

Institut für Zoologie, Bonn
Abteilung Neurobiologie,
Prof. Dr. Hans-Georg Heinzel

Dissertation

**Vom Verhalten zum fiktiven Fressen:
Anatomie und Elektrophysiologie des muskulären und neuronalen Systems
der Nahrungsaufnahme von Dipteren-Larven
(*Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*)**

von

Andreas Schoofs
aus Kranenburg

September 2009

Zur Erlangung der Doktorwürde (Dr. rer. nat.) an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

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

Erster Gutachter: Prof. Dr. H.-G. Heinzel

Zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. W. Stein

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2010

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2010

Zusammenfassung

Im letzten Jahrzehnt hat die Erforschung der Regulation des Fressverhaltens und die damit verbundene Integration extrinsischer und intrinsischer Informationen in die Verarbeitungsprozesse des zentralen Nervensystems von *Drosophila melanogaster* eine Renaissance erlebt. Im Gegensatz zu den vielfältigen molekularbiologischen Innovationen und Erkenntnissen, die an *Drosophila melanogaster* gewonnen wurden, fehlen grundlegende Verhaltensbeobachtungen, sowie anatomische und elektrophysiologische Daten über das larvale Fressverhalten. In dieser Arbeit wurde versucht auf Basis klassischer neurobiologischer Methoden die vorhandenen Lücken zu füllen, um das larvale Fressverhalten von Dipteren im Speziellen von *Drosophila melanogaster* als ein Modellsystem für die Untersuchung neuronaler Netzwerke zu etablieren.

Es besteht eine weitgehende Übereinstimmung der Anatomie des stomatogastrischen Nervensystems von *Calliphora vicina* und *Drosophila melanogaster*. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Methoden für die anatomischen und elektrophysiologischen Experimente an *Calliphora vicina* entwickelt, um die gewonnenen Daten als Leitfaden für zielgerichtete, analoge Experimente bei *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* zu verwenden.

Bei Verhaltensbeobachtungen unter möglichst natürlichen Bedingungen bestand das rhythmische Fressverhalten von Dipteren-Larven aus Heben und Senken der Mundhaken, Pro- und Retraktion des cephalopharyngealen Skeletts und eine durch einen Saugmechanismus vermittelte Nahrungsaufnahme. Diese charakteristischen Einzelbewegungen werden durch die Mundhakenelevatoren und -depressoren, die akzessorischen Protraktormuskeln A, die cibarialen Dilatormuskeln und die Labialretraktoren ausgeführt. Innerviert werden diese Muskeln vom Antennal-, Maxillar- und akzessorischen Prothorakalnerv. Die motorischen Bahnen in den entsprechenden Nerven konnten elektrophysiologisch durch Läsionsexperimente und 1:1 Korrelationen zwischen den Aktionspotentialen der identifizierbaren neuronalen Einheiten und postsynaptischen Muskelpotentialen nachgewiesen werden. Simultane extrazelluläre Ableitungen des Antennal-, Maxillar- und akzessorischen Prothorakalnervs am isolierten zentralen Nervensystem zeigten ein spontanes motorisches Erregungsmuster, das ein neuronales Intermediat des larvalen

Fressverhaltens von Dipteren repräsentiert und somit als „fiktives Fressen“ aufgefasst werden kann. Das fiktive motorische Muster des Fressverhaltens von *Calliphora vicina* besaß eine hohe Variabilität und es konnten in einer Rhythmusanalyse erste Hinweise auf die Organisation der neuronalen Schaltkreise des Verhaltens erarbeitet werden. Die Phasenanalyse der neuronalen Einheiten zeigte, dass die Erregungsmuster bei *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* weitgehend identisch sind. Verglichen damit unterschied sich das Muster von *Calliphora vicina* in der Phasenlage bestimmter Einheiten. In der anatomischen Untersuchung der pharyngealen Nerven konnten neben den bekannten Projektionen auf die cephalen Sinnesorgane bisher unbekannte Nervenverzweigungen und neuronale Anastomosen zwischen den Nerven beschrieben werden. Retrograde axonale Füllungen zeigten, dass die Somata der Neuronen, deren Axone durch die pharyngealen Nerven verlaufen, im Suboesophagialganglion lokalisiert sind. Die cephalen Sinnesorgane von *Calliphora vicina*, deren sensorische Bahnen durch den Antennal- und Maxillarnerv verlaufen, haben neben der bereits beschriebenen chemosensorischen auch eine mechanorezeptive Funktion, wie elektrophysiologische Experimente belegt haben. *Hugin*-Neurone, die an der Regulation des Fressverhaltens von *Drosophila melanogaster* beteiligt sind, wurden ebenfalls im zentralen Nervensystem von *Calliphora vicina* nachgewiesen. Die Nervenfortsätze einer Gruppe von *hugin*-Neuronen projizieren durch den akzessorischen Prothorakalnerv.

