1 und MCN5 sowie auf pylorischen und gastrischen Rhythmus untersucht (siehe Abbildung 106).

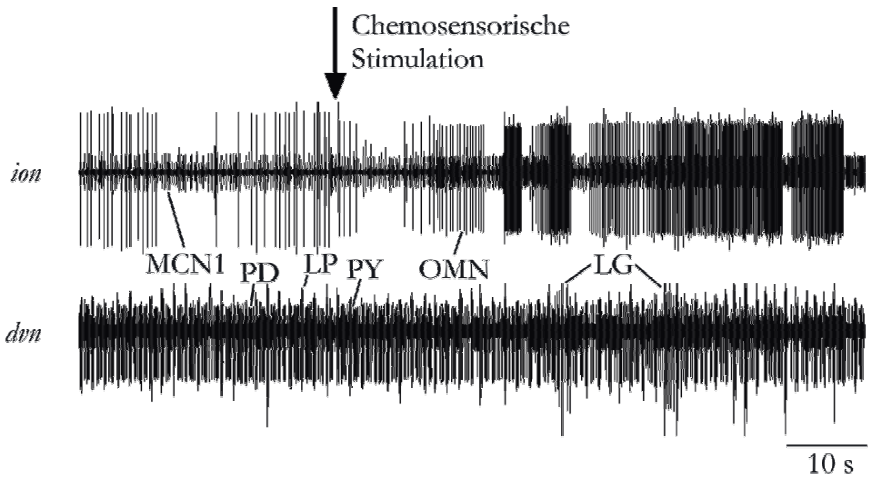


Abbildung 106: Chemosensorische Stimulation erregt MCN1 im intakten Tier. Extrazelluläre Ableitungen des *dvn*s mit der Aktivität von PD, LP, PY und LG (untere Spur) und des *ion*s mit der Aktivität von MCN1 und OMN (obere Spur). Durch eine chemosensorische Stimulation erhöhte sich die Aktivität von MCN1 und OMN, gleichzeitig begann LG zu bursten.

Dies könnte man auf andere Sinnesmodalitäten erweitern und den Einfluss weiterer sensorischer Organe auf Ebene der Projektionsneurone und der erhaltenen motorischen Muster untersuchen. Eine mögliche Verarbeitung verschiedener sensorischer Eingänge in den Projektionsneuronen würde einen weiteren Beitrag leisten zur Untersuchung der Selektion motorischer Muster aus einem multifunktionellen Netzwerk. Im Allgemeinen könnten diese Versuche daher unser Verständnis über die Entscheidungsfindung in verschiedenen Organismen vertiefen.

6 Literaturverzeichnis

1 **Anderson, W. W. and Kushner, P. D.** (1987). The pyloric pacemakers of the crayfish stomatogastric ganglion are conditional burster neurons. In *The Crustacean Stomatogastric System*, eds. A. I. Selverston and M. Moulins), pp. 139–145. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

2 **Atwood, H. L. and Wiersma, C. A. G.** (1967). Command Interneurons in the Crayfish Central Nervous System. *J Exp Biol* 46, 249-261.

3 **Bal, T., Nagy, F. and Moulins, M.** (1988). The pyloric central pattern generator in Crustacea: a set of conditional neuronal oscillators. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 163, 715-727.

4 **Bartos, M., Manor, Y., Nadim, F., Marder, E. and Nusbaum, M. P.** (1999). Coordination of fast and slow rhythmic neuronal circuits. *J Neurosci* 19, 6650-6660.

5 **Bartos, M. and Nusbaum, M. P.** (1997). Intercircuit control of motor pattern modulation by presynaptic inhibition. *J Neurosci* 17, 2247-2256.

6 **Bässler, U.** (1983). Neural Basis of Elementary Behavior in Stick Insects. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

7 **Bässler, U.** (1993). The walking-(and searching-) pattern generator of stick insects, a modular system composed of reflex chains and endogenous oscillators. *Biol Cybern* 69, 305-317.

8 **Beenhakker, M. P.** (2004). Sensory regulation of rhythmically active neuronal networks. In *School of Medicine*, vol. PhD. Philadelphia: University of Pennsylvania.

9 **Beenhakker, M. P., Blitz, D. M. and Nusbaum, M. P.** (2004). Long-lasting activation of rhythmic neuronal activity by a novel mechanosensory system in the crustacean stomatogastric nervous system. *J Neurophysiol* 91, 78-91.

10 **Beenhakker, M. P., DeLong, N. D., Saideman, S. R., Nadim, F. and Nusbaum, M. P.** (2005). Proprioceptor regulation of motor circuit activity by presynaptic inhibition of a modulatory projection neuron. *J Neurosci* 25, 8794-8806.

11 **Beenhakker, M. P. and Nusbaum, M. P.** (2004). Mechanosensory activation of a motor circuit by coactivation of two projection neurons. *J Neurosci* 24, 6741-6750.

12 **Blitz, D. M., Beenhakker, M. P. and Nusbaum, M. P.** (2004). Different sensory systems share projection neurons but elicit distinct motor patterns. *J Neurosci* 24, 11381-11390.

