

**Aufbau und Materialeigenschaften kutikulärer  
Gelenkstrukturen und Infrarotrezeptoren bei Insekten und  
ihre funktionale Bedeutung**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Martin Müller

aus

Duisburg

Bonn, im Dezember 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Helmut Schmitz
2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Bleckmann

Tag der Promotion: 22.01.2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>8</b>
2.1 Versuchstiere .....	8
2.2 Probenvorbereitung .....	9
2.2.1 Präparation und Einbettung.....	9
2.2.2 Anschneiden und Polieren.....	12
2.2.3 Mallory Trichrome Färbung .....	13
2.2.4 Herstellung getrockneter Präparate.....	14
2.3 Atomic Force Microscopy.....	15
2.4 Bestimmung der Oberflächenstruktur des Infrarotorgans von <i>Merimna atrata</i> .....	16
2.5 Nanoindentation.....	16
2.5.1 Grundlagen.....	16
2.5.2 Bestimmung der mechanischen Eigenschaften.....	19
2.6 Scanning Thermal Microscopy.....	21
2.6.1 Grundlagen.....	21
2.6.2 Qualitative und quantitative Bestimmung der Wärmeleitfähigkeit.....	23
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
3.1 Struktur .....	26
3.1.1 Die Kutikulaschichten der Gula von <i>Pachnoda marginata</i> .....	26
3.1.2 Der kutikuläre Aufbau infrarotsensitiver Strukturen bei Käfern .....	28
3.1.2.1 <i>Melanophila acuminata</i> .....	28
3.1.2.2 <i>Merimna atrata</i> .....	31
3.1.2.3 <i>Acanthocnemus nigricans</i> .....	35
3.2 Mikromechanische Eigenschaften kutikulärer Schichten und Strukturen.....	40
3.2.1 Strukturen mit mechanischer Funktionsweise: <i>Melanophila acuminata</i> und <i>Pachnoda marginata</i> .....	40
3.2.1.1 Härte .....	41
3.2.1.2 Elastizitätsmodul .....	44
3.2.1.3 AFM-Topographie der Eindrücke .....	45

3.2.1.4	<i>Melanophila</i> : Vergleich der Kutikula von Infrarotorgan und Referenz.....	46
3.2.2	<i>Merimna atrata</i> .....	49
3.2.2.1	Härte .....	49
3.2.2.2	Elastizitätsmodul .....	51
3.2.2.3	AFM Topographie der Eindrücke .....	52
3.2.3	<i>Acanthocnemus nigricans</i> .....	53
3.2.3.1	Härte .....	53
3.2.3.2	Elastizitätsmodul .....	55
3.2.3.3	AFM-Topographie der Eindrücke .....	56
3.2.3.4	Einfluss der Krafrichtung auf den „rod“ .....	57
3.3	Wärmeleitfähigkeit .....	58
3.3.1	Qualitative Messungen .....	58
3.3.1.1	<i>Melanophila acuminata</i> .....	59
3.3.1.2	<i>Merimna atrata</i> .....	62
3.3.1.3	<i>Acanthocnemus nigricans</i> .....	62
3.3.2	Quantitative Messungen .....	66
3.3.2.1	Die Wärmeleitfähigkeit der Kutikulaschichten in den Infrarotorganen von <i>Melanophila acuminata</i> und <i>Merimna atrata</i> ....	67
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>70</b>
4.1	Vergleich der Materialeigenschaften hydrierter und dehydrierter Kutikula ....	72
4.2	Materialeigenschaften der Kutikulaapparate biologischer Infratrezeptoren und ihre Bedeutung für die Reiztransformation .....	77
4.2.1	Das thermische Infrarotorgan von <i>Acanthocnemus nigricans</i> .....	77
4.2.2	Das thermische Infrarotorgan von <i>Merimna atrata</i> .....	79
4.2.3	Das photomechanische Infrarotsensillum von <i>Melanophila acuminata</i> .....	86
4.3	Struktur und Funktion der Gula von <i>Pachnoda marginata</i> .....	93
4.4	Schlussbemerkung und Ausblick .....	97
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>107</b>

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Aufbau sowie mechanische und thermische Materialeigenschaften hoch spezialisierter Insektenkutikula untersucht. Besonderes Interesse galt den Infrarotorganen der drei pyrophilen Käfer *Melanophila acuminata*, *Merimna atrata* und *Acanthocnemus nigricans*, die trotz ähnlicher sensorischer Funktion sehr unterschiedlich aufgebaut sind. Zusätzlich wurden die mechanischen Eigenschaften der Gula von *Pachnoda marginata* gemessen. Bisher wurden die Materialeigenschaften der Kutikula zumeist an der äußeren Oberfläche bestimmt. Bei den untersuchten Strukturen ist die dreidimensionale Abstimmung jedoch von entscheidender Bedeutung. Daher wurden sie gezielt geöffnet. Erstmals wurden so die Materialeigenschaften an mikrostrukturierten, konsekutiven Kutikulaschichten gemessen. Da dabei das Dehydrieren und Einbetten der Proben unumgänglich war, wurde der Versuch unternommen, anhand der Daten bereits veröffentlichter Literatur die nativen Eigenschaften hydrierter Kutikula abzuleiten.

Die beiden Infrarotorgane von *Merimna atrata* und *Acanthocnemus nigricans*, die beide nach dem Bolometerprinzip arbeiten, zeigten neben den strukturellen keine mechanischen Anpassungen. Auch die thermischen Eigenschaften entsprechen denen unstrukturierter Referenzkutikula. Ein Gradient der Wärmeleitfähigkeit vermindert die Wärmeabfuhr nach außen, wobei die Exokutikula bedingt durch den geringen Wassergehalt die geringste Wärmeleitfähigkeit besitzt. Diese thermische Isolation hat vermutlich eine positive Auswirkung auf die Sensitivität des Infrarotorgans. Mittels Scanning Thermal Microscopy konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die elektronendichten Strukturen („rods“) im Infrarotorgan von *Acanthocnemus nigricans* im Vergleich zur Kutikula keine erhöhte Wärmeleitfähigkeit aufweisen. Es handelt sich also nicht um eine wärmeleitende Struktur.

Bei *Melanophila acuminata* ist das kugelförmige Sensillum ebenfalls durch eine exokutikuläre Schale nach außen hin thermisch isoliert. Der Mantel des Sensillums ist im Vergleich zum schwammartigen Kern wesentlich härter und unelastischer. Im nativen Zustand könnte dieser Unterschied sogar ca. eine Größenordnung betragen. Da die thermische Ausdehnung mit den mechanischen Eigenschaften verknüpft ist, dehnt sich die harte, unelastische Exokutikula bei Erwärmung, wie sie z.B. durch Absorption von Infrarotstrahlung entsteht, kaum aus. Der exokutikuläre Mantel des Sensillums bildet also eine Art Druckgefäß, das das Volumen im Inneren konstant

hält. Die Mesokutikula und das Fluid im Inneren des Sensillum hingegen dehnen sich besonders stark aus. Das Fluid überträgt diese thermische Expansion auf den Mechanorezeptor, so dass dieser adäquat gereizt wird. Die gemessenen Materialeigenschaften konnten das photomechanische Funktionsprinzip detailliert erklären.

Um das photomechanische Infrarotsensillum von *Melanophila acuminata* mit einem weiteren mechanisch angepassten System vergleichen zu können, wurden Kutikulaschichtung, Härte und Elastizitätsmodul der Gula von *Pachnoda marginata* untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich, anders als bisher vermutet, unter der dünnen Epikutikula weiche und elastische Schichten aus Meso- und Endokutikula befinden und die Standardabfolge von Exo-, Meso- und Endokutikula somit durchbrochen wird. Die Anpassung des Systems an seine mechanische Belastung ist bereits an der Zusammensetzung der Kutikula sichtbar und bestätigte sich durch Messungen der mechanischen Eigenschaften mittels Nanoindentation.

Im abschließenden Teil der vorgelegten Arbeit wird ein Ausblick gegeben, wie es basierend auf der vorgelegten Arbeit in Zukunft möglich sein könnte, durch die Entwicklung und den Einsatz neuer Technologien die Materialeigenschaften im nativen Zustand messen.

## Abstract

This study focuses on the structure and the mechanical and thermal material characteristics of specialized insect cuticle. Special interest is given to the infrared organs of the pyrophilous beetles *Melanophila acuminata*, *Merimna atrata* and *Acanthocnemus nigricans*. In spite of having the same sensory function, their structure and working principle differ from each other. Additionally, the gula of *Pachnoda marginata* were investigated. Hitherto, the material characteristics of insect cuticle were mostly probed on the outer surface. Since the three dimensional composition is of special importance in the examined structures, they were specifically opened. In this way, the material characteristics of microstructured consecutive cuticle layers were measured for the first time. In doing so, dehydration and embedding of the samples was required. The characteristics of the native, hydrated cuticle were estimated relying on data of published literature.

The infrared organs of *Merimna atrata* and *Acanthocnemus nigricans*, which are both infrared detectors of the bolometer type, do not show any mechanical adaptation. Moreover, the thermal properties of the infrared organ cuticle equal those of the unstructured reference cuticle. A gradient of thermal conductivity reduces the thermal loss to the outside. Thereby the outer exocuticle has the lowest conductivity which is caused by the small content of water. This thermal isolation has most probably a positive impact upon the sensitivity of the infrared detector. Furthermore, the measurements by means of the Scanning Thermal Microscope could show that the electron dense rods in the infrared organs of *Acanthocnemus nigricans* do not show an increased thermal conductivity compared to the ambient cuticle. Therefore, they are not a thermal conducting structure as has been assumed up to now.

The infrared sensilla of *Melanophila acuminata* are also thermally isolated by their exocuticular shell. Furthermore, the shell is significantly harder and stiffer than the spongy mesocuticular core. In the native state, the difference could be one order of magnitude. Since thermal expansion is correlated with the mechanical characteristics, the hard and stiff shell does not expand when heated by absorbing infrared radiation. Thus, the shell functions as a pressure vessel which keeps the inner volume constant. In contrast, the inner mesocuticle and the fluid expand thermally and thereby generate pressure inside the sensillum which is transmitted by the incompressible fluid to the mechanosensor. This is an adequate stimulus for the mechanoreceptor.

The measured material properties helped to elucidate the working principle of the photomechanic infrared sensillum.

To compare the infrared sensilla of *Melanophila* with another mechanically adapted system, structure, hardness and elasticity of the gula of *Pachnoda marginata* were examined. Contrary to former descriptions, it could be shown that there are soft layers of meso- and endocuticle beneath the thin outer epicuticle, followed toward the inside by a layer of exocuticle. The standard sequence of cuticle is therefore interrupted. The mechanical adaptations of the gula system could already be observed in the composition of the cuticle layers und were confirmed by probing via nanoindentation.

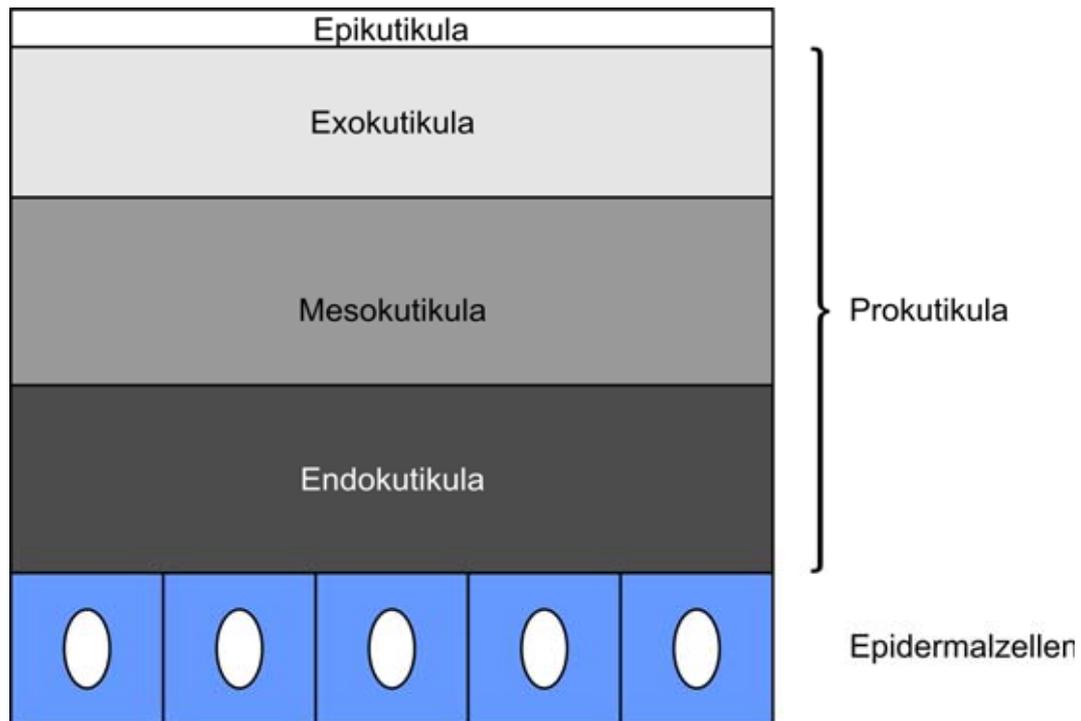
This work is completed by recommendations for future work, where the possibility to detect the native characteristics of hydrated cuticle by means of development and application of new techniques is described.

## 1. Einleitung

Insektenkutikula erfüllt eine große Bandbreite an Aufgaben. Sie formt nicht nur das Exoskelett und schützt so die inneren Organe vor äußeren Einflüssen, sondern bildet auch Sensillen aus, die es dem Tier erlauben, seine Umwelt, wie z.B. durch Mechano-, Chemo- und Hygrorezeption, wahrzunehmen (Gorb, 2001; Neville, 1975). Zudem bildet sie auch die Gelenkstrukturen aus, die die Beweglichkeit des Insekts sichern. In dieser Arbeit wurden die Materialeigenschaften der Infrarotorgane von drei pyrophilen Käfern sowie der Gula von *Pachnoda marginata* (Coleoptera: Scarabaeidae) untersucht. Alle genannten Systeme bestehen hauptsächlich aus Kutikula, die in diesen Systemen unterschiedlichste Funktionen erfüllt.

Wie viele biologische Materialien ist auch Kutikula ein Faserverbundwerkstoff (Hepburn und Chandler, 1980). Die Matrix wird durch Proteine gebildet, die Fasern bestehen aus Chitin. Chitin ist ein biologisches Polymer, das aus 300 nm langen und 3 nm dicken Nanofibrillen zusammengesetzt wird. Jede Nanofibrille enthält ca. 19 Molekülketten (Vincent, 1980; Vincent, 2002), die antiparallel zueinander verlaufen (Neville, 1975; Vincent, 1980). Die Chitinfasern werden durch die Proteinmatrix stabilisiert (Andersen et al., 1996). Das in der Proteinmatrix enthaltene Wasser separiert vermutlich die zwei Hauptkomponenten voneinander und bestimmt so die mechanischen Eigenschaften der Kutikula mit (Vincent, 1980; Vincent und Wegst, 2004).

Das Exoskelett der Arthropoden besteht in der Regel aus einem mehrschichtigen Verbund aus Epi-, Exo-, Meso- und Endokutikula (Abb. 1) (Andersen, 1979; Neville, 1975). Exo-, Meso- und Endokutikula formen die sog. Prokutikula, die Chitin enthält. Die Epikutikula ist die äußerste Schicht und enthält kein Chitin. Sie ist sehr dünn und reißfest. Ihre Oberfläche ist mit Wachsen und Lipiden beschichtet. Unter ihr befindet sich die harte, unelastische Exokutikula, die eine dichte Chitin-Protein-Struktur besitzt. Einen großen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Kutikula hat auch der Wassergehalt. Die Exokutikula besitzt nur einen geringen Wassergehalt, während die Endokutikula bis zu 70% Wasser aufnehmen kann (Vincent, 2004).



**Abb. 1:** Der mehrschichtige Aufbau der Kutikula bei Arthropoden. Unter der Kutikula befinden sich Epidermalzellen, die für die Bildung der Kutikula verantwortlich sind. Die chitinhaltige Prokutikula besteht aus Exo-, Meso- und Endokutikula, wobei die einzelnen Schichten unterschiedlich ausgeprägt und sogar vollständig reduziert sein können (Neville, 1975). Nach außen schließt das Exoskelett mit einer dünnen Schicht aus Epikutikula ab. Verändert nach Neville, 1975.

Die mechanischen Eigenschaften werden vor allem durch den Grad der Härtung (Sklerotisierung) bestimmt. Bisher wurden zwei Arten von Sklerotisierung beschrieben (Andersen, 1974): die Chinonsklerotisierung, bei der weiche, farblose Kutikula härter und dunkel gefärbt (melanisiert) wird (Fraenkel und Rudall, 1940; Pryor, 1940), und die  $\beta$ -Sklerotisierung, bei der die Kutikula zwar gehärtet wird, aber farblos bis hellgelb bleibt (Andersen, 1971; Andersen und Barrett, 1971). Dabei wird die Exokutikula am stärksten, die Mesokutikula weniger stark und die Endokutikula nicht oder nur gering sklerotisiert. Gleichzeitig verringert sich durch die Sklerotisierung der Wassergehalt der Kutikula (Fraenkel und Rudall, 1940). Die Sklerotisierung und der Wassergehalt haben einen bedeutenden Einfluss auf die Härte und die Elastizität der Kutikula (Vincent und Wegst, 2004).

In Gelenken sind die mechanischen Eigenschaften der Kutikula von besonderem Interesse, da Gelenke eine Vielzahl von Aufgaben erfüllen müssen. Als Beispiel sei hier das Kopfgelenk des Rosenkäfers (*Pachnoda marginata*, Coleoptera: Scarabaeidae) genannt. Es besteht aus einem ventralen Bereich des Kopfes, der

sog. Gula, und einem Gegenlager am Metathorax. Beide Seiten des Gelenks sind Teil des Exoskeletts, bestehen also aus Kutikula und stehen in ständigem Kontakt zueinander. Die Kutikula muss in diesen Bereichen daher besonders abriebfest sein. Andererseits müssen die beiden Flächen problemlos übereinander gleiten können, um die Beweglichkeit des Kopfes sicherzustellen. Die äußeren Kutikulaschichten müssen also zusätzlich reibungsminimierende Eigenschaften aufweisen.

Die mechanischen Eigenschaften der äußeren Gulaoberfläche wurden bereits umfangreich untersucht. Dai et al. bestimmten die Reibungseigenschaften der Gula und folgerten, dass das Material für die Reduzierung des Reibungswiderstandes eine entscheidende Bedeutung hat (Dai et al., 2006). Vor kurzem untersuchten Barbakadze et al. mittels Nanoindentation Härte und reduzierten Elastizitätsmodul der äußeren Gulaoberfläche (Barbakadze et al., 2006). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sich unter der äußersten Kutikulaschicht vermutlich weichere und elastischere Kutikula befindet. Um dieses Phänomen weiterführend zu untersuchen, wurden in der hier vorliegenden Arbeit Querschnitte durch die Gula angefertigt und die mechanischen Eigenschaften der unterschiedlichen Kutikulaschichten gemessen. Um den Kutikulatyp (Exo-, Meso-, Endokutikula) der Schichten identifizieren zu können, wurden Schnitte durch die Gula mittels Mallory Trichrome Lösung spezifisch angefärbt.

Bei Insektenrezeptoren bestimmen Struktur und Zusammensetzung des externen Kutikulaapparates, welche Art von Stimulus perzipiert wird (Altner und Loftus, 1985; Steinbrecht, 1984; Thurm, 1969). Die Modalität eines zu untersuchenden Sensillum kann daher sehr oft bereits von der Konstruktion der kutikulären Komponenten abgeleitet werden, die der Übertragung des Stimulus dient (Keil, 1997). Außerdem verstärkt oder filtert der Kutikulaapparat oft den Stimulus. Das gilt vor allem für Mechanorezeptoren, bei denen die mechanischen Eigenschaften der unterschiedlichen Kutikulaarten festlegen, welche spezifische Funktion (wie z.B. Wahrnehmung von Berührung, Windgeschwindigkeit, Geräuschen, Schwerkraft etc.) der Sensor erfüllt (Barth und Holler, 1999; French et al., 2002; Hossli et al., 2007; Humphrey und Barth, 2008).

Auch die Infrarotsensoren der pyrophilen Käfer *Melanophila acuminata*, *Merimna atrata* (beide Coleoptera: Buprestidae) und *Acanthocnemus nigricans* (Buprestidae: Acanthocnemidae) bestehen hauptsächlich aus Kutikula. Hier übernimmt die Kutikula

vor allem die Funktion des Infrarotabsorbers und der Reiztransformation in Wärme und mechanischer Ausdehnung (Schmitz und Bleckmann, 1998; Schmitz et al., 2000; Schmitz et al., 2002).

Das Infrarotsensillum von *Melanophila acuminata* ist ein umgewandelter Mechanorezeptor, der sich höchstwahrscheinlich aus Haarmechanorezeptoren entwickelt hat (Schmitz et al., 2007). Jedes der beiden Infrarotorgane, die sich auf den beiden Seiten des Metathoraxes befinden, beherbergt ca. 70 IR-Sensillen (Vondran et al., 1995). Ein Sensillum besteht aus einer Art Kugel, die eine exokutikuläre Schale und einen schwammartigen mesokutikulären Kern besitzt. Der Kern weist kleine Hohlräume und eine Druckkammer auf, die miteinander in Verbindung stehen und vermutlich mit einem Fluid gefüllt sind. Die Kugel ist über einen Stiel in einer dünnen Kuppel aus Exo- und Mesokutikula aufgehängt. Die Kuppel grenzt die Kugel nach außen ab. Zwischen Kugel und Kuppel liegt zudem eine dünne Schicht aus Hüllzellen. Die Eindringtiefe der Infrarotstrahlung beträgt höchstwahrscheinlich einige Mikrometer, so dass sie durch diese dünnen Schichten bis in das kugelförmige Sensillum gelangt (Schmitz et al., 2007). Hier wird sie von der Kutikula absorbiert, so dass sich die Kutikula und das Fluid erwärmen. Durch die einhergehende thermische Ausdehnung entsteht eine Druckerhöhung im Inneren des Sensillums, die die Spitze des Mechanodendriten, der bis in die Druckkammer zieht, deformiert.

Das Prinzip der Umwandlung infraroter Strahlung in ein mechanisches Ereignis wurde von Schmitz und Bleckmann photomechanischer Mechanismus genannt (Schmitz und Bleckmann, 1998) und von Schmitz et al. vor kurzem detaillierter untersucht (Schmitz et al., 2007). Aufgrund des postulierten Funktionsmodells wurden für die exokutikuläre Schale extrem harte, unelastische Eigenschaften und für den mesokutikulären Kern ein hoher thermischer Ausdehnungskoeffizient prognostiziert. Außer der Identifizierung von Meso- und Exokutikula wurde bisher allerdings kein Versuch unternommen, die mechanischen und thermomechanischen Materialwerte des vorliegenden Materials quantitativ zu ermitteln. Hazel et al. untersuchten die thermischen Eigenschaften der Sensillen und die mechanischen Eigenschaften der exokutikulären Schale nur qualitativ (Hazel et al., 2001). Dabei wurden Semidünnschnitte mit sehr rauer Oberfläche verwendet, so dass vor allem die Messungen mittels SThM stark von der Topographie beeinflusst wurden. Zudem wurde das Kutikulamaterial durch eine Fixierung mit Glutaraldehyd und

Osmiumtetroxid erheblich verändert, da diese Chemikalien die Materialkomponenten stärker quervernetzen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher eine geeignetere Probenvorbereitung entwickelt und quantitative Materialdaten ermittelt werden.

Neben den mechanischen Eigenschaften sind zudem auch die thermischen Eigenschaften (wie z.B. die Wärmeleitfähigkeit) von großer Bedeutung, da Infrarotstrahlung in den Infrarotorganen der pyrophilen Käfer bei der Absorption vor allem in Wärme transformiert wird. Die Infrarotorgane von *Merimna atrata* und *Acanthocnemus nigricans* messen, im Gegensatz zum *Melanophila* IR-Sensillum, diese Wärme durch Wärmerezeptoren.

Auch bei *Merimna atrata* liegen die Infrarotorgane paarig auf beiden Seiten, jedoch befinden sie sich ventral am Abdomen. Häufig werden zwei Paar Infrarotorgane ausgebildet, die auf dem zweiten und dritten Sternit des Abdomens liegen (Mainz et al., 2004). Die Infrarotorgane bestehen aus Gruben, die auf ihrer Oberfläche eine Mikrostrukturierung besitzen (Schmitz et al., 2000). Jedes dieser Organe wird von einem Thermorezeptor innerviert, der sich unter der Kutikula der Grube befindet und die Absorptionswärme detektiert. Zudem liegt unter dem Infrarotorgan ein Luftsack, der vermutlich das Infrarotorgan vom restlichen Körper isoliert und so die thermische Masse des Infrarotorgans reduziert.

Ähnlich funktionieren wahrscheinlich auch die Infrarotorgane von *Acanthocnemus nigricans*. Diese befinden sich paarig am Prothorax des Käfers. Es handelt sich um eine sensorische Scheibe mit einem Durchmesser von ca. 120-130 µm, die nur über einen dünnen Stiel mit dem restlichen Exoskelett verbunden ist. Die thermische Masse des Systems ist also minimiert (Schmitz et al., 2002). Die Scheibe wird von einem Thermorezeptor innerviert, dessen genaue Funktionsweise bis heute nicht bekannt ist. Auf der äußeren Oberfläche befinden sich die sog. „pegs“, die von einer ziliären Sensorzelle innerviert werden. Das äußere Dendritensegment ist sehr kurz und endet bereits unter der Kutikula. Eine stabförmige, elektronendichte Masse, die von Kreiss et al. „rod“ genannt wurde (Kreiss et al., 2005) und vermutlich aus Kutikula besteht, verläuft durch den kutikulären Kanal und verbindet „peg“ und die Spitze des äußeren Dendritensegmentes. Dieser „rod“ stellt vermutlich die hypertrophierte Dendritenscheide dar.

Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Rezeptor auf Wärmereize reagiert (Kreiss et al., 2007). Auch hier dient die Kutikula als

Infrarotabsorber. Erkenntnisse über die Wärmeleitfähigkeit der einzelnen Kutikulakomponenten könnten helfen, die Temperaturverteilung im Organ und die Funktionsweise besser zu verstehen. Die genaue Funktion des „rods“ ist bisher unbekannt. Da er im Transmissionselektronenmikroskop elektronendicht erscheint, könnte er ein guter Wärmeleiter sein und Absorptionswärme besonders gut in Richtung Thermorezeptor leiten.

Mit den Infrarotorganen von *Merimna atrata* und *Acanthocnemus nigricans* liegen nach dem momentanen Stand des Wissens zwei sog. Bolometer vor. Dieser Sensortyp ist in der Technik bei ungekühlten Infrarotsensoren weit verbreitet und kann auch in anderen biologischen Systemen, wie den Infrarotorganen von Grubenottern (Crotalinae), Boas (Boidae) und Pythons (Pythonidae) gefunden werden. Das photomechanische Prinzip, das erstmals beim Schwarzen Kiefernprachtkäfer beschrieben wurde, wurde vor kurzem zudem bei der pyrophilen Rindenwanze *Aradus albicornis* (Aradidae) entdeckt (Schmitz et al., 2008). In der Technik wurde dieses Messprinzip bisher noch nicht technisch umgesetzt, obwohl es Hinweise darauf gibt, dass zumindest unter den biologischen IR-Sensoren das photomechanische IR-Sensillum eine höhere Sensitivität und geringere Reaktionszeiten gegenüber den Bolometern erreicht (Schmitz und Trenner, 2003).

Diese Arbeit soll nicht nur helfen, die Funktion der Materialeigenschaften in den untersuchten biologischen Systemen besser zu verstehen, sondern auch den Wirkungsmechanismus des photomechanischen Prinzips weiter aufzuklären. Die biologischen Strukturen sind dreidimensionale Strukturen und können daher nicht untersucht werden, ohne sie gezielt zu öffnen. Die gesammelten Materialdaten sollen anderen Wissenschaftlern bei der Simulation der Reiztransduktion z.B. mittels Finite Elemente Modellen helfen und so weitere Einsichten in die Prozesse eines funktionierenden biologischen Infrarotsensors liefern.

### Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, das Funktionsprinzip der Gula von *Pachnoda marginata* sowie der Infrarotorgane der pyrophilen Käfer *Melanophila acuminata*, *Merimna atrata* und *Acanthocnemus nigricans* mittels materialwissenschaftlicher Methoden detailliert zu untersuchen. Folgender Fragenkatalog wurde daher aufgestellt:

- Wie sieht die Struktur des jeweiligen Systems aus?
- Welche mechanischen und/oder thermischen Eigenschaften besitzen die einzelnen Schichten?
- Wie beeinflussen Struktur und Materialeigenschaften das jeweilige Funktionsprinzip?

Bisher wurden die Materialeigenschaften von Kutikula meistens an der von außen leicht zugänglichen Oberfläche bestimmt. Um die Materialeigenschaften der einzelnen Kutikulaschichten bestimmen zu können, müssen die biologischen Strukturen gezielt geöffnet werden. Eine geeignete Methodik zum gezielten Öffnen der kutikulären Strukturen war daher im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls zu entwickeln.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

#### ***Melanophila acuminata***

*Melanophila* Käfer wurden nicht als adulte Tiere gefangen, sondern schlüpften aus verbrannten Holzstämmen. Das Holz entstammte einer Brandfläche in Katalonien (Spanien), auf der es im Sommer des Jahres 2005 gebrannt hatte. Dort wurden im Frühjahr 2006 von Wissenschaftlern der Universität Bonn Stämme mit einem Durchmesser von ca. 10 cm und einer Länge von 1-2 m herausgesägt und nach Bonn transportiert, wo sie im Tierhaus der Universität Bonn senkrecht gelagert wurden. Die Stämme wurden wöchentlich mit Wasser besprüht.

Die Käfer schlüpften im Sommer 2006 und 2007. Frisch geschlüpfte Tiere wurden in Plastikbehältern gehalten und mit Rosinen, Erdnüssen und Salat gefüttert. Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Käfer wurden erst verwendet, wenn sie mindestens eine Woche alt waren. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass keine frisch geschlüpfte Käfer mit unvollständig ausgehärteter Kutikula getestet wurden. Die ausgewählte Tiere wurden für weitere Schritte in 30%- und 70%-igem Ethanol konserviert.

#### ***Merimna atrata* und *Acanthocnemus nigricans***

*Merimna atrata* und *Acanthocnemus nigricans* wurden von Wissenschaftlern der Universität Bonn auf Waldbrandflächen in West-Australien nahe Perth in den Jahren 2004 bis 2006 gefangen und lebend nach Deutschland überführt. Sie wurden mit Erdnüssen und Rosinen gefüttert. Wasser stand ad libitum bereit. Nach ca. einer bis zehn Wochen wurden sie in 70%-igem Ethanol konserviert. Die verwendeten Kutikulaprobe wurden den alkoholkonservierten Tieren entnommen. Aufgrund des zeitlichen Abstandes vom Tag der Aufsammlung in Australien bis zur Konservierung in Deutschland kann davon ausgegangen werden, dass die Kutikula der Tiere ausgehärtet war.

## ***Pachnoda marginata***

Käfer der Art *Pachnoda marginata* wurden vom Aquazoo-Löbbecke Museum (Düsseldorf, Deutschland) bezogen. Diese wurden nach Erhalt einige Tage mit Bananenstücken gefüttert und anschließend in 70%-igem Ethanol konserviert. Auch bei diesen kann daher davon ausgegangen werden, dass ihre Kutikula zum Zeitpunkt der Konservierung bereits ausgehärtet war.

## **2.2 Probenvorbereitung**

### **2.2.1 Präparation und Einbettung**

Mittels Mikroschere und Rasierklinge wurden die Infrarotorgane der pyrophilen Käfer und die Gula von *Pachnoda marginata* zusammen mit umgebender Kutikula den Alkoholpräparaten entnommen. Um möglichst unverfälschte Eigenschaften des Materials zu messen, wurde auf eine zusätzliche chemische Fixierung, wie sie üblicherweise mit Glutaraldehyd und/oder Osmiumtetroxid durchgeführt wird, verzichtet. Eine solche chemische Fixierung führt zu einer dichteren Verknüpfung der Moleküle und würde daher die mechanischen und thermischen Eigenschaften der Proben verändern. Das zum Konservieren verwendete Ethanol besitzt ebenfalls eine fixierende Wirkung, die jedoch schwächer ist. Barbakadze et al. verwendeten mit einem Methanol/Chloroform-Gemisch wesentlich reaktivere Substanzen als Alkohol. Diese bewirkten jedoch im Vergleich zur getrockneten Kutikula keine Veränderung des Elastizitätsmoduls, lediglich die gemessene Härte veränderte sich geringfügig (Barbakadze et al., 2006).

Material aus 30%-iger Ethanollösung wurde mittels destilliertem Wasser vollständig rehydriert und in wasserlösliches Durcupan eingebettet. Dabei wurden die Proben zunächst nach Durcupan A und schließlich in die vollständige Durcupanmischung bestehend aus Durcupan A, Härter, Beschleuniger und Weichmacher überführt. Das Protokoll sah folgendermaßen aus (Kushida, 1964; Stäubli, 1960):

Entwässerung mit Durcupan-Wasser-Gemisch:

Anteil Durcupan A [%]	Dauer [min]
50	15-30
70	15-30
90	15-30
100	30-60
100	30-60

Überführung in die Durcupanmischung:

Anteil Durcupan A [%]	Anteil Durcupanmischung [%]	Dauer [h]
75	25	1
50	50	1
25	75	1
0	100	1-3
0	100	1-3

Die Durcupanmischung setzte sich wie folgt zusammen:

Menge [ml]	Bezeichnung
5	Durcupan
11,7	Härter 964
1-2	Beschleuniger 960
0,2-0,4	Weichmacher

Material aus 70%-iger Ethanollösung wurde in Anlehnung an das Protokoll von Luft über eine Alkoholreihe dehydriert und wie folgt eingebettet (Luft, 1961):

Alkoholreihe (jeder Schritt 10 min):

Anteil Aqua dest. [%]	Anteil Ethanol[%]	Anteil Isopropanol[%]
30	70	0
20	80	0
10	90	0
4	96	0
0	100	0
0	0	100

Überführung in das Intermedium Propylenoxid (jeder Schritt 10 min):

Anteil Isopropanol [%]	Anteil Propylenoxid [%]
50	50
25	75
0	100
0	100
0	100

Überführung in die Eponmischung (jeder Schritt 10 min):

Anteil Isopropanol [%]	Anteil Propylenoxid [%]
50	50
25	75
0	100
0	100
0	100

Die Eponmischung setzte sich wie folgt zusammen:

Menge [ml]	Bezeichnung
25,5	Epon 812
25	Härter DDSA (Dodecenybernsteinsäureanhydrid)
8,9	Härter MNA (Methylendomethylenphthalsäureanhydrid)
0,86	Beschleuniger DMP-30 (2,4,6-tri(dimethylaminomethyl)Phenol)

### Einbettung in Durcupan und Epon

Die verwendeten Silikonformen wurden mit den Einbettmedien Durcupan und Epon halb ausgegossen und für einen Tag in einem Wärmeschrank bei 60°C ausgehärtet. Anschließend wurden die vorbereiteten Formen vollständig mit dem entsprechenden Harzgemisch aufgefüllt und die Proben wurden in die gefüllten Formen überführt. Diese Vorgehensweise verhindert ein vollständiges Absinken der Probe auf den Boden der Form. Der Kunststoff wurde anschließend für drei Tage bei 60°C ausgehärtet. So lange das Einbettmedium noch flüssig ist, können die Proben während der Aushärtung ihre Lage verändern. In den ersten Stunden dieses Prozesses wurde daher die Lage der Proben immer wieder korrigiert.

### **2.2.2 Anschneiden und Polieren**

Um die unterschiedlichen Schichten und Mikrostrukturen der Proben messen zu können, mussten die eingebetteten Kutikulaprobe präzise geöffnet werden. Dazu wurden die ausgehärteten Probenblöckchen der Form entnommen und mittels Rasierklingen und Feile pyramidenförmig angetrimmt, um die Schnittfläche zu verkleinern. Anschließend wurden die Blöckchen in einem Mikrotom (OMU3, Reichert, Wien, Österreich) mit Hilfe eines Diamantmessers (Histo, Diatome, Biel, Schweiz) angeschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger gegeben, auf einer Wärmeplatte gestreckt und mit einem Lichtmikroskop (Leitz DM RBE, Leica, Wetzlar, Deutschland) untersucht. Wenn die Schnittebene die gewünschte Struktur in der Probe erreichte, wurde die Oberfläche der Probe durch stetig dünner werdende Schnitte (Ultradünnschnitte bis < 100 nm) poliert. Zur Untersuchung mittels AFM, Nanoindenter oder SThM wurden nicht die abgetragenen Schnitte, sondern diese polierten Oberflächen der Blöckchen verwendet, da diese wesentlich glatter sind

(Matsko und Mueller, 2004) und zudem eine dickere Materialschicht besitzen als die nur 1 µm dicken Schnitte. Diese ist jedoch gerade bei Meßmethoden wie der Nanoindentation sehr wichtig, da hier Materialeigenschaften bis zum zehnfachen der Eindringtiefe der Indenterspitze mit gemessen werden (vgl. Kapitel 2.5). Die Schnitte würden somit nur eine Eindringtiefe von 100 nm zulassen. Bei derartig geringer Tiefe würde aufgrund der geringen Kontaktfläche die Genauigkeit der Messungen noch wesentlich durch die Rauigkeit der Probe beeinträchtigt (Fischer-Cripps, 2004; Gouldstone et al., 2000).

Die Schnitte ließen sich auch ohne Kontrastierung (z.B. Toluidinblau) ausreichend gut im Lichtmikroskop untersuchen, so dass hierauf verzichtet werden konnte und die Schnitte für eine spezifische Kutikula-Färbung mit Mallory Trichrome Lösung zur Verfügung standen.

### 2.2.3 Mallory Trichrome Färbung

Um die unterschiedlichen Schichten der Kutikula nachzuweisen, wurden die abgetragenen Schnitte der Proben mit einer Mallory Trichrome Lösung angefärbt (Weyda, 1982). Das umgebende Einbettmedium wurde zunächst durch dreiminütiges Waschen in einer Kaliumhydroxidlösung entfernt. Anschließend wurden die Schnitte für wenige Sekunden erst in 96%-igem Ethanol, dann in Aqua bidest. gewaschen und durchliefen folgende Stationen:

Lösung	Dauer [min]
5% Kaliumdichromat	15
Aqua bidest.	wenige Sekunden
0,2% Säurefuchsin	10
Aqua bidest.	wenige Sekunden
1% Phosphorwolframsäure	3
Aqua bidest.	0,5
Mallory Trichrome Lösung A	7
Aqua bidest.	einige Sekunden

Mallory Trichrome Lösung A setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge [g]</b>
Anilinblau	0,5
Orange G	2
Oxalsäure	2
Aqua bidest.	100

Als Ergebnis färben sich die Endokutikula blau und die Mesokutikula rot. Exokutikula hingegen färbt sich kaum oder gar nicht an, so dass  $\beta$ -sklerotisierte Exokutikula ihre natürliche, schwach gelbliche Färbung beibehält und melanisierte Kutikula weiterhin dunkelbraun bis schwarz erscheint. Die angefärbten Schnitte wurden mit einer Kamera (Nikon Coolpix 5000) am Lichtmikroskop aufgenommen.

#### **2.2.4 Herstellung getrockneter Präparate**

Um die mechanischen Eigenschaften an der Oberfläche der Gula mittels Nanoindentation zu untersuchen, wurde ein Teil der herausgeschnittenen Kutikulabereiche (vgl. Kapitel 2.2.1) über mindestens drei Tage luftgetrocknet. Anschließend wurden die getrockneten Gulapräparate mit Epoxydkleber (Pattex Kraft-Mix, Düsseldorf, Deutschland) auf Siliziumplättchen befestigt.