Die Ergebnisse zeigen eine große anatomische und elektrophysiologische Konformität im larvalen Fressverhalten der drei untersuchten Dipteren-Larven und sollen die Basis für eine weiterführende neurobiologisch und -genetisch orientierte Erforschung der neuronalen Netzwerke von Dipteren schaffen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	15
2.1 Versuchstiere	15
2.1.1 Haltung und Zucht	17
2.1.1.1 <i>Calliphora vicina</i>	18
2.1.1.2 <i>Drosophila virilis</i> und <i>Drosophila melanogaster</i>	18
2.2 Präparation	19
2.2.1 Basispräparation	19
2.2.2 Perfusion des Präparats mit physiologischer Ringerlösung	21
2.2.3 Verwendete physiologische Ringerlösungen	23
2.3 Verhalten	24
2.4 Anatomie und Funktionsmorphologie	24
2.4.1 Präparation	24
2.4.2 Färbemethoden	25
2.4.2.1 Kobaltchlorid- und Kobalt-Lysin Füllung	25
2.4.2.2 Silber-Intensivierung der Kobaltchlorid/ Kobalt-Lysin Füllungen	26
2.4.2.3 Coomassie-Brilliant-Blue Färbung	27
2.4.2.4 Protein-Detektion (Antikörperfärbung)	27
2.5 Elektrophysiologie	28
2.5.1 Extrazelluläre Ableittechnik	28
2.5.2 Extrazelluläre Nervenableitung	31
2.5.3 Intrazelluläre Muskelableitungen	33
2.5.4 Elektrische Stimulation	35
2.5.5 Extrazelluläre Dreifachableitung am isolierten zentralen Nervensystem	36

2.5.6	Untersuchung der larvalen Sensorik	38
2.5.6.1	Reizgeber für die Untersuchung des Labial-, Ventral-, Terminal- und Dorsalorgans	38
2.5.6.2	Reizgeber für die Untersuchung der Kropfsensorik	38
2.6	Auswertung und Statistik	39
2.6.1	Auswertung der anatomischen und funktionsmorphologischen Daten	39
2.6.2	Auswertung der elektrophysiologischen Daten	40
3	Ergebnisse	47
3.1	Verhalten	47
3.2	Anatomie und Funktionsmorphologie	50
3.2.1	Anatomie und Funktionsmorphologie der pharyngealen und akzes- sorischen pharyngealen Muskulatur	50
3.2.1.1	Cibariale Dilatormuskulatur	50
3.2.1.2	Mundhakenelevator und Mundhakendepressor	51
3.2.1.3	Labialretraktor	52
3.2.1.4	Dorsaler Protraktormuskel A	52
3.2.2	Anatomie der pharyngealen Nerven	54
3.2.2.1	Antennalnerv	54
3.2.2.2	Maxillarnerv	60
3.2.2.3	Akzessorischer Prothorakalnerv	65
3.2.3	Retrograde axonale Füllung der Nerven von <i>Calliphora vicina</i>	70
3.2.3.1	Antennal- und Frontalnerv	70
3.2.3.2	Maxillarnerv	71
3.2.3.3	Akzessorischer Prothorakalnerv	73
3.2.4	Immunhistologie - <i>hugin</i> -Neurone und deren Projektionen bei <i>Cal- liphora vicina</i>	75
3.3	Elektrophysiologie	77
3.3.1	Efferenzen der Nerven von <i>Calliphora vicina</i>	77
3.3.1.1	Antennalnerv und cibariale Dilatormuskulatur	77
3.3.1.2	Maxillarnerv und Mundhakendepressor, -elevator und La- bialretraktor	80
3.3.1.3	Akzessorischer Prothorakalnerv und dorsaler Protraktor- muskel A	84
3.3.2	Afferenzen der Nerven von <i>Calliphora vicina</i>	90
3.3.2.1	Manipulation des Kropfvolumens	90
3.3.2.2	Mechanische Stimulation des Dorsalorgans	91
3.3.2.3	Mechanische Stimulation des Terminal-, Ventral- und La- bialorgans	91

3.3.2.4	Afferenzen des akzessorischen Prothorakalnervs	91
3.3.3	Efferenzen der Nerven von <i>Drosophila virilis</i>	95
3.3.3.1	Antennalnerv und cibariale Dilatormuskulatur	95
3.3.3.2	Maxillarnerv und Mundhakendepressor, -elevater	96
3.3.3.3	Akzessorischer Prothorakalnerv und dorsaler Protraktormuskel A	99
3.3.4	Efferenzen der Nerven von <i>Drosophila melanogaster</i>	100
3.3.4.1	Antennalnerv und cibariale Dilatormuskulatur	100
3.3.4.2	Maxillarnerv und Mundhakendepressor, -elevater	101
3.3.4.3	Akzessorischer Prothorakalnerv und dorsaler Protraktormuskel A	103
3.4	Fiktives Fressverhalten	106
3.4.1	<i>Calliphora vicina</i>	106
3.4.1.1	Etablierung	106
3.4.1.2	Variabilität	109
3.4.1.3	Rhythmusanalyse	111
3.4.1.4	Interaktion der neuronalen Einheiten	116
3.4.2	<i>Drosophila virilis</i>	117
3.4.2.1	Etablierung	117
3.4.2.2	Phasenanalyse	120
3.4.3	<i>Drosophila melanogaster</i>	122
3.4.3.1	Etablierung	122
3.4.3.2	Phasenanalyse	125
4	Diskussion	127
4.1	Verhalten	129
4.2	Anatomie und Funktionsmorphologie	131
4.2.1	Muskulatur	131
4.2.1.1	Cibariale Dilatormuskulatur	131
4.2.1.2	Mundhakendepressor und -elevater	132
4.2.1.3	Labialretraktor	133
4.2.1.4	Dorsaler Protraktormuskel A	134
4.2.2	Pharyngeale Nerven	135
4.2.2.1	Antennalnerv	135
4.2.2.2	Maxillarnerv	136
4.2.2.3	Akzessorischer Prothorakalnerv	138
4.2.3	Retrograde axonale Füllung der pharyngealen Nerven	140
4.2.4	<i>hugin</i> -Neurone und -Projektionen in <i>Calliphora vicina</i>	141
4.3	Elektrophysiologie	143