13 **Blitz, D. M., Christie, A. E., Coleman, M. J., Norris, B. J., Marder, E. and Nusbaum, M. P.** (1999). Different proctolin neurons elicit distinct motor patterns from a multifunctional neuronal network. *J Neurosci* 19, 5449-5463.

14 **Blitz, D. M. and Nusbaum, M. P.** (1997). Motor pattern selection via inhibition of parallel pathways. *J Neurosci* 17, 4965-4975.

15 **Blitz, D. M. and Nusbaum, M. P.** (1999). Distinct functions for cotransmitters mediating motor pattern selection. *J Neurosci* 19, 6774-6783.

16 **Böhm, H., Dybek, E. and Heinzel, H. G.** (2001). Anatomy and in vivo activity of neurons connecting the crustacean stomatogastric nervous system to the brain. *J Comp Physiol A* 187, 393-403.

17 **Borovikov, D., Evans, C. G., Jing, J., Rosen, S. C. and Cropper, E. C.** (2000). A Proprioceptive Role for an Exteroceptive Mechanoafferent Neuron in Aplysia. *J Neurosci* 20, 1990-2002.

18 **Bowerman, R. F. and Larimer, J. L.** (1974a). Command Fibres in the Circumoesophageal Connectives of Crayfish I. Tonic Fibres. *J Exp Biol* 60, 95-117.

19 **Bowerman, R. F. and Larimer, J. L.** (1974b). Command Fibres in the Circumoesophageal Connectives of Crayfish II. Phasic Fibres. *J Exp Biol* 60, 119-134.

20 **Brezina, V. and Weiss, K. R.** (1997). Analyzing the functional consequences of transmitter complexity. *Trends Neurosci* 20, 538-543.

21 **Brock, F.** (1926). Das Verhalten des Einsiedlerkrebses Pagurus arrosor herbst während der Suche und Aufnahme der Nahrung. Beitrag zu einer Umweltanalyse. *Zoomorphology* 6, 415-552.

22 **Brock, F.** (1930). Das Verhalten der ersten Antennen von Brachyuren und Anomuren in bezug auf das umgebende Medium. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 11, 774-790.

23 **Brodfuehrer, P. D. and Thorogood, M. S. E.** (2001). Identified neurons and leech swimming behavior. *Prog Neurobiol* 63, 371-381.

24 **Bucher, D., Thirumalai, V. and Marder, E.** (2003). Axonal dopamine receptors activate peripheral spike initiation in a stomatogastric motor neuron. *J Neurosci* 23, 6866-6875.

25 **Cazalets, J. R., Nagy, F. and Moulins, M.** (1987). Suppressive control of a rhythmic central pattern generator by an identified modulatory neuron in crustacea. *Neurosci Lett* 81, 267-272.

26 **Cazalets, J. R., Nagy, F. and Moulins, M.** (1990a). Suppressive control of the crustacean pyloric network by a pair of identified interneurons. I. Modulation of the motor pattern. *J Neurosci* 10, 448-457.

27 **Cazalets, J. R., Nagy, F. and Moulins, M.** (1990b). Suppressive control of the crustacean pyloric network by a pair of identified interneurons. II. Modulation of neuronal properties. *J Neurosci* 10, 458-468.

28 **Christie, A. E., Stein, W., Quinlan, J. E., Beenhakker, M. P., Marder, E. and Nusbaum, M. P.** (2004). Actions of a histaminergic/peptidergic projection neuron on rhythmic motor patterns in the stomatogastric nervous system of the crab Cancer borealis. *J Comp Neurol* 469, 153-169.

29 **Claiborne, B. J. and Selverston, A. I.** (1984). Histamine as a neurotransmitter in the stomatogastric nervous system of the spiny lobster. *J Neurosci* 4, 708-721.

30 **Coleman, M. J., Meyrand, P. and Nusbaum, M. P.** (1995). A switch between two modes of synaptic transmission mediated by presynaptic inhibition. *Nature* 378, 502-505.

31 **Coleman, M. J. and Nusbaum, M. P.** (1994). Functional consequences of compartmentalization of synaptic input. *J Neurosci* 14, 6544-6552.

32 **Coleman, M. J., Nusbaum, M. P., Cournil, I. and Claiborne, B. J.** (1992). Distribution of modulatory inputs to the stomatogastric ganglion of the crab, Cancer borealis. *J Comp Neurol* 325, 581-594.

33 **Cottrell, G. A.** (1997). The first peptide-gated ion channel. *J Exp Biol* 200, 2377-2386.

34 **Cropper, E. C., Evans, C. G., Jing, J., Klein, A., Proekt, A., Romero, A. and Rosen, S. C.** (2004). Regulation of afferent transmission in the feeding circuitry of Aplysia. *Acta Biol Hung* 55, 211-220.

35 **Dando, M. R. and Selverston, A. I.** (1972). Command fibres from the supra-oesophageal ganglion to the stomatogastric ganglion in Panulirus argus. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 78, 138-175.

36 **Deliagina, T. G., Zelenin, P. V., Fagerstedt, P., Grillner, S. and Orlovsky, G. N.** (2000). Activity of Reticulospinal Neurons During Locomotion in the Freely Behaving Lamprey. *J Neurophysiol* 83, 853-863.