### 2.3 Atomic Force Microscopy

Mittels Atomic Force Microscopy (AFM) wurden die Topographien der polierten Proben untersucht. Die Proben wurden auf eine Halterung mittels Modelliermasse (Weible fantasia KNET, Schorndorf, Deutschland) alternativ Epoxydkleber (Pattex Kraft-Mix, Düsseldorf, Deutschland) aufgebracht. Diese konnte durch Schrauben auf dem beweglichen Probenstisch des AFMs fixiert werden. Das verwendete Gerät (MicroProf zusätzlich ausgestattet mit SiS ULTRAObjective AFM, FRT, Bergisch Gladbach, Deutschland) kombiniert Videokamera, Weißlichtprofilometer und AFM über eine mikrometeregenaue Positionierung, die durch den beweglichen Probenstisch gewährleistet wird. Die erste grobe Positionierung wird unter Verwendung der Videokamera durchgeführt. Die Topographie des ausgewählten Messbereichs kann dann mittels Weißlichtprofilometer bildgebend gemessen werden, wobei theoretisch eine Höhenauflösung von 10 nm erreicht werden kann. Jedoch ist die laterale Auflösung durch die Größe des projizierten Lichtflecks auf eine minimale Pixelgröße von 1-2  $\mu\text{m}$  begrenzt. Eine hochauflösende Topographie kann daher nicht aufgenommen werden. Allerdings können grobe Unebenheiten der Probe erkannt werden, bevor die AFM-Spitze aufgesetzt wird. Diese sind kritisch, da der maximal mögliche Hub des AFMs 6  $\mu\text{m}$  beträgt. Größere Unebenheiten der Probenoberfläche können nicht nachgeregelt werden, so dass diese zu einem Abbruch der Messung, im schlimmsten Fall zu einer Beschädigung der Nadel führen.

Um sowohl AFM-Spitze als auch die Oberfläche der Probe zu schonen, wurde das AFM im Non-Contact-Modus betrieben. Bei diesem Modus wird der Cantilever samt Spitze durch einen separaten Piezo zum Schwingen angeregt. Nähert sich die Nadel der Oberfläche, sinkt die Amplitude aufgrund der Repulsivkräfte (Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte, etc.). Einer der Piezos des AFMs regelt während des Scannens den Abstand zwischen Probe und Spitze so nach, dass die Amplitude immer den gleichen prozentualen Anteil (Set Point) der frei schwingenden Amplitude (freie Amplitude) beibehält. Aus der Information der Nachregelung wird die eigentliche Topographie der Probe berechnet, während die Spitze die Oberfläche mittels der lateralen Piezos linienweise abrastert (max. 80x80  $\mu\text{m}$ ). Verwendet wurden Standard Non-Contact-Spitzen (Nanosensors PPP-NCLR). Für die verwendeten Proben erwiesen sich eine freie Amplitude von 160 nm, ein Set-Point von 65% und eine Rastergeschwindigkeit von maximal 30  $\mu\text{m}/\text{s}$  als geeignet.

## **2.4 Bestimmung der Oberflächenstruktur des Infrarotorgans von *Merimna atrata***

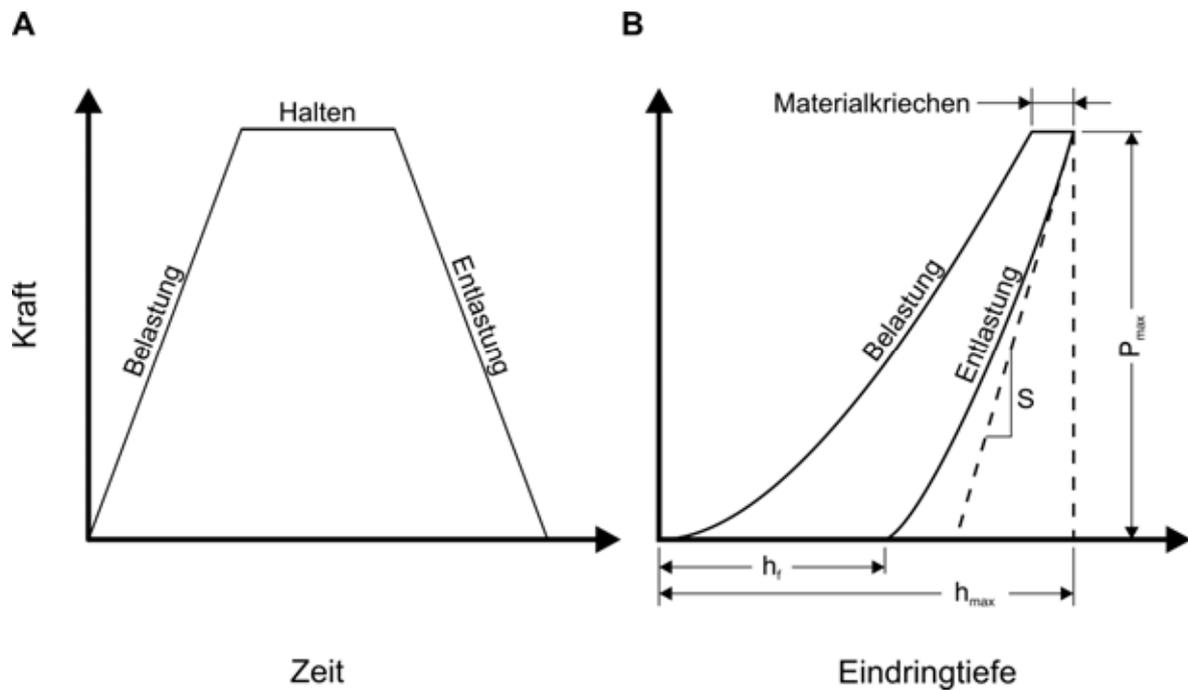
Aufgrund ihrer besonderen Strukturierung wurde die Oberfläche des Infrarotorgans von *Merimna atrata* mit dem Weißlichtprofilometer des MicroProfs (siehe Kapitel 2.3) vermessen. Da die Strukturierung Höhenunterschiede von mehr als 6 µm aufwies, war eine Vermessung mittels AFM nicht realisierbar. Die laterale Auflösung des Profilometers liegt zwischen 1-2 µm. Die aufgenommene Topographie wurde zudem mit Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen verglichen (Stereoscan 200, Cambridge Instruments).

Es wurden luftgetrocknete Präparate verwendet. Die Infrarotorgane wurden mit einer Rasierklinge herausgetrennt und mittels leitenden Klebepads auf Objekthaltern befestigt. Um die Reflexionen und somit die Signalstärke des Weißlichtprofilometers zu erhöhen und die Proben zugleich für das Rasterelektronenmikroskop vorzubereiten, wurden die Proben mit einer leitenden, metallisch reflektierenden Schicht besputtert.

## **2.5 Nanoindentation**

### **2.5.1 Grundlagen**

Die Nanoindentation ist ein standardmäßiges Verfahren, um die mechanischen Eigenschaften von extrem kleinen Materialvolumen zu messen (Bhushan und Li, 2003; Oliver und Pharr, 1992). Hierbei werden Elastizitätsmodul und Härte einer Probe ermittelt, indem eine flache Diamantspitze mit definierter Geometrie in ein Material gedrückt und wieder hinausgezogen wird. Dabei werden simultan Eindringtiefe und applizierte Kraft gemessen. Wichtig hierbei sind eine gleichförmig steigende Be- und Entlastung der Probe sowie bei weichen/elastischen Proben, wie Biomaterialien, eine Haltezeit bei maximaler Belastung, so dass das Materialkriechen nicht verhindert wird (Chudoba und Richter, 2001). Ein typisches Belastungsprofil wird in Abb. 2A dargestellt. Die gemessene Härte wird durch Materialschichten beeinflusst, die sich bis zur zehnfachen Eindringtiefe unter der Indenterspitze befinden (Bhushan und Li, 2003; Bückle, 1965).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung eines **A** zeitlichen Belastungsprofils und einer **B** Kraft-Eindringtiefe-Kurve. Die Steigung  $S$  wird aus der Steigung der Tangenten an dem oberen Teil der Entlastungskurve berechnet. Verändert nach Oliver & Pharr, 1992.

Kraft und Eindringtiefe an sich sagen aber noch nichts über die eigentlichen Materialeigenschaften aus. Härte ( $H$ ) und Elastizität ( $E$ ) setzen sich wie folgt zusammen:

$$H = \frac{P_{max}}{A} \quad (2.1)$$

$$E_r = \frac{S\sqrt{\pi}}{2\beta\sqrt{A}} \quad (2.2)$$

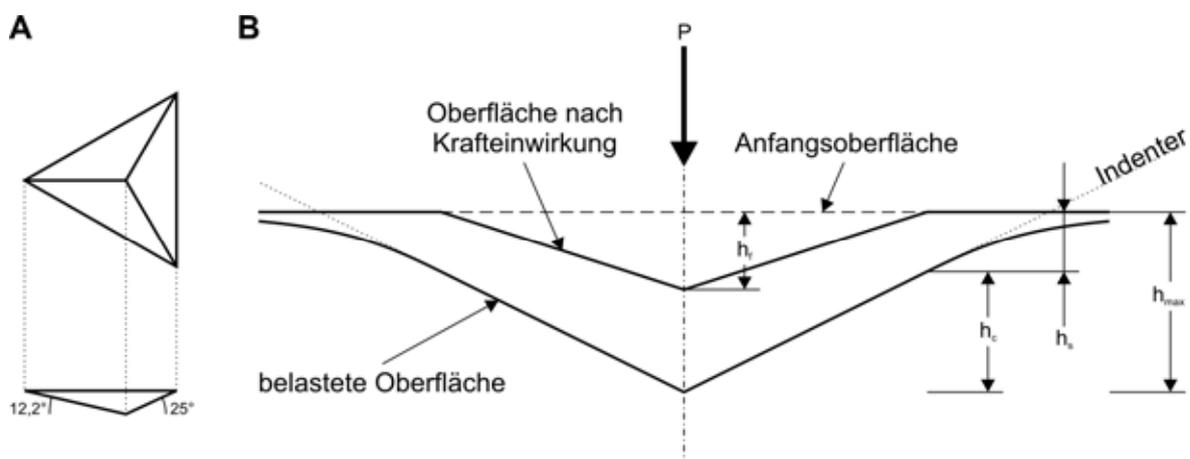
wobei  $P_{max}$  die maximal applizierte Kraft gemessen in Newton (N),  $A$  die Kontaktfläche zwischen Indenter und Probe,  $\beta$  eine von der Indentergeometrie abhängige Konstante und  $S$  die Kontaktsteifigkeit, die gleichbedeutend mit der Steigung am oberen Anfang der Entlastungskurve ist, darstellen (Abb. 2B). In beide Formeln geht die Fläche  $A$  ein, die sich wiederum bei einer genau definierten Geometrie der verwendeten Spitze über die Eindringtiefe berechnen lässt. Genauer gesagt wird der reduzierte Elastizitätsmodul ( $E_r$ ) gemessen, da auch die Elastizität des Indenters ( $E_i$ ) die Messung beeinflusst, wie folgende Formel zeigt.

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1-\nu^2)}{E} + \frac{(1-\nu_i^2)}{E_i} \quad (2.3)$$

$E$  auf der rechten Seite der Formel steht für den Young's Modulus des jeweiligen Materials,  $\nu$  für die jeweilige Poissonzahl, die ebenfalls eine mechanische Materialeigenschaft ist. Die Poissonzahl gibt das Verhältnis zwischen Kompression durch anliegen eines Drucks an einer Seite und der damit einhergehenden Querausdehnung des Materials wieder. Negative Werte, also ein Schrumpfen des Materials quer zur Kompressionsrichtung sind selten. Solche Materialien werden auxetisch genannt.

In den Messungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurde eine Berkovichspitze aus Diamant verwendet. Diamant ist eines der härtesten Materialien und hat einen Young's Modulus von 1141 GPa und eine Poissonzahl von 0,07 (Oliver und Pharr, 1992).  $E_i$  ist also um ein Vielfaches größer als  $E$ , so dass der zweite Term auf der rechten Seite in (2.3) sehr klein wird und vernachlässigt werden kann. Daher wird im Folgenden meistens vereinfacht von Elastizität, Elastizitätsmodul oder Young's Modulus gesprochen, auch wenn streng genommen  $E_r$  gemeint ist.

Die Berkovichspitze ist eine Pyramide aus drei symmetrischen Flächen, die in einem Winkel von  $65^\circ$  zur Krafrichtung stehen (Abb. 3A). Daraus ergibt sich eine sehr stumpfe Spitze mit einem Gesamtwinkel von  $142,8^\circ$ , die bereits sehr häufig für die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften weicher Materialien wie Polymere und Biomaterialien eingesetzt wurde (Fischer-Cripps, 2004). Die Indenterkonstante  $\beta$  beträgt 1,034.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung **A** der maßstabsgetreuen Geometrie der Berkovichspitze und **B** der Zusammensetzung der realen Kontaktfläche. **A** Der obere Teil der Grafik stellt eine Aufsicht auf die Spitze, der untere eine Seitenansicht dar. **B** Zu sehen sind die drei Stadien des Eindrucksprozesses, also vor, während und nach Krafteinwirkung. Die reale Kontakttiefe  $h_c$  entspricht dabei nicht der maximalen Eindringtiefe  $h_{max}$ , da sich das Material am Randbereich verwölbt. Verändert nach Oliver & Pharr, 1992.

Da bei der Herstellung einer Spitze immer Abweichungen von der idealen Geometrie entstehen, weicht die wirkliche Funktion zwischen Eindringtiefe  $h$  und Kontaktfläche  $A$  von der theoretischen Funktion ab. Zudem kann mit dem Nanoindenter nur die maximale Eindringtiefe  $h_{\max}$  ermittelt werden. Die wirkliche Kontakttiefe  $h_c$  weicht allerdings abhängig von den Materialeigenschaften der Probe ab (Abb. 3B). Diese kann wie folgt berechnet werden:

$$h_c = h_{\max} - \varepsilon \frac{P_{\max}}{S} \quad (2.4)$$

wobei für Berkovichspitzen  $\varepsilon = 0,75$  gilt. Daher eicht man jede Spitze auf einem Standardmaterial mit bekannter Härte und Elastizität, das sich ähnlich wie das zu untersuchende Material verhält, indem man die maximale Last und somit die Eindringtiefe variiert. Durch fitten einer mathematischen Funktion lässt sich dann die Kontaktflächenfunktion bestimmen. Dabei hat sich folgende Grundstruktur für die Funktion bewährt:

$$A(h_c) = C_0 h_c^2 + C_1 h_c + C_2 h_c^{\frac{1}{2}} + C_3 h_c^{\frac{1}{4}} + \dots + C_8 h_c^{\frac{1}{128}} \quad (2.5)$$

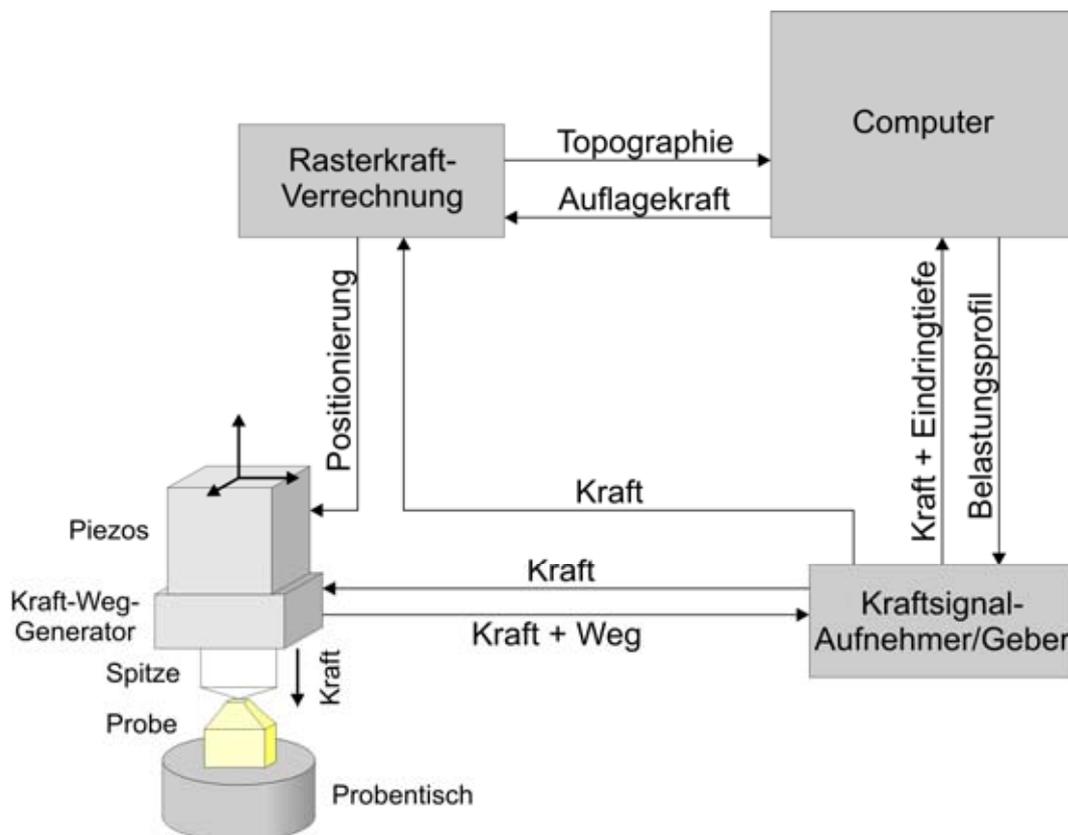
Anhand dieser Funktion kann durch die ermittelte Kontakttiefe  $h_c$  die Kontaktfläche berechnet werden, so dass Härte und Elastizitätsmodul bestimmt werden können.  $C_{1-8}$  sind dabei die Parameter, die z.B. mittels eines Nonlinear Least Square Fit ermittelt werden können.

### 2.5.2 Bestimmung der mechanischen Eigenschaften

Verwendet wurde ein NanoScope IV AFM (Digital Instruments (Veeco), Plainview, NY, USA) ausgerüstet mit einem TriboScope Nanoindenter (Hysitron Inc., Minneapolis, MN, USA). Dieser kann nicht nur die Eindringtiefe mit einer Genauigkeit von bis zu 0,0002 nm und die applizierte Kraft mit einer Genauigkeit von bis zu 1 nN messen, sondern auch die Oberflächentopographie der Probe abrastern. Die zu untersuchenden Strukturen der Probe können so eindeutig identifiziert und die Spitze präzise abgesetzt werden.

Vor den Messungen wurde das Kontaktflächenmodell für die verwendete Spitze auf Quarzglas bestimmt. Da Unebenheiten auf der Probe die Kontaktfläche beeinflussen, wurden die Proben wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben poliert und vor den Messungen mit dem AFM untersucht. Die Probenblöckchen wurden so mit

Zweikomponentenkleber auf Siliziumträger geklebt, dass die zu untersuchende Oberfläche möglichst orthogonal zur einwirkenden Kraft der Indenterspitze orientiert war. Die Siliziumträger wurden auf den beweglichen Probenstisch des Nanoindenters gelegt und mit einem in den Probenstisch integrierten Vakuumsystem fixiert. Angeschnittene IR Sensillen von *Melanophila* und die Gula von *Pachnoda* Käfern wurde linienweise gemessen. Zwischen jedem Eindruck wurde ein Abstand von mindestens  $2\ \mu\text{m}$  eingehalten, in der Regel  $2,5$  oder  $3\ \mu\text{m}$ . Es wurde ein trapezförmiges Belastungsprofil angewendet, bestehend aus einer ansteigenden Belastung mit einer Rate von  $30\ \mu\text{N/s}$  bis zu einer maximalen Kraft von  $300\ \mu\text{N}$ , eine Haltezeit von  $10\ \text{s}$ , und einer Entladung mit einer Rate von  $-30\ \mu\text{N/s}$ . Die Spitze wurde nach mehreren Messungen immer wieder mit einem in Ethanol getränkten Wattestäbchen gereinigt.



**Abb. 4:** Schematischer Versuchsaufbau der Nanoindentation. Die Piezos und die Rasterkraftverrechnung stellen hierbei den Teil des AFMs, der Kraft-Weg-Generator, die Diamantspitze und der Kraftsignal-Aufnehmer/Geber den eigentlichen Nanoindenterbereich dar. Um die Auflagekraft beim abrastern der Probenoberfläche konstant halten zu können, benötigt das AFM die Informationen über die momentane Auflagekraft vom Nanoindenter. Vor dem Eindringen wird die Diamantspitze mit Hilfe der Piezos platziert und der Oberfläche angenähert.

## 2.6 Scanning Thermal Microscopy

### 2.6.1 Grundlagen

Mit Hilfe eines Scanning Thermal Microscopes (SThM) und der Anwendung der so genannten  $3\omega$ -Methode (Cahill und Pohl, 1987) können bildgebend qualitative und punktuell quantitative Messungen zur Wärmeleitfähigkeit eines Materials oder einer Struktur durchgeführt werden (Altes et al., 2004; Fiege et al., 1999). Bei SThMs mit resistiver Sonde wird dabei, vereinfacht gesagt, eine durch Wechselstrom beheizte Drahtschleife über die Oberfläche der Probe bewegt. Es handelt sich hierbei um ein modifiziertes Rasterkraftmikroskop, so dass simultan Topographie und Wärmeleitfähigkeit gemessen werden. Da die Kontaktfläche bei der Messung der Wärmeleitfähigkeit eine essentielle Rolle spielt, wird die Auflagekraft der Sonde während des Abrasterns konstant gehalten. Um zudem eine möglichst hohe Auflösung zu erzielen, wird die Auflagekraft möglichst niedrig eingestellt. Zudem können an Kanten artifizielle Kontraste entstehen, wenn die Schleife nur gering aufliegt oder sogar zwei Kontaktstellen ausweist und sich so die Kontaktfläche verändert. Ähnlich der Nanoindentation muss daher auch hier die zu untersuchende Oberfläche möglichst glatt sein.

Das gebogene Filament hat einen Durchmesser von  $5\ \mu\text{m}$  und besteht aus einer Platin/Rhodium-Legierung. Durch das Biegen wird die Kontaktfläche zwischen Wärmequelle und Probe minimiert, so dass eine Kontaktfläche mit einem Durchmesser von  $30\text{-}300\ \text{nm}$  entsteht. Die Drahtschleife kann dabei als Linienquelle angesehen werden, d.h. sie bildet einen linienförmigen Kontakt mit der Probe. So entstehen bei einer solchen Messung Nahfeldcharakteristika, die es überhaupt erst ermöglichen, thermische Materialeigenschaften in solch kleinen Dimensionen zu messen. Detaillierte Informationen zu dieser Theorie können den Arbeiten von Altes und Fiege (Altes, 2004; Fiege, 2001) entnommen werden und werden daher in dieser Arbeit nicht weiter besprochen.

Der Wechselstrom durch das Filament mit der Frequenz  $\omega$  wird während der Messung konstant gehalten. Der Temperaturgradient zwischen beheizter Sonde und Probe führt zu einem Wärmestrom an der Kontaktfläche, der proportional zur lokalen thermischen Leitfähigkeit der Probe ist. Der Wärmeverlust der Sonde spiegelt sich in einer Änderung des elektrischen Widerstands wider. Aufgrund des Ohmschen

Gesetzes beeinflusst diese wiederum auch die Spannung, welche über einen Lock-In-Verstärker abgelesen werden kann. Diese setzt sich wie folgt zusammen:

$$U(t) = R_0 \cdot I_0 \cdot \sin(\omega t) + I_0 \cdot \frac{dR}{dT} \cdot \frac{\Delta T}{4} \cdot \sin(\omega t - \varphi) - I_0 \cdot \frac{dR}{dT} \cdot \frac{\Delta T}{4} \cdot \sin(3\omega t - \varphi) \quad (2.6)$$

Kurz zusammengefasst gibt der erste Term die Temperatur in Abhängigkeit von  $\omega$  wieder, da dieser den Effektivwert des Widerstandes  $R_0$  beinhaltet und dieser von der Temperatur abhängt. Der zweite Term, ebenfalls variierend mit  $\omega$ , und der dritte Term, variierend mit  $3\omega$ , enthalten die Wärmeleitfähigkeit durch  $\Delta T$ . Daher liefert die Analyse des  $\omega$ -Signals Informationen über die sich überlagernden Komponenten Temperatur und die Wärmeleitfähigkeit, die Analyse des  $3\omega$ -Signals hingegen gibt Auskunft über die isolierte Wärmeleitfähigkeit. Eine Analyse des  $3\omega$ -Signals ist daher geeignet, um Aussagen über die qualitative Wärmeleitfähigkeit zu treffen.

Für eine quantitative Bestimmung der Wärmeleitfähigkeit muss das System zudem geeicht werden. Dies geschieht durch die Analyse der Frequenzabhängigkeit der Messungen von mindestens einem Material mit bekannter Wärmeleitfähigkeit und durch Bestimmung des Anteils der durch Konvektion abgegebenen Wärme. Letztere kann durch eine frequenzabhängige Messung bei nicht angenäherter Sonde ermittelt werden. Das  $3\omega$ -Signal wird mittels Lock-In-Verstärker auf eine Veränderung des Real- und des Imaginärteils untersucht. Der Realteil zeigt dabei die Veränderung der Amplitude, der Imaginärteil die Phasenverschiebung des Signals. Für qualitative Messungen eignet sich der Imaginärteil, da er weitgehend unabhängig von anderen Größen, wie z.B. der thermischen Diffusität, ist. Für eine quantitative Bestimmung der Wärmeleitfähigkeit können theoretisch beide Komponenten verwendet werden, jedoch erwies sich in früheren Veröffentlichungen der Realteil als geeigneter (Cahill, 1990).

Nach Altes et al. (2004) gilt für Materialien mit geringer thermischer Leitfähigkeit ( $\lambda \leq 10 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ):

$$\frac{U_{3\omega_1} - U_{3\omega_2}}{\ln(\omega_1^*) - \ln(\omega_2^*)} \propto \frac{\tilde{P}(\lambda_S)}{\lambda_S} = \frac{k_1 \lambda_S^2 + k_2 \lambda_S}{\lambda_S} \quad (2.7)$$

$$\frac{U_{3\omega_1} - U_{3\omega_2}}{\ln(\omega_1^*) - \ln(\omega_2^*)} \propto k_1 \lambda_S + k_2 \quad (2.8)$$

wobei die linke Seite die logarithmische Steigung des über die Frequenz aufgetragenen  $3\omega$ -Signals darstellt. Die Heizleistung  $P$  ist von der Kontaktfläche und der Wärmeleitfähigkeit abhängig. Da die Kontaktfläche durch die geregelte Auflagekraft konstant gehalten wird, bleibt lediglich  $\lambda$  als Variable übrig. Über die zwei Referenzmessungen können  $k_1$  und  $k_2$  berechnet werden, indem die Steigung und die bekannten Wärmeleitfähigkeiten in (2.8) eingesetzt werden, wobei  $\lambda=0 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  für die Messung in Luft bzw. Vakuum als Nullmessung eingesetzt wird. Berechnet man nun noch die Steigungen des unbekanntes Materials, kann die Wärmeleitfähigkeit von diesem ermittelt werden. Detaillierte Beschreibungen können in früheren Arbeiten eingesehen werden (Altes, 2004; Altes et al., 2004; Fiege, 2001; Fiege et al., 1999).

Um die logarithmische Steigung des aufgezeichneten  $3\omega$ -Signals berechnen zu können, wird eine logarithmische Funktion an diese angepasst. Diese hat die Form:

$$f(x) = a \cdot \ln x + b \quad (2.9)$$

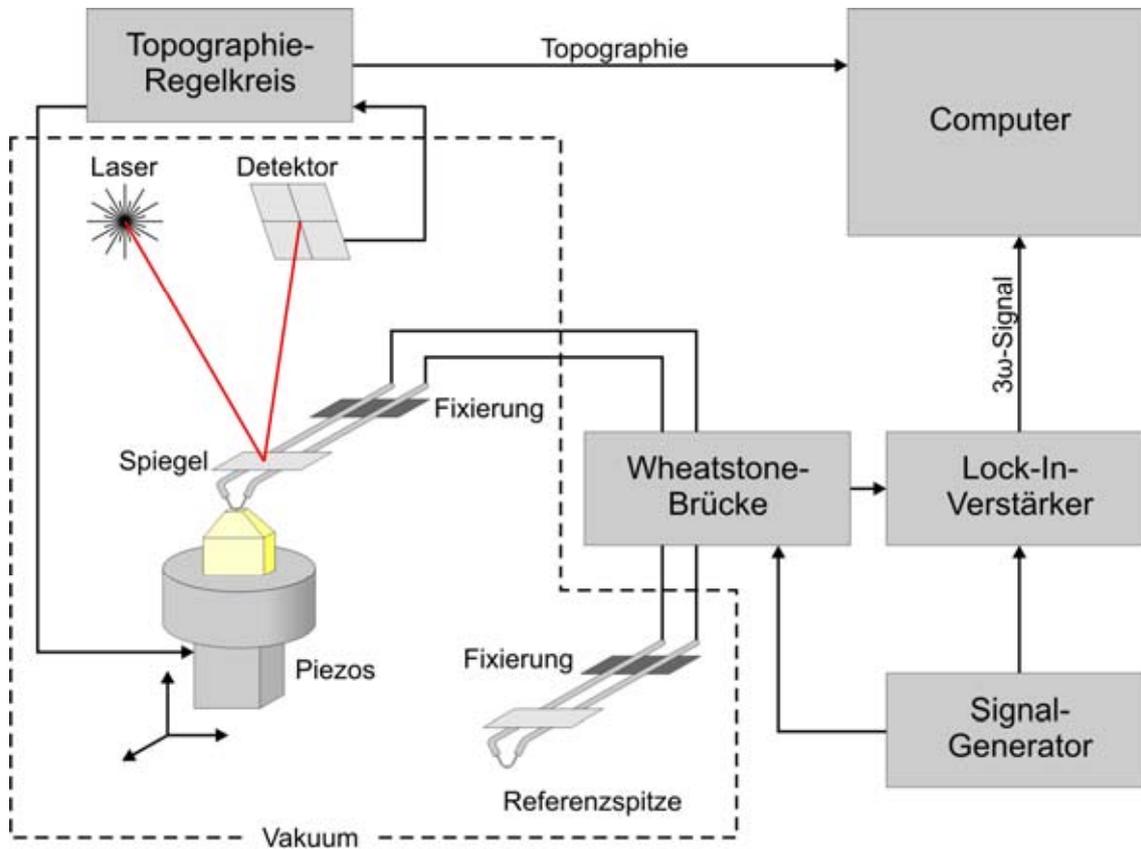
wobei für  $x$  die Frequenz und für  $f(x)$  das  $3\omega$ -Signal eingesetzt werden. Die Parameter  $a$  und  $b$  können durch einen Nonlinear Least Square Fit (NLSF) ermittelt werden. Die gesuchte logarithmische Steigung entspricht dabei dem Parameter  $a$ .

Zudem können mit Hilfe einer Korrekturfunktion die aufgenommen frequenzabhängigen Kurven des  $3\omega$ -Signals von systematischen Fehlern, die durch die Frequenzabhängigkeit des Meßsystems erzeugt werden, bereinigt werden. Hierbei fittet man die Kurve einer Referenzmessung, vorzugsweise einer Messung ohne Kontakt zur Probenoberfläche, mit der in (2.9) beschriebenen Funktion. Für jeden Messpunkt berechnet man in der Folge den Faktor der Abweichung von der gefitteten Funktion. Nun kann jede weitere aufgezeichnete Kurve durch die vorliegende Korrekturfunktion von systematischen Fehlern befreit werden. Um diese Vorgehensweise anwenden zu können, müssen die Frequenzwerte, bei denen das  $3\omega$ -Signal aufgezeichnet wurde, bei jeder folgenden Messung übereinstimmen.

### 2.6.2 Qualitative und quantitative Bestimmung der Wärmeleitfähigkeit

Für die Bestimmung der Wärmeleitfähigkeit wurde ein von der Arbeitsgruppe von Prof. Balk (Universität Wuppertal) eigens hergestelltes SThM verwendet. Als Messspitzen dienten resistive Sonden (Wollaston wire Pt/Rh thermal probes, Veeco), wie

sie in 2.6.1 vorgestellt wurden. Betrieben wurden diese mittels Funktionsgenerator und ausgelesen unter Verwendung einer Wheatstone-Messbrücke und eines Lock-In-Verstärkers. Das genaue Schaltbild kann der Abb. 4 entnommen werden.



**Abb. 5:** Schaltbild des SThM Systems. Der Probenstisch mit seinen beweglichen Piezos bewegt die Probe (gelb) an der beheizten Filamentschleife vorbei, so dass Topographie mit dazugehöriger Wärmeleitfähigkeit gemessen werden kann. Der Vierfelddetektor misst dabei die Auslenkung des Lasers und somit des SThM Cantilevers. Über den Topographieregelkreis wird die Auflagekraft konstant gehalten. Der Lock-In-Verstärker extrahiert aus dem mit  $\omega$  betriebenen Signal aus der Wheatstone-Brücke das  $3\omega$ -Signal. Topographie und Wärmeleitfähigkeit ( $3\omega$ -Signal) werden in einen Computer eingespeist.

Das SThM wurde in Verbindung mit einem Rasterelektronenmikroskop (Inspect S, FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA) in einer Vakuumkammer im Hochvakuum betrieben, so dass die Annäherung und Platzierung der Mess-Spitze mittels Elektromotoren erleichtert wurde. Die präzise Positionierung wurde durch die Piezosteuerung des SThMs (ähnlich Rasterkraftmikroskop, vgl. Abb. 5) vorgenommen. Bei Messungen der thermischen Leitfähigkeit wurde der

Elektronenstrahl des REMs ausgeschaltet, um Störungen wie z.B. einen Wärmeeintrag durch den Strahl auf die Probe und Mess-Spitze auszuschließen.

Verwendet wurden polierte Proben der infrarotsensitiven Käfer *Melanophila*, *Merimna* und *Acanthocnemus*, da die Wärmeleitfähigkeit bei der Funktionsweise der Infrarotorgane von besonderer Bedeutung sein könnte. Die logarithmische Steigung bei Bestimmung der qualitativen Wärmeleitfähigkeit wurde über einen NLSF mit der Software Origin 7.5 (OriginLab, Northampton, MA, USA) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Im folgenden werden die Ergebnisse der Histologie und Topographie sowie der Wärmeleitfähigkeit und der mechanischen Materialeigenschaften wiedergegeben, so dass diese in einer anschließenden Diskussion miteinander verglichen und in Beziehung gesetzt werden können. Bei den Infrarotorganen wird stets die Kutikula des Infrarotorgans mit der Prokutikula am Rande des Organs als Referenz verglichen, um gezielt Anpassungen des Materials kenntlich zu machen.

#### 3.1 Struktur

Mittels Mallory Trichrome Färbung wurde die kutikuläre Zusammensetzung des IR-Organs von *Melanophila* und der Gula von *Pachnoda marginata* bestimmt. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Schnittdicke von 1 µm und einer Einwirkzeit der Mallory Trichrome A Lösung von 7 min erreicht. Da die Proben keiner chemischen Fixierung unterzogen wurden, entstanden gerade bei Schnitten der relativ dicken Kutikula der Gula Risse. Durch eine Schnittrichtung von außen nach innen konnten diese Artefakte reduziert werden.

Zudem wurden die Topographien der polierten Proben mittels AFM erfasst. Diese sind zwar durch das Anschneiden sehr glatt geworden, dennoch lassen sich Strukturen problemlos erkennen.

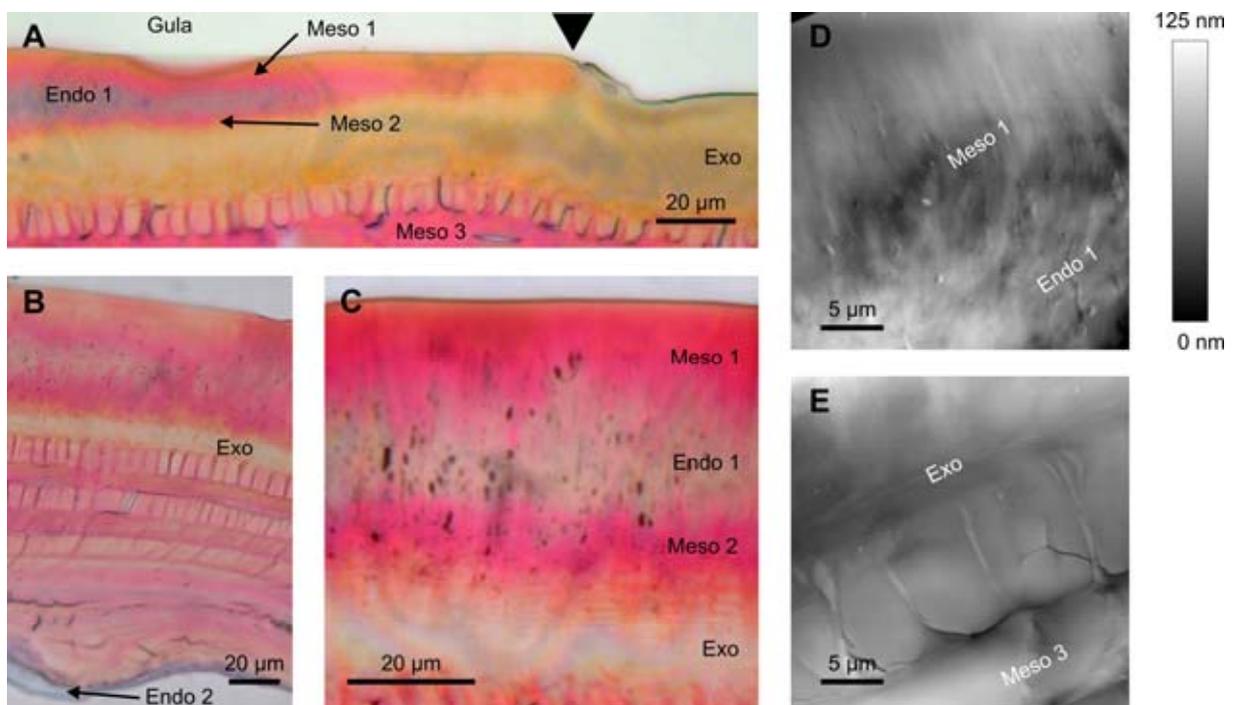
##### 3.1.1 Die Kutikulaschichten der Gula von *Pachnoda marginata*

Im Gegensatz zu den Infrarotorganen der pyrophilen Käfer handelt es sich bei der Gula von *Pachnoda marginata* um eine großflächige, glatte Struktur, die lediglich geschichtet ist, aber keine Mikrostrukturen wie z.B. Sensillen enthält. In der Gula lassen sich alle Arten von Kutikula nachweisen, wobei die Endokutikula sich jedoch im kaudalen Teil verjüngt (Abb. 6B). Die Gesamtdicke der Gula ist mit ca. 150 µm im Vergleich zu der Kutikula der anderen Versuchstiere relativ dick. Mesokutikula nimmt mit einer Gesamtdicke von ca. 12 µm den größten Anteil ein. Die Endokutikula ist unter 2 µm dick.

Die Mallory Trichrome Färbung zeigt eine Besonderheit der Gula auf. Wie Abb. 6 zeigt, wird die standardmäßige Abfolge der Kutikulaschichten durchbrochen.

Zwischen einer dünnen Epikutikula und der Exokutikula befinden sich zwei Schichten aus Mesokutikula, zwischen denen sich wiederum eine leicht bläulich gefärbte, also endokutikuläre Schicht befindet. Diese drei Schichten zeigen in den Topographie- und Lichtmikroskopieaufnahmen eine rauere, granuläre Oberfläche. Diese granulären Strukturen könnten auf ein mikro-/nanostrukturiertes Material hindeuten.

Da Schichten ähnlichen Sklerotisierungsgrades mehrmals auftauchen, wurden in den folgenden Betrachtungen die Schichten mit gleicher Färbung von außen nach innen durchnummeriert (z.B. Meso 1, Meso 2, Meso 3).