4.3.1	Antennalnerv	143
4.3.2	Maxillarnerv	147
4.3.3	Akzessorischer Prothorakalnerv	149
4.4	Fiktives Fressverhalten	153
Anhang		161
Danksagung		171
Abkürzungen		173
Abbildungsverzeichnis		175
Tabellenverzeichnis		179
Literaturverzeichnis		181
Erklärung		199
Lebenslauf		201

1 Einleitung

Allgemein

Die Gesamtheit aller messbaren Interaktionen zwischen einem tierischen Organismus und seiner Umwelt ist Verhalten. In der Neurobiologie basiert die Analyse von Verhalten unter anderem auf der extra- und intrazellulären Messung der Aktivität von Muskeln und Neuronen. Verhalten basiert auf der neuronalen Integration extrinsischer und intrinsischer Informationen von Sinnesorganen zu einem räumlich und zeitlich definierten Erregungsmuster, das sich in der Aktivität von Motorneuronen widerspiegelt und sich durch die Kontraktion der entsprechenden Muskeln in adäquaten Bewegungen manifestiert. Für die Erforschung der neuronalen Grundlagen von Verhalten sind Verhaltensformen, die sich aus stereotypen, sich wiederholenden Bewegungssequenzen zusammensetzen, wie z.B. Schwimmen, Laufen, Atmen und Fressen, aufgrund ihrer Klarheit in der motorischen Ausführung und ihrer Vorhersagbarkeit prädestiniert. Auf neuronaler Ebene wird rhythmisches Verhalten durch Netzwerke von Neuronen erzeugt, die durch ihre intrinsischen Eigenschaften und synaptischen Verbindungen befähigt sind entsprechende motorische Erregungsmuster zu produzieren. Allgemein werden solche oszillierenden neuronalen Netzwerke als „zentrale Mustergeneratoren“ bezeichnet. Sie generieren das „Grundschema“ des motorischen Erregungsmusters, das durch die Integration der Sensorik an die akuten Umwelterfordernisse angepasst wird.

Das Fressverhalten von Dipteren-Larven, insbesondere von *Drosophila melanogaster*, könnte ein neues Modellsystem für die Erforschung neuronaler Netzwerke werden, die repetitives Verhalten generieren. Denn Larven von *Drosophila melanogaster* zeigten in Studien ein begrenztes Verhaltenrepertoire, das aus Fressen (84%), Fortbewegung (12%) und sonstigen Verhaltensformen (4%) besteht [Green et al., 1983]. In der Tatsache, dass sie das zu untersuchende Verhalten praktisch permanent zeigen, unterscheiden sich die Dipteren-Larven von weniger „kooperativen“ Systemen, an denen rhythmisches Verhalten erforscht wird, wie z.B. Laufen bei Stabheuschrecken, bei denen das gewünschte Verhalten durch taktile Reizung des Abdomens induziert werden muss. Ein weiterer elementarer Vorteil ist die numerische Einfachheit des zentralen Nervensystems von *Dro-*

sophila melanogaster [Olsen & Wilson, 2008], das im Gegensatz zu den Gehirnen von Säugetieren nicht aus Milliarden von Neuronen, sondern nur aus ca. 100.000 bis 200.000 Neuronen besteht. Des Weiteren gab es in den letzten Jahren viele technische Innovationen zur genetisch basierten Untersuchung von *Drosophila*-Neuronen, die von Luo et al. [2008] zusammengefasst wurden. Die Vielzahl von genetischen Manipulationsmöglichkeiten für die Erforschung zentralnervöser Verarbeitungsprozesse von *Drosophila* [Wilson et al., 2004], belegen das enorme Potential, dass ein solcher neurobiologischer und -genetischer Untersuchungsansatz bietet.

In der letzten Dekade entwickelte sich ein neu erstarktes Interesse, die molekular- und neurobiologischen Mechanismen und beteiligten Prozesse des Fressverhaltens von Dipteren, insbesondere von *Drosophila melanogaster*, zu erforschen [Lee et al., 2004; Melcher et al., 2007; Melcher & Pankratz, 2005; Meunier et al., 2007; Zinke et al., 1999, 2002]. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen nicht das Verhalten an sich untersucht, sondern vielmehr diente es als „Werkzeug“, um die genetische Varianz der Phänotypen zu bestimmen und Mutationen zu isolieren. Aber für ein vollständiges Verständnis von Verhalten und den beteiligten neuronalen Netzwerken müssen folgende Erfordernisse erfüllt sein:

- das zu untersuchende Verhalten sollte in seinem zyklischen Bewegungsablauf beschrieben sein,
- die Anatomie und Funktionsmorphologie der Muskeln, die das Verhalten ausführen sollte bekannt sein,
- die Anatomie der Nerven, die das motorische System des Verhaltens innervieren, sollte beschrieben sein,
- die Neurone, die an der Erzeugung des Verhaltens mitbeteiligt sind, sollten identifiziert sein,
- das neuronale Intermediat (Ausgänge der Motorneurone), welches das Verhalten produziert, sollte bestimmt sein,
- die zellulären und synaptischen Eigenschaften der netzwerk-bildenden Neurone, die das neuronale Intermediat generieren, sollten entschlüsselt sein,
- die sensorischen und neuromodulatorischen Einflüsse auf das neuronale Intermediat sollten charakterisiert sein.