37 **Derby, C. D., Steullet, P., Horner, A. J. and Cate, H. S.** (2001). The sensory basis of feeding behaviour in the Caribbean spiny lobster, Panulirus argus. *Mar Freshw Res* 52, 1339-1350.

38 **Di Prisco, G. V., Ohta, Y., Bongianni, F., Grillner, S. and Dubuc, R.** (1995). Trigeminal inputs to reticulospinal neurones in lampreys are mediated by excitatory and inhibitory amino acids. *Brain Res* 695, 76-80.

39 **Di Prisco, G. V., Pearlstein, E., Le Ray, D., Robitaille, R. and Dubuc, R.** (2000). A Cellular Mechanism for the Transformation of a Sensory Input into a Motor Command. *J Neurosci* 20, 8169-8176.

40 **Dickinson, P. S. and Marder, E.** (1989). Peptidergic modulation of a multioscillator system in the lobster. I. Activation of the cardiac sac motor pattern by the neuropeptides proctolin and red pigment-concentrating hormone. *J Neurophysiol* 61, 833-844.

41 **Dubuc, R., Bongianni, F., Ohta, Y. and Grillner, S.** (1993a). Anatomical and Physiological Study of Brainstem Nuclei Relaying Dorsal Column. *J Comp Neurol* 327, 260 - 270.

42 **Dubuc, R., Bongianni, F., Ohta, Y. and Grillner, S.** (1993b). Dorsal root and dorsal column mediated synaptic inputs to reticulospinal neurons in lampreys: Involvement of glutamatergic, glycinergic, and GABaergic transmission. *J Comp Neurol* 327, 251-259.

43 **Dudel, J., Menzel, R. and Schmidt, R. F.** (2001). Neurowissenschaft: Vom Molekül zur Kognition. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

44 **Eckert, R., Randall, D. J. and Apfelbach, R.** (1993). Tierphysiologie. Stuttgart, New York: Thieme.

45 **Eisen, J. S. and Marder, E.** (1982). Mechanisms underlying pattern generation in lobster stomatogastric ganglion as determined by selective inactivation of identified neurons. III. Synaptic connections of electrically coupled pyloric neurons. *J Neurophysiol* 48, 1392-1415.

46 **Elphick, M. R., Kemenes, G., Staras, K. and O'Shea, M.** (1995). Behavioral role for nitric oxide in chemosensory activation of feeding in a mollusc. *J Neurosci* 15, 7653-7664.

47 **Esch, T., Mesce, K. A. and Kristan, W. B.** (2002). Evidence for Sequential Decision Making in the Medicinal Leech. *J Neurosci* 22, 11045-11054.

48 **Evans, C. G., Jing, J., Rosen, S. C. and Cropper, E. C.** (2003). Regulation of Spike Initiation and Propagation in an Aplysia Sensory Neuron: Gating-In via Central Depolarization. *J Neurosci* 23, 2920–2931.

49 **Fleischer, A. G.** (1981). The effect of eyestalk hormones on the gastric mill in the intact lobster, Panulirus interruptus. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 141, 363-368.

50 **Friesen, W. O. and Hocker, C. G.** (2001). Functional analyses of the leech swim oscillator. *J Neurophysiol* 86, 824-835.

51 **Garm, A., Shabani, S., Høeg, J. T. and Derby, C. D.** (2005). Chemosensory neurons in the mouthparts of the spiny lobsters Panulirus argus and Panulirus interruptus (Crustacea: Decapoda). *J Exp Mar Biol Ecol* 314, 175-186.

52 **Gillette, R., Huang, R. C., Hatcher, N. and Moroz, L. L.** (2000). Cost-benefit analysis potential in feeding behavior of a predatory snail by integration of hunger, taste, and pain. *Proc Natl Acad Sci US A* 97, 3585-3590.

53 **Gisselmann, G., Pusch, H., Hovemann, B. T. and Hatt, H.** (2002). Two cDNAs coding for histamine-gated ion channels in D. melanogaster. *Nat Neurosci* 5, 11-12.

54 **Goaillard, J. M., Schulz, D. J., Kilman, V. L. and Marder, E.** (2004). Octopamine modulates the axons of modulatory projection neurons. *J Neurosci* 24, 7063-7073.

55 **Grillner, S.** (1985). Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates. *Science* 228, 143-149.

56 **Grillner, S.** (2003). The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci* 4, 573-586.

57 **Grillner, S., Cangiano, L., Hu, G.-Y., Thompson, R., Hill, R. and Wallén, P.** (2000). The intrinsic function of a motor system - from ion channels to networks and behavior. *Brain Res* 886, 224-236.

58 **Grillner, S., Hellgren, J., Ménard, A., Saitoh, K. and Wikström, M. A.** (2005). Mechanisms for selection of basic motor programs–roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* 28, 364-370.

59 **Harris-Warrick, R. M., Marder, E., Selverston, A. I. and Moulins, M.** (1992). Dynamic biological networks: the stomatogastric nervous system. Cambridge: MIT Press.

60 **Hartline, D. K., Gassie, D. V. and Sirchia, C. D.** (1987). PY cell types in the stomatogastric ganglion of Panulirus. In *The Crustacean Stomatogastric System*, eds. A. I. Selverston and M. Moulins), pp. 75-77. Berlin, Heidelberg, New York: Spinger.