**Abb. 6:** Kutikulastruktur der Gula von *Pachnoda marginata*. **A-C** lichtmikroskopische Aufnahmen von Mallory Trichrome gefärbten Schnitten in Sagittalrichtung. **D-E** Topographie der Gula aufgenommen mit einem AFM. **A** Rostraler Anfang der Gula (Pfeilspitze). Die Exokutikula wird überlagert von Meso- und Endokutikula. Die Standardabfolge der Kutikulaschichten wird somit durchbrochen. **B** Übersicht über alle Schichten mittig, bzw. etwas kaudal in der Gula. Bereich entspricht der Region, in der die mechanischen Eigenschaften gemessen wurden. Die innere Endokutikula (Endo 2) verjüngt sich zur Mitte der Gula hin (rechts). **C** Vergrößerung der ungewöhnlichen Kutikulaabfolge. **D** Topographie der äußeren Meso- und Endokutikulaschichten. Diese erscheinen granulär im Vergleich zu **E** anderen Schichten. Aus Müller et al., 2008.

### 3.1.2 Der kutikuläre Aufbau infrarotsensitiver Strukturen bei Käfern

Im Folgenden wird der Aufbau der Infrarotsensoren sowie von Referenzkutikula der Käfer *Melanophila acuminata*, *Merimna atrata* und *Acanthocnemus nigricans* beschrieben.

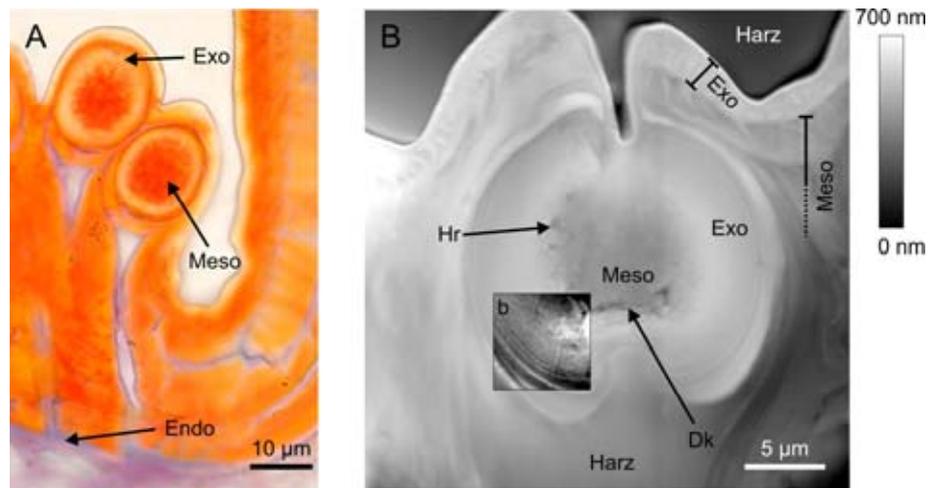
#### 3.1.2.1 *Melanophila acuminata*

Wie die Arbeit von Schmitz (Schmitz et al., 2007) zeigt, setzt sich ein IR-Sensillum aus einer mehrfach geschichteten Schale aus Exokutikula und einem inneren schwammartigen Kern aus Mesokutikula zusammen (Abb. 7A). Der mesokutikuläre Kern weist dabei viele kleine Hohlräume sowie eine größere Kammer im medianen Teil des Sensillums auf. Die feine Schichtung der exokutikulären Schale, die aufgrund der gleichförmigen Ausrichtung der Chitinfasern pro Schicht entsteht, kann besonders gut im AFM Bild gesehen werden (Abb. 7B). Der von Schmitz et al. beschriebene birnenförmige kleine Kern aus Exokutikula im inneren der schwammartigen Mesokutikula des Sensillums konnte weder im Lichtmikroskop, noch im AFM gefunden werden, da die Sensillen nie exakt mittig angeschnitten wurden.

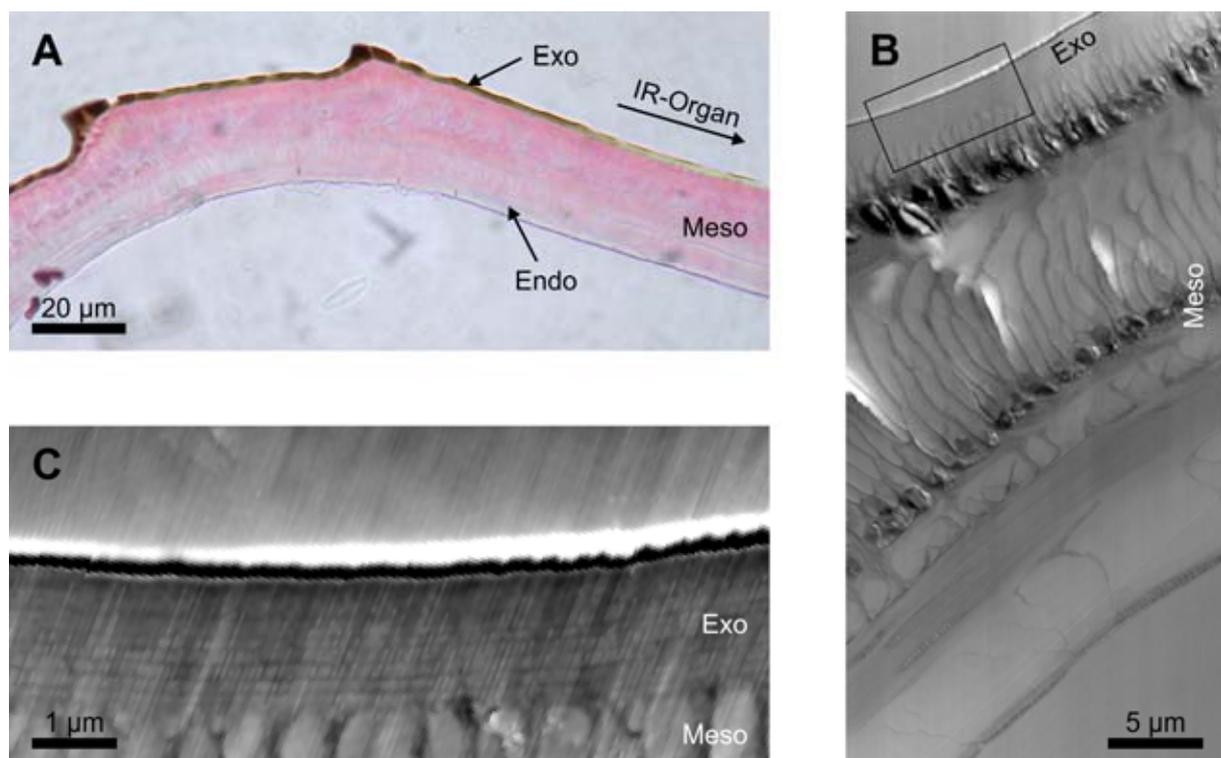
Umgeben wird das Sensillum von einer dünnen Kuppel aus Mesokutikula und Exokutikula. Eine Epikutikula kann, wahrscheinlich aufgrund der geringen Dicke, weder in der AFM Topographie, noch im Lichtmikroskop nachgewiesen werden.

Die restliche Kutikula besteht größtenteils aus Mesokutikula. Der Anteil der innen liegenden Endokutikula variiert von Individuum zu Individuum. Sie kann häufig vollkommen reduziert (Abb. 7A) oder selten sogar gut ausgeprägt sein.

Auffällig ist, dass Grenzen zwischen Exo- und Mesokutikula sich auch in der Topographie widerspiegeln (vgl. Abb. 7A+B). Außerdem zeigt sich in der Topographie, dass das Einbettmedium (Epoxydharz) Zellmaterial ersetzt, aber nicht bis in die sonst flüssigkeitsgefüllten Hohlräume des Sensillums eindringt.



**Abb. 7:** Kutikulastruktur des IR-Organs von *Melanophila*. **A** Lichtmikroskopische Aufnahme zweier angeschnittener Sensillen, beide nicht mittig getroffen. Gelbe Färbung bedeutet Exokutikula (Exo), rote Mesokutikula (Meso) und blaue Endokutikula (Endo). **B** AFM Topographie eines zentral angeschnittenen Sensillums. Die geschichtete exokutikuläre Schale umgibt einen Kern aus schwammartiger Mesokutikula mit Hohlräumen (Hr) und einer Druckkammer (Dk). Im umrandeten Bereich **b** ist die Grauwertskala so angepasst, dass die Schichtung der Exokutikula gut sichtbar wird. Aus Müller et al., 2008.



**Abb. 8:** Die Referenzkutikula von *Melanophila acuminata* am Rand des IR-Organs. **A** Mallory Trichrome Färbung mit den jeweiligen Ausprägungen: Exokutikula gelb/braun, Mesokutikula rot, Endokutikula blau. Zur rechten Bildseite hin nähert sich der Bereich dem Infrarotorgan. Die Pigmentierung durch Melanin der Exokutikula lässt nach. Mesokutikula stellt den größten Bereich dar. Endokutikula ist kaum nachweisbar (Pfeil). **B** Topographie einer polierten Probe. Die Mesokutikula weist eine faserige Strukturierung orthogonal zur Oberfläche auf. **C** Vergrößerter Bereich aus B (Kasten). Die Exokutikula ist mit einer feinen Schichtung versehen.

Als Referenzkutikula wurde der Randbereich des Infrarotorgans untersucht. Die Mallory Trichrome Färbung zeigt ähnlich wie im IR-Organ, dass der größte Anteil der Kutikula aus Mesokutikula besteht (Abb. 8A). Endokutikula kann kaum nachgewiesen werden. Die Exokutikula ist im IR-Organ  $\beta$ -sklerotisiert und enthält kein Melanin. Je weiter die Kutikula aber von dem IR-Organ entfernt ist, desto stärker ist sie melanisiert, was man deutlich an der dunkelbraunen Färbung erkennen kann. Die äußere Oberfläche der Kutikula ist leicht strukturiert und zeigt in der Schnittansicht eine wellenförmige Ausprägung.

In der AFM-Topographie kann man eine faserige Strukturierung der Mesokutikula erkennen. Diese verläuft orthogonal zur Oberfläche und somit zur eigentlichen Schichtung. Die Exokutikula ist nur ca. 1,5  $\mu\text{m}$  dick und ist aus vielen feinen Schichten mit nur 100-200  $\mu\text{m}$  Dicke zusammengesetzt (Abb. 8C).

Referenz- wie auch IR-Organ-Kutikula bestehen beide hauptsächlich aus Mesokutikula, Endokutikula konnte nur vereinzelt nachgewiesen werden. Melanisierte Exokutikula hingegen findet man im IR-Organ nicht.

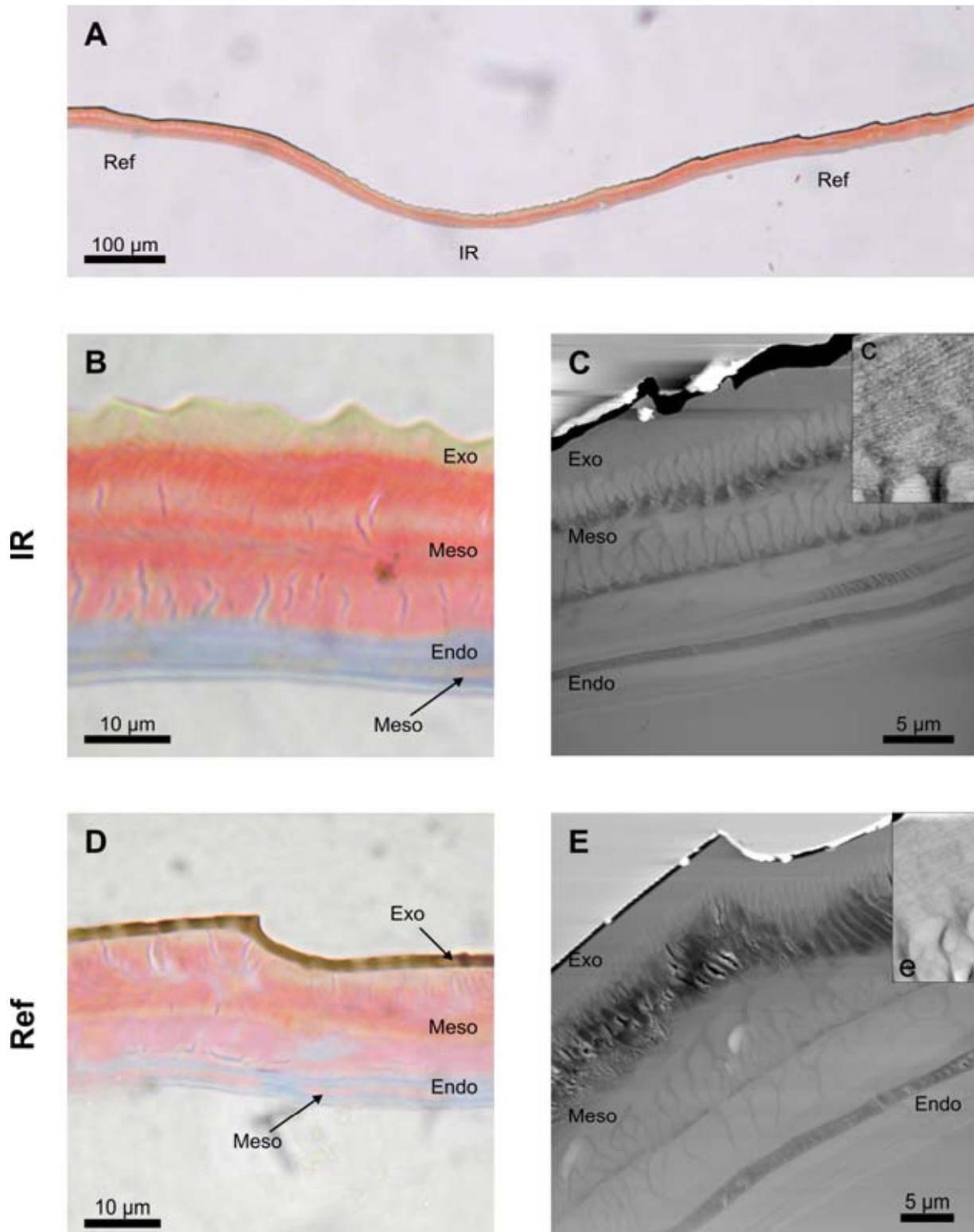
### 3.1.2.2 *Merimna atrata*

Die angefertigten Schnitte verlaufen mittig durch das Infrarotorgan und zeigen auch noch den Randbereich, der aus abdominaler Kutikula besteht (Abb. 9A). Das Infrarotorgan stellt dabei eine Grube mit einer Tiefe von ca. 100  $\mu\text{m}$  dar. Um das Infrarotorgan herum ist die Kutikula 30-35  $\mu\text{m}$  dick mit leichten schuppenförmigen Erhebungen (Abb. 10). Zur Mitte des IR-Organs verjüngt sich die Kutikula immer mehr und verliert schon am Rand ihre bräunliche Färbung der äußeren Schicht. Die mit 16  $\mu\text{m}$  dünnste Stelle befindet sich mittig im Organ.

Die Kutikula von *Merimna atrata* ist standardmäßig in eine äußere Exo-, eine darunter liegende Meso- und eine innere Endokutikula gegliedert. Im Bereich der zum Infrarotorgan benachbarten, abdominalen Kutikula, die hier als Referenz dienen soll, ist die Exokutikula zudem stark pigmentiert und weist daher eine deutliche Braunfärbung auf (Abb. 9D). Die äußere Oberfläche ist kaum strukturiert und zeigt lediglich leichte Wellen auf, die auch bei den anderen Versuchstieren zu sehen sind. Im Vergleich dazu findet man im Infrarotorgan eine stark mikrostrukturierte Oberfläche (Abb. 9B). Die Exokutikula ist nicht pigmentiert und zeigt die für Exokutikula typische Gelbfärbung. Sowohl im Infrarotorgan als auch im Referenzbereich besteht die Exokutikula jedoch aus vielen dünnen Schichten (ca. 100 nm dick) mit eingelagerten geordneten Chitinfaserlagen, wie in der Topographieaufnahme zu sehen ist (Abb. 9C und E).

Die Mesokutikula besteht aus zwei Schichten, die eine Strukturierung orthogonal zur eigentlichen Schichtung besitzen. Zudem färben sich manche Bereiche weniger an als andere, so dass ihr Färbungsgrad fast dem von Exokutikula entspricht. Die Lage dieser Bereiche scheint zufällig verteilt zu sein. Es kann sich daher um Unregelmäßigkeiten bei der Sklerotisierung oder der Färbung handeln.

Auch der Bereich der Endokutikula ähnelt sich bei IR-Organ und Referenz stark. Die innen liegenden Schichten zeigen eine deutliche Blaufärbung, jedoch konnten zwischen diesen auch mesokutikuläre Schichten nachgewiesen werden (Abb. 9B und D). Eine feine Schichtung wie bei der Exokutikula oder eine zur Schichtung orthogonal verlaufende Strukturierung wie bei der Mesokutikula wurde hier in der AFM-Topographie nicht gefunden (Abb. 9C und E). Stattdessen setzt sich die Endokutikula aus Schichten von ca. 1,5  $\mu\text{m}$  Dicke zusammen.



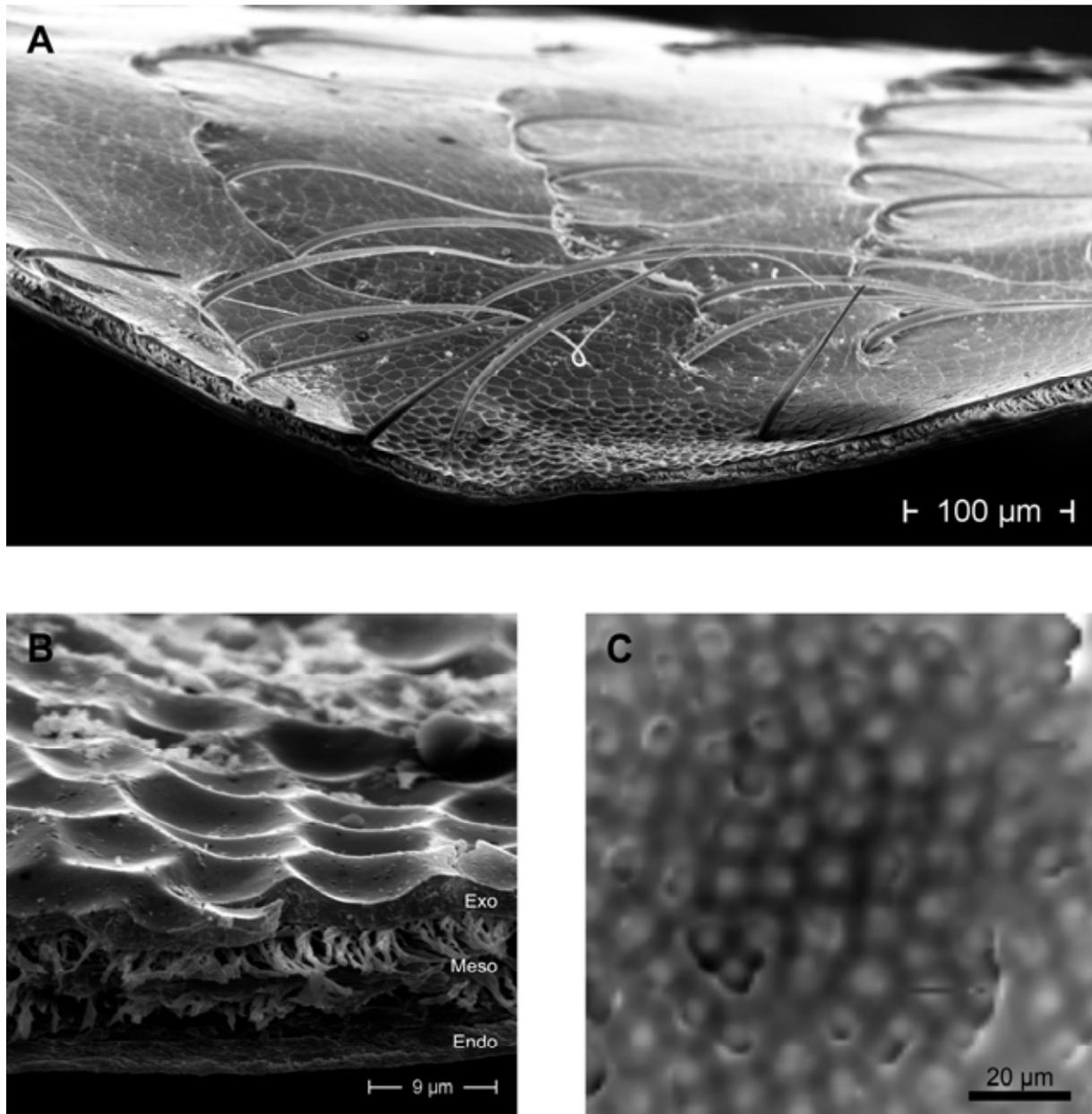
**Abb. 9:** Die Kutikula von *Merimna atrata* im Bereich des Infrarotorgans (IR) und im Referenzbereich (Ref). Die Schnitte verlaufen in sagittaler Richtung. Es handelt sich um lichtmikroskopische Aufnahmen von Mallory Trichrome gefärbtem Material (A, B, D) und AFM Topographieaufnahmen der angeschnittenen und polierten Blöckchen (C, E). **A** Ansicht des kompletten Schnittes mit IR- und Ref-Bereich. Deutlich zu sehen das eingesenkte Grubenorgan (IR). Die Kutikula verjüngt sich zur Mitte des IR-Organes hin. **B** IR-Bereich der Kutikula mit mikrostrukturierter Oberfläche. **C** IR-Topographie mit feingeschichteter Exokutikula (siehe Vergrößerung **c**). **D** Referenzkutikula mit melanisierter Exokutikula (braun) und schuppenförmiger Struktur. **E** Topographie der angeschnittenen Referenzkutikula. Auch hier erkennt man die feingeschichtete Exokutikula in der Vergrößerung **e**; Mallory Trichrome: Exokutikula gelb/braun, Mesokutikula rot, Endokutikula blau.

Aufgrund der besonderen Beschaffenheit der kutikulären Oberfläche im Infrarotorgan wurde diese mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) und Weißlichtprofilometer (WP) weiterführend untersucht. Die Strukturgröße von mehr als  $6\ \mu\text{m}$  ließ eine Vermessung mittels AFM nicht zu, so dass ein WP mit einer lateralen Auflösung von  $1\text{-}2\ \mu\text{m}$  eingesetzt wurde.

Um einen besseren Einblick und eine bessere räumliche Vorstellung von der Struktur zu erlangen, wurden die Proben unter Zuhilfenahme einer Rasierklinge mittig angeschnitten. Am Rand des Organs und im Referenzbereich ist die Kutikula schuppenartig strukturiert und weist zudem die bereits in den Schnitten gesehene Wellen auf (Abb. 10A). Haare entspringen vor allem den Kanten dieser Wellen, aber auch im Infrarotorgan können solche gefunden werden. Zur Mitte des Infrarotorgans entwickeln sich die Schuppen zu immer tiefer werdenden Strukturen. Im Organ erscheint die Struktur schließlich wabenförmig mit Einsenkungen in der Mitte (Abb. 10B). Die Tiefe dieser Struktur beträgt ca.  $5\ \mu\text{m}$ . Die Waben haben einen Durchmesser von ca.  $11\ \mu\text{m}$ .

An der Schnittebene können im Rasterelektronenmikroskop die drei verschiedenen Arten der Kutikula gut unterschieden werden (Abb. 10B). Die kompakte Exokutikula bildet die Topographie der äußeren Oberfläche. Darunter liegen zwei Schichten Mesokutikula, die die bereits beschriebene orthogonal zu Oberfläche ausgerichtete Faserung aufweist (vgl. Abb. 9C und E). Innen liegend befindet sich Endokutikula, die von Mesokutikula durchsetzt sein kann.

Das WP sollte der quantitativen Vermessung der Oberflächentopographie dienen. Mit seiner begrenzten lateralen Auflösung von  $1\text{-}2\ \mu\text{m}$  ist es bei den hier vorliegenden Strukturgrößen von ca.  $10\ \mu\text{m}$  bedingt geeignet. Das WP-Bild zeigt ebenfalls eine wabenförmige Struktur, jedoch zeigt es in der Mitte dieser Strukturen Erhebungen statt, wie im REM-Bild, Einsenkungen. Die Topographie der Oberfläche erscheint also invertiert. Rasterelektronenmikroskopie und Weißlichtprofilometrie unterscheiden sich damit deutlich. Eine einfache Invertierung des WP-Bildes scheint nicht sinnvoll zu sein, da die Grube an sich und auch andere Strukturen in der Grube, die korrekt dargestellt werden, verfälscht wurden. Eine quantitative Vermessung der Oberfläche mittels WP erscheint somit nicht möglich. Die Strukturierung stört/ändert also die Reflexionen des Lichtflecks des WPs.



**Abb. 10:** Die Oberfläche des Infrarotorgans von *Merimna atrata*. **A** und **B** Aufnahme mittels Rasterelektronenmikroskop in unterschiedlichen Vergrößerungen. Das IR-Organ eines getrockneten Präparates wurde mit einer Rasierklinge mittig durchschnitten. Die Mikrostrukturierung entwickelt sich vom Rand her aus einer schuppenartigen Struktur. In (B) ist deutlich zu sehen, dass es sich um wabenförmige Strukturen handelt, die in ihrer Mitte eingesenkt sind. An der Schnittfläche sind orthogonal zur Oberfläche angeordnete Faserstrukturen im Bereich der Mesokutikula zu erkennen. Darunter befindet sich die Endokutikula **C** Topographie des Infrarotorgans vermessen mit Weißlichtprofilometrie. Im Vergleich zu den Bildern A und B erscheint die Topographie invertiert und nicht erwartungsgemäß.

### 3.1.2.3 *Acanthocnemus nigricans*

Die Aufteilung der kutikulären Schichten von *Acanthocnemus nigricans* folgt ebenfalls der sehr häufig zu beobachtenden Aufteilung in eine äußere Exokutikula, eine darunter liegende Mesokutikula und eine innen liegende Endokutikula (Abb. 11). Die Gesamtdicke beträgt im Infrarotorgan ca. 9  $\mu\text{m}$ , im Referenzbereich ca. 13  $\mu\text{m}$ . Im Gegensatz zum *Merimna* IR-Organ ist die durch die Exokutikula gebildete Oberfläche nicht auffällig strukturiert. Lediglich wellenförmige Strukturen finden sich in beiden Bereichen. Auffällig ist jedoch, dass weder im Referenzbereich, noch im Infrarotorgan melanisierte Exokutikula nachgewiesen werden konnte. Die Mesokutikula nimmt mit einer Dicke von ca. 5  $\mu\text{m}$  im IR-Organ und 7  $\mu\text{m}$  in der Referenz den größten Anteil ein. Eine dünne (1-2  $\mu\text{m}$ ), endokutikuläre Schicht konnte in der Referenzkutikula gut nachgewiesen werden (Abb. 11D). Im Infrarotorgan hingegen ist Endokutikula kaum sichtbar (Abb. 11B).

Bei Betrachtung der polierten Probenoberflächen der Anschnitte mittels AFM-Technik wird die feine Schichtung der Exokutikula sichtbar, die sowohl die Kutikula des Infrarotorgans (Abb. 11C) als auch die Referenzkutikula aufweist (Abb. 11E). Eine quer zur Oberflächenausrichtung strukturierte Mesokutikula konnte hier nicht gefunden werden. In manchen Anschnitten wurden jedoch die quer durch die gesamte Kutikula laufenden Ausläufer des Dendriten mit den sog. „rods“ sichtbar, wie sie von Kreiss und Schmitz beschrieben wurden (Kreiss et al., 2005). Dabei handelt es sich um Strukturen, die im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) elektronendicht erscheinen. Sie verlaufen mittig in einem Kanal und ziehen durch die Kutikula bis unter die äußere Oberfläche.

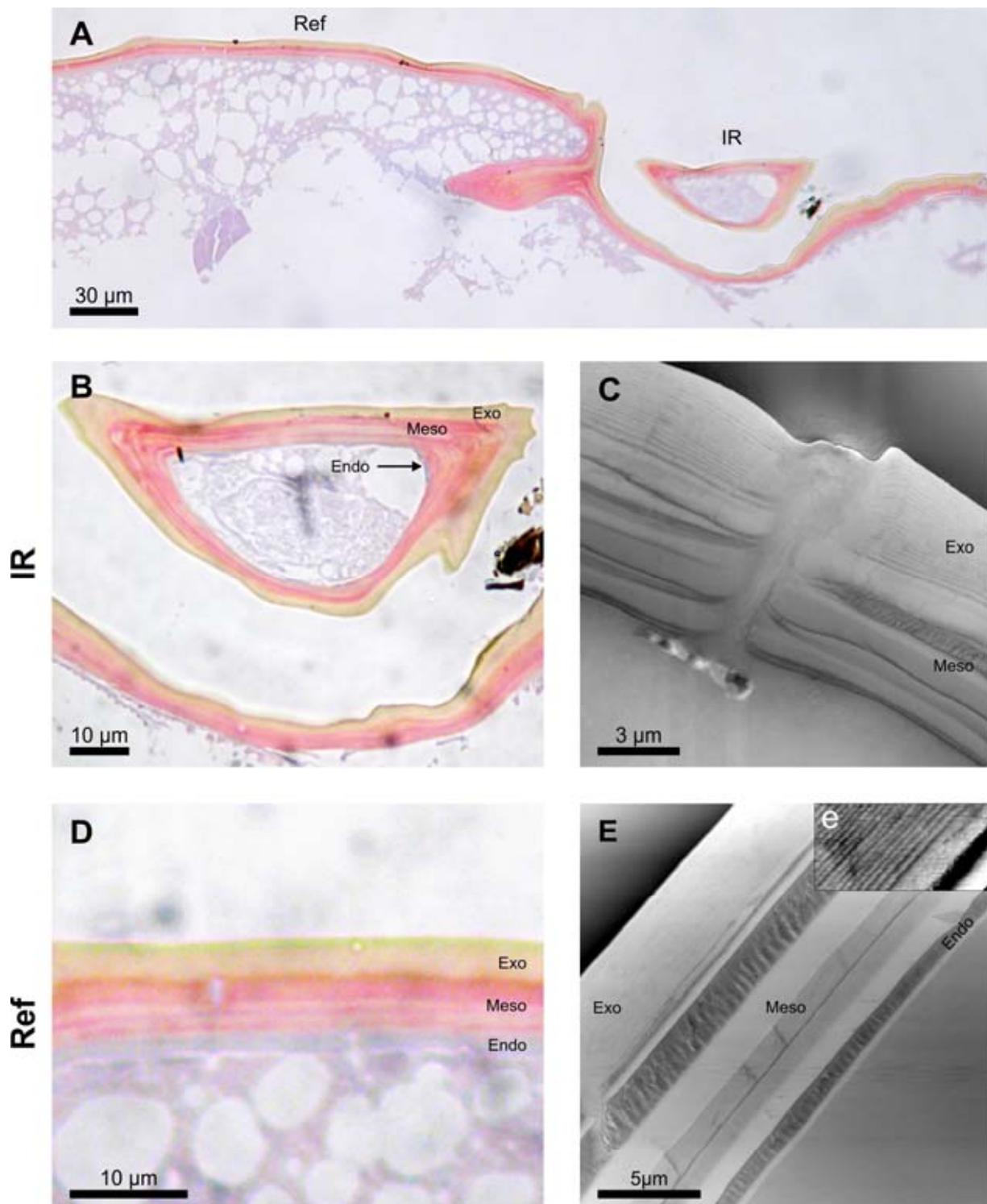
In Abb. 12 ist die Topographie noch einmal vergrößert dargestellt. Zudem sieht man die dazu gehörige Aufnahme der Phase der schwingenden AFM-Nadel. Das Phasenbild kann bei Materialien mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften einen besseren Kontrast bieten. Bei dieser Probe wurde der durch die Kutikula ziehende Kanal des Sensillum fast mittig angeschnitten. Man erkennt deutlich das von Kreiss und Schmitz beschriebene elektronendichte Material, in späteren Veröffentlichungen dieser Autoren auch „rod“ genannt. Der Durchmesser entspricht mit ca. 0,5  $\mu\text{m}$  den bereits veröffentlichten Werten. Das Phasenbild zeigt eine Verschiebung der Schwingungsamplitude in positive Richtung. Eine Phasenverschiebung deutet auf Veränderung von Materialeigenschaften wie z.B. der

Zusammensetzung, Adhäsion, Reibung oder Elastizität hin. Aufgrund des vielseitigen Einflusses dieser unterschiedlichen Materialeigenschaften kann eine genaue Aussage über die Ursache der Phasenverschiebung nicht getroffen werden.

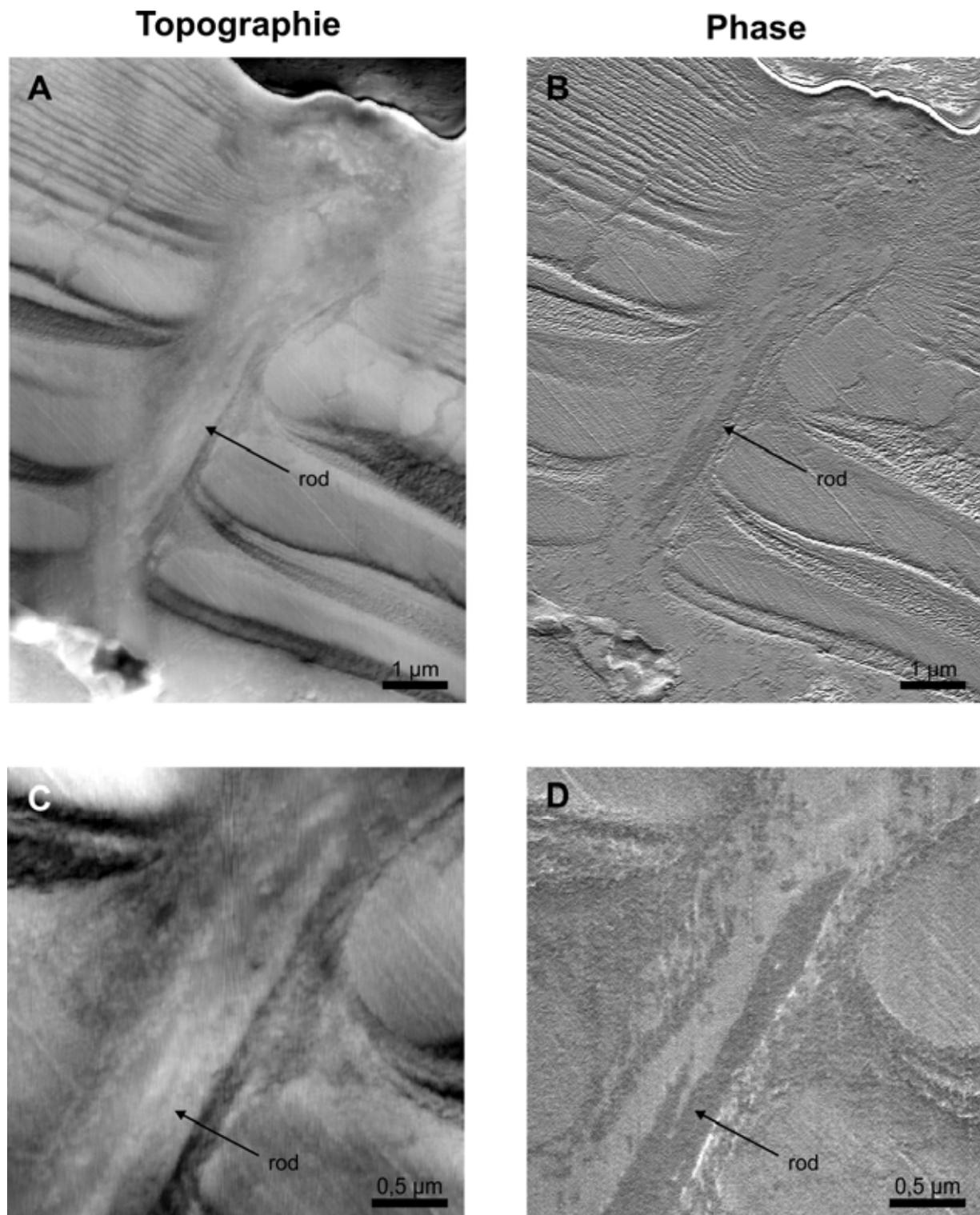
Die hier gezeigte Probe wurde später auch mittels SThM und Nanoindentation untersucht, indem dieser Bereich gezielt gescannt wurde bzw. indem gezielt Eindrücke in diese Struktur gemacht wurden.

Zusätzlich zu den Längsschnitten wurden Präparate mit einer möglichst parallel zur äußeren Oberfläche des Infrarotorgans verlaufenden Schnittebene angefertigt (Abb. 13). Die in die Kutikula ziehenden Kanäle der Sensillen konnten so transversal angeschnitten werden. Dies erhöhte die Wahrscheinlichkeit, beim Schneiden diese Strukturen offen zu legen und sichtbar zu machen. Im Querschnitt findet man die Kanäle aufgrund der größeren Schnittfläche wesentlich häufiger. Relativ zentral in diesen Kanälen befindet sich der von Kreiss und Schmitz beschriebene „rod“ (Kreiss et al., 2005). Das Phasenbild des AFMs zeigt keine eindeutige Phasenverschiebung der Schwingungsamplitude der AFM-Nadel. Ein großer Kontrast im Phasenbild könnte auf stark unterschiedliche Elastizitäten der verschiedenen Materialien hinweisen. Im Längsschnitt (Abb. 12B und D) ist ein leichter Kontrast zu erkennen, nicht jedoch im Querschnitt in Abb. 13D.

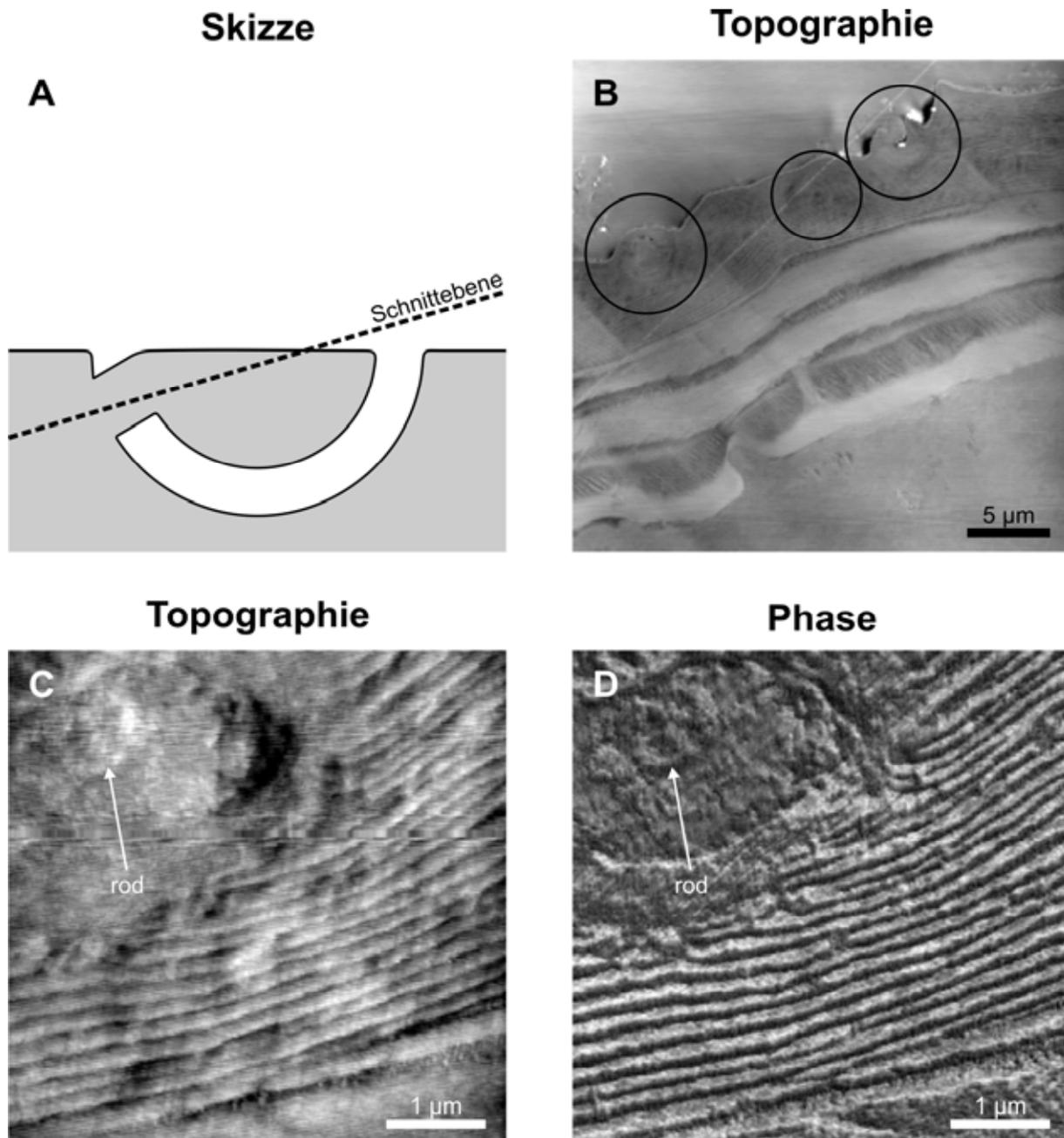
Auch die in Abb. 13 gezeigte Probe wurde gezielt mittels der anderen verwendeten Techniken untersucht. Durch Anwenden von zwei unterschiedlichen Messrichtungen konnte das Material auf Anisotropien bei den verschiedenen Materialeigenschaften untersucht werden.