Das Ziel der Arbeit war es, bei den drei Dipteren-Arten *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*, die entsprechenden Daten so weit möglich durch anatomische und elektrophysiologische Untersuchungen zu liefern.

Verhalten

Das larvale Fressverhalten von Insekten besteht in seinen Grundanlagen aus rhythmischen, stereotypen Bewegungen, die der Nahrungsaufnahme in den Verdauungstrakt dienen. Bei eucephalen Larven mit einer vollständig entwickelten Kopfkapsel erfolgt das Fressen unter Zuhilfenahme der Mundwerkzeuge, vornehmlich der Mandibeln, des Pharynx und des Oesophagus unter Beteiligung der assoziierten Körpersegmente (Larven von *Manduca sexta*: [Miles & Booker, 1994, 1998; Rohrbacher, 1994]). An Larven von *Manduca sexta* wurde die Mikrostruktur des Fressens untersucht, um einen Einblick in die komplexe zentralnervöse Interaktion von extrinsischen und intrinsischen Faktoren bei der Regulation des Fressverhaltens zu gewinnen [Bowdan, 1988, 1995].

Das Fressverhalten der acephalen Larven der Dipteren besteht, wie bei den untersuchten Arten *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*, aus rhythmischer Pro- und Retraktion des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) in Verbindung mit schaufel-ähnlichen Bewegungen der Mundhaken [Bauer & Sokolowski, 1984; Green et al., 1983; Hobson, 1932; Sokolowski, 1982; Sokolowski et al., 1984]. Die Nahrungsaufnahme bei Dipteren-Larven erfolgt wahrscheinlich durch die Aktivität eines cibarialen oder pharyngealen Pumpmechanismus ähnlich wie bei *Manduca sexta* [Miles & Booker, 1998; Sasaki & Asaoka, 2006], wodurch die Nahrung durch den Pharynx befördert wird [Gorczyca et al., 1991]. Bestärkt wird diese Annahme durch die Studie von Hobson [1932], der formulierte, dass Dipteren-Larven nur verflüssigte oder semi-verflüssigte Nahrung aufnehmen. Keine der angeführten Arbeiten enthält eine detaillierte Beschreibung des larvalen Fressverhaltens von Dipteren-Larven. In diesen Studien wurden nur einzelne Bewegungsaspekte des Fressens beschrieben. Auch in aktuelleren Studien wurde das Fressverhalten von *Drosophila melanogaster* nur fragmentarisch erläutert, weil es in Verhaltensessays zur Charakterisierung des genetischen Phänotyps genutzt wurde [Li et al., 2001; Shaver et al., 1998; Tissot et al., 1998; Zinke et al., 1999]. Aber die meisten rhythmischen Verhaltensarten eines Organismus bestehen aus einem sich wiederholenden Zyklus von einzelnen Bewegungskomponenten, die in ihrer räumlichen und zeitlichen Abfolge ein angepasstes Verhalten an die vorhandenen Umweltbedingungen darstellen. Fragwürdig ist, ob, wie bei diesen Untersuchungen vorausgesetzt wurde, eine Einzelbewegung, wie z.B. Protraktion des CPS oder Elevation der Mundhaken repräsentativ für das ganze Verhalten ist. Deshalb ist eine detaillierte Beschreibung der zu untersuchenden Verhaltensweise eine Grundvoraussetzung für die Analyse der anatomischen und neuronalen Grundlagen und war somit ein Ziel dieser Arbeit.

Anatomie der Muskulatur

In der Literatur existiert keine vollständig detaillierte anatomische und funktionsmorphologische Beschreibung der Muskelgruppen, die am larvalen Fressverhalten von Dipteren beteiligt sind. Das Verhalten eines Lebewesens ist das finale Ergebnis der Kontraktion der relevanten Muskelgruppen, die aus einem motorischen Erregungsmuster des zentralen Nervensystems resultiert. Dementsprechend bildet die Anatomie und Funktionsmorphologie der einem Verhalten zugrunde liegenden Muskeln die Grundlage für das Verständnis der neuronalen Erzeugung von Verhalten.

Der Körper von Dipteren-Larven ist in zwölf Segmente unterteilt, die durch Dentikelbänder („denticle belts“) voneinander abgegrenzt sind. Der Körper der Larve besteht aus dem Pseudocephalon mit den cephalen Loben, daran schließen sich die drei Thorakalsegmente (Pro-, Meso- und Metathorax) an, gefolgt von sieben Abdominalsegmenten und einem Analsegment („anal division“) mit den posterioren Spirakeln [Szpila et al., 2008]. Das Pseudocephalon der cyclorrhaphen Larven ist eine Rückbildung der Kopfsegmente, die bei *Drosophila melanogaster* aus labialen, maxillaren, mandibularen, interkalaren, antennalen und labralen Anlagen der Kopfsegmente besteht [Jürgens et al., 1986]. Durch diese acephale Erscheinung unterscheiden sich die Larven der höheren Dipteren von denen mit vollständig entwickeltem Kopf der niederen Insekten.