61 **Hashemzadeh-Gargari, H. and Freschi, J. E.** (1992). Histamine activates chloride conductance in motor neurons of the lobster cardiac ganglion. *J Neurophysiol* 68, 9-15.

62 **Heinzel, H. G., Weimann, J. M. and Marder, E.** (1993). The behavioral repertoire of the gastric mill in the crab, Cancer pagurus: an in situ endoscopic and electrophysiological examination. *J Neurosci* 13, 1793-1803.

63 **Hikosaka, O., Nakamura, K. and Nakahara, H.** (2006). Basal Ganglia Orient Eyes to Reward. *J Neurophysiol* 95, 567-584.

64 **Homberg, U., Christensen, T. A. and Hildebrand, J. G.** (1989). Structure and Function of the Deutocerebrum in Insects. *Annu Rev Entomol* 34, 477-501.

65 **Hooper, S. L. and Moulins, M.** (1990). Cellular and synaptic mechanisms responsible for a long-lasting restructuring of the lobster pyloric network. *J Neurophysiol* 64, 1574-1589.

66 **Hooper, S. L., Moulins, M. and Nonnotte, L.** (1990). Sensory input induces long-lasting changes in the output of the lobster pyloric network. *J Neurophysiol* 64, 1555-1573.

67 **Hooper, S. L., O'Neil, M. B., Wagner, R., Ewer, J., Golowasch, J. and Marder, E.** (1986). The innervation of the pyloric region of the crab, Cancer borealis: homologous muscles in decapod species are differently innervated. *J Comp Physiol A* 159, 227-240.

68 **Huxley, T. H.** (1880). The Crayfish: An Introduction to the Study of Zoology. Cambridge: MIT Press.

69 **Katz, P. S., Eigg, M. H. and Harris-Warrick, R. M.** (1989). Serotonergic/cholinergic muscle receptor cells in the crab stomatogastric nervous system. I. Identification and characterization of the gastropyloric receptor cells. *J Neurophysiol* 62, 558-570.

70 **Katz, P. S., Fickbohm, D. J. and Lynn-Bullock, C. P.** (2001). Evidence that the Central Pattern Generator for Swimming in Tritonia Arose from a Non-Rhythmic Neuromodulatory Arousal System: Implications for the Evolution of Specialized Behavior. *Am Zool* 41, 962-975.

71 **Katz, P. S. and Harris-Warrick, R. M.** (1989). Serotonergic/cholinergic muscle receptor cells in the crab stomatogastric nervous system. II. Rapid nicotinic and prolonged modulatory effects on neurons in the stomatogastric ganglion. *J Neurophysiol* 62, 571-581.

72 **Katz, P. S. and Harris-Warrick, R. M.** (1991). Recruitment of crab gastric mill neurons into the pyloric motor pattern by mechanosensory afferent stimulation. *J Neurophysiol* 65, 1442-1451.

73 **Kemenes, G., Elliot, C. J. H. and Benjamin, P. R.** (1986). Chemical and Tactile Inputs to the Lymnaea Feeding System: Effects on Behaviour and Neural Circuitry. *J Exp Biol* 122, 113-137.

74 **Kilman, V. L. and Marder, E.** (1996). Ultrastructure of the stomatogastric ganglion neuropil of the crab, Cancer borealis. *J Comp Neurol* 374, 362-375.

75 **Kirby, M. S. and Nusbaum, M. P.** (2007). Central nervous system projections to and from the commissural ganglion of the crab Cancer borealis. *Cell Tissue Res* 328, 625-637.

76 **Kristan, W. B., Jr., Calabrese, R. L. and Friesen, W. O.** (2005). Neuronal control of leech behavior. *Prog Neurobiol* 76, 279-327.

77 **Kupfermann, I.** (1991). Studies of Behavioral State in Aplysia. *Biol Bull* 180, 262-268.

78 **Lancet, D.** (1986). Vertebrate Olfactory Reception. *Annu Rev Neurosci* 9, 329-355.

79 **Le, T., Verley, D. R., Goaillard, J. M., Messinger, D. I., Christie, A. E. and Birmingham, J. T.** (2006). Bistable Behavior Originating in the Axon of a Crustacean Motor Neuron. *J Neurophysiol* 95, 1356-1368.

80 **Lechner, H. A., Baxter, D. A. and Byrne, J. H.** (2000a). Classical Conditioning of Feeding in Aplysia: I. Behavioral Analysis. *J Neurosci* 20, 3369-3376.

81 **Lechner, H. A., Baxter, D. A. and Byrne, J. H.** (2000b). Classical Conditioning of Feeding in Aplysia: II. Neurophysiological Correlates. *J Neurosci* 20, 3377-3386.

82 **Li, Y. and Strausfeld, N. J.** (1997). Morphology and sensory modality of mushroom body extrinsic neurons in the brain of the cockroach, Periplaneta americana. *J Comp Neurol* 387, 631-650.

83 **Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P. and Ramirez, J. M.** (2000). Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat Neurosci* 3, 600-607.

84 **Marder, E.** (1998). From Biophysics to Models of Network Function. *Annu Rev Neurosci* 21, 25-45.