**Abb. 11:** Aufbau der Kutikula von *Acanthocnemus nigricans*. Bei A, B und D handelt es sich um Mallory Trichrome Färbungen von Semidünnschnitten, C und E zeigen die Topographie der Anschnitte der polierten Probenblöckchen. **A** Übersicht eines kompletten Schnittes mit Referenz- (Ref) und IR-Organ-Kutikula (IR). **B** Angefärbtes IR-Organ. Endokutikula ist kaum nachweisbar. **C** Topographieausschnitt im IR-Organ. Mittig zu sehen ist ein von Kreiss und Schmitz (2005) beschriebener Kanal, durch den der sog. „rod“ zieht. Im Phasenbild ist dieser besser zu erkennen (vgl. Abb. 12). Die Exokutikula zeigt eine feine Schichtung. **D** Referenzkutikula mit gut erkennbarer endokutikulärer Schicht. **E** Topographieansicht der Referenzkutikula. Der umrandete Kasten **e** zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der fein geschichteten Exokutikula.



**Abb. 12:** Vergrößerter Bereich eines Kanals durch die Kutikula des Infrarotorgans von *Acanthocnemus nigricans* mit „rod“-Struktur. Links befinden sich Topographieaufnahmen, rechts die dazu gehörigen Phasenbilder. Der Anschnitt verläuft durch die Kanäle mit einem mit dem elektronendichten „rod“, wenn auch nicht auf ganzer Länge.



**Abb. 13:** Parallel zur äußeren Oberfläche angeschnittenes Infrarotorgan. **A** Skizze des Schnittverlaufs durch die sensorische Scheibe von *Acanthocnemus nigricans*, die über einen Stiel mit dem restlichen Exoskelett in Verbindung steht. **B** AFM-Topographie der Kutikula des Infrarotorgans. Zu sehen sind die quer angeschnittenen Kanäle der Sensillen (siehe Kreise). **C** Vergrößerung der Topographie eines angeschnittenen Kanals. In der Mitte des Kanals ist eine kreisrunde Erhöhung, der „rod“ (siehe Pfeil), zu sehen, die auch im **D** Phasenbild gut sichtbar ist. Der Querschnitt des Kanals befindet sich auf Höhe der fein geschichteten Exokutikula.

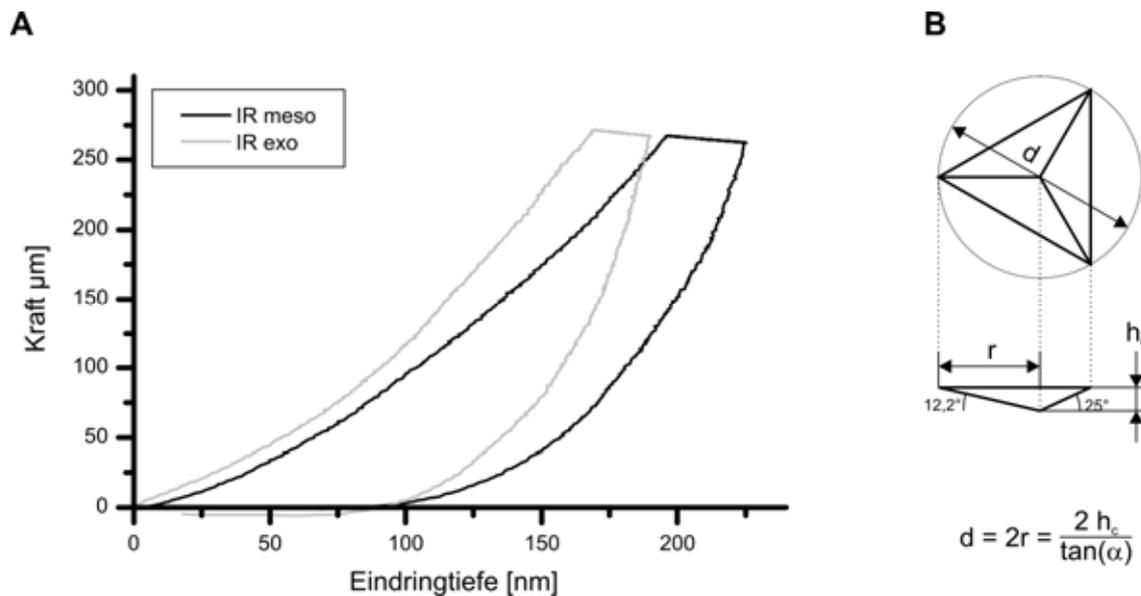
### 3.2 Mikromechanische Eigenschaften kutikulärer Schichten und Strukturen

Die mikromechanischen Eigenschaften der unterschiedlichen Schichten und Strukturen wurden mittels Nanoindentation gemessen. Die Ergebnisse der Mallory Trichrome Färbung halfen dabei, die Schichten in Materialgruppen zusammenzufassen und diese mittels statistischer Methoden zu vergleichen. Die Infrarotorgane wurden mit den dazugehörigen Referenzbereichen verglichen. Da es sich bei dem Infrarotorgan von *Melanophila acuminata* und der Gula von *Pachnoda marginata* um zwei Strukturen mit mechanischer Funktionsweise handelt, wurden zudem diese Systeme gegenübergestellt. Die mechanischen Eigenschaften der verschiedenen Kutikulatypen wurden ebenfalls mit denen des verwendeten Einbettmediums verglichen.

#### 3.2.1 Strukturen mit mechanischer Funktionsweise: *Melanophila acuminata* und *Pachnoda marginata*

Typische Kraft-Eindringtiefe-Kurven von Messungen an einem *Melanophila* IR-Sensillum zeigt die Abb. 14. Bei gleicher maximaler Kraft wird bei der weicheren Mesokutikula des Sensillums eine tiefere Eindringtiefe erreicht als bei der Exokutikula. In den Versuchen führte die maximale Kraft von ungefähr 300  $\mu\text{N}$  abhängig vom untersuchten Material zu Eindringtiefen von 120-400 nm bei Kontaktdurchmessern von ca. 0,5-2  $\mu\text{m}$ .

Die ermittelte Härte und der Elastizitätsmodul des umgebenden Epoxydharzes (Durcupan und Epon) sind zwei- bis viermal größer als die ermittelten Werte aller Kutikulaprobe (Abb. 15, Tab. 1). Daher konnten schon während der laufenden Messung Probenbereiche, die Harz enthalten, von den biologischen Materialien unterschieden werden. Sondiert man z.B. linienweise über den Querschnitt einer Kutikulaprobe, kann das Ende der biologischen Struktur anhand der unmittelbar danach zu messenden geringen Härte und des geringen Elastizitätsmoduls des Kunststoffes erkannt werden.



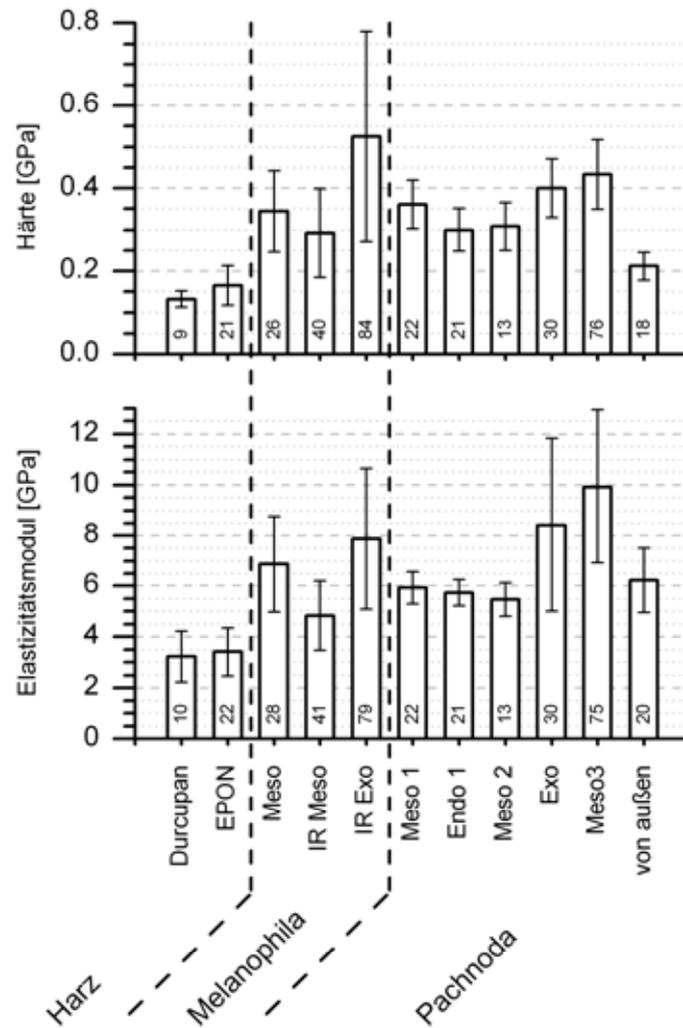
**Abb. 14:** **A** Typische Kraft-Eindringtiefe-Kurven für die innere Mesokutikula und die Exokutikula der Schale eines IR-Sensillums von *Melanophila* (aus Müller et al., 2008). **B** Der Kontaktdurchmesser in Aufsicht (oben) und die Berechnung des Durchmessers (unten) anhand der Kontakttiefe und der Spitzengeometrie.

### 3.2.1.1 Härte

Die ermittelte Härte für die exokutikuläre Schale des *Melanophila* Sensillums beträgt  $0,53 \pm 0,25$  GPa. Damit ist diese Schicht signifikant härter als jedes andere in dieser Arbeit gemessene Kutikulamaterial (Abb. 15, Tab. 1). Zudem ist diese fast zweimal härter als der aus Mesokutikula bestehende, darunter liegende Kern des Sensillums. Dieser wiederum stellt mit einer Härte von  $0,29 \pm 0,1$  GPa unter den eingebetteten biologischen Proben den weichsten Kutikulatyp dar.

Die Härte des Kerns ist darüber hinaus signifikant geringer als die unter den Sensillen befindliche Mesokutikula ( $0,34 \pm 0,09$  GPa), obwohl beide den gleichen Kutikulatyp aufweisen. Auch die innen liegende dritte Mesokutikulaschicht (Meso 3) der *Pachnoda* Gula ist deutlich härter. Hingegen unterscheiden sich die direkt über der Exokutikula befindliche Mesokutikula (Meso 2) und die darüber gelegene Endokutikula (Endo 1) der Gula nicht signifikant.

Die Exokutikula stellt auch bei den gemessenen Schichten von *Pachnoda marginata* mit  $0,40 \pm 0,07$  GPa zusammen mit der innen liegenden Meso 3 mit  $0,43 \pm 0,08$  GPa die härteste Schicht dar. Beide unterscheiden sich nicht signifikant von einander, weisen aber signifikante Unterschiede zu allen anderen gemessenen Materialien auf (Abb. 15 Tab. 1).



**Abb. 15:** Gemittelte Werte der Härte und des Elastizitätsmoduls der gemessenen Kutikulaschichten und der Einbettmedien. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder, die Beschriftung in den Säulen die Anzahl der berücksichtigten Messungen. Deutlich weicher und elastischer erscheinen die beiden Epoxyharze. Aus Müller et al., 2008.

		Harz		<i>Melanophila</i>			<i>Pachnoda</i>					
		Durcupan	EPON	Meso	IR Meso	IR Exo	Meso 1	Endo 1	Meso 2	Exo	Meso 3	von außen
Harz	Durcupan		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EPON	-		+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Melanophila</i>	Meso	+	+		+	+	-	-	-	+	+	+
	IR Meso	+	+	+		+	+	-	-	+	+	+
	IR Exo	+	+	-	+		+	+	+	+	+	+
<i>Pachnoda</i>	Meso 1	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
	Endo 1	+	+	+	+	+	-		-	+	+	+
	Meso 2	+	+	+	-	+	+	-		+	+	+
	Exo	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+
	Meso 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
	von außen	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	

**Elastizitätsmodul**

**Härte**

**Tab. 1:** Ergebnisse der ANOVA Analyse bei *Melanophila acuminata* und *Pachnoda marginata*. + steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Materialien, - deutet auf eine Gleichheit oder einen nicht signifikanten Unterschied der ermittelten Parameter hin. Das Signifikanzniveau beträgt  $p < 0,05$ . Die Werte in der oberen rechten Ecke vergleichen die Härte, die in der unteren linken Ecke den Elastizitätsmodul. Aus Müller et al., 2008.

Im Gegensatz zum *Melanophila* IR-Organ kann bei der Gula von *Pachnoda* immer eine gut ausgeprägte, innen liegende Endokutikula (Endo 2) gefunden werden. Diese ist jedoch in dem Bereich, in dem die mechanischen Eigenschaften mittels Nanoindenter ermittelt wurden, auf eine dünne Schicht von  $\leq 5\mu\text{m}$  reduziert (Abb. 6B) und konnte nicht gemessen werden. Die äußere Endo 1 und Meso 2 der Gula sind mit einer Härte von  $0,3 \pm 0,05$  GPa bzw.  $0,31 \pm 0,06$  GPa die weichsten Kutikulaschichten der *Pachnoda*, wobei der Unterschied untereinander nicht signifikant ist. Die Werte liegen zwischen denen der *Melanophila* IR Meso und Meso und weisen auch zu diesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Um Messungen der *Pachnoda* zudem mit denen von Barbakadze et. al. vergleichen zu können, wurde die äußere Oberfläche der Gula ähnlich präpariert und abgetastet. Dabei wurde eine mittlere Härte von  $0,21 \pm 0,03$  GPa gemessen, die sich deutlich von allen transversalen Messungen unterscheidet.

### 3.2.1.2 Elastizitätsmodul

Im Vergleich zur Härte sind die Unterschiede der Elastizitäten der verschiedenen Materialien etwas anders verteilt (Abb. 15, Tab. 1). Höhere Werte des Elastizitätsmoduls bedeuten eine geringere Elastizität, also eine höhere Steifigkeit. Das signifikant steifste Biomaterial ist die innen liegende Mesokutikula (Meso 3) von *Pachnoda* mit einem Elastizitätsmodul von  $9,93 \pm 3,03$  GPa. Zwischen der Exokutikula von *Pachnoda* Elastizitätsmodul von  $8,42 \pm 3,42$  GPa und der exokutikulären Schale von *Melanophila* mit  $7,87 \pm 2,79$  GPa besteht kein signifikanter Unterschied. Die Schale zeigt zudem keinen signifikanten Unterschied zur unter den Sensillen liegenden Mesokutikula.

Im Unterschied zu diesen vergleichsweise steifen Materialien zeigt der mesokutikuläre Kern des *Melanophila* Sensillums mit einem Elastizitätsmodul von  $4,84 \pm 1,36$  GPa die höchste Elastizität. Er ist somit mehr als eineinhalbmals elastischer als die ihn umgebende exokutikuläre Schale und doppelt so elastisch, wie das steifste gemessene Material (*Pachnoda* Meso 3). Der Unterschied zu allen anderen Materialien ist signifikant, außer zur über der Exokutikula liegenden Mesokutikula (Meso 2) der Gula.

Auch in der Gula zeigen die für mechanische Leistungen speziell angepassten Schichten Abweichungen zu den standardmäßig vorkommenden Schichten. Die Meso 2 stellt mit einem Elastizitätsmodul von  $5,47 \pm 0,66$  GPa die elastischste Schicht dar, die sich jedoch von der darüber liegenden und ebenfalls sehr elastischen Endokutikula (Endo 1) ( $5,74 \pm 0,51$  GPa), den Messungen an der Gulaoberfläche und dem mesokutikulären Kern des *Melanophila* IR-Sensillums (IR Meso) nicht signifikant unterscheidet. Die äußere Mesokutikula der Gula (Meso 1) ist mit  $5,93 \pm 0,64$  GPa ebenfalls relativ elastisch und zeigt keine signifikanten Unterschiede zur Endo 1 der Gula und den Messungen der äußeren Oberfläche.

Trotz unterschiedlicher Krafrichtung und Probenvorbereitung besteht zwischen den Messungen an der äußeren Oberfläche der Gula mit einem Elastizitätsmodul von

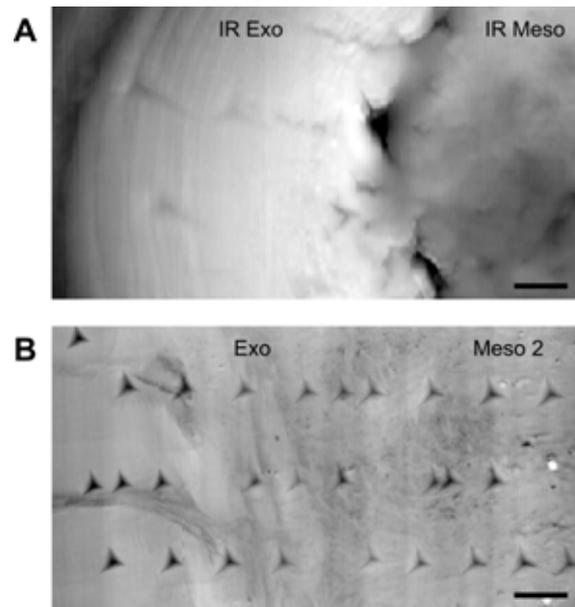
6,24±1,26 GPa und den Werten der äußeren drei Schichten (Meso 1, Endo 1, Meso 2) kein signifikanter Unterschied. Zudem ist auch der Unterschied zur Mesokutikula von *Melanophila* nicht signifikant.

### 3.2.1.3 AFM-Topographie der Eindrücke

Die Topographie der Eindrücke wurde mittels AFM mehrere Tage nach den Nanoindentation Messungen untersucht, um eine größtmögliche Rückverformung des Materials zu gewährleisten. Da die gemessenen Materialien jedoch nicht perfekt elastisch sind, blieben Eindrücke auf der Probenoberfläche zurück. Diese konnten sehr gut in allen Schichten der *Pachnoda* Gula (Abb. 16B) sowie in der Mesokutikula unter den Sensillen (Meso) und in der exokutikulären Schale (IR Exo) des *Melanophila* IR-Organs festgestellt werden (Abb. 16A). Hingegen konnten Eindrücke in der schwammartigen Mesokutikula des IR-Sensillums (IR Meso) nur schwer erkannt werden.

Durch diese Untersuchung konnte die Platzierung der Eindrücke sehr gut nachvollzogen werden, so dass die Restverformungen in der AFM Topographie den Indentierungen zugeordnet werden konnten. Eine Topographieaufnahme war zwar auch mit dem verwendeten Nanoindenter möglich, jedoch ist die Auflösung des AFMs durch die sehr feine AFM Nadel (Spitzendurchmesser <7nm) wesentlich besser als die der stumpferen Berkovichspitze.

Eine geringere Restverformung könnte eine bessere Rückverformung des Materials bedeuten. Leider war eine quantitative Analyse der Tiefe der Restverformung aufgrund der geringen Eindringtiefen  $h_{\max}$  und der hohen Rückverformung größtenteils nicht möglich. Durch die geringe Größe der Strukturen konnte die Eindringtiefe nicht höher gewählt werden, da dies zu einer Vergrößerung des Kontaktdurchmessers führen würde (vgl. Kapitel 2.5 und Abb. 14)

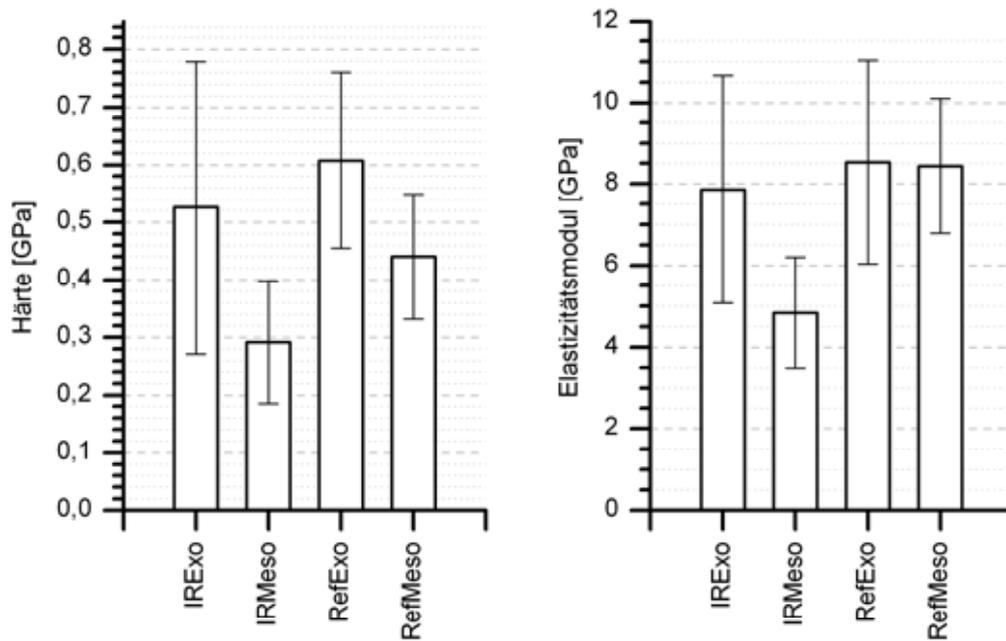


**Abb. 16:** AFM Topographie der angeschnittenen Proben mehrere Tage nach der Nanoindentation. **A** Topographieausschnitt eines IR-Sensillum von *Melanophila*. Die Eindrücke können auch nach mehreren Tagen in der exokutikulären Schale (IR Exo) gut gefunden werden. Hingegen verschwindet die Verformung im schwammartigen mesokutikulären Kern (IR Meso) fast vollständig. **B** Beispielhafter Topographieausschnitt der Gula von *Pachnoda marginata*. Die Eindrücke verformen sich auch nach mehreren Tagen kaum zurück und können gut erkannt werden. Aus Müller et al., 2008.

#### 3.2.1.4 *Melanophila*: Vergleich der Kutikula von Infrarotorgan und Referenz

Um noch gezielter zu untersuchen, welche mechanischen Spezialisierungen das Infrarotorgan von *Melanophila acuminata* aufweist, wird im Folgenden die Kutikula des IR-Organs mit der Referenzkutikula verglichen.

Die melanierte Exokutikula des Referenzbereichs ist mit 0,61 GPa härter und zeigt mit 8,53 GPa auch einen höheren Elastizitätsmodul als die unpigmentierte Exokutikula im Infrarotorgan (Abb. 17). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Exo- und Mesokutikula unterscheiden sich bzgl. der Härte in beiden Bereichen IR-Organ signifikant; bei der Elastizität ist dies nicht der Fall. Zudem sind die Unterschiede im Infrarotsensillum mit einem Faktor von fast zwei wesentlich größer.



**Abb. 17:** Vergleich der mechanischen Eigenschaften von Kutikula des IR-Organs (IR) und des Referenzbereichs (Ref) von *Melanophila acuminata*. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Zu sehen sind Härte (links) und Elastizitätsmodul (rechts) der unterschiedlichen Kutikulaschichten.

		IR		Ref		Härte
		Exo	Meso	Exo	Meso	
IR	Exo		+	-	-	Härte
	Meso	+		+	+	
Ref	Exo	-	+		+	
	Meso	-	+	-		

Modulus

**Tab. 2:** Ergebnisse der ANOVA Analyse bei Vergleich von Kutikula des IR-Organs und Referenzbereichs von *Melanophila acuminata*. + steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Materialien, - deutet auf eine Gleichheit oder einen nicht signifikanten Unterschied der ermittelten Parameter hin. Das verwendete Signifikanzniveau beträgt  $p < 0,05$ . Die Werte in der oberen rechten Ecke vergleichen die Härte, die in der unteren linken Ecke den Elastizitätsmodul.

Auch in diesem Vergleich ist die schwammartige Mesokutikula des IR-Sensillums das weichste und zugleich elastischste kutikuläre Material und unterscheidet sich signifikant von allen anderen Kutikulaschichten. Hingegen ähnelt die Mesokutikula des Referenzbereichs in seiner Elastizität mit 8,44 GPa allen anderen Schichten außer eben dieser.

Zusammenfassung: Die Mesokutikula des IR-Organs grenzt sich durch ihre geringe Härte und hohe Elastizität am deutlichsten von allen anderen Schichten ab. Die Exokutikula des IR-Organs erreicht, obwohl nicht melanisiert, ähnliche Härte und Steifigkeit wie die Exokutikula des Referenzbereichs.

### 3.2.2 *Merimna atrata*

Im Folgenden werden die mechanischen Eigenschaften der Kutikula von *Merimna atrata* dargestellt. Wie die histologischen Untersuchungen gezeigt haben, ist das Infrarotorgan wenig strukturiert. Im Gegensatz zum Infrarotorgan von *Melanophila* zeigt die Kutikula keine Mikrostrukturen. Die normale Schichtung der umliegenden Kutikula wird beibehalten. Die Kutikula zeigt die standardmäßige Gliederung von außen nach innen in Exo-, Meso- und Endokutikula. Um eventuelle Spezialisierungen im Bereich des IR-Organs kenntlich zu machen, werden die mechanischen Eigenschaften mit denen der Referenzkutikula am Rande des Grubenorgans verglichen. Gemessen wurden Härte und Elastizitätsmodul der Exo-, Meso- und Endokutikula an angeschnittenen Infrarotorganen und Schnitten durch die Kutikula des Referenzbereichs sowie des Einbettmediums.

#### 3.2.2.1 Härte

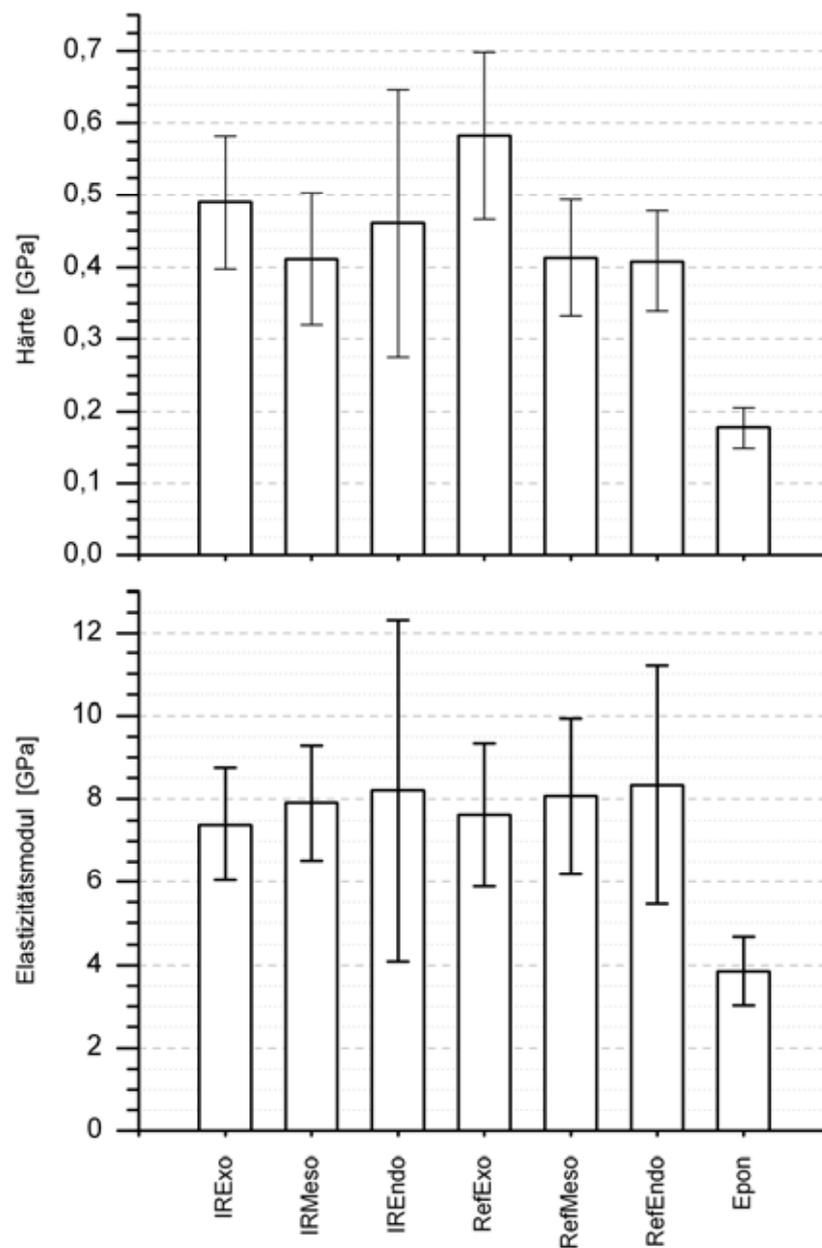
Das umgebende Epon hat mit einem Mittelwert von 0,18 GPa (Abb. 18) eine ähnliche Härte wie das Einbettmedium bei vorangegangenen Messungen (Abb. 6) und ist zu diesen auch nicht signifikant unterschiedlich. Das Einbettmedium unterscheidet sich jedoch deutlich von allen anderen Proben dieser Messreihe (Tab. 3). Da das Epoxydharzes mehrmals angemischt wurde und die Proben nicht alle zeitgleich im Wärmeschrank ausgehärtet wurden, waren konstante mechanische Eigenschaften nicht unbedingt zu erwarten. Das Ergebnis zeigt somit die Zuverlässigkeit des verwendeten Protokolls.

Die sklerotisierte Exokutikula des Referenzbereichs ist mit 0,58 GPa bei *Merimna* die härteste gemessene Schicht. Allerdings unterscheidet sie sich nicht signifikant von der zweithärtesten Schicht, der Exokutikula des Infrarotorgans (0,49 GPa), und auch nicht von der Endokutikula des Infrarotorgans, wo 0,46 GPa gemessen wurden.

Die weichste kutikuläre Schicht stellt mit 0,41 GPa die Endokutikula des Referenzbereichs dar. Sie ist deutlich weicher als Exokutikula, zu allen anderen gemessenen Kutikulaprobe ist der Vergleich nicht eindeutig.

Stellt man die Kutikula des IR-Organs und des Referenzbereichs gegenüber, fällt auf, dass sich die jeweiligen entsprechenden Schichten nicht signifikant unterscheiden. Im Infrarotorgan selber unterscheiden sich lediglich Exo- und Mesokutikula signifikant

voneinander. Beim Referenzmaterial grenzt sich die Exokutikula signifikant von den zwei anderen Schichten ab. Meso- und Endokutikula hingegen zeigen mit jeweils ca. 0,41 GPa aber ähnliche Härte­werte.



**Abb. 18:** Gemittelte Werte der Härte und des Elastizitätsmoduls der gemessenen Kutikulaschichten von *Merimna atrata*. Das Präfix „IR“ weist auf Kutikula des Infrarotorgans, „Ref“ auf Kutikula des Referenzbereichs hin. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

		IR			Ref			Epon
		Exo	Meso	Endo	Exo	Meso	Endo	
IR	Exo		+	-	-	+	+	+
	Meso	-		-	+	-	-	+
	Endo	-	-		-	-	-	+
Ref	Exo	-	-	-		+	+	+
	Meso	-	-	-	-		-	+
	Endo	-	-	-	-	-		+
Epon		+	+	+	+	+	+	

Modulus

Härte

**Tab. 3:** Ergebnisse der ANOVA Analyse von *Merimna atrata*. Es wurden jeweils zwei Materialien gegeneinander getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  gesetzt. Signifikante Unterschiede werden durch ein +, nicht signifikante durch ein - angezeigt. Die obere rechte Ecke beinhaltet die Vergleiche der Härten, die untere linke die Vergleiche der Elastizitätsmoduln.

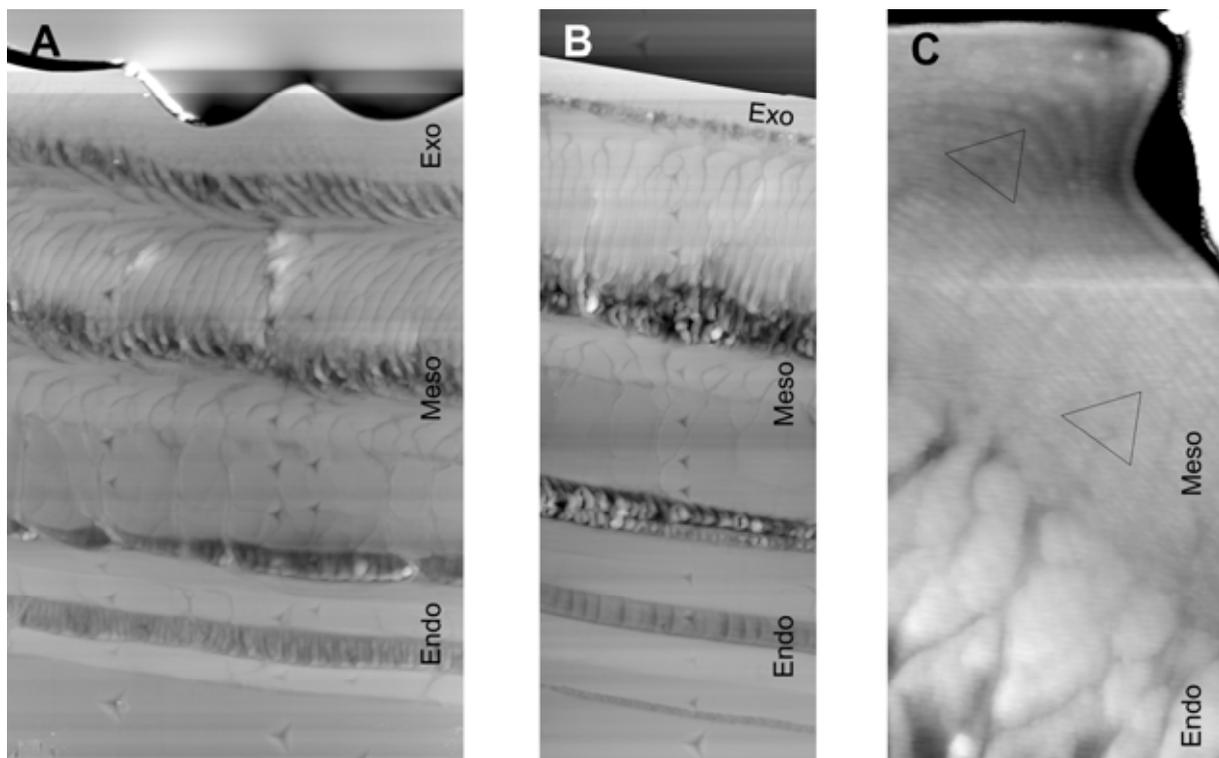
### 3.2.2.2 Elastizitätsmodul

Der Vergleich der Elastizitätsmoduln untereinander zeigt, dass sich lediglich das Einbettmedium mit 3,85 GPa von allen anderen Materialien signifikant unterscheidet. Die Werte für Kutikula liegen zwischen 7,39 GPa und 8,33 GPa, wobei die Exokutikula des Infrarotorgans das elastischste und die Endokutikula des Referenzbereichs das unelastischste Material darstellen. Insgesamt liegt eine Tendenz zu einem Gradienten von elastischen äußeren und zu unelastischen innen liegenden Schichten vor, der sowohl im Infrarotorgan als auch bei der Referenzkutikula gefunden werden kann, jedoch nicht signifikant nachweisbar ist.

Die Signifikanzwerte (p-Werte) der Kutikulavergleiche liegen zwischen 0,35 beim Test Exo- gegen Mesokutikula des IR-Organs und 0,93 bei Test der Endokutikula des IR-Organs und des Referenzbereichs, so dass sie deutlich über dem Niveau für einen signifikanten Unterschied liegen ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2.3 AFM Topographie der Eindrücke

Die nach der Nanoindentation aufgenommenen AFM-Topographien bestätigen die Ergebnisse der Elastizitätsmoduln. Die Eindrücke der Berkovichspitze können in den Bereichen der Meso- und Endokutikula sowie im Einbettmedium deutlich nachgewiesen werden (Abb. 19). Das Einbettmedium zeigt mit einem Elastizitätsmodul von 3,85 GPa zwar eine hohe Elastizität, jedoch ist es auch deutlich weicher als alle anderen Materialien, so dass hier die höchsten Eindringtiefen und tiefe Restverformungen erzielt wurden. Eindrücke in der Exokutikula sind weder im Infrarotorgan noch in der Referenz gut auffindbar. Auch in vergrößerten Aufnahmen fällt die Positionsbestimmung schwer. Anhand der Positionsangaben, die während der Indentierung notiert wurden, lassen sich die Position im AFM-Bild dennoch präzise rekonstruieren (Abb. 19C). Die Exokutikula ist ähnlich hart wie die anderen Schichten, zeigte jedoch eine nicht signifikant höhere Elastizität (vgl. Abb. 18 und Tab. 3). Betrachtet man Eindrücke ist die höhere Elastizität jedoch gut zu erkennen.



**Abb. 19:** Eindrücke vom Nanoindenter bei Kutikula von *Merimna atrata* im **A** Infrarotorgan und **B** Referenzbereich. Die Anschnitte wurden linienweise abgetastet. Die Eindrücke der Berkovichspitze sind in beiden Bildern im Bereich der Endo- und Mesokutikula noch gut zu sehen. In der Exokutikula sind sie hingegen kaum nachweisbar. **B** Vergrößerte Aufnahme der Exokutikula eines Anschnitts im IR-Organ. Die Dreiecke zeigen Positionen von Eindrücken. Auch hier sind Eindrücke kaum sichtbar. Die Rückverformung nach Eindringen der Spitze ist hier am größten.