Dipteren-Larven besitzen kein Exoskelett. Eine muskulöse Körperwand umschließt das Körperlumen, das die inneren Organe trägt und mit inkompressibler Hämolymphe gefüllt ist. Die muskulöse Körperwand und die Hämolymphe fungieren als hydrostatisches Skelett [Berrigan & Lighton, 1993]. Die Muskulatur der Dipteren-Larven kann in drei anatomisch-funktionelle Gruppen unterteilt werden:

- Körperwandmuskulatur; die Ansatzstellen der Muskeln sind cuticulären Ursprungs (drei dimensionale Bewegungen des Körpers),
- akzessorische pharyngeale Muskulatur; die Muskeln besitzen eine Ansatzstelle am CPS und eine an der Cuticula (Relativbewegungen des CPS zum Körper),
- pharyngeale Muskulatur; die Muskeln setzen am CPS an (Bewegungen von CPS-Elementen, Pumpmechanismus).

Die **Körperwandmuskulatur** von *Drosophila*-Larven besteht aus 24 bis 30 Muskeln pro Hemi-Segment, die sich aus einer externen, einer intermediären und einer internen Schicht zusammensetzt. Die Thoraxsegmente, das erste Abdominalsegment und das Analsegment besitzen einen segmentspezifischen muskulären Aufbau, wohingegen das zweite bis siebte Abdominalsegment eine stereotypische Muskelanordnung aufweisen [Bate, 1990; Crossley, 1978; Hooper, 1986]. Bewegungen der Segmente werden durch die Körperwandmuskulatur bewerkstelligt [Siebenaller, 2008]. Diese Bewegungen dienen der

Fortbewegung und damit in Zusammenhang stehenden Bewegungsformen (z.B. „bending“, „turning“, „retreating“, „rearing“ and „burrowing“) [Green et al., 1983; Pino & Godoy-Herrera, 1999].

Acht anatomisch unterschiedliche Muskeln, die zur Gruppe der **akzessorischen pharyngealen Muskulatur** gehören, sind in einer Zeichnung der anterioren Segmente von *Calliphora erythrocephala* vorhanden [Ludwig, 1949]. Eine funktionsmorphologische Beschreibung der akzessorischen pharyngealen Muskulatur konnte in der Literatur nicht gefunden werden. In einer Diplomarbeit sind die funktionsmorphologischen Aspekte der akzessorischen pharyngealen Muskulatur von *Calliphora vicina* untersucht worden [Siebenaller, 2008]. Die Geometrie der muskulären Ansatzstellen am CPS und der Cuticula legen nahe, dass durch diese Muskulatur das CPS während des Fressverhaltens und der Lokomotion relativ zum Körper der Larve bewegt wird.

Die **pharyngeale Muskulatur** von Dipteren-Larven ist in geringem Ausmaß anatomisch charakterisiert worden. Sie besteht aus der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM), Mundhakenelevator (MHE) und -depressor (MHD) und Labialretraktor (LR). Die grundlegende Anatomie und die mögliche Funktion bei der Nahrungsaufnahme der CDM von *Drosophila melanogaster* ist von Gorczyca et al. [1991] im Rahmen einer Untersuchung der Wirkung von cholinergen Agonisten und Antagonisten auf das motorische Programm der pharyngealen Muskulatur am Rande beschrieben worden. In einer schematischen Darstellung von *Calliphora erythrocephala* ist eine Muskelgruppe abgebildet, deren anatomische Merkmale der CDM von *Drosophila melanogaster* entsprechen [Bolwig, 1946; Ludwig, 1949]. In Arbeiten über larvale Lepidopteren werden Dilatormuskeln beschrieben, die eine Ansatzstelle auf der dorsalen Oberfläche des Oesophagus besitzen und wie die CDM von *Drosophila melanogaster* der Nahrungsaufnahme dienen [Miles & Booker, 1998; Sasaki & Asaoka, 2006]. In einer weiteren Zeichnung von *Calliphora erythrocephala* sind die Ansatzstellen von drei weiteren pharyngealen Muskelgruppen am CPS enthalten [Ludwig, 1949]. Diese wurden als ventraler Adduktor, dorsaler Abduktor und als Labialretraktor bezeichnet. Hennig [1973] erwähnt in seiner Abhandlung über Dipteren die Bewegung der Mundhaken, die durch die Kontraktion der ventralen Adduktoren und dorsalen Abduktoren realisiert wird. Aufgrund der fragmentarischen Kenntnisse über die Muskulatur der Dipteren-Larven, die an der Nahrungsaufnahme beteiligt sind, wurden in dieser Arbeit die charakteristischen Muskeln des Fressverhaltens anatomisch und funktionsmorphologisch beschrieben.

Die Bewegungen eines Verhaltens werden durch Kontraktionen der entsprechenden Muskelgruppen erzeugt. Die Aktivität der Muskulatur basiert auf einem motorischen Erregungsmuster, das durch ein neuronales Netzwerk bestehend aus prämotorischen Interneuronen und/oder Motorneuronen produziert wird. Für die Anpassung des Impulsmusters an die entsprechenden Umweltbedingungen werden im zentralen Nervensystem

sensorische Informationen von Sinnesorganen auf unterschiedlichen neuronale Verarbeitungsprozessen in das Muster eingegliedert. Ein derartiges generiertes motorische Muster kann als neuronales Intermediat eines Verhaltens aufgefasst werden, das über die axonalen Verbindungen der Motorneurone zu den Muskeln fortgeleitet wird, wo es durch extrazelluläre Ableitungen registriert werden kann. Deshalb ist die Anatomie der involvierten sensorischen und neuronalen Strukturen ein Grundbaustein für die Analyse von Verhalten auf neuronaler Ebene.