85 **Marder, E. and Bucher, D.** (2001). Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Curr Biol* 11, 986-996.

86 **Marder, E. and Calabrese, R. L.** (1996). Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* 76, 687-717.

87 **Marder, E. and Eisen, J. S.** (1984a). Electrically coupled pacemaker neurons respond differently to same physiological inputs and neurotransmitters. *J Neurophysiol* 51, 1362-1374.

88 **Marder, E. and Eisen, J. S.** (1984b). Transmitter identification of pyloric neurons: electrically coupled neurons use different transmitters. *J Neurophysiol* 51, 1345-1361.

89 **Maynard, D. M.** (1972). Simpler networks. *Ann. NY Acad. Sci* 193, 59-72.

90 **Maynard, D. M. and Dingle, H.** (1963). An effect of eyestalk ablation on antennular function in the spiny lobster, Panulirus argus. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 46, 515-540.

91 **Maynard, D. M. and Selverston, A. I.** (1975). Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 100, 161-182.

92 **McClellan, A. D.** (1986). Command systems for initiating locomotion in fish and amphibians: parallels to initiation systems in mammals. In *Neurobiology of Vertebrate Locomotion*, eds. S. Grillner R. Herman D. Stein and D. Stuart), pp. 1-20. Basingstoke: Macmillan Press.

93 **Meyrand, P., Simmers, J. and Moulins, M.** (1991). Construction of a pattern-generating circuit with neurons of different networks. *Nature* 351, 60-63.

94 **Meyrand, P., Simmers, J. and Moulins, M.** (1994). Dynamic construction of a neural network from multiple pattern generators in the lobster stomatogastric nervous system. *J Neurosci* 14, 630-644.

95 **Miller, J. P. and Selverston, A. I.** (1982). Mechanisms underlying pattern generation in lobster stomatogastric ganglion as determined by selective inactivation of identified neurons. IV. Network properties of pyloric system. *J Neurophysiol* 48, 1416-1432.

96 **Mulloney, B. and Hall, W. M.** (1991). Neurons with histaminelike immunoreactivity in the segmental and stomatogastric nervous systems of the crayfishPacifastacus leniusculus and the lobsterHomarus americanus. *Cell Tissue Res* 266, 197-207.

97 **Nadim, F., Manor, Y., Nusbaum, M. P. and Marder, E.** (1998). Frequency regulation of a slow rhythm by a fast periodic input. *J Neurosci* 18, 5053-5067.

98 **Nakamura, H., Kojima, S., Kobayashi, S., Ito, I., Fujito, Y., Suzuki, H. and Ito, E.** (1999). Physiological characterization of lip and tentacle nerves in Lymnaea stagnalis. *Neurosci Res* 33, 291-298.

99 **Norris, B. J., Coleman, M. J. and Nusbaum, M. P.** (1994). Recruitment of a projection neuron determines gastric mill motor pattern selection in the stomatogastric nervous system of the crab, Cancer borealis. *J Neurophysiol* 72, 1451-1463.

100 **Norris, B. J., Coleman, M. J. and Nusbaum, M. P.** (1996). Pyloric motor pattern modification by a newly identified projection neuron in the crab stomatogastric nervous system. *J Neurophysiol* 75, 97-108.

101 **Nusbaum, M. P.** (2002). Regulating peptidergic modulation of rhythmically active neural circuits. *Brain Behav Evol* 60, 378-387.

102 **Nusbaum, M. P. and Beenhakker, M. P.** (2002). A small-systems approach to motor pattern generation. *Nature* 417, 343-350.

103 **Nusbaum, M. P., Blitz, D. M., Swensen, A. M., Wood, D. and Marder, E.** (2001). The roles of co-transmission in neural network modulation. *Trends Neurosci* 24, 146-154.

104 **Nusbaum, M. P. and Marder, E.** (1989). A modulatory proctolin-containing neuron (MPN). I. Identification and characterization. *J Neurosci* 9, 1591-1599.

105 **Nusbaum, M. P., Weimann, J. M., Golowasch, J. and Marder, E.** (1992). Presynaptic control of modulatory fibers by their neural network targets. *J Neurosci* 12, 2706-2714.

106 **Ohnuma, K., Whim, M. D., Fetter, R. D., Kaczmarek, L. K. and Zucker, R. S.** (2001). Presynaptic target of Ca2+ action on neuropeptide and acetylcholine release in Aplysia californica. *J Physiol* 535, 647-662.

107 **Parsons, M. E. and Ganellin, C. R.** (2006). Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol* 147, 127-135.

108 **Pearson, K. G.** (2004). Generating the walking gait: role of sensory feedback. *Prog Brain Res* 143, 123-129.

109 **Perrins, R., Walford, A. and Roberts, A.** (2002). Sensory activation and role of inhibitory reticulospinal neurons that stop swimming in hatchling frog tadpoles. *J Neurosci* 22, 4229-4240.

110 **Richter, S. and Scholtz, G.** (2001). Phylogenetic analysis of the Malacostraca (Crustacea). *J. Zool. Syst. Evol. Res* 39, 113-136.