### 3.2.3 *Acanthocnemus nigricans*

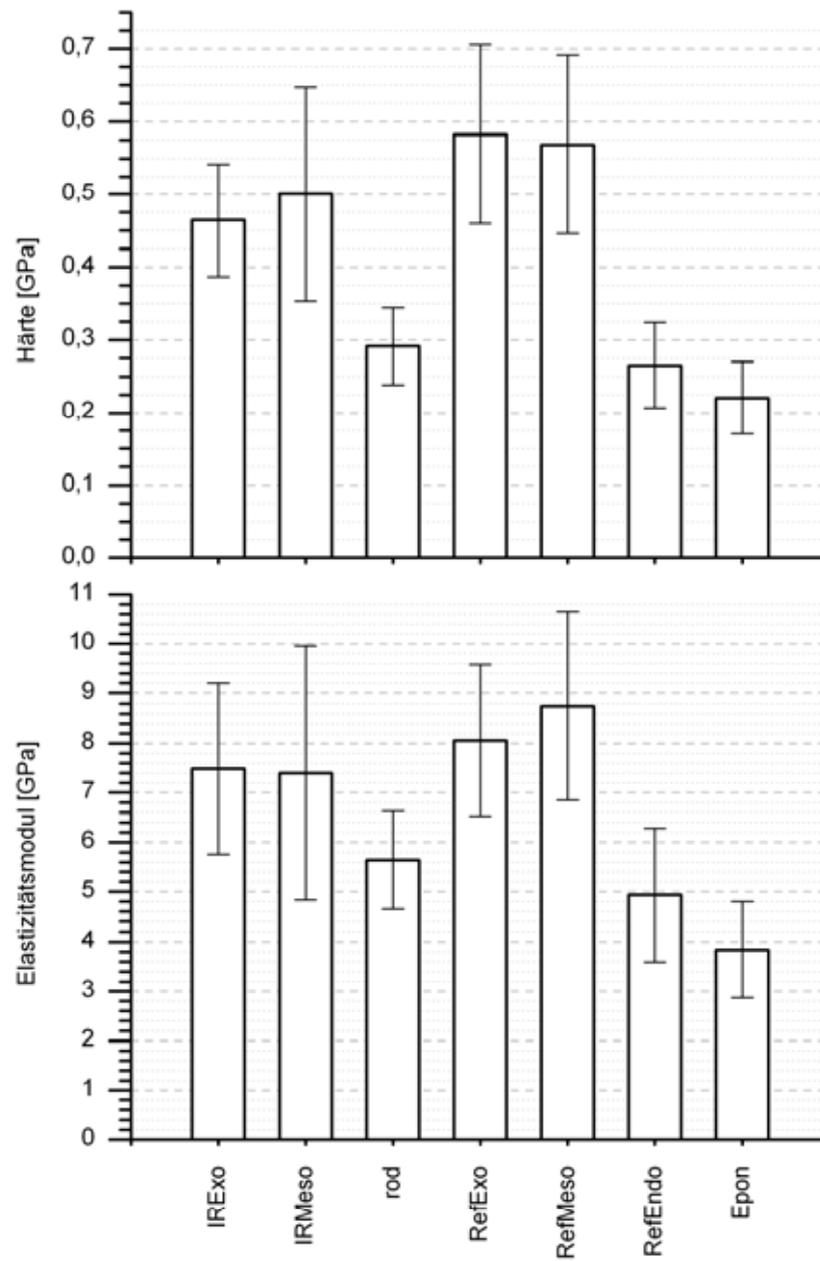
Auch das Infrarotorgan von *Acanthocnemus nigricans* funktioniert nach bisherigen Kenntnissen als Bolometer bestehend aus einem Infrarotabsorber und einem darunter liegenden Wärmerezeptor. Mechanische Komponenten wurden bisher nicht entdeckt. Besonderheiten stellen die Minimierung der thermischen Masse und der bisher unbekannte Sensillentyp mit seinen sog. „rods“ dar. Trotzdem könnten mechanische Eigenschaften eine Rolle spielen. Um etwaige Spezialisierungen gegenüber der unstrukturierten Körperkutikula zu entdecken, werden die Ergebnisse der mechanischen Tests dieser zwei Bereiche im Folgenden miteinander verglichen.

#### 3.2.3.1 Härte

Die beiden härtesten Schichten sind mit 0,58 GPa bzw. 0,57 GPa die Exo- bzw. die Mesokutikula des Referenzbereichs (Abb. 20), wobei kein signifikanter Unterschied vorliegt. Beide unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant von der Mesokutikula des Infrarotorgans, die das dritthärteste Material darstellt (Tab. 4), jedoch grenzen sie sich zu allen anderen Schichten deutlich ab. Der Unterschied zwischen Exo- und Mesokutikula des Infrarotorgans ist ebenfalls nicht eindeutig.

Die weichsten Kutikulaschichten sind mit 0,27 GPa die Endokutikula des Referenzbereichs und mit 0,29 GPa der Bereich der „rods“ innerhalb der Dendritenkanäle. Das Zellmaterial in diesem Kanal ist beim Einbetten durch weiches Epon ersetzt worden, wie die AFM-Bilder vermuten lassen (Abb. 13). Die „rods“ wurden in zwei unterschiedlichen Richtungen vermessen, nämlich transversal und longitudinal. In Kapitel 3.2.3.4 wird eine Fallunterscheidung dieser beiden Messrichtungen durchgeführt. Aufgrund der geringen Dicke der Endokutikula im Infrarotorgan konnte diese nicht gemessen werden.

Die gemessene Härte des Einbettmediums der *Acanthocnemus* Proben liegt mit 0,22 GPa leicht über den Werten der anderen Proben. Es sei an dieser Stelle aber bereits vorweggenommen, dass eine solche Abweichung nicht bei den gemessenen Elastizitätsmoduln zutrifft und die Messungen somit nicht beeinflusst wurden. Die Messungen am Einbettmedium unterscheiden sich, wie auch in allen anderen Messungen zuvor, signifikant vom biologischen Material.



**Abb. 20:** Gemittelte Werte der Härte und des Elastizitätsmoduls der gemessenen Kutikulaschichten von *Acanthocnemus nigricans*. Das Präfix „IR“ weist auf Kutikula des Infrarotorgans, „Ref“ auf Kutikula des Referenzbereichs hin. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

		IR			Ref			Epon
		Exo	Meso	rod	Exo	Meso	Endo	
IR	Exo		-	+	+	+	+	+
	Meso	-		+	-	-	+	+
	rod	+	-		+	+	-	+
Ref	Exo	-	-	+		-	+	+
	Meso	+	-	+	-		+	+
	Endo	+	+	-	+	+		+
Epon		+	+	+	+	+	+	

Modulus

Härte

**Tab. 4:** Ergebnisse der ANOVA Analyse von *Acanthocnemus nigricans*. Es wurden jeweils zwei Materialien gegeneinander getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  gesetzt. Signifikante Unterschiede werden durch ein +, nicht signifikante durch ein - angezeigt. Die obere rechte Ecke beinhaltet die Vergleiche der Härten, die untere linke die Vergleiche der Elastizitätsmoduln.

### 3.2.3.2 Elastizitätsmodul

Die Elastizität der verschiedenen Schichten ist ähnlich verteilt wie die Härte (Abb. 20 unten). Die steifsten Materialien sind die Exo- und Mesokutikula des Referenzbereichs mit 8,06 GPa und 8,76 GPa. Der Unterschied zwischen diesen beiden Schichten ist nicht signifikant (Tab. 4). Die Exokutikula des Infrarotorgans unterscheidet sich mit 7,48 GPa ebenfalls nicht signifikant von der Exokutikula der Referenz. Im IR-Organ stellt sie die unelastischste Schicht dar, ihr Unterschied zur Mesokutikula (7,40 GPa) ist allerdings nicht eindeutig.

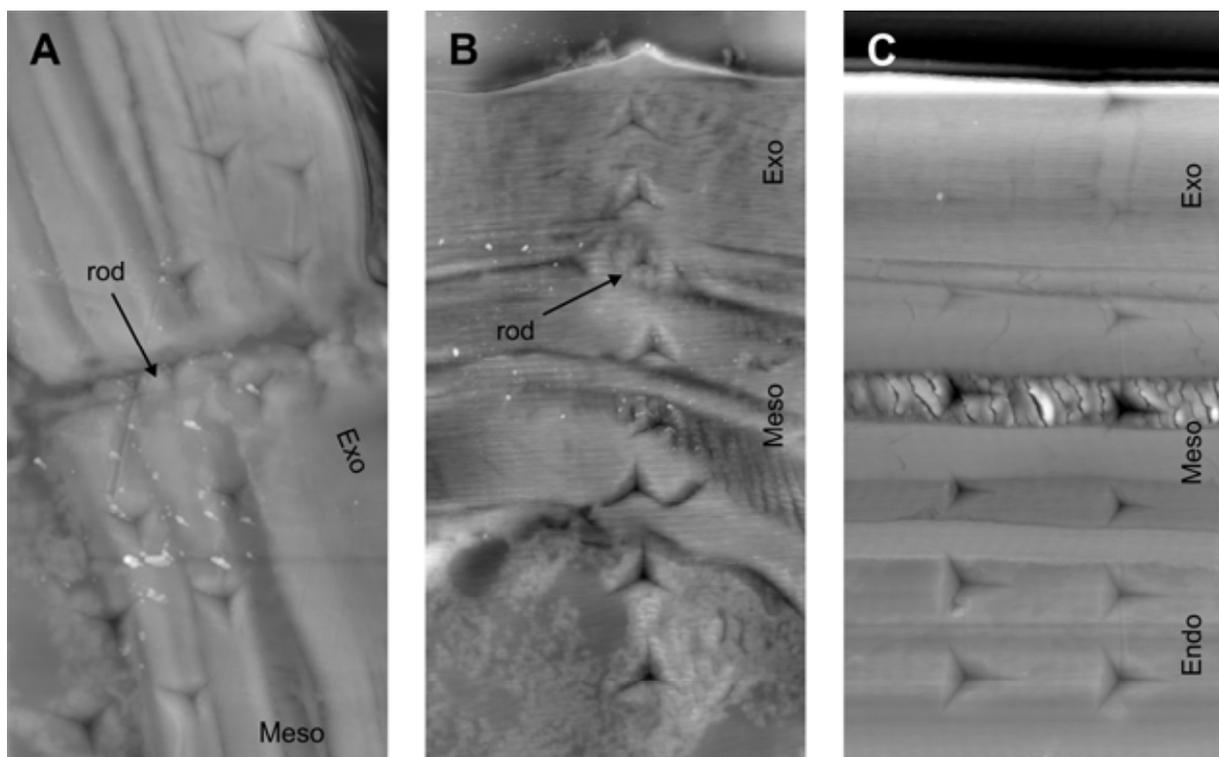
Die elastischste kutikuläre Schicht ist mit 4,94 GPa die Endokutikula der Referenz. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, konnten die Materialdaten der Endokutikula im IR-Organ aufgrund ihrer geringen Dicke nicht ermittelt werden.

Wie zu erwarten war, gibt es zwischen der Kutikula des Infrarotorgans und des Referenzbereichs keinen signifikanten Unterschied bei Kutikulaschichten des gleichen Typs. Die Ähnlichkeit der Zusammensetzung der Schichten zeigt sich also

nicht nur im strukturellen Aufbau (vgl. Abb. 11), sondern auch in den mechanischen Eigenschaften der Schichten.

### 3.2.3.3 AFM-Topographie der Eindrücke

Die Eindrücke der Berkovichspitze lassen sich in allen Kutikulaschichten außer in der Exokutikula der Referenzkutikula in der AFM-Topographie gut erkennen. Die zurückgebliebene Eindrucktiefe ist dort also gering. Erklärt werden kann das durch die gemessenen mechanischen Eigenschaften. Bei der Nanoindentation war diese Kutikulaschicht das härteste Material, so dass hier die geringsten Eindringtiefen erzielt wurden. Ein direkter Zusammenhang zu einer höheren Elastizität ist somit nicht direkt gegeben und konnte auch in den Messungen nicht gezeigt werden.



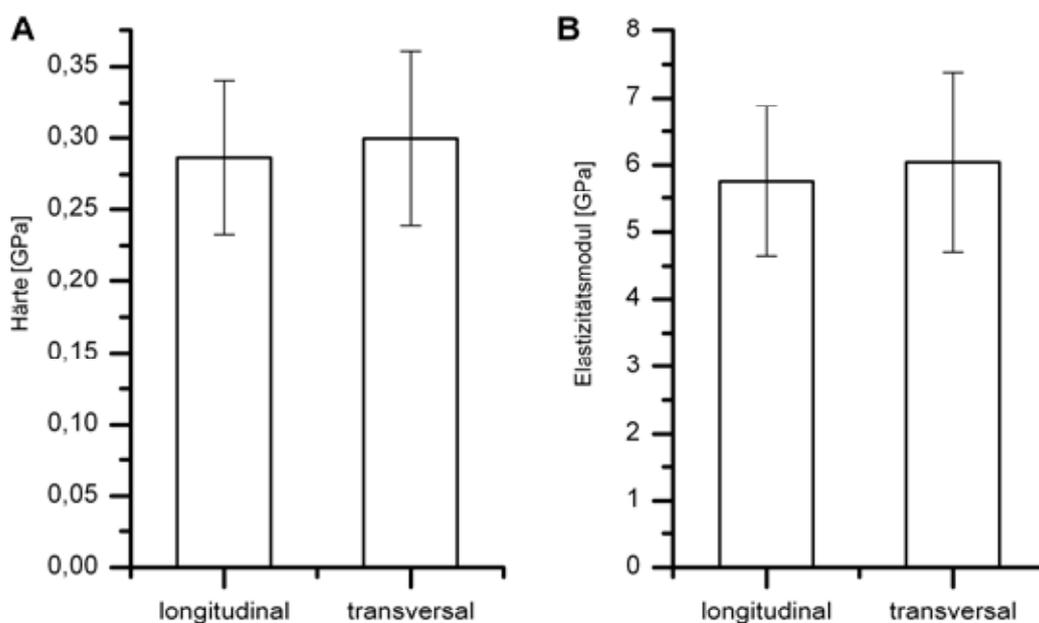
**Abb. 21:** AFM-Topographie der Probenoberfläche von *Acanthocnemus nigricans* nach Nanoindentation. Die Anschnitte wurden linienweise abgetastet. **A** Anschnitt transversal durch die Schichten des IR-Organs. Der sog. „rod“ ist longitudinal angeschnitten (vgl. Abb. 12, selber Anschnitt). Die Rückverformung in allen Schichten ist gering, so dass die Eindrücke auch nach der Nanoindentation noch gut sichtbar sind. **B** Nahezu longitudinaler Anschnitt des IR-Organs. Kanal mit „rod“ ist transversal angeschnitten. Ein Eindruck befindet sich mitten im Kanal. Die Rückverformung ist in allen Materialien gering. **C** Topographie der Referenzkutikula. Die Eindrücke in der Exokutikula sind weniger gut zu sehen, was für eine stärkere Rückverformung und somit für eine höhere Elastizität spricht.

Die Eindrücke mit geringerer Tiefe und kleinerer Fläche im Bereich der „rods“ können dadurch erklärt werden, dass hier die maximal applizierte Kraft verringert wurde. Dieses war aufgrund der geringen Strukturgröße erforderlich. Die Kontaktfläche wurde so reduziert und es wurde verhindert, dass zuviel Randmaterial die Messung beeinflusst.

### 3.2.3.4 Einfluss der Krafrichtung auf den „rod“

Der „rod“, der durch einen Kanal der Kutikula des Infrarotorgans zieht, wurde in verschiedenen Richtungen angeschnitten. Bei der Nanoindentation konnte so die Kraft beim Eindringen in die Probe in unterschiedlicher Ausrichtung zum „rod“ appliziert werden.

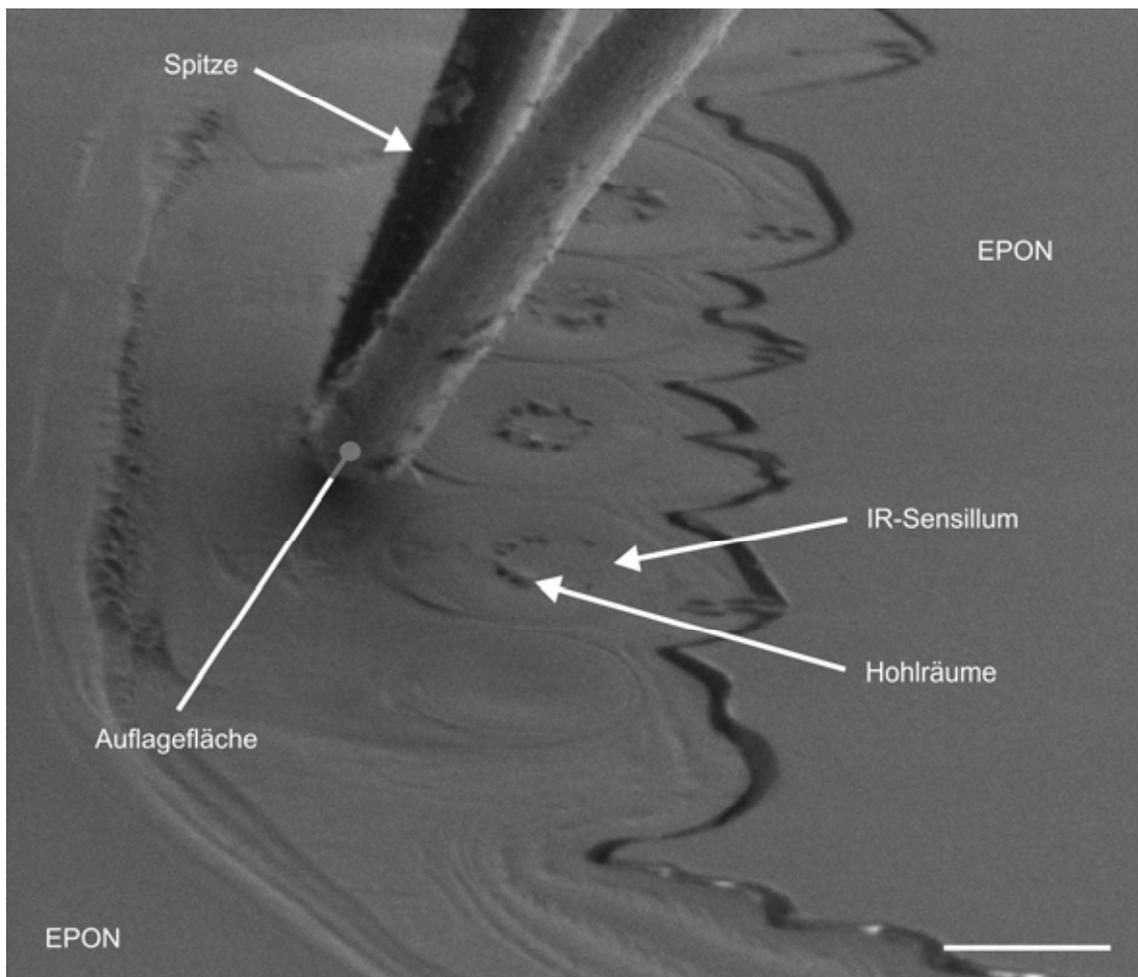
Die Krafrichtung hat auf die Messergebnisse keine Auswirkung (Abb. 22). Die Unterschiede sind sowohl bei der Härte als auch beim Elastizitätsmodul mit p-Werten von je 0,76 nicht signifikant unterschiedlich. Die ermittelte Härte lag longitudinal bei 0,29 GPa, transversal bei 0,30 GPa. Die entsprechenden Elastizitätsmoduln lagen mit 5,78 GPa und 6,04 GPa ebenfalls dicht beieinander.



**Abb. 22:** Vergleich der mechanischen Eigenschaften des „rods“ bei unterschiedlichen Anschnitttrichtungen. Proben geschnitten transversal und longitudinal zur Ausrichtung des „rods“. **A** Ermittelte Härte der unterschiedlichen Krafrichtungen. Der geringe Unterschied ist nicht signifikant. **B** Elastizitätsmodul bei unterschiedlicher Kraftapplikation. Der Unterschied ist nicht signifikant.

### 3.3 Wärmeleitfähigkeit

Agrund der Kombination des SThMs mit einem Rasterelektronenmikroskop konnte die Mess-Spitze sehr gut positioniert werden (Abb. 23). Zudem konnte die Probenoberfläche vor dem Aufsetzen der Mess-Spitze auf Topographieartefakte hin untersucht werden.



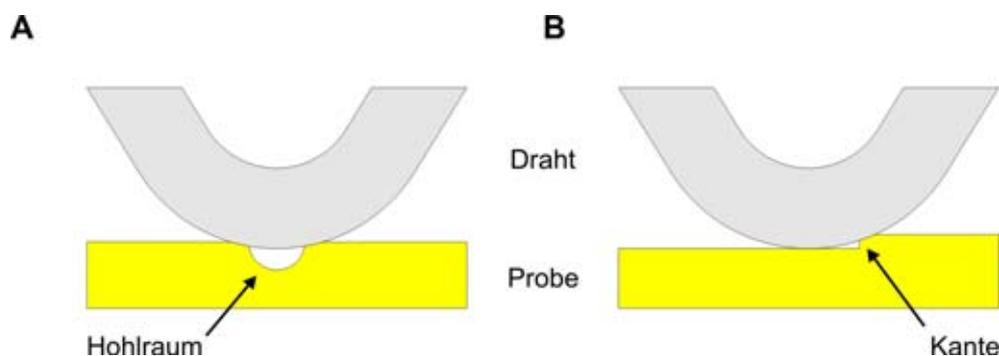
**Abb. 23:** REM-Aufnahme einer angenäherten SThM-Mess-Spitze nach dem qualitativen Scan eines IR-Sensillums. Die eigentliche Kontaktfläche wird von der Spitze verdeckt. Das Einbettmedium (EPON) erscheint sehr glatt. Bei Materialübergängen entstehen Topographiekontraste. Gut zu sehen sind auch die Hohlräume im Inneren des Sensillums. Balken entspricht 10 µm.

#### 3.3.1 Qualitative Messungen

Qualitative Messungen zeigen lediglich Materialkontraste, präzise Werte der Wärmeleitfähigkeit lassen sich jedoch nicht ablesen. Diese Methode lässt ein Abrastern der Oberfläche zu und bietet dabei die üblichen Daten der

Rasterkraftmikroskopie wie Topographie und Feedbacksignal. Das Feedbacksignal entspricht der Auslenkung des Cantilevers und ist gleichbedeutend mit der Auflagekraft, wenn sich die Spitze in Kontakt zur Probenoberfläche befindet. Die Auflagekraft bzw. das Feedbacksignal wird während des Scannens konstant gehalten, so dass die Kontaktflächen bei Materialien mit ähnlichen mechanischen Eigenschaften vergleichbar sind. Starke Kontraste des Feedbacksignals deuten auf eine nicht optimale Kraftregelung hin und können aufgrund der variierenden Auflagefläche zu Kontrasten in der Wärmeleitfähigkeit führen, da bei größerer Kontaktfläche mehr Wärme in die Probe abgeleitet werden kann. Hier muss die Signalspanne betrachtet werden, um Aussagen über die Qualität der Regelung treffen zu können.

Kanten und ähnliche topographische Erhebungen bzw. Einsenkungen können ebenfalls durch Veränderungen der Kontaktfläche zu artifiziellen Kontrasten der Wärmeleitfähigkeit führen (Abb. 24), so dass die Topographie der Probenoberfläche bei der Auswertung ebenfalls berücksichtigt werden muss.



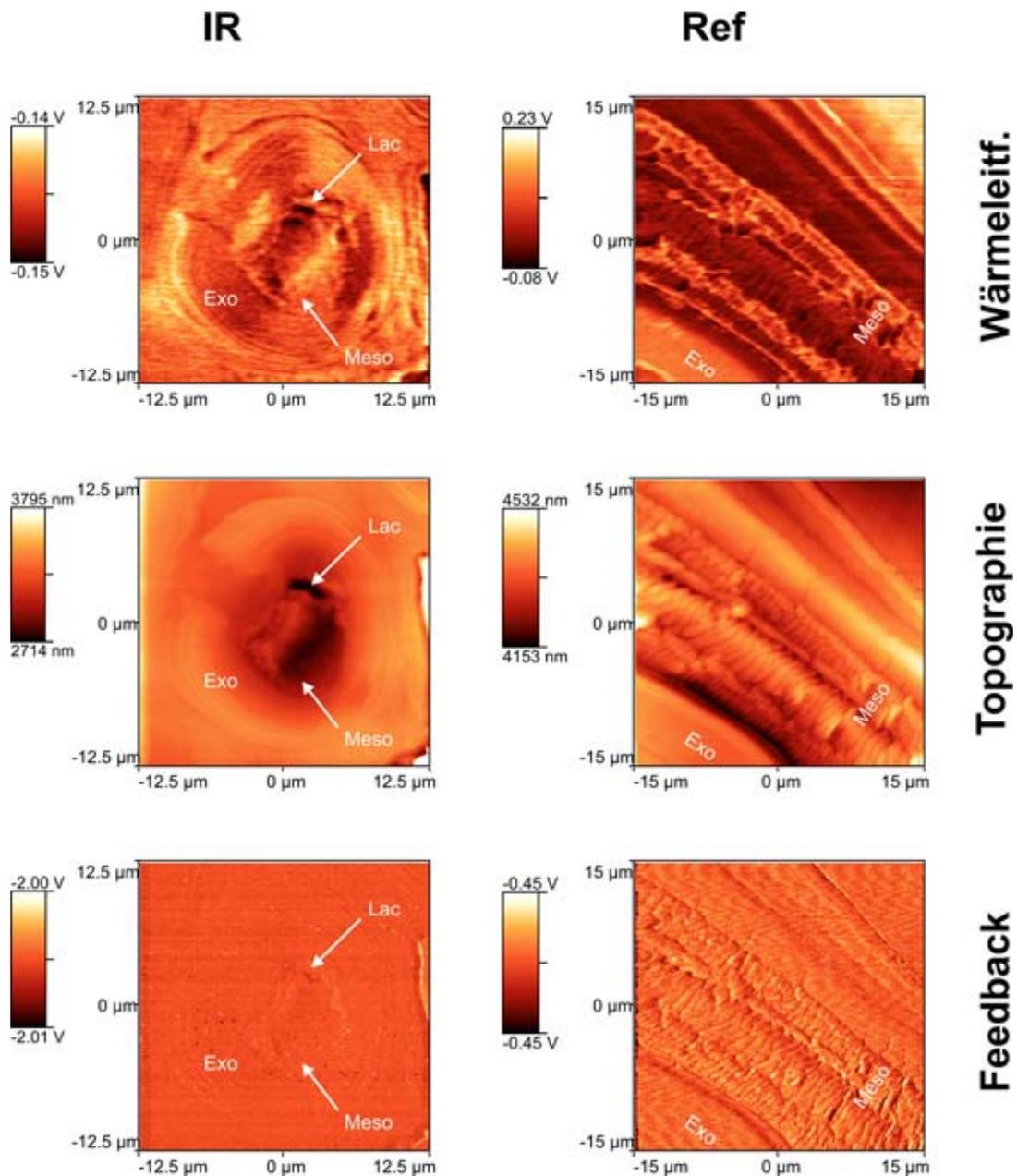
**Abb. 24:** Schema der Auflagefläche der beheizten Drahtschleife (grau) bei Unebenheiten der Probenoberfläche (gelb). Unebenheiten in der Topographie führen häufig zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche, da der Draht die Probe an mehreren Stellen berührt. Beispiel **A** zeigt die Vergrößerung der Kontaktfläche, wie sie an Hohlräumen (z.B. im angeschnittenen IR-Sensillum) möglich ist. **B** Zudem können Kanten und andere Unebenheiten zu einer vergrößerten Kontaktfläche führen.

### 3.3.1.1 *Melanophila acuminata*

In den qualitativen Scans sind bzgl. der Wärmeleitfähigkeit nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Materialien festzustellen, was an der Spanne des aufgenommenen Signals (in Abb. 25 links neben dem Bild) zu erkennen ist. Dies gilt insbesondere für die Kutikula des Infrarotorgans. Die Referenzkutikula hingegen

zeigt einen Kontrast in der Exokutikula, wo die Wärmeleitfähigkeit leicht erhöht erscheint. Die Mesokutikula leitet dementsprechend Wärme schlechter. Die schmalen Bereiche mit erhöhter Leitfähigkeit können auf die Topographie zurückgeführt werden. Dies gilt auch im Bereich der IR-Sensillen, insbesondere in der mesokutikulären Schicht im Inneren der Kugel.

Endokutikula konnte sowohl im Bereich des Infrarotorgans als auch im Referenzbereich kaum nachgewiesen werden. Bei den innen liegenden Schichten der Referenzkutikula mit erhöhter Wärmeleitfähigkeit handelt es sich daher ebenfalls um Mesokutikula. Auch das umgebende Epoxydharz scheint Wärme besser von der beheizten Drahtspitze abzuleiten.



**Abb. 25:** Wärmeleitfähigkeit des Infrarotorgans und der Referenzkutikula von *Melanophila acuminata*. Kontraste der Wärmeleitfähigkeit können im IR-Sensillum (links) vor allem durch topographische Gegebenheiten, wie zu Beispiel den Hohlräumen im Sensillum (lac) erklärt werden. Die Signalspanne ist zudem gering. Im Referenzbereich (rechts) zeigt die Exokutikula und die innen liegende Mesokutikula eine erhöhte Leitfähigkeit. Ebenfalls wärmeleitfähiger erscheint das Einbettmedium (Epoxydharz).

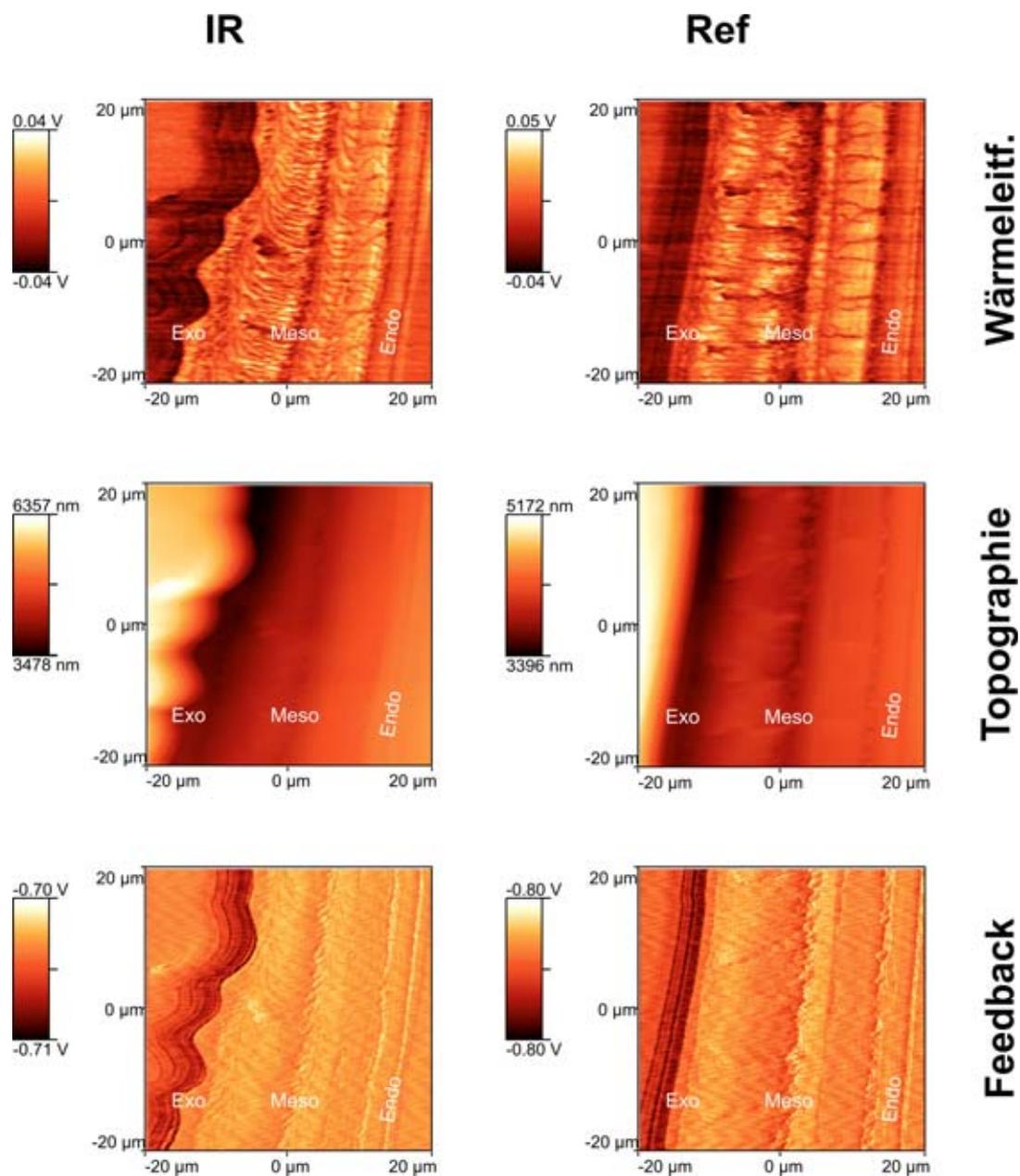
### 3.3.1.2 *Merimna atrata*

Bei *Merimna atrata* lassen sich weder im Infrarotorgan noch in der Referenzkutikula eindeutige Kontraste der Wärmeleitfähigkeit feststellen (Abb. 26). Der Signalbereich ist bei beiden Proben sehr klein, was auf nur geringe Unterschiede hindeutet. Im äußeren Bereich der Exokutikula wird Wärme schlechter abgeleitet (Abb. 26, dunkler Bereich im Bild der Wärmeleitfähigkeit). Allerdings befindet sich hier eine hohe Kante, die häufiger an der Außenseite der Exokutikula entsteht, wenn sich beim Schneiden durch die mechanische Belastung der Kontakt zwischen Exokutikula und Einbettmedium löst. Im Feedbacksignal ist deutlich zu erkennen, dass hier die Kraftregelung der Spitze nicht optimal verlief. Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Schichten können also auch hier nicht eindeutig nachgewiesen werden.

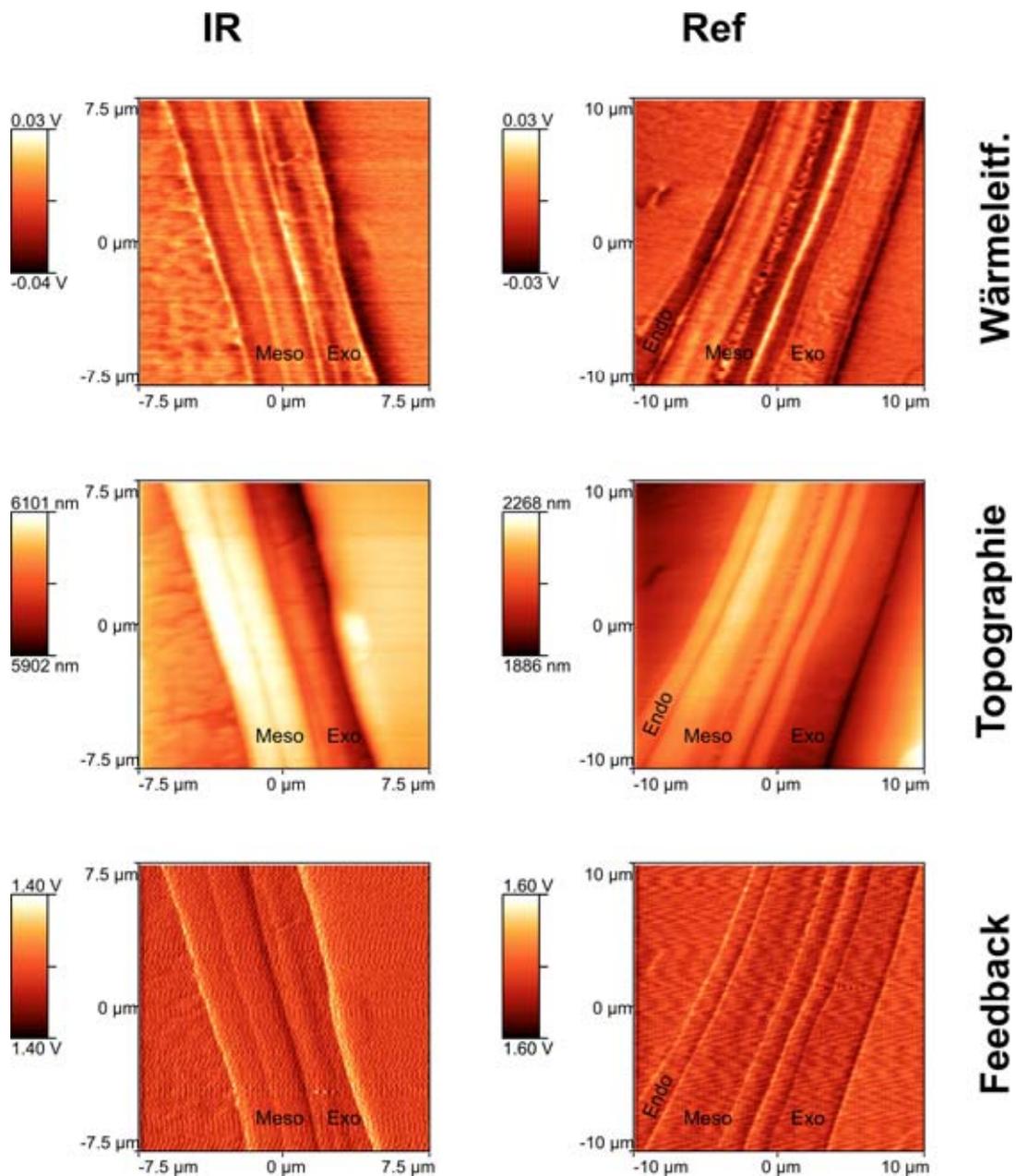
### 3.3.1.3 *Acanthocnemus nigricans*

Auch bei *Acanthocnemus* ist die Signalspanne der Wärmeleitfähigkeit auf einem niedrigen Niveau. Im Infrarotorgan findet man lediglich einen schmalen Bereich in der Exokutikula der eine verminderte Leitfähigkeit aufweist. Etwas anders sieht es in der Referenz aus. Hier zeigen zwei zentrale Lagen der Mesokutikula eine verminderte Wärmeabfuhr sowie die schmale endokutikuläre Schicht. Die Unterschiede sind jedoch auch hier nur gering. Absenkungen der Topographie zwischen Schichtübergängen führen zu einem Doppelkontakt der Spitze mit der Probenoberfläche und erhöhter Wärmeableitung (Abb. 27).