Anatomie der Sensorik

Bei Dipteren-Larven sind vier paarige cephal Sinnesorgane, das **Dorsal-** (DO), das **Terminal-** (TO), das **Ventral-** (VO) und das **Labialorgan** (LO), auf dem Pseudocephalon lokalisiert [Szpila et al., 2008], die vermutlich Verhaltensreaktionen auf Nahrung, Geschmack, Feuchtigkeit, Temperatur, Schwerkraft, Druck und Vibration vermitteln [Singh & Singh, 1984].

Das DO ist eine kuppel-ähnliche Struktur, die von einem basalen Ring umgeben ist und antero-dorsal dem cephalen Lobus des Pseudocephalons aufliegt. Die Kuppel des DO wird von 21 bipolaren Neuronen innerviert (*Musca domestica*: [Chu-Wang & Axtell, 1971], *Drosophila melanogaster*: [Jürgens et al., 1986]) und ist mit Poren-Kanälen ausgestattet (*Drosophila melanogaster*: [Singh & Singh, 1984]. Insgesamt enthält das Dorsalorganglion 35-41 bipolar Neurone und besitzt fünf unterschiedliche Rezeptortypen (*Musca domestica*: [Chu-Wang & Axtell, 1971]). Primär ist das DO das olfaktorische Sinnesorgan der Dipteren-Larven (*Drosophila melanogaster*: [Gerber & Stocker, 2007; Singh & Singh, 1984; Stocker, 1994; Tissot et al., 1997]. In verschiedenen Studien über die larvalen Sinnesorgane wurde aufgrund der anatomischen Merkmale der Rezeptoren des DO vermutet, dass es sekundär gustatorische und mechanorezeptive Funktionen besitzt (*Musca domestica*: [Chu-Wang & Axtell, 1971], *Drosophila melanogaster*: [Gerber & Stocker, 2007; Singh & Singh, 1984; Tissot et al., 1997]).

Das TO ist antero-lateral auf den cephalen Loben positioniert und setzt sich aus einer distalen und einer dorso-lateralen Gruppe von Sensillen, bestehend aus vier bis sechs unterschiedlichen Sensillentypen, zusammen, die auf einem Platten-ähnlichen Sockel liegen (*Musca domestica*: [Chu-Wang & Axtell, 1972a], *Drosophila melanogaster*: [Jürgens et al., 1986; Singh & Singh, 1984; Tissot et al., 1997]). Chu-Wang & Axtell [1972a] und Gerber & Stocker [2007] vermuteten neben der primären gustatorischen Funktion des TO, dass es ein multisensorisches Organ ist. In bisherigen Studien konnte für *Drosophila melanogaster* eine Thermosensitivität des TO nachgewiesen werden [Liu et al., 2003]¹. Die Morphologie einiger Rezeptoren des TO suggerieren eine mechanorezeptive Funktion

1 In einer aktuellen Diplomarbeit konnte die Thermosensitivität des TO von Dipteren-Larven für *Calliphora vomitoria* bestätigt werden [Hückesfeld, 2009].

des TO [Chu-Wang & Axtell, 1972a; Gerber & Stocker, 2007; Singh & Singh, 1984]. Das paarige VO liegt anterior der Mundöffnung und besteht aus vier bis fünf Sensillen, die in einem kleinen und einem großen cuticulären Ring eingelassen sind (*Musca domestica*: [Chu-Wang & Axtell, 1972b], *Drosophila melanogaster*: [Hertweck, 1931; Singh & Singh, 1984]). Das VO scheint primär gustatorische Funktion zu besitzen. Zusätzlich wird eine mechanorezeptive Funktion des VO angenommen (*Musca domestica*: [Chu-Wang & Axtell, 1972b], *Drosophila melanogaster*: [Gerber & Stocker, 2007; Singh & Singh, 1984]). Das paarige LO ist von den larvalen cephalen Sinnesorganen am wenigsten untersucht worden. Es liegt posterior der Mundöffnung lateral auf den labialen Loben [Szpila et al., 2008]. Das LO besteht aus zwei Sensillen, deren sensorische Funktion in bisherigen Untersuchungen nicht bestimmt wurde.

In der Literatur sind kaum Untersuchungen zur Mechanosensorik bei Dipteren durchgeführt worden (adulte *Drosophila melanogaster*: [Corfas & Dudai, 1990]), obwohl die putative mechanosensorische Funktion der cephalen Sinnesorgane aufgrund des enormen Wissens über diese Strukturen ein interessantes Forschungsgebiet darstellen könnte. In dieser Arbeit wurde versucht die Mechanorezeption bei *Calliphora vicina* qualitativ nachzuweisen, um erste Ansatzstellen für eine sensorische Untersuchung von Dipteren-Larven zu schaffen.

Anatomie der Nerven

Das **stomatogastrische Nervensystem** (SNS) von Insekten besteht aus einer Kette von peripheren Ganglien, die mit dem zentralen Nervensystem und dem endokrinen System verbunden sind. Über Nerven, die die Muskulatur des Cibariums, des Pharynx, des Vorderdarms und des Mitteldarms innervieren, reguliert das SNS die Nahrungsaufnahme und den Nahrungstransport durch den Verdauungsapparat [Hartenstein, 1997; Penzlin, 1985]. In anatomischen Studien wurde das SNS in vielen Insektenordnungen untersucht (Caelifera: [Aubele & Klemm, 1977; Burrows, 1996; Ayali et al., 2002], Blattodea: [Willey, 1961; Gundel & Penzlin, 1978, 1980], Lepidoptera: [Bell et al., 1974; Miles & Booker, 1994], Hymenoptera: [Boleli et al., 1998]). Das SNS von Insekten besteht aus dem Frontalganglion (FG), das über die Frontalkonnektive mit dem zentralen Nervensystem verbunden ist. Über den rekurrenten Nerv (RN) ist das FG mit dem Hypocerebralganglion (HCG) verbunden, das über den cardiostomatogastrischen Nerv mit dem endokrinen System, bestehend aus Corpora allata und Corpora cardiaca, verbunden ist. Ausgehend vom HCG projiziert der Proventrikularnerv (PVN) entlang dem Oesophagus nach posterior zum Proventrikularganglion (PVG). Die aufgeführten neuronalen Strukturen bilden die Grundelemente des SNS von Insekten.