111 **Rosen, S. C., Miller, M. W., Cropper, E. C. and Kupfermann, I.** (2000). Outputs of Radula Mechanoafferent Neurons in Aplysia are Modulated by Motor Neurons, Interneurons, and Sensory Neurons. *J Neurophysiol* 83, 1621-1636.

112 **Rossignol, S., Dubuc, R. and Gossard, J. P.** (2006). Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiol Rev* 86, 89-154.

113 **Russell, D. F. and Hartline, D. K.** (1981). A multiaction synapse evoking both EPSPs and enhancement of endogenous bursting. *Brain Res* 223, 19-38.

114 **Saideman, S. R., Blitz, D. M. and Nusbaum, M. P.** (2007). Convergent Motor Patterns from Divergent Circuits. *J Neurosci* 27, 6664-6674.

115 **Sandeman, D., Sandeman, R., Derby, C. and Schmidt, M.** (1992). Morphology of the Brain of Crayfish, Crabs, and Spiny Lobsters: A Common Nomenclature for Homologous Structures. *Biol Bull* 183, 304-326.

116 **Schachtner, J., Schmidt, M. and Homberg, U.** (2005). Organization and evolutionary trends of primary olfactory brain centers in Tetraconata (Crustacea+ Hexapoda). *Arthropod Struct Dev* 34, 257-299.

117 **Schmidt, M. and Ache, B. W.** (1996). Processing of antennular input in the brain of the spiny lobster, Panulirus argus. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 178, 579-604.

118 **Shaw, B. K. and Kristan Jr, W. B.** (1997). The Neuronal Basis of the Behavioral Choice between Swimming and Shortening in the Leech: Control Is Not Selectively Exercised at Higher Circuit Levels. *J Neurosci* 17, 786-795.

119 **Shik, M. L., Severin, F. V. and Orlovskii, G. N.** (1966). Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain. *Biofizika* 11, 659-666.

120 **Sigvardt, K. A. and Mulloney, B.** (1982a). Properties of synapses made by IVN command-interneurones in the stomatogastric ganglion of the spiny lobster Panulirus interruptus. *J Exp Biol* 97, 153-168.

121 **Sigvardt, K. A. and Mulloney, B.** (1982b). Sensory alteration of motor patterns in the stomatogastric nervous system of the spiny lobster Panulirus interruptus. *J Exp Biol* 97, 137-152.

122 **Sirota, M. G., Di Prisco, G. V. and Dubuc, R.** (2000). Stimulation of the mesencephalic locomotor region elicits controlled swimming in semi-intact lampreys. *Eur J Neurosci* 12, 4081-4092.

123 **Skiebe, P.** (2001). Neuropeptides are ubiquitous chemical mediators: Using the stomatogastric nervous system as a model system. *J Exp Biol* 204, 2035-2048.

124 **Smarandache, C. R.** (2007). Der Einfluss eines Muskelsehnenorgans auf modulatorische Projektionsneurone und zentrale Mustergeneratoren im stomatogastrischen Nervensystem des Taschenkrebses. In *Institut für Neurobiologie*, vol. Dr. rer. nat. Ulm: Universität Ulm.

125 **Spirito, C. P.** (1975). The organization of the crayfish oesophageal nervous system. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 102, 237-249.

126 **Stein, W., DeLong, N. D., Wood, D. E. and Nusbaum, M. P.** (2007). Divergent co-transmitter actions underlie motor pattern activation by a modulatory projection neuron. *Eur J Neurosci* 26, 1148-1165.

127 **Stein, W., Eberle, C. C. and Hedrich, U. B. S.** (2005). Motor pattern selection by nitric oxide in the stomatogastric nervous system of the crab. *Eur J Neurosci* 21, 2767-2781.

128 **Turrigiano, G. G. and Heinzel, H. G.** (1992). Correlates of Stomatogastric Network Function. In *Dynamic Biological Networks: The Stomatogastric Nervous System*, eds. R. M. Harris-Warrick E. Marder A. I. Selverston and M. Moulins). Cambridge: MIT Press.

129 **Utting, M., Agricola, H. J., Sandeman, R. and Sandeman, D.** (2000). Central complex in the brain of crayfish and its possible homology with that of insects. *J. Comp. Neurol* 416, 245-261.

130 **Vedel, J. P. and Moulins, M.** (1977). Functional properties of interganglionic motor neurons in the stomatogastric nervous system of the rock lobster. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 118, 307-325.

131 **Weimann, J. M. and Marder, E.** (1994). Switching neurons are integral members of multiple oscillatory networks. *Curr Biol* 4, 896-902.

132 **Weimann, J. M., Marder, E., Evans, B. and Calabrese, R. L.** (1993). The effects of SDRNFLRFamide and TNRNFLRFamide on the motor patterns of the stomatogastric ganglion of the crab Cancer borealis. *J Exp Biol* 181, 1-26.

133 **Weimann, J. M., Meyrand, P. and Marder, E.** (1991). Neurons that form multiple pattern generators: identification and multiple activity patterns of gastric/pyloric neurons in the crab stomatogastric system. *J Neurophysiol* 65, 111-122.

134 **Whim, M. D., Niemann, H. and Kaczmarek, L. K.** (1997). The Secretion of Classical and Peptide Cotransmitters from a Single Presynaptic Neuron Involves a Synaptobrevin-Like Molecule. *J Neurosci* 17, 2338-2347.