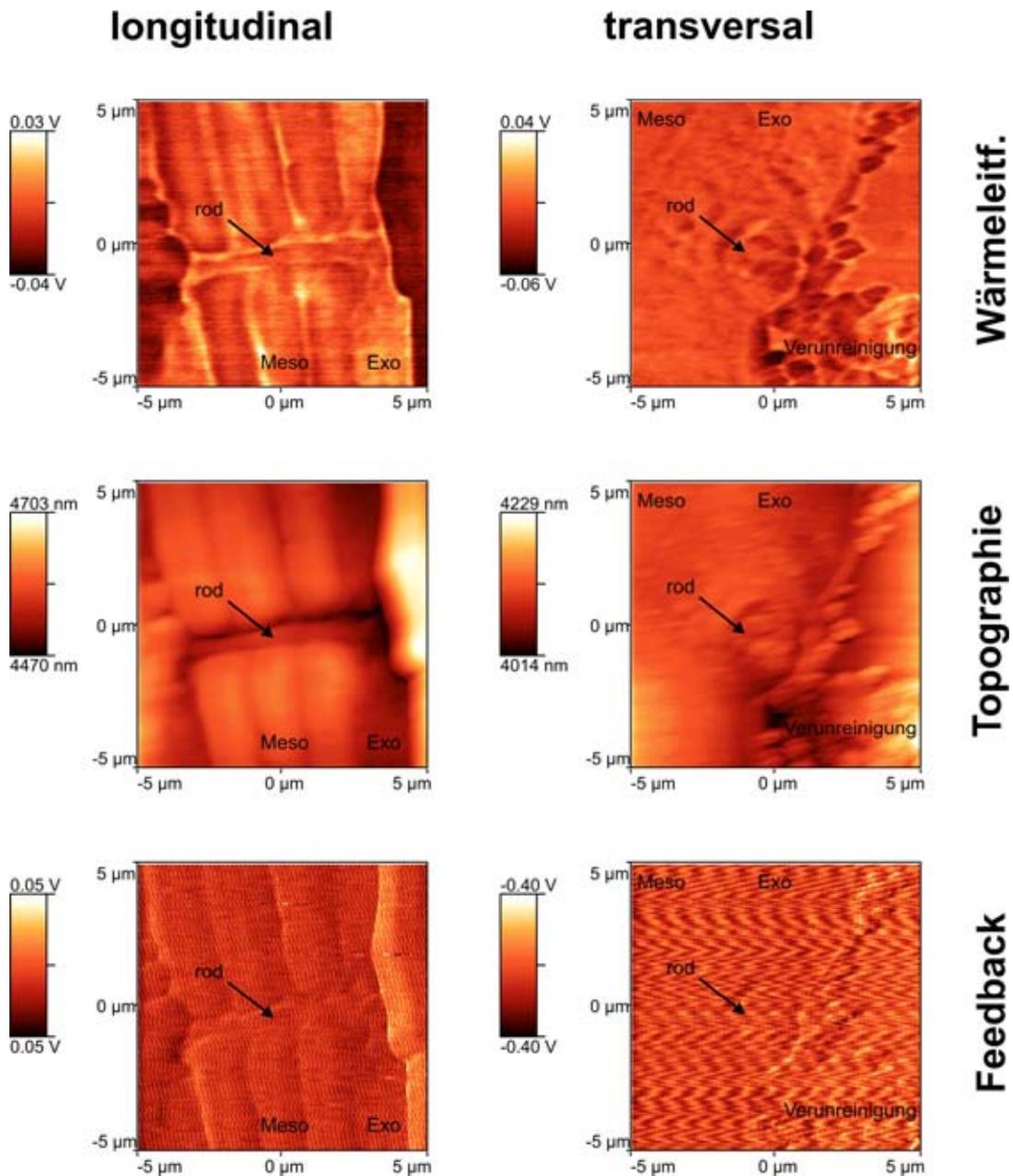
Genauer untersucht wurden auch die „rods“ der Infrarotsensillen. Aufgrund ihrer elektronendichten Erscheinung im Transmissionselektronenmikroskop wurden sie als wärmeleitende Strukturen diskutiert, die die durch Absorption entstehende Wärme möglichst schnell ins Innere zum Wärmerezeptor leiten. Wie in Kapitel 3.1.2.3 gezeigt, wurden diese „rods“ durch transversale und longitudinale Anschnitte freigelegt. Die in Abb. 28 gezeigten Proben sind dieselben wie in Abb. 12 und Abb. 13. Jedoch zeigen die SThM-Messungen dieser Schnitte in keiner Richtung eine auffällig veränderte Wärmeleitfähigkeit (Abb. 28). Bei diesen Messungen wurde mit geringer Auflagekraft gearbeitet, um die Kontaktfläche zwischen Spitze und Probe zu minimieren und so die laterale Auflösung zu maximieren. Die Kontaktfläche beim Abrastern sollte somit weit unter  $0,5\ \mu\text{m}$  liegen, so dass die „rods“ mit einem Durchmesser von  $0,5\ \mu\text{m}$  prinzipiell mindestens einem Bildpunkt entsprechen und aufgelöst werden konnten.



**Abb. 26:** Wärmeleitfähigkeit des Infrarotorgans und der Referenzkutikula von *Merimna atrata*. Deutliche Kontraste der Wärmeleitfähigkeit lassen sich sowohl im IR-Organ (links) als auch in der Referenz nur in der äußeren Exokutikula finden. Hier wurde Wärme schlechter abgeleitet. Die großen Höhenunterschiede zwischen Exokutikula und Einbettmedium könnten jedoch die Messung beeinflusst haben. Die Kraftregelung (Feedback) verlief in diesem Bereich nicht optimal. Die Signalspanne der Wärmeleitfähigkeit ist zudem gering.



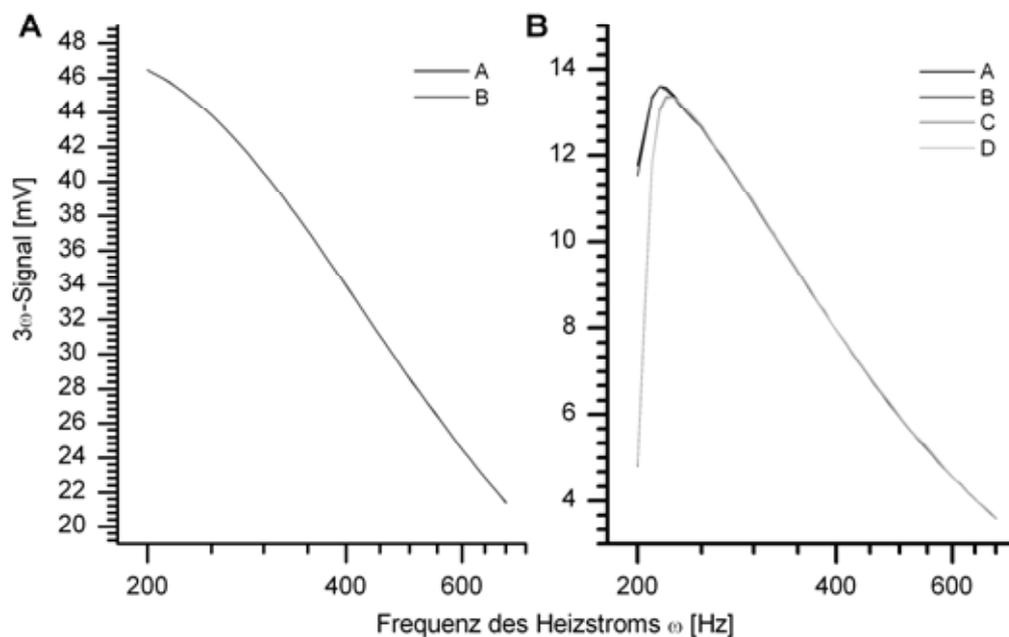
**Abb. 27:** Wärmeleitfähigkeit des Infrarotorgans und der Referenzkutikula von *Acanthocnemus nigricans*. Deutliche Kontraste der Wärmeleitfähigkeit lassen sich weder im IR-Organ (links) noch in der Referenz erkennen. Lediglich in der Referenz zeigen einzelne Schichten der Meso- und Endokutikula eine geringere Wärmeleitfähigkeit. Die Signalspanne ist gering. Zwischen den Schichten kommt es zwischen der Mess-Spitze und der Probenoberfläche durch topographische Einsenkungen zu Doppelkontakten, die dementsprechend eine erhöhte Ableitung der Wärme anzeigen.



**Abb. 28:** Wärmeleitfähigkeit der „rods“ eines *Acanthocnemus* Sensillums. Die linke Probe ist die selbe wie in Abb. 12. Der Pfeil zeigen die Lage des in der AFM Topographie nachgewiesenen „rods“ an. Deutliche Kontraste der Wärmeleitfähigkeit lassen sich weder im longitudinalen noch im transversalen Anschnitt erkennen. Die Signalspanne der Wärmeleitfähigkeit ist zudem gering. Kontraste entstehen vor allem durch topographische Gegebenheiten, wie zum Beispiel an Kantenübergängen, und an Verunreinigungen der Probe.

### 3.3.2 Quantitative Messungen

Die quantitativen Messungen erwiesen sich als schwierig, da hierfür das System über einen längeren Zeitraum stabil laufen muss. Beispiele für stabile und instabile Messung sind in Abb. 29 gezeigt. In Abb. 29B sind Veränderungen des Systems zu erkennen, die sich insbesondere in der Frequenzdynamik des unteren Frequenzbereichs zeigen. Die Berechnung der logarithmischen Steigungen führte in solchen Fällen zu keinen zuverlässigen Ergebnissen der Wärmeleitfähigkeit ( $\lambda$ ). Die Messreihen wurde ohne Kontakt der Mess-Spitze mit Probenmaterial im Vakuum durchgeführt. Im Folgenden wird daher auch von Vakuummessungen gesprochen.



**Abb. 29:** Beispielhafte quantitative Messreihen für **A** stabile und **B** instabile Messreihen. Alle gezeigten Messungen wurden im Vakuum ohne Kontakt zur Probe innerhalb einiger Minuten durchgeführt. Bei der über die Zeit stabilen Messreihe ähneln sich die Kurvenverläufe sehr stark über den gesamten Frequenzbereich. Bei instabilen Messungen springt die Signalkurve und die Frequenzabhängigkeit verändert sich vor allem im unteren Frequenzbereich. Die logarithmische Steigung zur Bestimmung von  $\lambda$  wurde im logarithmisch linearen Frequenzbereich von 300 bis 600 Hz ermittelt.

Abb. 29A zeigt einen sehr beständigen Messdurchgang, der für die Berechnung der quantitativen Wärmeleitfähigkeiten der Schichten des Infrarotorgans von *Melanophila acuminata* verwendet wurde. Als Referenzmaterialien mit definierter Wärmeleitfähigkeit dienten die erwähnten Vakuummessungen, wobei eine Wärmeleitfähigkeit von  $\lambda \approx 0 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  zugrunde gelegt wurde sowie Messungen an einem Bruchstück eines Objektträgers ( $\lambda = 0,99 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , Cahill und Pohl, 1987). Da bei der Vakuummessung das System isoliert ist, also ohne Kontakt gemessen wird, stellt diese Messung den Abtransport der Wärme durch das Systems an sich dar.

Zur Bestimmung der logarithmischen Steigung wurde eine logarithmische Funktion der Form

$$U_{3\omega} = a \cdot \ln(\omega) + b \quad (3.1)$$

an die gemessenen Werte im Bereich von 300 bis 600 Hz über einen Nonlinear least square Fit angepasst.  $U_{3\omega}$  ist hierbei das in Abhängigkeit von der Frequenz des Heizstroms gemessene  $3\omega$ -Signal. Da sich die Bestimmung der Wärmeleitfähigkeit über den Realteil des  $3\omega$ -Signals als geeigneter erwiesen hat (Cahill, 1990), wurde zur Ermittlung der linearen Steigung auch hier der Realteil verwendet.

Erfolgreich konnten nur die angeschnittenen Kutikulaprobe der Infrarotorgane von *Melanophila acuminata* und *Merimna atrata* vermessen werden. Bei allen anderen Messungen gelang es nicht, das System über eine genügend lange Dauer stabil zu halten. Die qualitativen Messungen haben jedoch bereits gezeigt, dass sich die einzelnen kutikulären Schichten kaum unterscheiden und eine Erfassung aller Proben somit nicht notwendig war. Da die Wärmeleitfähigkeit des Epoxydharzes gemessen wurde, ist ein Vergleich im qualitativen Scan gegeben. Die quantitativen Messungen werden helfen, die Größenordnung der Wärmeleitfähigkeit der Kutikula zu bestimmen.

### 3.3.2.1 Die Wärmeleitfähigkeit der Kutikulaschichten in den Infrarotorganen von *Melanophila acuminata* und *Merimna atrata*

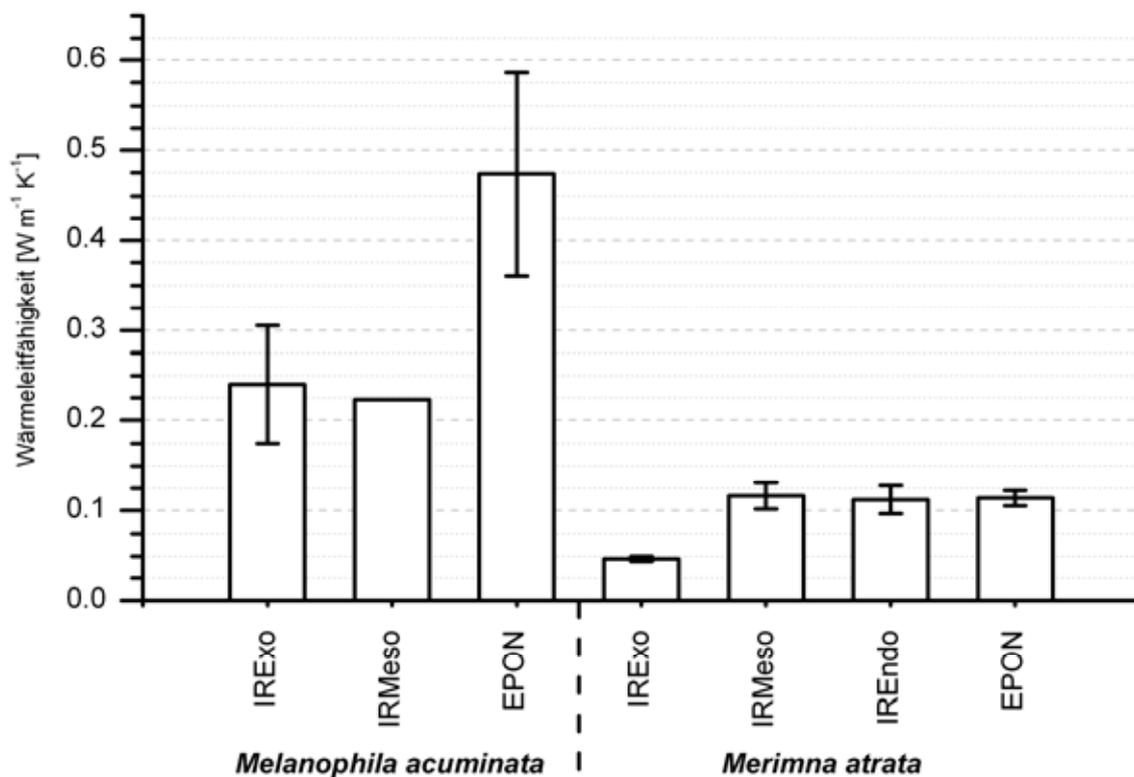
Am Infrarotsensillum von *Melanophila acuminata* wurden die schwammartige Mesokutikula sowie die lamellierte, exokutikuläre Schale des *Melanophila* IR-Sensillum und das Einbettmedium gemessen. Zudem wurden die Kutikulaschichten des Infrarotorgans von *Merimna atrata* untersucht.

Die unterschiedlichen Kutikulabereiche im Infrarotorgan von *Melanophila acuminata* weisen keine signifikanten Unterschiede der Wärmeleitfähigkeit auf. Es wurden  $\lambda=0,22 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  für die schwammartige Mesokutikula (IR Meso) und  $\lambda=0,24 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  für die exokutikuläre Schale (IR Exo) gemessen. Somit bestätigt sich das Bild, das bei den qualitativen Untersuchungen aufgezeigt wurde. Die unterschiedlichen Kutikulaschichten unterscheiden sich im dehydrierten Zustand kaum voneinander. Das Epoxydharz weist mit einem  $\lambda=0,47 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  eine ca. zweifach größere Wärmeleitfähigkeit als die Kutikula auf. Nach der Definition der quantitativen 3 $\omega$ -Methode nach Altes (Altes et al., 2004) handelt es sich somit bei allen gemessenen Proben (inkl. Referenzen) um Materialien geringer Wärmeleitfähigkeit ( $\lambda \leq 10 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ).

Das Gleiche gilt für die Kutikulaschichten des Infrarotorgans von *Merimna atrata*, jedoch mit dem Unterschied, dass sich die Exokutikula mit einer Wärmeleitfähigkeit von  $0,05 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  signifikant von allen anderen Materialien dieser Messreihe unterscheidet. Epoxydharz, Meso- und Endokutikula weisen mit  $0,12 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $0,11 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  und nochmals  $0,11 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  allesamt ähnliche Werte auf, unter denen kein signifikanter Unterschied besteht. Somit werden die Ergebnisse der qualitativen Scans gestützt, bei denen im Infrarotorgan von *Merimna atrata* im äußeren Bereich der Kutikula eine verminderte Wärmeleitfähigkeit festgestellt wurde. Fraglich ist jedoch, inwieweit die ausgeprägte Topographie an dieser Stelle (Abb. 26) die Messungen beeinflusste. Ob und wie die Kontaktfläche durch die Topographie verändert wurde, kann auch mittels REM nicht festgestellt werden, da die Spitze aufgrund ihrer Größe den Kontaktbereich verdeckt. Zudem ließ sich der Probenteller des REMs durch den Einbau des SThMs nicht mehr kippen oder drehen.

Auffällig ist der deutliche Unterschied zwischen den Messreihen der beiden Infrarotorgane, der sich dadurch zeigt, dass sich nicht nur die Wärmeleitfähigkeit der Kutikula der beiden Infrarotorgane unterscheidet, sondern auch die des Einbettmediums. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass bei den Messungen unterschiedliche Auflagekräfte eingestellt wurden. Die Auflagekraft war bei den Messungen der *Melanophila* Probe höher und kann sich dadurch vor allem bei weichen Materialien, wie der Kutikula oder vor allem dem EPON, ändern. Beim Referenzmaterial hingegen wird sich die Auflagefläche aufgrund der höheren Härte des Materials kaum verändern. Die beiden Messreihen sind daher nur bedingt vergleichbar.

Trotz aller Schwierigkeiten konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen kutikulären Schichten nahezu gleiche Wärmeleitfähigkeiten besitzen und sich kaum voneinander unterscheiden. Dehydrierte Kutikula mit einem  $\lambda$  von 0,05 bis 0,24  $\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$  kann eher als ein Wärmeisolator angesehen werden.



**Abb. 30:** Ermittelte Wärmeleitfähigkeit für die Kutikula des Infrarotorgans von *Melanophila acuminata* und *Merimna atrata*. Der Fehlerindikator zeigt die ermittelte Standardabweichung an. Die Anzahl der Messungen der Mesokutikula von *Melanophila* ist zu gering, um eine Standardabweichung berechnen zu können, da fehlerhafte Messungen aussortiert werden mussten. Die beiden Messreihen unterscheiden sich signifikant voneinander. Bei *Melanophila* wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen, während sich beim Infrarotorgan von *Merimna* die Exokutikula (IRExo) von allen anderen Materialien signifikant unterscheidet.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Materialeigenschaften von Infrarotorganen pyrophiler Käfer (*Melanophila acuminata*, *Merimna atrata*, *Acanthocnemus nigricans*) sowie der Gula von *Pachnoda marginata* untersucht; also von vier im Detail stark unterschiedlich aufgebauten biologischen Strukturen. Ein besonderes Interesse galt dabei den Infrarotsensoren der pyrophilen Käfer. Obwohl alle drei untersuchten Rezeptoren eine ähnliche sensorische Aufgabe erfüllen, unterscheiden sie sich doch stark in ihren Struktur-Funktionsbeziehungen. Die Infrarotsensoren von *Merimna atrata* und *Acanthocnemus nigricans* funktionieren thermisch nach dem sog. Bolometerprinzip (Schmitz et al., 2000; Schmitz et al., 2002), während dem Infrarotsensillum von *Melanophila acuminata* der sog. photomechanische Mechanismus zugrunde liegt (Schmitz und Bleckmann, 1998). Bei den beiden erstgenannten Infrarotsensoren sind daher die thermischen Eigenschaften von besonderem Interesse. Um jedoch das Funktionsprinzip des *Melanophila* IR-Sensors besser zu verstehen, reicht eine Analyse der thermischen Eigenschaften allein nicht aus. Hier sind zusätzlich die mechanischen (Härte und Elastizität) und thermo-mechanischen (thermischer Ausdehnungskoeffizient) Eigenschaften von Bedeutung, wobei die thermo-mechanischen mit den mechanischen Eigenschaften korrelieren können. Mechanische Eigenschaften wie die Härte oder der Elastizitätsmodul werden durch die Bindungsstärke im Material, d.h. die interatomaren Kräfte, bestimmt. Starke interatomare Kräfte sind mit einer geringen thermischen Ausdehnung, schwache Kräfte mit einer hohen thermischen Ausdehnung assoziiert (Newnham, 2005). Informationen über Härte und Elastizitätsmodul des Materials geben daher auch Auskunft über die thermischen Ausdehnungseigenschaften. Als Beispiel seien hier die Polymere genannt, bei denen eine Erhöhung der Querverbindungen (Crosslinks) zu einer Steigerung der Härte und des Elastizitätsmoduls führen, während der thermische Ausdehnungskoeffizient kleiner wird (Nielsen, 1969).

Zu Vergleichszwecken wurde zudem die Gula von *Pachnoda marginata* als nicht-sensorisches System untersucht. Sie ist Teil des Kopfgelenks und übernimmt vor allem mechanische Aufgaben, wie z.B. die möglichst reibungsarme Beweglichkeit des Kopfes bei gleichzeitiger Beständigkeit gegen Abrieb. Daher wurden an diesem System nur die mechanischen Eigenschaften bestimmt.

Da mit den verwendeten Methoden lediglich die Materialeigenschaften getrockneter Kutikula gemessen werden konnten, soll zunächst der Versuch unternommen werden, die nativen Eigenschaften auf Grundlage der gemessenen Werte mit Hilfe der bereits vorhandenen Literatur zu prognostizieren. Anschließend wird der kutikuläre Aufbau diskutiert und die Funktionsweise des Systems anhand der ermittelten Materialeigenschaften weiter aufgeklärt. Im abschließenden Kapitel soll ein Ausblick gegeben werden, wie es möglich sein könnte, die nativen Eigenschaften der Kutikula direkt zu messen.

#### 4.1 Vergleich der Materialeigenschaften hydrierter und dehydrierter Kutikula

Der Wassergehalt von Kutikula hat entscheidende Auswirkungen auf die Materialeigenschaften. In Bezug auf die mechanischen Eigenschaften ist der Einfluss des Wassers bereits mehrmals quantitativ untersucht worden (Arzt et al., 2002; Barbakadze et al., 2006; Enders et al., 2004; Hillerton et al., 1982; Vincent und Hillerton, 1979; Vincent und Wegst, 2004). Wasser lässt die Kutikula weicher und elastischer werden. Dementsprechend führt Dehydrieren zu einem Anstieg von Härte und Elastizitätsmodul. Es wird vermutet, dass der Grund für die ausgeprägte Abhängigkeit der mechanischen Eigenschaften vom Wassergehalt die Stabilisierung durch Wasserstoffbrückenbindungen ist (Nissan, 1976; Vincent und Wegst, 2004).

Der Prozess des Hydrierens/Dehydrierens kann reversibel sein und im lebenden Organismus dazu eingesetzt werden, die mechanischen Eigenschaften der Kutikula temporär zu verändern. So wird z.B. bei der blutsaugenden Raubwanze *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) die Abdomenkutikula beim Blutsaugen dehnungsfähiger. Induziert wird dieser Vorgang durch ein Absenken des pH-Wertes von 7 auf 6, so dass die Ladungsdichte des kutikulären Proteins erhöht wird und der Wassergehalt aufgrund der Dipoleigenschaften des Wassers von 26% auf 31% steigt. Der Elastizitätsmodul (Zugbelastung) wird so von 250 MPa auf 10 MPa gesenkt (Reynolds, 1975a; Reynolds, 1975b).

Die Materialeigenschaften von Kutikula werden aber nicht nur durch den Wassergehalt bedingt, sondern unter anderem auch durch die eingelagerten Chitinfasern, die verwendeten Proteintypen, den Grad der Sklerotisierung sowie durch die Einlagerung von Lipiden, metallischen Ionen (Zn, Mn, Fe) und Kalziumcarbonat (Vincent und Wegst, 2004). Das generelle Dehydrieren der untersuchten Kutikulaprobe war mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden nicht vermeidbar. Daher wurde beim Einbetten der Kutikulapräparate zumindest auf stark reaktive Chemikalien, wie z.B. Osmiumtetroxid oder Glutaraldehyd, verzichtet. Barbakadze et al. haben mittels eines Chloroform-Methanol-Gemisches versucht, die Lipide und Wachse der dünnen Epikutikula zu entfernen. Dabei wurde ab einer Eindringtiefe von mehr als 1 µm lediglich eine sehr geringe Erhöhung der Härte festgestellt, der Elastizitätsmodul hingegen blieb unverändert (Barbakadze et al., 2006). Aufgrund der Eindringtiefe kann diese

Veränderung der unter der Epikutikula befindlichen Mesokutikula zugeordnet werden. Demnach verändern Faktoren wie das Entfernen der eingelagerten Lipide die Materialeigenschaften der chitinhaltigen Kutikula nur gering. Die größte Veränderung stellt also der Verlust des Wassers dar.

Der Wassergehalt der unterschiedlichen Kutikulaschichten ist bekannt. Harte, unelastische Kutikula wie Exokutikula besitzt maximal einen Wasseranteil von bis zu 12%, weiche wie z.B. Endokutikula hingegen 40-70% (Vincent und Wegst, 2004). Mesokutikula ist weniger stark sklerotisiert als Exokutikula und daher nicht so stark vernetzt. Daher sollte der native Wassergehalt zwischen dem vom Exo- und Endokutikula liegen. Während der Dehydrierung verliert Exokutikula also weniger Wasser, so dass sich hier die mechanischen Eigenschaften vermutlich weniger verändern als bei den anderen beiden Kutikulaarten. Betrachtet man die Unterschiede zwischen hydrierter und dehydrierter Kutikula in der Literatur, wird diese Hypothese gestützt. Barbakadze et al. ermittelten Härte und Elastizitätsmodul von frischer und getrockneter Kutikula der Gulaoberfläche von *Pachnoda marginata*. Die Autoren vermuteten Epi- und Exokutikula als äußerste Schichten. Die Mallory Trichrome Färbung offenbarte jedoch, dass unter der dünnen Epikutikula vor allem Mesokutikula liegt (Müller et al., 2008). Der Unterschied, den Barbakadze et al. abhängig vom Hydrierungsstatus messen konnten, betrug sowohl für die Härte als auch für der Elastizitätsmodul ca. Faktor fünf und kann demnach der Mesokutikula zugeordnet werden. Hillerton et al. untersuchten die mechanischen Eigenschaften an der kutikulären Oberfläche der Tibia von *Schistocerca gregaria* (Caelifera: Acrididae). Die dehydrierte Kutikula war 1,6 bis 3 mal härter als frische Kutikula (Hillerton et al., 1982). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass die äußerste Schicht der Tibia aus Exokutikula besteht (Katz und Gosline, 1994).

Song et al. untersuchten die mechanischen Eigenschaften an der Oberfläche der Flügelmembran von *Libellula basilinea* (Odonata: Libellulidae) und konnten zeigen, dass der Hydrierungsstatus der ohnehin sehr trockenen Membrankutikula keinen deutlichen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften hat (Song et al., 2007). Zur gleichen Schlussfolgerung kamen Smith et al., die die Zugfestigkeit der Flügelmembran von *Schistocerca gregaria* untersuchten (Smith et al., 2000). Leider charakterisierten die Autoren die Kutikulaschichten der Flügelmembran nicht. Andere Arbeiten haben allerdings gezeigt, dass die Flügelmembranen von Insekten

überwiegend oder sogar ausschließlich aus Exokutikula bestehen (Banerjee, 1988; Wootton, 1992).

Wie der Vergleich dieser Literaturwerte zeigt, wird durch das Trocknen der Kutikula Mesokutikula fünfmal steifer und härter. Exokutikula, die schon im nativen Zustand weniger Wasser enthält als Mesokutikula, wird lediglich bis zu dreimal härter und steifer (vgl. Tab. 5). Der Effekt des Dehydrierens auf die mechanischen Eigenschaften ist also vermutlich umso kleiner, je stärker die Kutikula sklerotisiert ist und je weniger Wasser sie daher im nativen Zustand enthält.

### A Härte

Zitat	Jahr	Spezies	Bereich	Kutikula	Härte [GPa]		Faktor
					frisch	trocken	
Barbakadze et al.	2006	<i>Pachnoda m.</i>	Gula	Meso*	0,1	0,49	4,9
Song et al.	2007	<i>Libellula b.</i>	Flügelmembran	Exo	0,14	0,1	0,7
Hillerton et al.	1981	<i>Schistocerca g.</i>	Femur zwischen Rippen		0,071	0,189	2,7
			Femur Kopf (dunkel)		0,103	0,309	3,0
			Tibia proximal, posterior		0,083	0,237	2,9
			Tibia proximal, anterior		0,1	0,241	2,4
			Tibia distal, anterior		0,113	0,256	2,3
Tibia Klaue	0,152	0,25	1,6				

### B Elastizitätsmodul

Zitat	Jahr	Spezies	Bereich	Kutikula	Elastizitätsmodul [GPa]		Faktor
					frisch	trocken	
Song et al.	2007	<i>Libellula b.</i>	Flügelmembran	Exo	2,85	2,74	1,0
Barbakadze et al.	2006	<i>Pachnoda m.</i>	Gula	Meso	1,5	7,5	5,0

**Tab. 5:** Literaturangaben zur **A** Härte und zum **B** Elastizitätsmodul bei hydrierter und dehydrierter Insektenkutikula. Durch den Verlust von Wasser wird das Kutikulamaterial härter und unelastischer. Da Exokutikula im frischen Zustand weniger Wasser enthält als Mesokutikula, ist der relative Unterschied zwischen den zwei Zuständen im Falle von Exokutikula kleiner (siehe Spalte **Faktor**). Alle genannten Messungen wurden mittels Nanoindenter (Barbakadze et al., 2006; Song et al., 2007) oder Mikroindenter (Hillerton et al., 1982) durchgeführt und sind daher vergleichbar. \* Barbakadze et al. vermuteten Mesokutikula unter der dünnen Epikutikula. Die Mallory Färbungen zeigen jedoch, dass unter der Epikutikula eine Schicht Mesokutikula folgt (Müller et al., 2008).

Den thermischen Eigenschaften von Kutikula wurde bislang wenig Beachtung geschenkt. Bisher wurden Wärmeleitfähigkeit  $\lambda$  und spezifische Wärmekapazität  $c_p$  lediglich an abdominaler Kutikula von Hornissen quantitativ untersucht. Die Wärmeleitfähigkeit der braunen Kutikula betrug dabei  $0,14 \pm 0,05 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , die von gelber Kutikula  $0,15 \pm 0,05 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  (Galushko et al., 2005). Diese Messungen wurden jedoch nicht mittels Scanning Thermal Microscope durchgeführt, sondern es wurden Kutikulaprobe zwischen zwei Kupferplatten geklemmt, von der eine beheizt wurde. Mit der Hilfe von Thermoelementen wurde der Wärmefluss bestimmt, so dass die Wärmeleitfähigkeit berechnet werden konnte. Obwohl es sich hierbei im Vergleich zur verwendeten quantitativen  $3\omega$ -Methode um eine deutlich unterschiedliche Messmethodik handelt, gleichen die gemessenen Werte denen, die in der vorliegenden Arbeit mittels SThM gemessen wurden. Da die Kutikulastücke erst ca. eine Stunde nach dem Herauspräparieren getestet wurden, kann entgegen der Annahme von Galushko et al. davon ausgegangen werden, dass die Kutikula bereits dehydriert war. Barbakadze et al. haben gezeigt, dass selbst dicke Kutikula wie die der Gula beim Trocknen an Luft innerhalb von 40 min fast vollständig dehydriert (Barbakadze et al., 2006). Die Wärmeleitfähigkeit von nativer Kutikula ist daher bisher nicht bekannt.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit die spezifische Wärmekapazität mittels SThM nicht gemessen werden konnte, so könnte sie beim Einbeziehen der Materialeigenschaften in das Funktionsprinzip der Infrarotsensoren doch von Bedeutung sein. Sie wird häufig gleichbedeutend mit der sog. thermischen Masse verwendet. Aber wie auch die Wärmeleitfähigkeit wurde diese Materialeigenschaft bereits an Kutikula von Hornissen (*Vespa orientalis*) bestimmt (Ishay und Pertsis, 2002). Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der Präparationszeit und der zeitlich aufwändigen Messmethodik die thermische Eigenschaft von dehydrierter Kutikula gemessen wurde. Die spezifische Wärmekapazität von gelber abdominaler Kutikula betrug  $1,8 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$  und von brauner  $1,6 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$  (gemessen bei  $30^\circ\text{C}$ ). Im Vergleich dazu hat Wasser eine spezifische Wärmekapazität von  $4,2 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

Wie bereits erwähnt ist der natürliche Wassergehalt der unterschiedlichen Kutikulatypen relativ gut bekannt (vgl. Seite 73). Da Wasser sowohl eine höhere Wärmeleitfähigkeit ( $\lambda=0,6 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) als auch eine höhere spezifische Wärmekapazität besitzt und unterschiedlich stark in den verschiedenen Kutikulatypen

vertreten ist, wird ein steigender Anteil an Wasser die Wärmeleitfähigkeit und die spezifische Wärmekapazität der Kutikula proportional erhöhen. Nimmt man ein Gemisch der Materialwerte an und vereinfacht  $\lambda$  für Kutikula auf einen Wert  $0,15 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , so ließen sich die Wärmeleitfähigkeiten der unterschiedlichen Schichten wie folgt postulieren: Exokutikula  $0,15\text{-}0,2 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , Mesokutikula  $0,2\text{-}0,33 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  und Endokutikula  $0,33\text{-}0,47 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . Entsprechend sähe die Verteilung der spezifischen Wärmekapazität wie folgt aus: Exo  $1,8\text{-}2,1 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , Meso  $2,1\text{-}2,8 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , Endo  $2,8\text{-}3,5 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

Somit entstünde ein Gradient mit steigender Wärmeleitfähigkeit und steigender spezifischer Wärmekapazität von den äußeren, exokutikulären zu den innen liegenden, endokutikulären Schichten.

Kutikulatyp	Wassergehalt	Wärmeleitfähigkeit [ $\text{W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ]	
		dehydriert	hydriert
Endokutikula	40-70%	ca. 0,15	0,33-0,47
Mesokutikula	12-40%	ca. 0,15	0,2-0,33
Exokutikula	<12%	ca. 0,15	0,15-0,2

**Tab. 6:** Postulierte Wärmeleitfähigkeit der hydrierten Kutikula in Abhängigkeit vom Wassergehalt und der Wärmeleitfähigkeit dehydrierter Kutikula.

## 4.2 Materialeigenschaften der Kutikulaapparate biologischer Infrarotrezeptoren und ihre Bedeutung für die Reiztransformation

### 4.2.1 Das thermische Infrarotorgan von *Acanthocnemus nigricans*

Wie sich gezeigt hat, gibt es bei *Acanthocnemus nigricans* in Bezug auf die Kutikulaschichtung und die thermischen und mechanischen Materialeigenschaften zwischen der Kutikula des Infrarotorgans und des Referenzbereichs keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die Härte der jeweiligen Exokutikula unterscheidet sich signifikant. In keinem der beiden Bereiche ist eine deutliche Melanisierung der Exokutikula zu erkennen. Im Vergleich zur Referenzkutikula ist die Kutikuladicke des Infrarotorgans um 30% reduziert. Die Verkleinerung der thermischen Masse wird also nicht nur dadurch gewährleistet, dass das gesamte Organ über einen Stiel mit dem restlichen Exoskelett in Verbindung steht (Schmitz et al., 2002), sondern auch, indem die Masse der absorbierenden Kutikula verkleinert wird. Eine der wenigen Spezialisierungen in der infrarotabsorbierenden Kutikula des Infrarotorgans sind die Kanäle, durch die die „rods“ verlaufen.

Die sog. „rods“, die in TEM-Aufnahmen elektronendicht erscheinen (Kreiss et al., 2005), konnten auch mittels AFM sichtbar gemacht werden. Jedoch gelingt das nur im Phasenbild. Die mechanischen Eigenschaften der „rods“, die mittels Nanoindenter gemessen wurden, entsprachen eher denen der Endokutikula oder des Einbettmediums, das vermutlich in den Kanal gezogen ist und hier das getrocknete Zellmaterial ersetzt hat. Beim Messen mittels Nanoindenter wurde die Eindringtiefe auf den „rods“ zwar deutlich reduziert, indem die maximale Kraft des Belastungsprofils halbiert wurde. Da es sich bei den „rods“ jedoch um sehr dünne Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 0,5  $\mu\text{m}$  handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Werte einem Mischwert aus Epon und „rod“-Material entsprechen. Das Phasenbild, das mittels feiner AFM-Spitze und daher mit deutlich besserer Auflösung gemacht wurde, zeigt zwar, dass die Materialeigenschaften sich vom Epon unterscheiden. Es wird jedoch durch eine Vielzahl von Materialeigenschaften beeinflusst, so z.B. auch von Adhäsionskräften. Bei dem verwendeten Non-Contact-Modus ist der Einfluss der Adhäsionskräfte im Vergleich zum Einfluss der Elastizität besonders groß (Magonov et al., 1997). Den

Tapping-Modus, der für solche Untersuchungen geeigneter ist, beherrschte das zur Verfügung stehende AFM nicht. Der Ursprung des Kontrastes kann daher nicht einer einzigen Materialeigenschaft zugeordnet werden. Mechanische Eigenschaften wie Elastizität und Härte können deshalb nicht einfach abgeleitet werden.

Aktuelle Untersuchungen konnten zeigen, dass das Scheibensensillum von *Acanthocnemus* ausschließlich auf thermische Reize reagiert (Kreiss et al., 2007). Ein Mechanorezeptor wie bei *Melanophila acuminata* oder *Merimna atrata* wurde bisher im Infrarotorgan nicht entdeckt. Der Aufbau der Kutikulaschichten und die mechanischen Eigenschaften geben ebenfalls keine Hinweise auf eine Beteiligung einer mechanischen Reiztransformation. Aufgrund der anscheinend rein thermischen Funktionsweise sind daher die thermischen Eigenschaften der Kutikula sehr wahrscheinlich von größerer Bedeutung.

Wie die Berechnung der Wärmeleitfähigkeiten nativer Kutikula gezeigt haben (vgl. Kapitel 4.1), besitzen die unterschiedlichen Kutikulatypen aufgrund ihres Wassergehalts verschiedene Wärmeleitfähigkeiten. Aufgrund der Schichtenabfolge von Exo-, Meso- und Endokutikula in der Kutikula des Infrarotorgans von *Acanthocnemus* verläuft daher ein Gradient der Wärmeleitfähigkeit von außen nach innen in Richtung Thermorezeptor. Die Exokutikula isoliert mit einer Wärmeleitfähigkeit von  $0,15-0,2 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  das Organ nach außen. Die Endokutikula, die auf eine Dicke von unter  $1 \mu\text{m}$  reduziert ist, besitzt mit  $0,33-0,47 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  die höchste Wärmeleitfähigkeit und stellt den Kontakt zum darunter liegenden Wärmerezeptor her. Die Endokutikula leitet Wärme also ca. zweimal besser als die Exokutikula. Durch den Wärmeleitfähigkeitsgradienten wird die Wärme vermutlich besser ins Körperinnere zum Rezeptor geleitet (Abb. 31).

Außerdem konnte durch die Untersuchungen mit dem SThM gezeigt werden, dass die „rods“ im Vergleich zur Kutikula und zum Epon eine ähnlich niedrige Wärmeleitfähigkeit besitzen. Bisher wurde darüber spekuliert, dass die „rods“ aufgrund ihrer elektronendichten Erscheinung im TEM eine besonders hohe Wärmeleitfähigkeit besitzen könnten und so die Wärme, die durch die Absorption von Infrarotstrahlung in der Kutikula entsteht, schneller und verlustfreier zum Wärmerezeptor geleitet wird. Die SThM-Aufnahmen stützen diese Hypothese jedoch nicht. Weder in Quer- noch in Längsrichtung zeigen die „rods“ eine hohe Wärmeleitfähigkeit. Ganz bewusst wurden diese beiden Richtungen untersucht, da

von anderen Materialien wie z.B. Carbon Nanotubes bekannt ist, dass ihre Wärmeleitfähigkeit stark anisotrop ist. In Querrichtung leiten sie Wärme äußerst schlecht, in Längsrichtung hingegen zeigen sie eine Wärmeleitfähigkeit von mehr als  $3000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  (Berber et al., 2000; Kim et al., 2001; Ruoff und Lorents, 1995). Eine wärmeleitende Funktion der „rods“ scheint also unwahrscheinlich, kann allerdings nicht komplett verneint werden, da in dieser Arbeit kein natives Material verwendet wurde. Messungen an unbehandeltem Material könnten diese Frage klären.

#### **4.2.2 Das thermische Infrarotorgan von *Merimna atrata***

Im Infrarotorgan und in der Referenzkutikula von *Merimna atrata* konnte die übliche Abfolge von Exo-, Meso und Endokutikula nachgewiesen werden. Die Mesokutikula in beiden Bereichen weist eine Faserung orthogonal zur äußeren Oberfläche auf, die ähnlich auch in der Referenzkutikula von *Melanophila acuminata* gefunden werden kann (Abb. 7 und Abb. 9), nicht jedoch in der Mesokutikula von *Acanthocnemus nigricans*. Die mechanischen Eigenschaften der Kutikula werden unter anderem durch die Ausrichtung der Chitinfasern bestimmt (Vincent und Wegst, 2004), so dass die orthogonale Ausrichtung der Fasern höchstwahrscheinlich funktionale Gründe hat. Da sie aber sowohl im Infrarotorgan als auch in der Referenzkutikula gefunden werden kann, scheint sie keine spezielle Anpassung für die Perzeption von Infrarotstrahlung zu sein.