Das FG bildet das Zentrum des SNS aller Insekten [Penzlin, 1985]. Für verschiedene Ar-

ten wurde gezeigt, dass im FG die neuronalen Netzwerke für rhythmische Bewegungen des Vorderdarms enthalten sind (*Schistocerca gregaria*: [Ayali et al., 2002; Zilberstein & Ayali, 2002], *Manduca sexta*: [Miles & Booker, 1994, 1998]. Unsere anatomische Studie belegte, dass bei *Calliphora*- und *Drosophila*-Larven keine Somata im FG enthalten sind [Spieß et al., 2008]. Für adulte und larvale *Drosophila melanogaster* konnte nachgewiesen werden, dass die Motorneurone der pharyngealen Muskulatur im zentralen Nervensystem liegen [Rajashekhar & Singh, 1994; Tissot et al., 1998].

Das SNS von Dipteren-Larven wurde in verschiedenen anatomischen Studien thematisiert. Eine frühe anatomische Beschreibung des larvalen SNS von *Calliphora erythrocephala* stammt von Baccolo [1954]. Des Weiteren sind detaillierte entwicklungsbiologische Untersuchungen des SNS von *Drosophila melanogaster* durchgeführt worden [Forjanic et al., 1997; Gonzalez-Gaitan & Jäckle, 2001; Hartenstein et al., 1994; Hartenstein, 1997]. In einer vergleichenden anatomischen Studie unserer Arbeitsgruppe zwischen dem SNS von *Calliphora*- und *Drosophila*-Larven des dritten Larvenstadiums konnte eine starke Übereinstimmung zwischen beiden Systemen aufgezeigt werden [Spieß et al., 2008]. Grundsätzlich stimmen die anatomischen Merkmale des SNS von Dipteren-Larven mit denen der verschiedenen anderen Insektengattungen überein.

Das SNS von adulten Dipteren ist an der Regulation des Fressverhaltens beteiligt. Mechanorezeptoren, die im Verdauungstrakt der Fliegen lokalisiert sind, vermitteln über sensorische Rückkopplungsmechanismen inhibitorische Effekte auf das Fressverhalten [Bowdan & Dethier, 1986; Dethier & Gelperin, 1967; Gelperin, 1966a,b, 1967b, 1971b, 1972]. Für die zentralnervöse Integration von sensorischen Informationen fungierte die Regulation des Fressverhaltens von adulten Dipteren als Modellorganismus [Getting, 1971; Getting & Steinhardt, 1972]. Wohingegen über die Regulation und den Einfluss von mechanosensorischen Informationen auf das larvale Fressverhalten von Dipteren kaum Daten vorhanden sind.

Das **zentrale Nervensystem** der Dipteren-Larven (siehe Abb. 1.1), das im Meso- und Metathorax lokalisiert ist, besteht aus den folgenden drei fusionierten neuronalen Strukturen: dem Ventralganglion, dem Suboesophagialganglion und dem Supraoesophagialganglion [Hertweck, 1931; Ito et al., 1995; Nässel & Cantera, 1985]. Im Ventralganglion konzentrieren sich die fusionierten Ganglien der drei Thorakal- und der acht Abdominalsegmente². Aus dem Ventralganglion entspringen die drei paarigen Thorakal- und acht paarige ventrale Abdominalnerven, die jeweils sensorische und motorische Strukturen des zugehörigen Hemi-Segments innervieren. Zusätzlich münden sieben unpaarige dorsale Abdominalnerven (*Calliphora erythrocephala*: [Nässel & Cantera, 1985]) oder acht paarige dorsale Abdominalnerven, die jeweils von einem v-förmigen abdominalen Neurohaemalorgan ausgehen (*Drosophila melanogaster*: [Hertweck, 1931; Ito et al., 1995]),

² Die acht Abdominalsegmente entsprechen den sieben Abdominalsegmenten und der Analeinheit von Szpila et al. [2008].