135 **Wolf, H. and Pearson, K. G.** (1987). Flight motor patterns recorded in surgically isolated sections of the ventral nerve cord of Locusta migratoria. *J Comp Physiol A* 161, 103-114.

136 **Wood, D. E., Stein, W. and Nusbaum, M. P.** (2000). Projection neurons with shared cotransmitters elicit different motor patterns from the same neural circuit. *J Neurosci* 20, 8943-8953.

7 Abstract

The nervous system receives and processes sensory information from the environment and can thus respond to changes with the appropriate behaviour. The adequate response is pivotal for the survival of the animal. How the nervous system selects the adequate motor pattern, however, is not well understood. For the investigation of nervous system function and motor pattern selection in particular, one typically uses behaviours which comprise rhythmic components, such as walking, breathing or heartbeat. Such rhythmic movements are often driven by central pattern generators. The movements of the stomach of decapod crustaceans, for example, are generated by central pattern generators in the stomatogastric nervous system. They generate the oesophageal rhythm (swallowing), the gastric mill rhythm (chewing) and the pyloric rhythm (filtering). These rhythms are modulated by several projection neurons and they are affected by multiple sensory pathways. How higher neuronal centres like the brain select motor patterns out of these multifunctional networks and thus elicit appropriate behaviours is unknown.

In my thesis I characterised the projections of two descending brain pathways, the inferior ventricular neurons (IV neurons), in the crab, *Cancer pagurus*. In addition, their activation via sensory inputs as well as their effects on the central pattern generators located in the stomatogastric ganglion were analysed. In the intact animal chemosensory stimuli elicited rhythmic IV neuron bursts. Rhythmic IV neuron stimulation *in vitro* elicited gastric mill rhythms or entrained them, if they were already active. In addition, IV neuron stimulation excited the oesophageal motor neuron and inhibited several pyloric neurons. The central pattern generators in the stomatogastric nervous system were mostly affected indirectly via descending projection neurons located in the commissural ganglia. I thus characterised the interactions between the IV neurons and four identified CoG projection neurons and determined the synaptic connections between them. My findings support the hypothesis that the processing of different sensory information and the selection of motor patterns occur on the level of higher-order centres, namely in the crab on the level of projection neurons in the commissural ganglia.

8 Anhang

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die direkt oder indirekt am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren. Mein aufrichtiger und herzlicher Dank gilt:

Herrn PD Dr. Wolfgang Stein, meinem Doktorvater, für die intensive Betreuung, die große Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Außerdem möchte ich ihm für sein großes Vertrauen danken, das er mir entgegenbrachte und mir somit u.a. großartige „Forschungssommer" in Woods Hole ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. Harald Wolf, der mir diese Arbeit ermöglichte, einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellte und mit wertvollen Ideen und kreativen Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ohne sein Vertrauen und sein großes Interesse wäre diese Arbeit zu keiner Zeit möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Heinzel für die Bereitstellung der *in vivo* Versuchsapparatur und seine Hilfe bei den *in vivo* Ableitungen.

Herrn Dr. Wolfgang Mader für seine Hilfe bei großen und kleinen Computer-Problemen, und dafür, dass auch seine Türe immer für mich offen stand.

Frau Dr. Carmen Smarandache und Frau Nelly Daur für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Danke für die wunderbare Freundschaft, die sich im Laufe der Jahre entwickelt hat.

Meinen Promotionskolleginnen und -kollegen sowie meinen Bürokollegen für die schöne Zeit, die ich mit ihnen verbringen durfte, sowohl während als auch nach der Arbeitszeit.

Den fleißigen Helferinnen:

Frau Tina Eberle für ihre Hilfe bei der Durchführung retrograder Färbungen.

Frau Karin Dotzauer für das äußerst gründliche Korrekturlesen der Arbeit.

Frau Ursula Seifert für ihre große Hilfe bei organisatorischen Problemen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Neurobiologie für die gute Zusammenarbeit. Die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft haben wesentlich zur Motivation und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Sascha Klimosch für die Geduld, Unterstützung und Aufmunterung während der Durchführung der gesamten Arbeit, vor allem aber in der „Endphase".

Meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums moralisch und finanziell uneingeschränkt unterstützte und stets hinter mir stand.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Außerdem habe ich die Satzung der Universität Ulm zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet.

Ulrike Fridrich

Ulm, den 31. März 2008

Curriculum vitae

Name:	**Ulrike** Barbara Stefanie **Hedrich**
Institutsadresse:	Institut für Neurobiologie Universität Ulm D-89069 Ulm Deutschland Tel.: +49 (0)731 50 22 647 E-Mail: uli@neurobiologie.de
Privatadresse:	Goethestraße 11 89077 Ulm Deutschland Tel.: +49 (0)731 60 250 77
Geburtsdatum:	19. Mai 1980
Geburtsort:	Schwäbisch Gmünd
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	ledig

Persönliche Daten:

19.05.1980	Geboren in Schwäbisch Gmünd als zweites von zwei Kindern von Barbara Hedrich, geborene Haussmann (Hausfrau / Metallographin) und Prof. Dr.-Ing. Dieter Hedrich (Dipl.-Ing. Metallkunde).