Beim Vergleich der Elastizitätsmoduln fällt auf, dass sich keine der kutikulären Schichten signifikant von einer anderen unterscheidet. Die Schichten sind also alle gleich elastisch. Da nur eine Krafrichtung bei der Nanoindentation getestet wurde, können mögliche Anisotropien aber nicht ausgeschlossen werden. Vor allem in der fein geschichteten Exokutikula, in der die Chitinfasern hochgradig geordnet sind, und in der faserigen Mesokutikula wären Anisotropien denkbar, da die Chitinfasern nur in Längsrichtung eine hohe Zugfestigkeit (Elastizitätsmodul  $> 150 \text{ GPa}$ ) besitzen und daher die Richtung der Belastung, die auf den gesamten Faserverbund einwirkt, eine entscheidende Bedeutung hat (Vincent und Wegst, 2004). Beim Verwenden einer anderen Krafrichtung könnten also durchaus signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Kutikulaschichten auftreten. Mit den zur Verfügung stehenden Methoden konnte dies jedoch nicht getestet werden. Im Bereich des Infrarotorgans ist z.B. eine Untersuchung der äußeren Oberfläche mittels Nanoindentation nicht

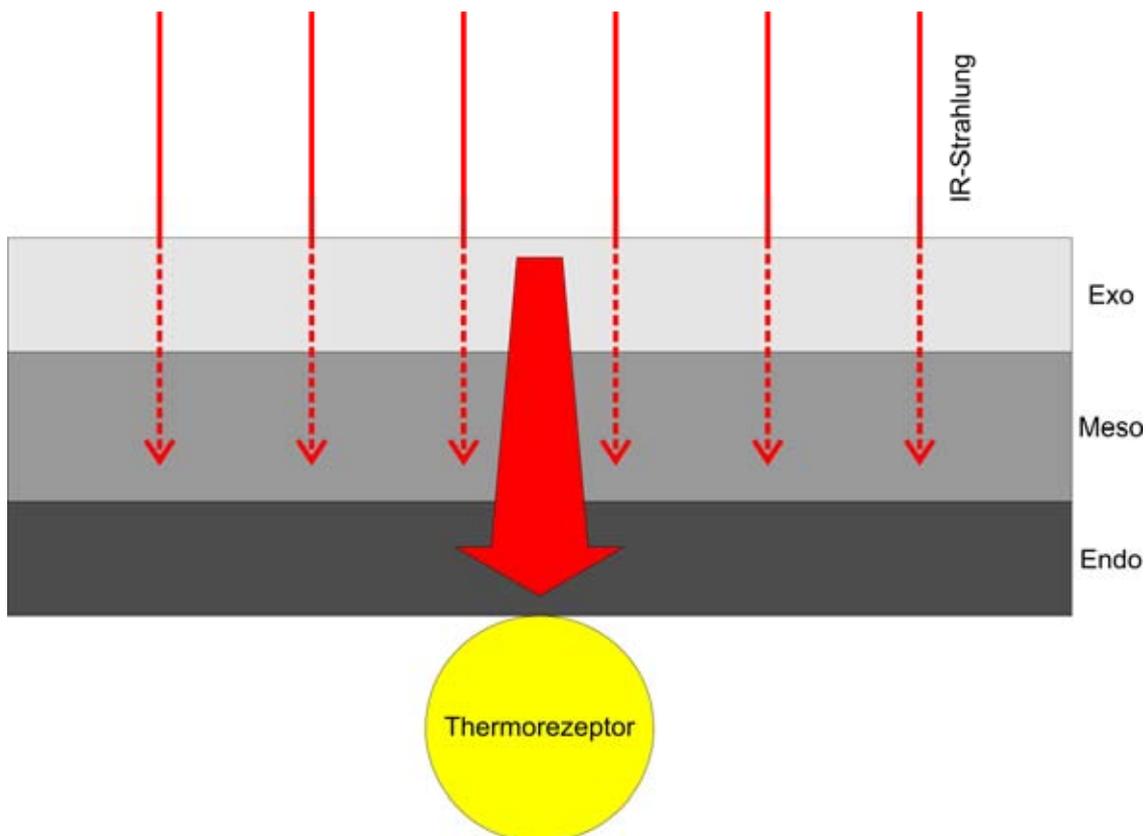
sinnvoll, da die Kontaktfläche beim Eindringen der Mess-Spitze aufgrund der mikrostrukturierten Oberfläche nicht zuverlässig von der Eindringtiefe abgeleitet werden kann.

Unter der Kutikula des Infrarotorgans von *Merimna atrata* befinden sich zusätzlich zum Thermorezeptor mindestens zwei Mechanorezeptoren in Form von Chordotonalorganen (Schmitz et al., 2001). Eine funktionale Beziehung zur Infrarotdetektion wurde bisher nicht untersucht. Da die fein geschichtete Exokutikula mit ihren parallel zur Oberfläche verlaufenden Chitinfasern und die hexagonale Strukturierung der Oberfläche das Material des Infrarotorgan vermutlich verstärken, wird eine thermische Ausdehnung in lateraler Richtung verhindert bzw. reduziert. Es wird vermutet, dass Chitinfasern mit einem Young's Modulus von mehr als 150 GPa eine hohe Zugfestigkeit aufweisen (Vincent und Wegst, 2004) und daher einen sehr geringen bis negativen thermischen Ausdehnungskoeffizienten haben (Müller et al., 2008). Eine Reizung des unter dem Infrarotorgan befindlichen Mechanosensors durch eine laterale Ausdehnung der Kutikula scheint daher unwahrscheinlich. Jedoch wäre ein Durchbiegen durch eine Art Bitmetalleffekt denkbar, da sich die Mesokutikula und vor allem die weiche und elastische Endokutikula höchstwahrscheinlich stärker ausdehnen werden als die Exokutikula. Elektrophysiologische Versuche am Chordotonalorgan wären nötig, um die Funktion des Mechanorezeptoren weiter aufzuklären.

Da nicht klar ist, ob der Mechanorezeptor bei der Infrarotdetektion involviert ist, wird im Folgenden das Funktionsprinzip des Infrarotorgans auf die rein thermische Reiztransformation beschränkt. Für eine solche Betrachtung sind die thermischen Eigenschaften der Kutikula vermutlich von größerer Bedeutung. Dazu zählen Eigenschaften wie die Wärmeleitfähigkeit oder die thermische Masse.

Die Wärmeleitfähigkeit der Kutikula wird vermutlich vor allem durch den Wassergehalt bestimmt (vgl. 4.1). Wie bereits diskutiert wurde, besitzt die Exokutikula im nativen Zustand höchstwahrscheinlich mit  $0,15-0,2 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  die geringste Wärmeleitfähigkeit und isoliert die darunter liegenden Schichten. Bedingt durch den höheren Wassergehalt der weiter innen liegenden Kutikulaschichten leitet die Kutikula von *Merimna atrata* umso besser die Wärme, je weiter innen sie sich befindet. Dadurch entsteht ein Gradient mit einer steigenden Wärmeleitfähigkeit von außen nach innen. Die Eindringtiefe von Infrarotstrahlung in Kutikula beträgt in der

Regel mehrere Mikrometer und wurde bei Kutikula auf ca. 6  $\mu\text{m}$  geschätzt (Schmitz et al., 2007). Die Infrarotstrahlung wird also auch von den tiefer liegenden Schichten absorbiert und in Wärme umgewandelt. Der Wärmeleitfähigkeitsgradient könnte dazu führen, dass die Wärme vor allem nach innen zum unter der Kutikula liegenden Wärmerezeptor weitergeleitet wird und nicht nach außen verloren geht (Abb. 31).



**Abb. 31:** Postuliertes Prinzip der Wärmeleitung im Infrarotorgan von *Merimna* und *Acanthocnemus*. Infrarotstrahlung (dünne rote Pfeile) trifft auf die Kutikula und wird absorbiert. Die entstehende Wärme wird durch den Wärmeleitfähigkeitsgradienten (dicker roter Pfeil) ins Innere zum unter der Kutikula liegenden Wärmerezeptor (gelb) geleitet. Die Breite des Pfeils deutet die prognostizierte Wärmeleitfähigkeit der hydrierten Kutikula an (siehe Text).

Ein weiterer Faktor bei der Infrarotrezeption ist die thermische Masse, die durch die Absorption der eintreffenden Infrarotstrahlung erwärmt werden muss. Die Dicke der Kutikula des Infrarotorgans ist mit 16  $\mu\text{m}$  nur halb so dick wie die Referenzkutikula. Zudem befinden sich direkt unter dem Infrarotorgan und dem an der Kutikula direkt anhaftenden sensorischen Komplex Luftsäcke (Schmitz et al., 2000). Dadurch wird, ähnlich wie beim Infrarotorgan von *Acanthocnemus nigricans*, die thermische Masse reduziert (Schmitz et al., 2002). Da die Infrarotstrahlen nur wenig Masse erwärmen

müssen, fällt der Temperaturanstieg dementsprechend umso größer und schneller aus.

Um die Leistung eines Infrarotsensors zu optimieren, muss zwar einerseits die thermische Masse des Absorbers reduziert werden, andererseits darf der Absorber aber nicht zu dünn sein, um der Infrarotstrahlung eine ausreichende Eindringtiefe zu bieten, und muss ein hohes Absorptionsvermögen aufweisen, um die auftreffende Infrarotstrahlung möglichst komplett absorbieren zu können. Die Eindringtiefe infraroter Strahlung in Kutikula ist bisher leider nicht bekannt. Auffällig ist jedoch, dass die Kutikula des *Merimna* Infrarotorgans mit einer Dicke von 16 µm eine ähnliche Absorptionstiefe bietet wie das IR-Sensillum von *Melanophila*, das einen Durchmesser von 15-20 µm hat. Dies könnte ein Hinweis auf die maximale Eindringtiefe infraroter Strahlung in Kutikula sein.

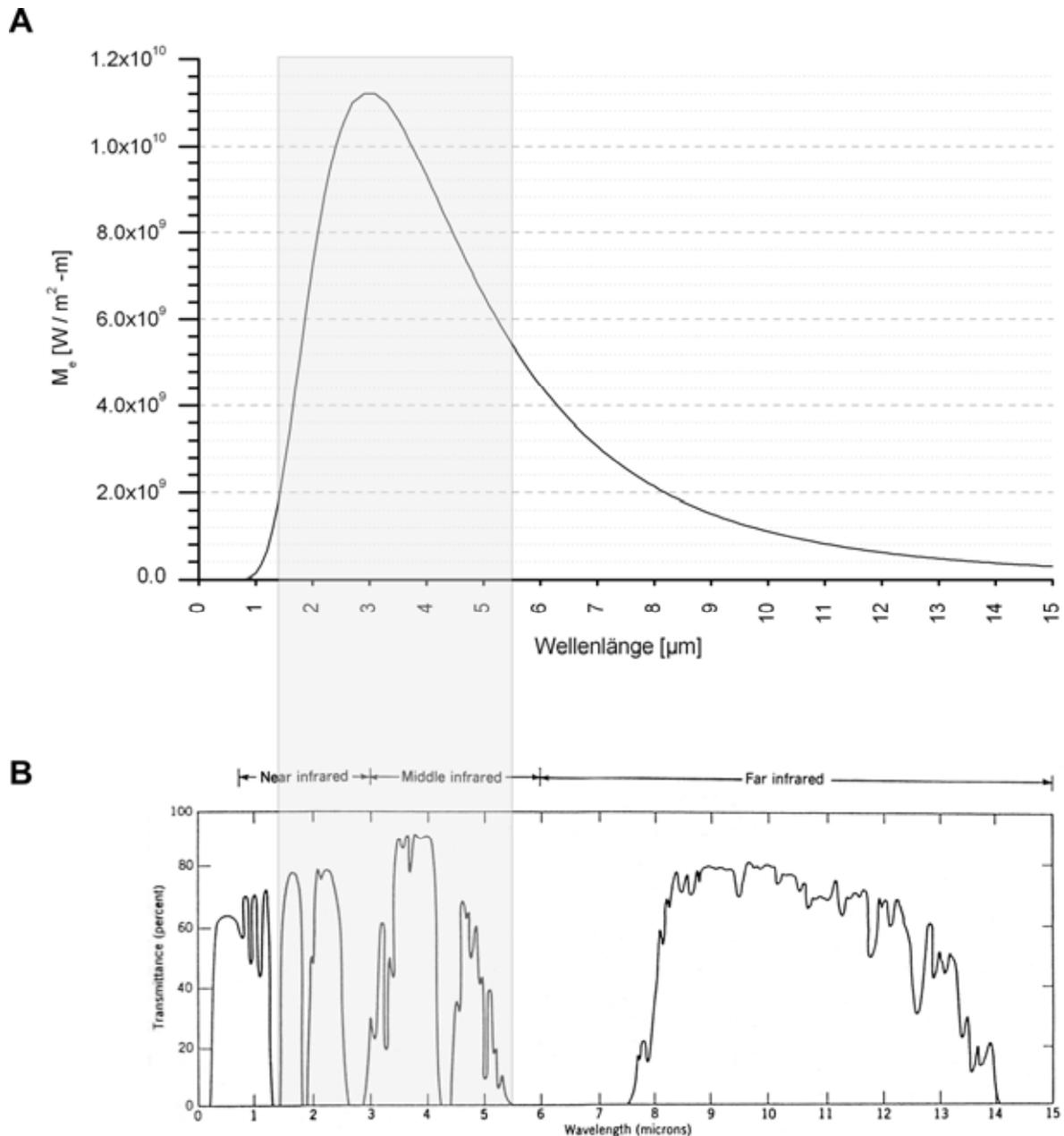
Um das Zusammenspiel zwischen Signal und Sensor noch besser zu verstehen, sind zudem Kenntnisse über die Strahlungsemission der Wärmequelle wichtig. Nach dem Planckschen Strahlungsgesetz hängt das Emissionsspektrum einer Infrarotquelle von der Temperatur T der Quelle ab und kann bei einem schwarzen Körper durch die Funktion

$$M_{e,\lambda}(\lambda, T) = \frac{2\pi hc^2}{\lambda^4 \left( e^{\frac{hc}{\lambda kT}} - 1 \right)} \quad (4.1)$$

beschrieben werden. Diese enthält das Plancksche Wirkungsquantum h, die Lichtgeschwindigkeit c sowie die Boltzmann-Konstante k und die Wellenlänge λ. Ein Waldbrand weist Temperaturen um die 700°C auf. Das Plancksche Strahlungsgesetz wird im Folgenden verwendet, um annäherungsweise das resultierende Emissionsspektrum eines Waldbrandes darzustellen (Abb. 32A) Das Emissionsmaximum liegt dann bei einer Wellenlänge von ca. 3 µm.

Die spektrale Zusammensetzung der Infrarotstrahlung, die das Infrarotorgan erreicht, hängt außerdem vom Absorptions- bzw. Transmissionsspektrum der Atmosphäre ab, da die Strahlung diese passieren muss, um bis zum Infrarotorgan zu gelangen. Das Absorptionsspektrum der Atmosphäre setzt sich aus den Absorptionsspektren der molekularen Bestandteile wie z.B. O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O zusammen (Hudson, 1969). Die Atmosphäre lässt Infrarotstrahlung im Bereich von 1,5-5,5 µm Wellenlänge sehr gut durch (Abb. 32B). Man spricht daher auch von einem sog. atmosphärischen Fenster.

Die Infrarotstrahlung eines Waldbrandes kann also weitestgehend ungehindert die Atmosphäre durchdringen und gelangt bis zum IR-Organ.



**Abb. 32:** Spektrum der Infrarotstrahlung. **A** Emissionsspektrum eines Waldbrandes mit einer Temperatur von 700°C. Bei 3 µm Wellenlänge wird am meisten Energie in Form von Infrarotstrahlung emittiert. **B** Transmissionsspektrum der Atmosphäre. Im Bereich von 1,5-5,5 µm Wellenlänge und zwischen 7,5-14 µm gibt es eine Vielzahl von Abschnitten, in denen Infrarotstrahlung besonders gut durch die Atmosphäre transmittiert wird. Man spricht daher auch von den sog. „atmosphärischen Fenstern“. Aus dem Emissions- und Transmissionsspektrum resultiert der spektrale Bereich, der das Infrarotorgan erreicht und von der Kutikula absorbiert werden kann (grauer Bereich). Grafik A berechnet mit der Formel (4.1); Grafik B verändert nach R. Hudson (Hudson, 1969).

Die Absorptionseigenschaften von Kutikula sind bei *Melanophila acuminata* bereits untersucht worden. Kutikula ist unter anderem im Wellenlängenbereich von 2,75-3,5  $\mu\text{m}$  ein guter Infrarotabsorber (Sowards et al., 2001). Die Infrarotstrahlung eines Waldbrandes kann also die Atmosphäre durchdringen und im Infrarotorgan von der Kutikula besonders gut absorbiert werden. Die Kutikula des IR-Organs besitzt also das nötige Absorptionsspektrum und bei einer vermuteten Absorptionstiefe von maximal 15-20  $\mu\text{m}$  auch eine ausreichende Materialtiefe.

Ein weiterer bisher nicht untersuchter Faktor ist die Reflexion, die entsteht, wenn die Infrarotstrahlung von der gasförmigen Atmosphäre in die optisch dichtere Kutikula gelangt. Wie die Topographieaufnahmen mittels WP gezeigt haben, scheint die wabenförmige Struktur im Infrarotorgan nicht nur eine Art Materialverstärkung zu sein, sondern könnte zudem die Reflexionseigenschaften für elektromagnetische Strahlung bis in den Wellenlängenbereich des Lichts beeinflussen. Die Messungen des WP lassen leider keine quantitativen Aussagen zu. Daher sind mehrere Möglichkeiten denkbar: Zum einen könnte die Reflexion in gewissen Wellenlängenbereichen verstärkt werden, so dass z.B. kurzwelliges Licht abgeblockt wird und vor allem langwelligere, d.h. infrarote, Strahlung in das Material eindringen kann und absorbiert wird. Da die Kutikula im IR-Organ jedoch fast durchsichtig erscheint und nicht weiß oder glänzend, wird diese Filterfunktion wahrscheinlich vor allem durch eine hohe Transmission des Lichts durch die Kutikula gewährleistet. Denkbar und wahrscheinlicher ist, dass durch die Strukturierung die Reflexion bis in den kurzwelligen Bereich des Lichts verringert wird. Die Absorption kurzwelliger Strahlung bliebe aufgrund des hohen Transmissionsgrades weiter gering. Für IR-Strahlung hieße das jedoch, dass weniger IR-Strahlung an der kutikulären Oberfläche reflektiert wird und mehr in die stark IR-absorbierende Kutikula eindringen kann und diese erwärmt.

Ein ähnlicher Effekt wurde bereits beim Mottenaugen entdeckt (Clapham und Hutley, 1973). Zur Reflexionsminderung im sichtbaren Wellenlängenbereich ist die Oberfläche mit kegelförmigen Strukturen übersät. Dieser Effekt konnte im langwelligen Infrarotbereich mit ähnlichen Geometrien, deren Abmessungen an die entsprechende Wellenlänge angepasst wurde, bereits auf technische Oberflächen übertragen werden (DeNatale et al., 1992; Motamedi et al., 1992). Die

Strukturgeometrie hat dabei einen wichtigen Einfluss auf das Reflexionsspektrum. Um die Reflexion effektiv zu minimieren, gilt für die Strukturhöhe  $h$ :

$$h \geq 0.4\lambda_{\max} \quad (4.2)$$

$\lambda_{\max}$  ist dabei die maximale Wellenlänge des Arbeitsbereiches, also des Wellenlängenbereichs, in dem die Reflexion reduziert werden soll. Zudem gilt für den maximalen Strukturabstand  $\Lambda$  von Mitte bis Mitte bei orthogonal zur Oberfläche eintreffender Strahlung:

$$\Lambda < \frac{\lambda_{\min}}{n} \quad (4.3)$$

$\lambda_{\min}$  ist die minimale Wellenlänge des Arbeitsbereichs und  $n$  die Brechungszahl. In der Literatur lassen sich bereits Angaben zu  $n$  für Insektenkutikula finden. Diese liegen im Bereich von 1,47 bis 1,74 (Stavenga et al., 2006; Vukusic et al., 2004).

Der Arbeitsbereich dieses biologischen Infrarotsensors liegt aufgrund des bereits erwähnten Emissionsspektrums und des atmosphärischen Fensters im Wellenlängenbereich von 1,5-5,5  $\mu\text{m}$ . Das würde bedeuten, dass die Strukturhöhe mindestens 2,2  $\mu\text{m}$  betragen muss und die Strukturen höchstens ca. 1  $\mu\text{m}$  auseinander liegen dürften. Die Tiefe der hexagonalen Struktur entspricht mit 5  $\mu\text{m}$  diesen Anforderungen. Der Abstand der Geometriemitten ist mit ca. 11  $\mu\text{m}$  jedoch ca. elf Mal größer als gefordert und lässt eine reflexionsmindernde Funktion der wabenförmigen Strukturen eher unwahrscheinlich erscheinen. Einschränkend für die Gültigkeit der Geometrievorgaben (4.2) und (4.3) muss erwähnt werden, dass die vorliegenden Strukturen nicht den kegelförmigen Zapfen des Mottenauges gleichen (vgl. Abb. 10), für die die Geometrievorgaben eigentlich gelten. Eine reflexionsmindernde Eigenschaft kann also trotzdem möglich sein. Einen Hinweis darauf lieferten die Topographieaufnahmen des IR-Organs, die mittels WP gemacht wurden. Die Intensität des reflektierten Weißlichtstrahls schien im Bereich des IR-Organs geringer zu sein. Das ist umso erstaunlicher da bei kürzeren Wellenlängen wie dem Weißlicht ein noch kleineres  $\Lambda$  gefordert wird. Geeignete Methoden könnten zeigen, ob die Oberflächenstrukturen des IR-Organs tatsächlich die Reflexion mindern oder ob die Strukturgeometrie tatsächlich zu groß ist.

Zusammenfassend kann also angenommen werden, dass das Infrarotorgan von *Merimna atrata* vermutlich mehrere Mechanismen besitzt, um Infrarotstrahlung effizient zu detektieren. Anpassungen der thermischen Masse, der

Wärmeleitfähigkeit und der Oberflächenreflexion optimieren die Funktionsweise des Infrarotorgans als Bolometer. Sollten die Mechanorezeptoren tatsächlich die thermische Ausdehnung der Kutikula detektieren, könnten sie ein weiterer Mechanismus zur Steigerung der Sensitivität sein.

#### **4.2.3 Das photomechanische Infrarotsensillum von *Melanophila acuminata***

Der Aufbau des kutikulären Apparates des Infrarotsensillums von *Melanophila acuminata*, der in aktualisierter Form vor kurzem von Schmitz et al. veröffentlicht wurde (Schmitz et al., 2007), konnte auch mit dem AFM in dieser Arbeit bestätigt werden. Lediglich der von Schmitz et al. beschriebene birnenförmige Kern konnte mittels AFM und Lichtmikroskop nicht dargestellt werden. Vermutlich waren die Proben nicht exakt mittig angeschnitten oder im Gegensatz zum TEM waren die verwendeten bildgebenden Methoden nicht in der Lage, eine solche Struktur darzustellen. Um Anpassungen der Materialeigenschaften und der Kutikulaschichtung des Infrarotorgans zu verdeutlichen, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Kutikula des Randbereichs als Referenz untersucht. Endokutikula konnte in beiden Bereichen nur vereinzelt und nur als sehr dünne, nicht durchgängige Schicht oder in Form von kleinen Inseln nachgewiesen werden.

Das kugelförmige Infrarotsensillum besteht aus einem Mantel aus geschichteter Exokutikula, die im Gegensatz zur Exokutikula des Referenzbereichs nicht melaninhaltig und daher vermutlich  $\beta$ -sklerotisiert ist. Bei der  $\beta$ -Sklerotisierung entstehen Bindungen an den  $\beta$ -Positionen in den aliphatischen Seitenketten von Katecholen (Andersen, 1971; Andersen und Barrett, 1971). Im Gegensatz zur Chinongerbung bleibt bei dieser Art der Sklerotisierung die Kutikula farblos bis hellgelb. Härte und Elastizitätsmodul des Mantels sind nur wenig geringer als die entsprechenden Werte der melanisierten Exokutikula des Referenzbereichs. Im Inneren der Kugel befindet sich schwammartige Mesokutikula, die Hohlräume aufweist. Diese Mesokutikula ist trotz des getrockneten Zustandes unter den verschiedenen Kutikulatypen aller untersuchten Käfer das deutlich weichste und elastischste Material, obwohl sie zumindest teilweise sklerotisiert ist.

Im nativen Zustand ist der Kontrast zwischen dem exokutikulären Mantel und der schwammartigen Mesokutikula vermutlich noch größer, da sich das Dehydrieren auf

die mechanischen Eigenschaften der Kutikulatypen unterschiedlich auswirkt (vgl. Kapitel 4.1). Exokutikula enthält nur bis zu 12% Wasser. Härte und Elastizitätsmodul steigen durch das Dehydrieren um einen Faktor von ca. eins bis drei. Bei der Mesokutikula ist dieser Faktor mit ca. fünf anzusetzen. Dementsprechend würde die Härte der nativen Exokutikula 0,18-0,53 GPa und der Elastizitätsmodul 2,62-7,87 GPa betragen. Die Mesokutikula müsste dementsprechend eine Härte von ca. 0,058 GPa und eine Elastizitätsmodul von ca. 0,97 GPa. Der maximale Unterschied würde also knapp eine Größenordnung betragen.

Die gemessenen mechanischen Eigenschaften können zudem Auskunft über die thermo-mechanischen Eigenschaften wie z.B. den thermischen Ausdehnungskoeffizienten geben. Bei der Sklerotisierung werden in der Kutikula die Proteine untereinander und mit den Chitinfasern durch Bildung von sog. Crosslinks enger miteinander verknüpft. Stark sklerotisierte Exokutikula ist so eng verknüpft, dass die Farbstoffe der Mallory Trichrome Färbung nicht in das Material eindringen können (Neville, 1975). Wie die Messungen mittels Nanoindenter zeigen konnten, führen die kovalenten Bindungen der Crosslinks zu Aushärtung und Versteifung des Materials. Zusätzlich können starke interatomare Verbindungen mit geringer thermischer Ausdehnung korreliert werden (Nielsen, 1969). Ein solcher Effekt der Crosslinks auf die mechanischen Eigenschaften wurde beispielsweise auch bei Polymeren nachgewiesen (Nielsen, 1969). Härtere und unelastischere Kutikula sollte dementsprechend einen geringeren thermischen Ausdehnungskoeffizienten aufweisen.

Im *Melanophila* Infrarotsensillum führt die Absorption infraroter Strahlung zur Erwärmung der Kutikulaschichten (Schmitz et al., 2007; Schmitz und Bleckmann, 1998). Die Erwärmung erzeugt also in den verschiedenen Kutikulaschichten unterschiedliche mechanische Reaktionen. Die weiche und elastische Mesokutikula wird sich wesentlich mehr ausdehnen als die harte unelastische Exokutikula, die zudem mit Chitinfasern verstärkt ist und somit eine Art Druckgefäß bildet, das das Volumen im Inneren nahezu konstant hält. Im Inneren wird durch die thermische Ausdehnung der Mesokutikula ein Druck aufgebaut. Die Hohlräume im Inneren des Sensillum sind höchstwahrscheinlich mit einer wässrigen Flüssigkeit gefüllt und stehen miteinander in Verbindung (Schmitz et al., 2007). Da das Fluid nicht komprimierbar ist, wird es aus den Hohlräumen in die Druckkammer gedrückt. In der Druckkammer befindet sich die Spitze des Mechanorezeptors, der in diesem Gebilde

das weichste Material ist und in Folge des aufgebauten Drucks komprimiert wird. Das Fluid überträgt also die thermische Ausdehnung der schwammartigen Mesokutikula ohne Verzögerung auf den Mechanorezeptor. Diese Deformation stellt einen adäquaten Reiz für einen Insektenmechanorezeptor dar. Das entstehende Signal kann über das metathorakale Ganglion bis hin zum Oberschlundganglion weitergeleitet werden (Gronenberg und Schmitz, 1999).

Bei dem Fluid handelt es sich sehr wahrscheinlich größtenteils um Wasser. Dieses ist bei einer Wellenlänge von 2,9  $\mu\text{m}$  ein sehr guter Infrarotabsorber (Bunker und Jensen, 1998). Genau bei dieser Wellenlänge wird ein Großteil der Infrarotstrahlung allerdings von der wasserhaltigen Atmosphäre absorbiert (vgl. Abb. 32), so dass das Fluid im Inneren des Sensillum vermutlich wenig zur Absorption der Strahlung beitragen kann. Welches Leistungsspektrum tatsächlich am Infrarotorgan ankommt, müsste allerdings noch genauer untersucht werden. Allerdings könnte das Fluid jedoch auch aus organischen Molekülen bestehen, wie sie z.B. in der Epikutikula (Wachse, Lipide etc.) vorkommen. Organische Substanzen sind in der Regel sehr gute Infrarotabsorber, so dass durch die Kombination von Kutikula und Fluid das Absorptionsspektrum und somit die Entstehung von Wärme maximiert wird. Zudem besitzen sie einen hohen thermischen Ausdehnungskoeffizienten. Sie könnten von den Epidermiszellen sekretiert werden und über die von Schmitz et al. beschriebenen Nanokanäle der Schale ins Innere des Sensillum gelangen. Die Nanokanäle sind zusätzlich wahrscheinlich ein Hochpass-Filtermechanismus. Kommt es zu einer langsamen Erwärmung, wie z.B. durch Änderung der Außentemperatur, kann das Fluid über die Kanäle langsam entweichen. Es entsteht daher keine Druckerhöhung und der Mechanorezeptor wird nicht gereizt (Schmitz et al., 2007).

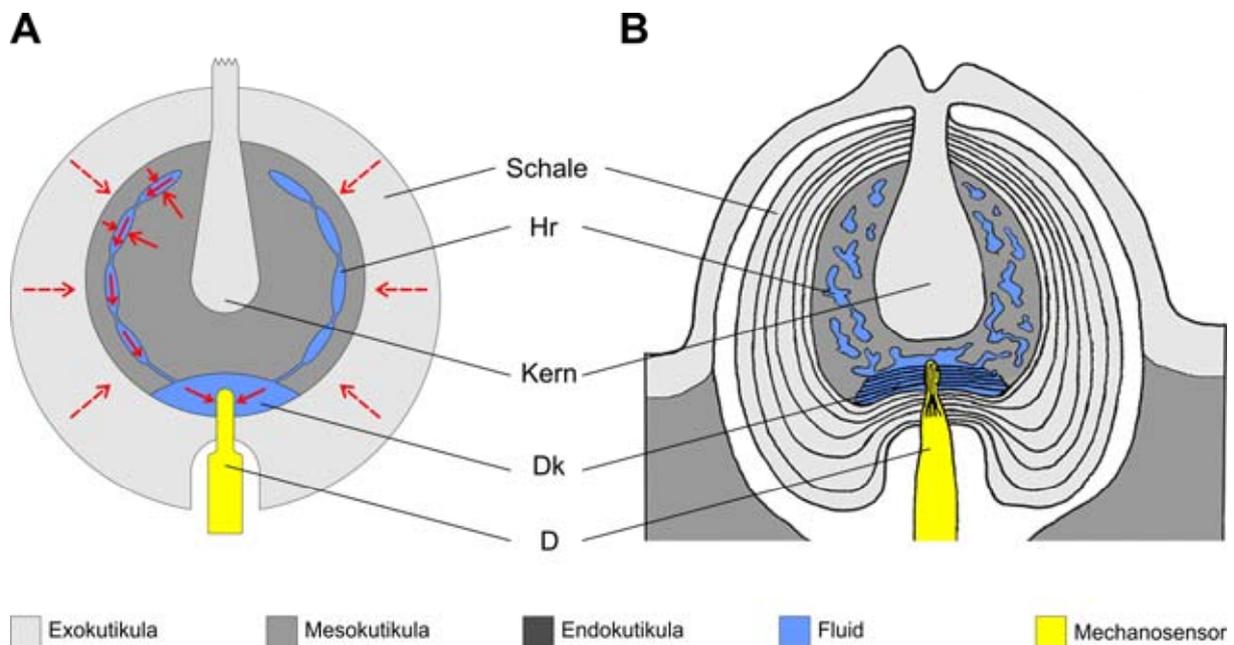
Die Schale aus Exokutikula funktioniert also als ein Druckbehälter. Um dem Druck im Inneren standzuhalten, ist sie zudem mit mehreren Lagen aus Chitin faser verstärkt. Im TEM und auch im AFM sind diese Lagen sehr gut zu erkennen (Müller et al., 2008; Schmitz et al., 2007; Vondran et al., 1995), da die Chitinfasern hochgradig geordnet sind. Die Fasern einer Lage weisen dabei die gleiche Orientierung auf. Von Lage zu Lage variiert die Ausrichtung der Fasern aber, so dass die Ausrichtung der Chitinfasern in konsekutiven Lagen um einen gewissen Winkel verdreht ist (Bouligan, Y., 1965). Die hohe Standardabweichung, die beim Messen der mechanischen Eigenschaften bei der Exokutikula auftrat, kann eine Folge der

variierenden Orientierung der Chitinfasern sein. Beim Messen drang die Spitze zufällig in die unterschiedlich orientierten Schichten ein.

Zusätzlich wurden einige Messungen an Infrarotsensillen durchgeführt, bei denen der äußere kugelförmige Mantel tangential angeschnitten wurde. In der Mitte des kreisrunden Schnittprofils konnte so die Spitze des Nanoindenters fast orthogonal zur Schichtungsrichtung eingedrückt werden. Diese mechanische Belastung entspricht eher einer Belastung, die durch einen Druckaufbau im Inneren zustande kommt. Hierbei wurde mit 0.67 GPa eine noch höhere Härte gemessen. Die Richtung der jeweiligen Belastung spielt daher bei der chitinverstärkten Exokutikula offensichtlich eine wichtige Rolle. Das exokutikuläre Material zeigt anisotrope mechanische Eigenschaften. Diese können durch die Anordnung und Eigenschaften der Chitinfasern erklärt werden. Chitinfasern weisen in Längsrichtung eine hohe Zugfestigkeit auf (Elastizitätsmodul  $> 150$  GPa) und werden daher so in Kutikula eingebaut, dass sie bei natürlicher Beanspruchung auf Zug belastet werden. Durch die variierende Orientierung der Chitinfasern im *Melanophila* IR-Organ wird das Sensillum in alle Richtungen „verschnürt“. Es ist daher davon auszugehen, dass eine Expansion im Inneren zu einer Zugbelastung der Chitinfasern führt. Diese verhindern durch ihre hohe Zugfestigkeit ein Ausdehnen der Schale. Druck und thermische Ausdehnung im Inneren der Schale werden somit fast ausschließlich auf die Spitze des Dendriten konzentriert.

Das Modell der photomechanischen Transduktion könnte sogar noch effizienter sein als bisher postuliert, wenn die Chitinfasern einen negativen thermischen Ausdehnungskoeffizienten aufweisen und sich deshalb das Volumen der Schale sogar verringert. Einige langkettige kohlenstoffhaltige Polymere (z.B. Carbonfaser) zeigen eine thermische Kontraktion in Längsrichtung, während in radialer Richtung eine thermische Ausdehnung stattfindet (Newnham, 2005). Da die Chitinfasern im Infrarotsensillum ringsum verlaufen, würde sich das innere Volumen verkleinern, wenn sich die Fasern in Längsrichtung kontrahieren und in radialer Richtung ausdehnen (Abb. 33). Dieser Effekt würde die Drückerhöhung im Inneren des Sensillums, die ohnehin durch die Expansion der Mesokutikula und des Fluids entsteht, weiter verstärken. Carbon- und Chitinfasern können allerdings nur eingeschränkt miteinander verglichen werden, da Chitinfasern normalerweise aus einem Bündel von Chitinketten bestehen, die über Wasserstoffbrückenbindungen

quervernetzt sind. Ähnliche thermomechanische Eigenschaften sind dennoch denkbar.

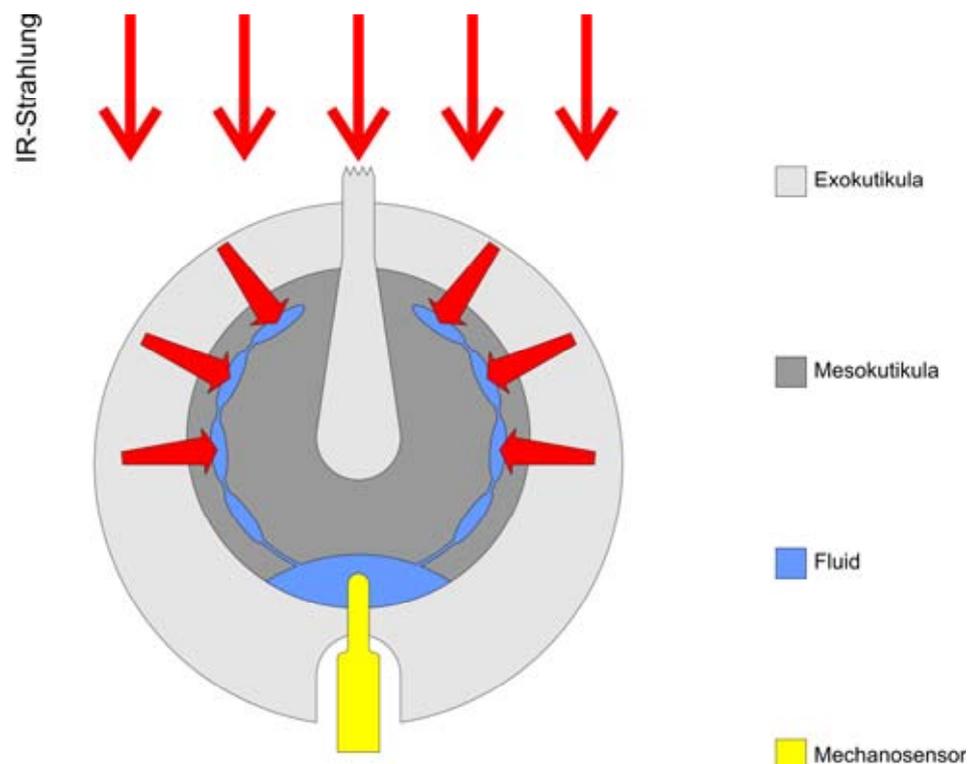


**Abb. 33:** Struktur und Funktion des *Melanophila* Infrarotsensillums. **A** Schematische Zeichnung des weiterentwickelten Funktionsprinzips und **B** morphologische Zeichnung verändert aus Schmitz et al. (Schmitz et al., 2007). Absorption von Infrarotstrahlung führt zur Erwärmung des Systems. Die Materialien reagieren unterschiedlich. Aufgrund der Einlagerung von Chitinfasern wird die exokutikuläre Schale (Schale) wahrscheinlich kleiner. Die Mesokutikula im Inneren (dunkelgrau) dehnt sich aus, so dass die schwammartigen Hohlräume (Hr) kleiner werden und das sich ebenfalls ausdehnende Fluid (blau) den entstehenden Druckanstieg in Richtung Druckkammer (Dk) überträgt. Dort wird die Spitze des Mechanodendriten (gelb) zusammengedrückt. Aus Müller et al., 2008.