Schule und akademische Ausbildung:

1986 – 1990	Klösterleschule in Schwäbisch Gmünd (Grundschule)
1990 – 1999	Parler-Gymnasium in Schwäbisch Gmünd
Juli 1999	Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife
1999–2004	Biologiestudium an der Universität Ulm
23.10.2001	Vordiplom (Gesamtnote: 2)
30.09.2004	Diplom (Hauptfach: Zoologie; Nebenfächer: Neurobiologie, Anthropologie und Informatik). Gesamtnote: 1,4.
seit 10/2004	Promotion an der Universität Ulm, Institut für Neurobiologie

Veröffentlichungen:

Wissenschaftliche Publikationen:

1. W. Stein, C. C. Eberle, U.B.S.Hedrich (2005) Motor pattern selection by nitric oxide in the stomatogastric nervous system of the crab. *Eur J Neurosci* 21, 2767-81.
2. W. Stein, C.R. Smarandache, M. Nickmann, U.B. Hedrich (2006) Functional consequences of activity-dependent synaptic enhancement at a crustacean neuromuscular junction. *J Exp Biol* 209(Pt 7):1285-300.
3. U.B.S. Hedrich & W. Stein (2008) Characterization of a descending pathway: Activation and effects on motor patterns in the crustacean stomatogastric nervous system. *J Exp Biol* (in press).
4. C.R. Smarandache, N. Daur, U.B.S. Hedrich, W. Stein (2008) Regulation of motor pattern frequency by switch of proprioceptive feedback sign. *Eur J Neurosci* (minor revisions).

Abstracts / Symposien:

1. C.C. Eberle, U.B.S. Hedrich, W. Stein (2004) Nitric oxide affects the central pattern generators in the stomatogastric nervous system of the crab. *Interdisciplinary College, Günne 2004*.
2. C.C. Eberle, U.B.S. Hedrich, W. Stein (2004) Nitric oxide indirectly affects a central pattern generator in the stomatogastric nervous system of the crab. *Society for Neuroscience Meeting 2004, San Diego.*
3. C.C. Eberle, U.B.S. Hedrich, W. Stein (2004) Nitric oxide indirectly affects a central pattern generator in the stomatogastric nervous system of the crab. *STG Meeting 2004, San Diego.*
4. U.B.S. Hedrich, C.C. Eberle & W. Stein (2005) Nitric oxide indirectly controls the central pattern generators in the stomatogastric nervous system of the crab. *30th. Göttingen Neurobiology Conference 2005, Göttingen.*

5. U.B.S. Hedrich, M. Nickmann, C.R. Smarandache &W. Stein (2005) Long term effects on facilitation at a neuromuscular junction of the crab. *Society for Neuroscience Meeting 2005, Washington D.C.*
6. W. Stein, W. Mader, C.R. Smarandache, U.B.S. Hedrich & J. Ausborn (2005) The effects of a sensory neuron on a central pattern generator in artificially closed loop conditions. *Society for Neuroscience Meeting 2005, Washington D.C.*
7. U.B.S. Hedrich, C.R. Smarandache & Wolfgang Stein (2006) How two brain cells affect the filtering and chewing of food in the foregut of the crab. *Society for Neuroscience Meeting 2006, Atlanta.*
8. C.R. Smarandache, U.B.S. Hedrich & W. Stein (2006) The influence of a sensory cell on projection neurons in the stomatogastric nervous system of the crab, *Cancer pagurus. Society for Neuroscience Meeting 2006, Atlanta.*
9. W. Stein, C. R. Smarandache, N. Daur & U.B.S. Hedrich (2006) In vivo activation of a sensory neuron in the stomatogastric nervous system of the crab. *Society for Neuroscience Meeting 2006, Atlanta.*
10. U.B.S. Hedrich, C.R. Smarandache & Wolfgang Stein (2007) Synaptic input to modulatory projection neurons. *31th. Göttingen Neurobiology Conference 2007, Göttingen.*
11. U.B.S. Hedrich & W. Stein (2007) From the brain to the motor system: *in vivo* characterization of a descending pathway in the crab *Cancer pagurus. Society for Neuroscience Meeting 2007, San Diego.*
12. C.R. Smarandache, U.B.S. Hedrich & W. Stein (2007) Convergence of a sensory pathway and a descending brain projection onto modulatory projection neurons. *Society for Neuroscience Meeting 2007, San Diego.*

Vorträge:

1. U.B.S. Hedrich, C.C. Eberle (2004) Nitric oxide indirectly controls the central pattern generators in the stomatogastric nervous system of the crab. *Arthropodenseminar 2004, Daun.*
2. U.B.S. Hedrich (2006) How two brain cells affect motor pattern generation in the stomatogastric nervous system of the crab. *Arthropodenseminar 2006, Schwandalpe, Allgäu.*

3. U.B.S. Hedrich (2007) Characterization of a descending pathway in the crab, *Cancer pagurus. Arthropodenseminar 2007, Ulm*
4. U.B.S. Hedrich (2007) The actions of a descending brain pathway on modulatory projection neurons and STG circuit neurons. *STG-Meeting 2007, San Diego.*