Neben den thermo-mechanischen Eigenschaften sind auch die thermischen Eigenschaften der Kutikula im IR-Sensillum von Bedeutung. Wie sich bei den Überlegungen zum Bau eines künstlichen photomechanischen Infrarotsensors gezeigt hat, ist für das *Melanophila* IR-Sensillum eine isolierende Kutikula von Vorteil (Bousack et al., 2008). Der Sensor ist im Vergleich zur Golay Zelle, die eine der sensitivsten ungekühlten IR-Sensoren im Bereich von 1-1000  $\mu\text{m}$  Wellenlänge ist (Dereniak und Boreman, 1996), mit Fluid statt Gas gefüllt. Das erhöht die thermische Masse des Systems und bedeutet einen Nachteil im Vergleich zum gasgefüllten technischen System, da die erhöhte thermische Masse eine langsamere Reaktionszeit bedingt. Eine thermische Isolierung des Sensors würde die Leistung

des biologischen Systems aber wiederum verbessern, da die Wärme, die durch die Absorption von IR-Strahlung entsteht, nur langsam abgeleitet werden kann. So wird eine größere Temperaturerhöhung des absorbierenden Materials erzielt.

Unter Annahme der berechneten Wärmeleitfähigkeiten hydrierter Kutikula (vgl. 4.1) stellt die Exokutikula den geforderten Isolator dar (Abb. 34). Demnach gäbe es im *Melanophila* IR-Sensillum einen Wärmeleitfähigkeitsgradienten von außen nach innen, bestehend aus isolierender Exokutikula als äußere Abgrenzung ( $0,15 < \lambda < 0,2 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), hin zur innen liegenden Mesokutikula ( $0,2 < \lambda < 0,33 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) und dem besser wärmeleitenden Fluid ( $\lambda = 0,6 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  für Wasser), das sich in den Hohlräumen und der Druckkammer befindet. Das Fluid erhöht zwar auch die thermische Masse im Inneren, es ist aber auf die Druckkammer und die kleinen Hohlräume begrenzt und optimiert die Übertragung des Drucks, der durch die thermische Ausdehnung zustande kommt, auf die Spitze des Dendriten.



**Abb. 34:** Wärmeleitungsprinzip im *Melanophila* IR-Sensillum. Infrarotstrahlung trifft auf das IR-Organ und wird von der Sensillumkutikula und dem Fluid absorbiert und in Wärme umgewandelt. Diese wird in Richtung des Wärmeleitfähigkeitsgradienten (dicker roter Pfeil) zum Fluid geleitet. Die Dicke des Pfeils deutet dabei die Wärmeleitfähigkeit der Schichten an. Die exokutikuläre Schale besitzt im hydrierten Zustand die geringste Wärmeleitfähigkeit und dient daher nicht nur als Druckgefäß (vgl. Abb. 33), sondern ist zudem eine Art Isolationsgefäß.

Um den Gedanken der Optimierung des Funktionsprinzips bei *Melanophila acuminata* weiterzuführen, hieße das, dass zuviel Fluid im Inneren des Sensillum sich negativ auf die Empfindlichkeit des Sensors ausüben würde. Die im Vergleich zur Kutikula höhere Wärmekapazität, sprich thermische Masse, würde den Temperaturanstieg im Sensillum verlangsamen. Die im Vergleich zum Wasser geringere spezifische Wärmekapazität von Kutikula könnte ein weiterer Grund dafür sein, warum das Innere des Sensillum nicht komplett mit Fluid gefüllt ist (Bousack et al., 2008).

### 4.3 Struktur und Funktion der Gula von *Pachnoda marginata*

Barbakadze et al. haben mittels Nanoindentation bereits die mechanischen Eigenschaften an der äußeren Oberfläche der Gula bestimmt. Die Härte von getrocknetem Material betrug dabei 0,49 GPa, der Elastizitätsmodul 7,5 GPa (Barbakadze et al., 2006). Diese Daten sind vergleichbar mit denen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessen wurden, bei denen eine Härte von 0,21 GPa und ein Elastizitätsmodul von 6,2 GPa gemessen wurden. Die niedrigeren Werte könnten dadurch zustande kommen, dass in der vorliegenden Arbeit die Proben nicht für 24 Stunden in einem Wärmeschrank bei 40°C getrocknet wurden, sondern lediglich luftgetrocknet wurden. Bei den Messungen der eingebetteten Proben betrug die Härte der äußeren, mesokutikulären Schicht (Meso 1) 0,36 GPa und die Elastizität 5,93 GPa. Diese Probe befand sich zum Aushärten des Einbettmediums für mehrere Tage bei 60°C im Wärmeschrank und ihre Materialwerte unterscheiden sich kaum von den Daten von Barbakadze et al. Die an Schnittproben gemessenen mechanischen Eigenschaften würden also zumindest bzgl. der Härte mit den Daten von Barbakadze et al. besser übereinstimmen.

In früheren Publikationen wurden die äußeren Schichten als Epi- und Exokutikula bezeichnet (Arzt et al., 2002; Barbakadze et al., 2006; Dai et al., 2006; Enders et al., 2004), da auf eine spezifische Anfärbung verzichtet wurde. Die Ergebnisse der Mallory Trichrome Färbung widerlegen diese Annahme nun (Müller et al., 2008).

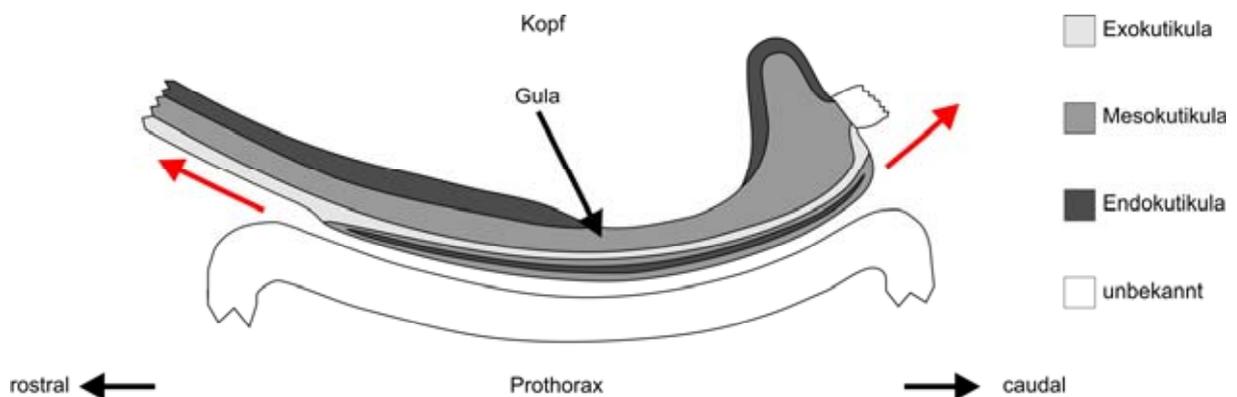
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kutikula der Gula wesentlich komplizierter aufgebaut ist, als bisher in früheren Publikationen vermutet wurde (Arzt et al., 2002; Barbakadze et al., 2006; Dai et al., 2006; Enders et al., 2004). Bei *Pachnoda marginata* findet man von innen nach außen gesehen zuerst die normale Reihenfolge von Endo-, Meso- und Exokutikula. Jedoch bildet die Exokutikula hier nicht die direkt nach außen abschließende Prokutikulaschicht. Über ihr befinden sich noch zwei Schichten aus Mesokutikula, zwischen denen eine endokutikuläre Schicht gelagert ist. Eine dünne Schicht, die vermutlich aus Epikutikula besteht, bildet die äußere Oberfläche. Grundlegende Abweichungen der Standardabfolge wurden bisher selten beschrieben (Richards, 1967) und scheinen sich auf Kutikula im Larven- und Puppenstadium oder bei adulten Insekten auf spezielle Bereiche (z.B. nahe Intersegmentalmembranen) zu beschränken. Über eine Abfolge wie die in der Kutikula der Gula wurde bisher nicht berichtet.

Die Ergebnisse der Histologie werden durch die Messungen der mechanischen Eigenschaften gestützt. Härte und der Elastizitätsmodul sind in den äußeren drei Schichten, die aus Endo- und Mesokutikula bestehen, signifikant kleiner als in der darunter liegenden Exokutikula (Abb. 15 und Tab. 1). Diese Unterschiede werden im nativen Zustand noch größer sein, da harte Exokutikula weniger Wasser aufnehmen kann (vgl. Kapitel 4.1). Die Daten von Barbakadze et al. haben gezeigt, dass Härte und Elastizitätsmodul der äußeren Mesokutikula in getrocknetem Zustand ca. fünf Mal höher ist (Barbakadze et al., 2006). Demzufolge würde die native äußere Mesokutikula eine Härte von 0,07 GPa und einen Elastizitätsmodul von 1 GPa aufweisen. Dies entspricht ungefähr den Werten, die Barbakadze et al. an frischen Gulaproben gemessen haben ( $H=0,1$  GPa;  $E=1,5$  GPa). Der etwas höhere Wert kann eventuell dadurch erklärt werden, dass die Messungen von Barbakadze et al. zudem von der Epikutikula beeinflusst wurden und diese vermutlich härter und unelastischer ist als die darunter befindliche Mesokutikula. Die unter der Mesokutikula liegende Endokutikula dürfte im nativen Zustand sogar noch wesentlich weicher und elastischer sein. Es liegen aber bislang keine Daten vor, die Unterschiede zwischen nativer und dehydrierter Endokutikula aufzeigen.

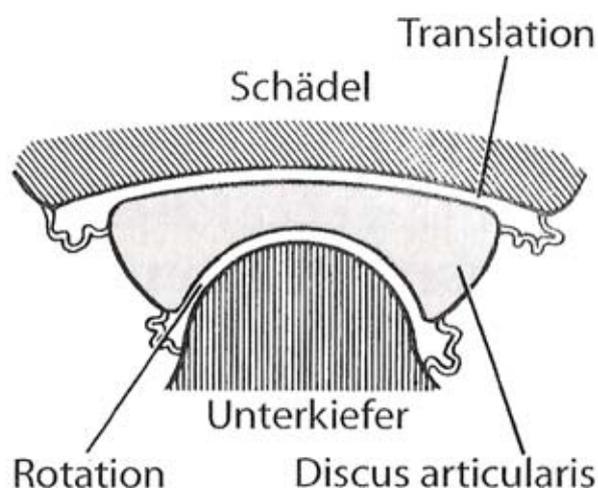
Die ungewöhnliche Schichtung der Gula ist höchstwahrscheinlich erklärbar durch die besondere mechanische Beanspruchung dieses Gelenkes, das die Bewegung zwischen Kopf und Prothorax gewährleistet. Bei Bewegungen des Kopfes gleitet die Gula über den prothorakalen Gegenpart (rote Pfeile in Abb. 35, und Fig. 2 in Barbakadze et al., 2006) Vergleichende Untersuchungen an getrocknetem Material von *Pachnoda marginata* haben gezeigt, dass der Kopfteil der Gula weicher und elastischer ist als das prothorakale Gegenlager (Arzt et al., 2002). Jedoch wurden in dieser Arbeit keine histologischen Untersuchungen durchgeführt, um Rückschlüsse auf die mechanischen Eigenschaften ziehen zu können.

Dai et al. untersuchten die Reibungseigenschaften der Gula und folgerten, dass die Materialzusammensetzung des Gelenkes einer der wichtigsten Faktoren beim Reibungsverhalten ist (Dai et al., 2006). Die Funktionsweise der Gula mit ihren elastischen, äußeren Schichten erinnert dabei an ein elastisches Kissen aus Faserknorpel, wie z.B. der Discus articularis des Temporomandibulargelenks (Abb. 36). Gelenkoberflächen aus Faserknorpel sind in der Regel eine Anpassung an große Scherkräfte (Benjamin und Evans, 1990). Das Temporomandibulargelenk wird stark durch Scher- und Zugkräfte beansprucht (McDevitt, 1989). Der elastische

Discus articularis zwischen den harten, unelastischen Knochenstrukturen des Unterkiefers und des Schädels erlaubt dem Gelenk nicht nur eine reibungsarme Translations- sondern auch Rotationsbewegung und erhöht so die möglichen Bewegungsfreiräume (Hildebrand und Goslow, 2001). Gleiche Bewegungsmöglichkeiten bietet auch die Gula, obwohl im Unterschied zum genannten Beispiel das elastische Kissen nicht über eine Kapsel mit den festen Strukturen verbunden ist, sondern sich in der Gula unbeweglich über der Exokutikula befindet. Die Funktion des Schmiermittels, die im Temporomandibulargelenk die Synovialflüssigkeit erfüllt, könnte im Kopfgelenk von *Pachnoda marginata* von der dünnen, epikutikulären Wachsschicht der Gula und des metathorakalen Gegenlagers übernommen werden.



**Abb. 35:** Die Struktur der Gula von *Pachnoda marginata* als Kugelgelenksystem. Zwischen dem Prothorax und dem Kopf bildet sich eine Kontaktfläche. Die roten Pfeile zeigen eine mögliche Bewegungsrichtung des Kopfes (verändert nach Barbakadze et al., 2006).



**Abb. 36:** Schema des Temporomandibulargelenks, das in Lateralansicht die wahrscheinliche Funktion des Discus articularis zeigt. Aus Hildebrand und Goslow, 2001.

Der Aufbau der Gula und ihres Gegenstücks weist außerdem auch Ähnlichkeiten mit künstlichen Hüftgelenken auf. Bei diesen ist eine harte Kugel, die aus Titanium besteht, in ein elastisches, reibungsminimierendes Lager aus Teflon gelagert. Reibung und Abnutzung werden so reduziert und die Lebenszeit des Gelenks erhöht. Bei der Gula ist der Aufbau jedoch anscheinend vertauscht. Das Lager stellt hier den härteren (Arzt et al., 2002) und die kugelförmig abgerundete Gula den elastischen Part dar. Weitere Untersuchungen des thorakalen Gegenstücks wären nötig, um dies eindeutig zu belegen.

#### 4.4 Schlussbemerkung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten detailliert der Aufbau sowie die mechanischen und thermischen Materialeigenschaften dehydrierter Kutikulastrukturen gemessen und ihre funktionale Bedeutung aufgeklärt werden. Zusätzlich wurden die nativen Materialeigenschaften der einzelnen Kutikulaschichten von den Ergebnissen der dehydrierten Proben abgeleitet. Die Zielsetzung wurde daher vollständig erfüllt. Aufbauend darauf kann nun als nächster Schritt der Versuch unternommen werden, die mechanischen Eigenschaften nativer, hydrierter Kutikulaschichten zu bestimmen. Dies erfordert jedoch umfangreiche Anpassungen der verwendeten Methoden und Technologien, da zum einen die verwendete Probenvorbereitung ein Dehydrieren des Kutikulamaterials bedingt und zum anderen die verwendeten Messgeräte in dem vorliegenden Zustand nicht in der Lage sind, in einem flüssigen Milieu, das zum Rehydrieren und Feuchthalten der Proben eingesetzt werden könnte, zu arbeiten.

Eine mögliche Lösung könnte der Einsatz eines geeigneten Atomic Force Microscopes sein, mit dem Kraftabstandskurven auch in flüssiger Umgebung durchgeführt werden können und das somit Messungen der mechanischen Eigenschaften von hydriertem Kutikulamaterial erlaubt. In einem ersten Schritt könnte angeschnittenes getrocknetes Material in einem flüssigen Milieu rehydriert werden.

Das AFM hat zudem den Vorteil, dass eine Vielzahl von verschiedenen Spitzengeometrien verwendet werden kann, unter anderem auch Spitzen mit geringerem Öffnungswinkel, so dass im Vergleich zur Berkovichspitze eine höhere laterale Auflösung erreicht wird, also flächenmäßig kleinere Eindrücke. In der lamellierten Exokutikula könnten so die mechanischen Eigenschaften der unterschiedlich ausgerichteten Schichten aus Chitinfasern untersucht werden. Da die Spitzengeometrie die Härte und das Elastizitätsmodul beeinflussen kann, sollten jedoch in einem ersten Schritt zum besseren Vergleich mit den vorgelegten Messungen der Nanoindentation Spitzengeometrien verwendet werden, die einer Berkovichspitze gleichen.

Ein Nachteil ist jedoch, dass die Spitze aufgrund des Biegebalkeneffekts des Cantilevers nicht immer orthogonal zur Probenoberfläche ausgerichtet ist und während des Eindringens dieser Anstellwinkel kontinuierlich verändert wird. Die AFM-Spitzen werden in der Regel aus Silizium gefertigt, das eine geringere Härte und einen geringeren Elastizitätsmodul als eine aus Diamant bestehende

Berkovichspitze besitzt. In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass die Härte und der Elastizitätsmodul von nativem Kutikulamaterial weit unter den Werten von Silizium (Härte 5-13 GPa; Elastizitätsmodul 62-202 GPa) liegen und der Einfluss der Materialeigenschaften der Siliziumspitze gering sein wird.

Die nativen thermischen Materialeigenschaften können theoretisch mittels Scanning Thermal Microscope in flüssigem Milieu untersucht werden. Dafür müssten Anstrengungen unternommen werden, das bestehende System umzubauen. Die Probenvorbereitung wäre identisch mit der, die für das AFM beschrieben wurde.

Um das Dehydrieren der Kutikula zu umgehen, könnten außerdem von dem frisch herauspräparierten Kutikulamaterial mittels Gefriermikrotom Schnitte angefertigt und anschließend zum Entfrostern in ein geeignetes Fluid überführt werden. Wie gezeigt wurde, kann der pH-Wert des Fluids einen erheblichen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften haben (Reynolds, 1975b) und muss daher optimal eingestellt werden.

Bei den vorgeschlagenen Anpassungen handelt es sich um umfangreiche Arbeiten, die im Rahmen einer oder mehrerer Promotionsarbeiten abgehandelt werden könnten.

## 5. Literaturverzeichnis

- Altes, A.** (2004). Quantitative dynamic near-field microscopy of thermal conductivity. In *Fachbereich Elektrotechnik, Informationstechnik, Medientechnik*: Bergische Universität Wuppertal.
- Altes, A., Heiderhoff, R. und Balk, L. J.** (2004). Quantitative dynamic near-field microscopy of thermal conductivity. *Journal Of Physics D-Applied Physics* **37**, 952-963.
- Altner, H. und Loftus, R.** (1985). Ultrastructure and function of insect thermo- and hygrosensors. *Annu. Rev. Entomol* **30**, 273-295.
- Andersen, S. O.** (1971). Phenolic compounds isolated from insect hard cuticle and their relationship to the sclerotization process *Insect Biochemistry* **1**, 157-&.
- Andersen, S. O.** (1974). Evidence for two mechanisms of sclerotisation in insect cuticle. *Nature* **251**, 507-508.
- Andersen, S. O.** (1979). Biochemistry of Insect Cuticle. *Annual Review of Entomology* **24**, 29-61.
- Andersen, S. O. und Barrett, F. M.** (1971). The isolation of ketocatechols from insect cuticle and their possible rôle in sclerotization. *Journal Of Insect Physiology* **17**, 69-&.
- Andersen, S. O., Peter, M. G. und Roepstorff, P.** (1996). Cuticular sclerotization in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **113**, 689-705.
- Arzt, E., Enders, S. und Gorb, S.** (2002). Towards a micromechanical understanding of biological surface devices. *Zeitschrift Fur Metallkunde* **93**, 345-351.
- Banerjee, S.** (1988). Organisation of wing cuticle in *Locusta migratoria linnaeus*, *Tropidacris cristata linnaeus* and *Romalea microptera beauvais* (Orthoptera : Acrididae) *International Journal of Insect Morphology & Embryology* **17**, 313-326.
- Barbakadze, N., Enders, S., Gorb, S. und Arzt, E.** (2006). Local mechanical properties of the head articulation cuticle in the beetle *Pachnoda marginata* (Coleoptera, Scarabaeidae). *Journal of Experimental Biology* **209**, 722-730.
- Barth, F. G. und Holler, A.** (1999). Dynamics of arthropod filiform hairs. V. The response of spider trichobothria to natural stimuli. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **354**, 183-192.
- Benjamin, M. und Evans, E. J.** (1990). Fibrocartilage. *Journal of Anatomy* **171**, 1-15.
- Berber, S., Kwon, Y. K. und Tomanek, D.** (2000). Unusually high thermal conductivity of carbon nanotubes. *Physical Review Letters* **84**, 4613-4616.
- Bhushan, B. und Li, X. D.** (2003). Nanomechanical characterisation of solid surfaces and thin films. *International Materials Reviews* **48**, 125-164.

- Bouligan, Y.** (1965). Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'arthropod *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De La Academie Des Sciences* **261**, 3665-3668.
- Bousack, H., Schmitz, H., Müller, M. und Offenhäuser, A.** (2008). A Fluidic Infrared Detector Based on the Infrared Sensilla in the Beetle *Melanophila acuminata*. In *Euroensors*. Dresden.
- Bückle, H.** (1965). *Mikrohärteprüfung und ihre Anwendung*. Stuttgart: Berliner Union.
- Bunker, P. R. und Jensen, P.** (1998). *Molecular Symmetry and Spectroscopy*. Ottawa: NRC Research Press.
- Cahill, D. G.** (1990). Thermal conductivity measurement from 30 to 750 K: the 3omega method. *Review of Scientific Instruments* **61**, 802-808.
- Cahill, D. G. und Pohl, R. O.** (1987). Thermal conductivity of amorphous solids above the plateau. *Physical Review B* **35**, 4067-4073.
- Chudoba, T. und Richter, F.** (2001). Investigation of creep behaviour under load during indentation experiments and its influence on hardness and modulus results. *Surface & Coatings Technology* **148**, 191-198.
- Clapham, P. B. und Hutley, M. C.** (1973). Reduction of lens reflection by moth eye principle. *Nature* **244**, 281-282.
- Dai, Z. D., Min, Y. und Gorb, S. N.** (2006). Frictional characteristics of the beetle head-joint material. *Wear* **260**, 168-174.
- DeNatale, J. F., Hood, P. J., Flintoff, J. F. und Harker, A. B.** (1992). Fabrication and characterization of diamond moth eye antireflective surfaces on Ge. *Journal of Applied Physics* **71**, 1388-1393.
- Dereniak, E. L. und Boreman, G. D.** (1996). *Infrared Detectors and Systems*. New York: John Wiley & Sons.
- Enders, S., Barbakadse, N., Gorb, S. N. und Arzt, E.** (2004). Exploring biological surfaces by nanoindentation. *Journal Of Materials Research* **19**, 880-887.
- Fiege, G. B. M.** (2001). Quantitative Erfassung von thermischen Eigenschaften mit Hilfe der Rastersondenmikroskopie. In *Fachbereich Elektrotechnik und Informationstechnik*: Bergische Universität Wuppertal.
- Fiege, G. B. M., Altes, A., Heiderhoff, B. und Balk, L. J.** (1999). Quantitative thermal conductivity measurements with nanometre resolution. *Journal Of Physics D-Applied Physics* **32**, L13-L17.
- Fischer-Cripps, A. C.** (2004). *Nanoindentation*. New York: Springer Verlag.
- Fraenkel, G. und Rudall, K. M.** (1940). A Study of the Physical and Chemical Properties of the Insect Cuticle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **129**, 1-35.
- French, A. S., Torkkeli, P. H. und Seyfarth, E. A.** (2002). From stress and strain to spikes: mechanotransduction in spider slit sensilla. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology* **188**, 739-752.

- Galushko, D., Ermakov, N., Karpovski, M., Palevski, A., Ishay, J. S. und Bergman, D. J.** (2005). Electrical, thermoelectric and thermophysical properties of hornet cuticle. *Semiconductor Science and Technology* **20**, 286-289.
- Gorb, S. N.** (2001). Attachment Devices of the Insect Cuticle. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Gouldstone, A., Koh, H. J., Zeng, K. Y., Giannakopoulos, A. E. und Suresh, S.** (2000). Discrete and continuous deformation during nanoindentation of thin films. *Acta Materialia* **48**, 2277-2295.
- Gronenberg, W. und Schmitz, H.** (1999). Afferent projections of infrared-sensitive sensilla in the beetle *Melanophila acuminata* (Coleoptera : Buprestidae). *Cell and Tissue Research* **297**, 311-318.
- Hazel, J., Fuchigami, N., Gorbunov, V., Schmitz, H., Stone, M. und Tsukruk, V. V.** (2001). Ultramicrostructure and microthermomechanics of biological IR detectors: Materials properties from a biomimetic perspective. *Biomacromolecules* **2**, 304-312.
- Hepburn, H. R. und Chandler, D.** (1980). Materials testing of arthropod cuticle preparations. In *Cuticle Technologies in Arthropods*, (ed. T. A. Miller), pp. 1-44. New York: Springer-Verlag.
- Hildebrand, M. und Goslow, G. E.** (2001). Analysis of Vertebrate Structure. New York: John Wiley & Sons.
- Hillerton, J. E., Reynolds, S. E. und Vincent, J. F. V.** (1982). On the Indentation Hardness of Insect Cuticle. *Journal of Experimental Biology* **96**, 45-&.
- Hossli, B., Bohm, H. J., Rammerstorfer, F. G. und Barth, F. G.** (2007). Finite element modeling of arachnid slit sensilla- I. The mechanical significance of different slit arrays. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology* **193**, 445-459.
- Hudson, R. D.** (1969). Infrared Systems Engineering. New York: John Wiley & Sons.
- Humphrey, J. A. C. und Barth, F. G.** (2008). Medium flow-sensing hairs: Biomechanics and models. In *Advances in Insect Physiology: Insect Mechanics and Control*, vol. 34, pp. 1-80. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
- Ishay, J. S. und Pertsis, V.** (2002). The specific heat of the cuticle and the morphological differences between the brown and yellow cuticles of hornets. *Journal of Electron Microscopy* **51**, 401-411.
- Katz, S. L. und Gosline, J. M.** (1994). Scaling Modulus as a Degree of Freedom in the Design of Locust Legs. *Journal of Experimental Biology* **187**, 207-223.
- Keil, T. A.** (1997). Functional morphology of insect mechanoreceptors. *Microscopy Research and Technique* **39**, 506-531.
- Kim, P., Shi, L., Majumdar, A. und McEuen, P. L.** (2001). Thermal transport measurements of individual multiwalled nanotubes. *Physical Review Letters* **87**, 4.
- Kreiss, E., Schmitz, H. und Gebhardt, M.** (2007). Electrophysiological characterisation of the infrared organ of the Australian "Little Ash Beetle" *Acanthocnemus nigricans* (Coleoptera, Acanthocnemidae). *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology* **193**, 729-739.

- Kreiss, E. J., Schmitz, A. und Schmitz, H.** (2005). Morphology of the prothoracic discs and associated sensilla of *Acanthocnemus nigricans* (Coleoptera, Acanthocnemidae). *Arthropod Structure & Development* **34**, 419-428.
- Kushida, H.** (1964). Improved Methods For Embedding With Durcupan. *Journal of Electron Microscopy* **13**, 139-144.
- Luft, J. H.** (1961). Improvements In Epoxy Resin Embedding Methods. *Journal Of Biophysical And Biochemical Cytology* **9**, 409-&.
- Magonov, S. N., Elings, V. und Whangbo, M. H.** (1997). Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. *Surface Science* **375**, L385-L391.
- Mainz, T., Schmitz, A. und Schmitz, H.** (2004). Variation in number and differentiation of the abdominal infrared receptors in the Australian 'fire-beetle' *Merimna atrata* (Coleoptera, Buprestidae). *Arthropod Structure & Development* **33**, 419-430.
- Matsko, N. und Mueller, M.** (2004). AFM of biological material embedded in epoxy resin. *Journal of Structural Biology* **146**, 334-343.
- McDevitt, W. E.** (1989). *Functional Anatomy of the Masticatory System*. London: Wright.
- Motamedi, M. E., Southwell, W. H. und Gunning, W. J.** (1992). Antireflection surfaces in silicon using binary optics technology. *Applied Optics* **31**, 4371-4376.
- Müller, M., Olek, M., Giersig, M. und Schmitz, H.** (2008). Micromechanical properties of consecutive layers in specialized insect cuticle: the gula of *Pachnoda marginata* (Coleoptera, Scarabaeidae) and the infrared sensilla of *Melanophila acuminata* (Coleoptera, Buprestidae). *Journal of Experimental Biology* **211**, 2576-2583.
- Neville, A. C.** (1975). *Biology of the arthropod cuticle*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Newnham, R. E.** (2005). *Properties of Materials. Anisotropy, Symmetry, Structure*. New York: Oxford University Press.
- Nielsen, L. E.** (1969). Cross-linking-effect on physical properties of polymers. *Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry* **C 3**, 69-103.
- Nissan, A. H.** (1976). H-Bond Dissociation in Hydrogen Bond Dominated Solids. *Macromolecules* **9**, 840-850.
- Oliver, W. C. und Pharr, G. M.** (1992). An Improved Technique For Determining Hardness And Elastic-Modulus Using Load And Displacement Sensing Indentation Experiments. *Journal Of Materials Research* **7**, 1564-1583.
- Pryor, M. G. M.** (1940). On the Hardening of the Cuticle of Insects. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **128**, 378-393.
- Reynolds, S. E.** (1975a). The mechanical properties of the abdominal cuticle of *Rhodnius* larvae. *Journal of Experimental Biology* **62**, 69-80.
- Reynolds, S. E.** (1975b). The mechanism of plasticization of the abdominal cuticle in *Rhodnius*. *Journal of Experimental Biology* **62**, 81-98.

- Richards, A. G.** (1967). Sclerotization and the localization of brown and black colors in insects. *Zool. Jahrb. Abt. Anat. Ontogenie Tiere* **84**, 25-62.
- Ruoff, R. S. und Lorents, D. C.** (1995). Mechanical and thermal properties of carbon nanotubes. *Carbon* **33**, 925-930.
- Schmitz, A., Gebhardt, M. und Schmitz, H.** (2008). Microfluidic photomechanic infrared receptors in a pyrophilous flat bug. *Naturwissenschaften* **95**, 455-460.
- Schmitz, A., Sehrbrock, A. und Schmitz, H.** (2007). The analysis of the mechanosensory origin of the infrared sensilla in *Melanophila acuminata* (Coleoptera; Buprestidae) adduces new insight into the transduction mechanism. *Arthropod Structure & Development* **36**, 291-303.
- Schmitz, H. und Bleckmann, H.** (1998). The photomechanic infrared receptor for the detection of forest fires in the beetle *Melanophila acuminata* (Coleoptera : Buprestidae). *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* **182**, 647-657.
- Schmitz, H., Schmitz, A. und Bleckmann, H.** (2000). A new type of infrared organ in the Australian "fire-beetle" *Merimna atrata* (Coleoptera : Buprestidae). *Naturwissenschaften* **87**, 542-545.
- Schmitz, H., Schmitz, A. und Bleckmann, H.** (2001). Morphology of a thermosensitive multipolar neuron in the infrared organ of *Merimna atrata* (Coleoptera, Buprestidae). *Arthropod Structure & Development* **30**, 99-111.
- Schmitz, H., Schmitz, A., Trenner, S. und Bleckmann, H.** (2002). A new type of insect infrared organ of low thermal mass. *Naturwissenschaften* **89**, 226-229.
- Schmitz, H. und Trenner, S.** (2003). Electrophysiological characterization of the multipolar thermoreceptors in the "fire-beetle" *Merimna atrata* and comparison with the infrared sensilla of *Melanophila acuminata* (both Coleoptera, Buprestidae). *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology* **189**, 715-722.
- Smith, C. W., Herbert, R., Wootton, R. J. und Evans, K. E.** (2000). The hind wing of the desert locust (*Schistocerca gregaria* Forskal) II. Mechanical properties and functioning of the membrane. *Journal of Experimental Biology* **203**, 2933-2943.
- Song, F., Xiao, K. W., Bai, K. und Bai, Y. L.** (2007). Microstructure and nanomechanical properties of the wing membrane of dragonfly. *Materials Science and Engineering a-Structural Materials Properties Microstructure and Processing* **457**, 254-260.
- Sowards, L. A., Schmitz, H., Tomlin, D. W., Naik, R. R. und Stone, M. O.** (2001). Characterization of beetle *Melanophila acuminata* (Coleoptera : Buprestidae) infrared pit organs by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, scanning electron microscope, and Fourier transform-infrared spectroscopy. *Annals of the Entomological Society of America* **94**, 686-694.
- Stäubli, W.** (1960). Nouvelle Matière D'inclusion Hydrosoluble Pour La Cytologie Electronique. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences* **250**, 1137-8.
- Stavenga, D. G., Foletti, S., Palasantzas, G. und Arikawa, K.** (2006). Light on the moth-eye corneal nipple array of butterflies. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**, 661-667.

- Steinbrecht, R. A.** (1984). Chemo-, hygro-, and thermoreceptors. In *Biology of the Integument, 1 Invertebrates*, (ed. A. G. M. a. K. S. R. J. Bereiter-Hahn), pp. 523-553. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Thurm, U.** (1969). General organization of sensory receptors. In *Processing of Optical Data by Organisms and by Machines*. New York: Academic Press.
- Vincent, J. F. V.** (1980). Insect cuticle – a paradigm for natural composites. In *The Mechanical Properties of Biological Materials*, vol. 34 eds. J. F. V. Vincent und J. D. Currey), pp. 183-210.
- Vincent, J. F. V.** (2002). Arthropod cuticle: a natural composite shell system. In *Interfacial Phenomena in Composite Materials Conference*, pp. 1311-1315. Arcachon, France: Elsevier Sci Ltd.
- Vincent, J. F. V. und Hillerton, J. E.** (1979). Tanning Of Insect Cuticle - Critical-Review And A Revised Mechanism. *Journal Of Insect Physiology* **25**, 653-658.
- Vincent, J. F. V. und Wegst, U. G. K.** (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure & Development* **33**, 187-199.
- Vondran, T., Apel, K. H. und Schmitz, H.** (1995). The infrared receptor of *Melanophila acuminata* De Geer (Coleoptera: Buprestidae): Ultrastructural study of a unique insect thermoreceptor and its possible descent from a hair mechanoreceptor. *Tissue & Cell* **27**, 645-658.
- Vukusic, P., Wootton, R. J. und Sambles, J. R.** (2004). Remarkable iridescence in the hindwings of the damselfly *Neurobasis chinensis chinensis* (Linnaeus) (Zygoptera : Calopterygidae). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**, 595-601.
- Weyda, F.** (1982). Adaptation Of Mallory Trichrome Stain To Insect Tissue Epoxy Sections. *Zeitschrift Fur Mikroskopisch-Anatomische Forschung* **96**, 79-80.
- Wootton, R. J.** (1992). Functional Morphology of Insect Wings. *Annual Review of Entomology* **37**, 113-140.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der mehrschichtige Aufbau der Kutikula bei Arthropoden.....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung eines A zeitlichen Belastungsprofils und einer B Kraft-Eindringtiefe-Kurve.....	17
Abb. 3: Schematische Darstellung A der maßstabsgetreuen Geometrie der Berkovichspitze und B der Zusammensetzung der realen Kontaktfläche.....	18
Abb. 4: Schematischer Versuchsaufbau der Nanoindentation.....	20
Abb. 5: Schaltbild des SThM Systems. ....	24
Abb. 6: Kutikulastruktur der Gula von <i>Pachnoda marginata</i> . ....	27
Abb. 7: Kutikulastruktur des IR-Organs von <i>Melanophila</i> . ....	29
Abb. 8: Die Referenzkutikula von <i>Melanophila acuminata</i> am Rand des IR-Organs.....	29
Abb. 9: Die Kutikula von <i>Merimna atrata</i> im Bereich des Infrarotorgans (IR) und im Referenzbereich (Ref). ....	32
Abb. 10: Die Oberfläche des Infrarotorgans von <i>Merimna atrata</i> .....	34
Abb. 11: Aufbau der Kutikula von <i>Acanthocnemus nigricans</i> . ....	37
Abb. 12: Vergrößerter Bereich eines Kanals durch die Kutikula des Infrarotorgans von <i>Acanthocnemus nigricans</i> mit „rod“-Struktur.....	38
Abb. 13: Parallel zur äußeren Oberfläche angeschnittenes Infrarotorgan.....	39
Abb. 14: A Typische Kraft-Eindringtiefe-Kurven für die innere Mesokutikula und die Exokutikula der Schale eines IR-Sensillums von <i>Melanophila</i> (aus Müller et al., 2008).....	41
Abb. 15: Gemittelte Werte der Härte und des Elastizitätsmoduls der gemessenen Kutikulaschichten und der Einbettmedien.....	42
Abb. 16: AFM Topographie der angeschnittenen Proben mehrere Tage nach der Nanoindentation. ....	46
Abb. 17: Vergleich der mechanischen Eigenschaften von Kutikula des IR-Organs (IR) und des Referenzbereichs (Ref) von <i>Melanophila acuminata</i> . ....	47
Abb. 18: Gemittelte Werte der Härte und des Elastizitätsmoduls der gemessenen Kutikulaschichten von <i>Merimna atrata</i> . ....	50
Abb. 19: Eindrücke vom Nanoindenter bei Kutikula von <i>Merimna atrata</i> im A Infrarotorgan und B Referenzbereich. ....	52
Abb. 20: Gemittelte Werte der Härte und des Elastizitätsmoduls der gemessenen Kutikulaschichten von <i>Acanthocnemus nigricans</i> . ....	54
Abb. 21: AFM-Topographie der Probenoberfläche von <i>Acanthocnemus nigricans</i> nach Nanoindentation. ....	56

Abb. 22: Vergleich der mechanischen Eigenschaften des „rods“ bei unterschiedlichen Anschnittrichtungen.....	57
Abb. 23: REM-Aufnahme einer angenäherten SThM-Mess-Spitze nach dem qualitativen Scan eines IR-Sensillums.....	58
Abb. 24: Schema der Auflagefläche der beheizten Drahtschleife (grau) bei Unebenheiten der Probenoberfläche (gelb).....	59
Abb. 25: Wärmeleitfähigkeit des Infrarotorgans und der Referenzkutikula von <i>Melanophila acuminata</i> .....	61
Abb. 26: Wärmeleitfähigkeit des Infrarotorgans und der Referenzkutikula von <i>Merimna atrata</i> .....	63
Abb. 27: Wärmeleitfähigkeit des Infrarotorgans und der Referenzkutikula von <i>Acanthocnemus nigricans</i> .....	64
Abb. 28: Wärmeleitfähigkeit der „rods“ eines <i>Acanthocnemus</i> Sensillums.....	65
Abb. 29: Beispielhafte quantitative Messreihen für A stabile und B instabile Messreihen.....	66
Abb. 30: Ermittelte Wärmeleitfähigkeit für die Kutikula des Infrarotorgans von <i>Melanophila acuminata</i> und <i>Merimna atrata</i> . ....	69
Abb. 31: Postuliertes Prinzip der Wärmeleitung im Infrarotorgan von <i>Merimna</i> und <i>Acanthocnemus</i> .....	81
Abb. 32: Spektrum der Infrarotstrahlung. ....	83
Abb. 33: Struktur und Funktion des <i>Melanophila</i> Infrarotsensillums.....	90
Abb. 34: Wärmeleitungsprinzip im <i>Melanophila</i> IR-Sensillum.....	91
Abb. 35: Die Struktur der Gula von <i>Pachnoda marginata</i> als Kugelgelenksystem.....	95
Abb. 36: Schema des Temporomandibulargelenks, das in Lateralansicht die wahrscheinliche Funktion des Discus articularis zeigt. Aus Hildebrand und Goslow, 2001.....	95

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ergebnisse der ANOVA Analyse bei <i>Melanophila acuminata</i> und <i>Pachnoda marginata</i> . .....	43
Tab. 2: Ergebnisse der ANOVA Analyse bei Vergleich von Kutikula des IR-Organs und Referenzbereichs von <i>Melanophila acuminata</i> . .....	47
Tab. 3: Ergebnisse der ANOVA Analyse von <i>Merimna atrata</i> . .....	51
Tab. 4: Ergebnisse der ANOVA Analyse von <i>Acanthocnemus nigricans</i> . .....	55
Tab. 5: Literaturangaben zur A Härte und zum B Elastizitätsmodul bei hydrierter und dehydrierter Insektenkutikula. ....	74
Tab. 6: Postulierte Wärmeleitfähigkeit der hydrierten Kutikula in Abhängigkeit vom Wassergehalt und der Wärmeleitfähigkeit dehydrierter Kutikula. ....	76