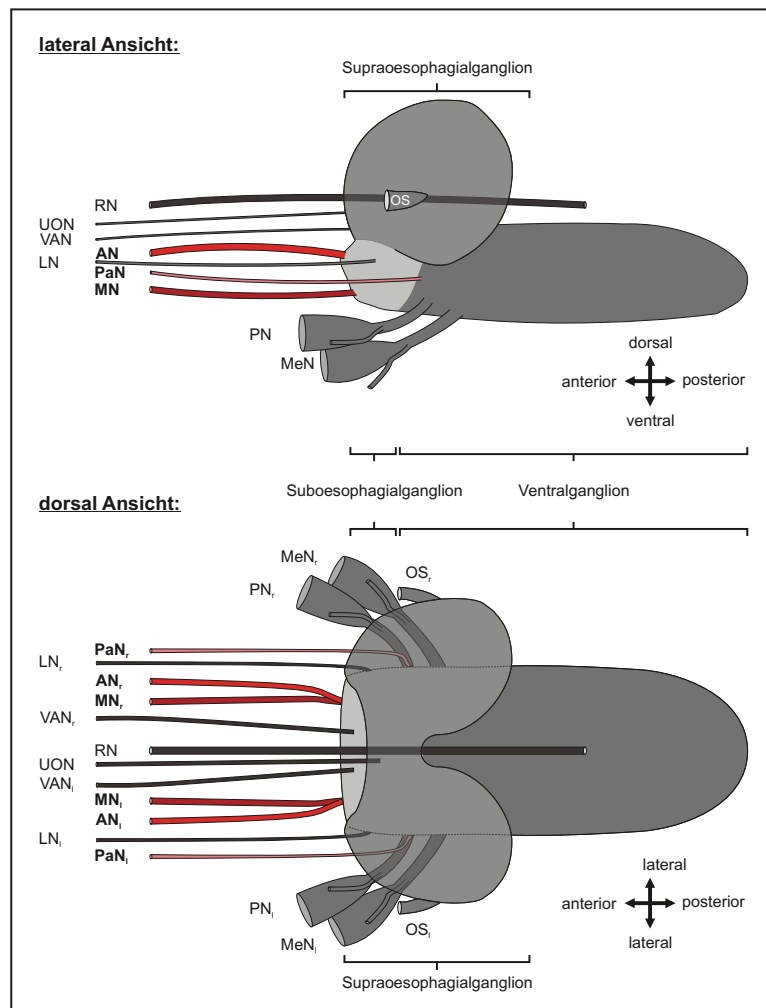


Abb. 1.1: Schematische Zeichnung des zentralen Nervensystems inklusive der pharyngealen und pro-/mesothorakalen Nerven von Dipteren-Larven (dorsal und lateral Ansicht); das zentrale Nervensystem besteht aus dem Ventralganglion, dem Sub- und Supraoesophagialganglion (Kompartimente des zentralen Nervensystem sind in unterschiedlich Grautönen dargestellt), die untersuchten pharyngealen Nerven sind rot eingefärbt, der Metathorakalnerv und die dorsalen und ventralen Abdominalnerven sind nicht eingezeichnet; Abkürzungen: **AN** - Antennalnerv, **LN** - Labialnerv, **MN** -Maxillarnerv, **OS** - Optischer Stiel, **PaN** - Akzessorischer Prothorakalnerv, **RN** - Rekurrenter Nerv, **UON** - Unpaariger Oesophagialnerv, **VAN** - Ventraler Arm Nerv; thorakale Nerven: **MeN** - Mesothorakalnerv, **PN** - Prothorakalnerv.

aus dem Ventralganglion. Anterior des Ventralganglions schließt sich das Suboesophagialganglion an, aus dem die Mehrheit der pharyngealen Nerven, entspringt. Das Supraoesophagialganglion liegt dorsal über den Suboesophagialganglion und besteht aus zwei medial miteinander verschmolzenen supraoesophagialen Loben (Gehirnhemisphären). Das Supraoesophagialganglion ist ventro-lateral mit den Suboesophagialganglion fusioniert und bildet zwischen den verschmolzen Loben ein Foramen, durch das der Oesophagus und der RN verlaufen.

In der Literatur sind Daten über die Anatomie der **pharyngealen Nerven** von Dipteren-Larven nur fragmentarisch vorhanden. Schon frühere Arbeiten beschäftigten sich mit der Anatomie und den Projektionszielen des Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und akzessorischen Prothorakalnervs (PaN). Beispielsweise hat Ludwig [1949] in seiner entwicklungsbiologisch geprägten Arbeit über die anterioren Segmente der Larven von *Calliphora erythrocephala* den AN, MN und PaN beschrieben. Aufgrund der Rückbildung der Kopfsegmente bei cyclorrhaphen Larven und der damit verbundenen Fusion von anatomischen Strukturen repräsentiert aus einem entwicklungsbiologischen Blickwinkel der in dieser Arbeit als AN bezeichnete Nerv vermutlich ein Fusionsprodukt bestehend aus dem Antennal- und Labralnerv, weshalb er teilweise in der Literatur als „antennal-labral nerve“ aufgeführt wurde [Ludwig, 1949]. Nach Ludwig [1949] ist der so genannte MN ein ontogenetisches Fusionsprodukt aus Maxillar-, Mandibular- und Labialnerv. Er bezeichnete ihn als „mandibular-maxillary-labial nerve“. Weil der entwicklungsbiologische Ursprung der pharyngealen Nerven nicht vollständig aufgeklärt ist und die anatomische Untersuchung in dieser Arbeit funktionsmorphologisch orientiert war, wurden die untersuchten pharyngealen Nerven als AN, MN und PaN bezeichnet.

Für *Drosophila melanogaster* sind die sensorischen Bahnen, die die cephalen Sinnesorgane mit dem zentralen Nervensystem verbinden, umfangreich untersucht worden. Es wurde nachgewiesen, dass die sensorischen Bahnen des DO durch den AN projizieren, wohingegen die des TO und VO durch den MN verlaufen [Colomb et al., 2007; Gerber et al., 2004; Gerber & Stocker, 2007; Python & Stocker, 2002a; Stocker, 1994; Tissot et al., 1997; Vossahl & Stocker, 2007]. Des Weiteren konnte etabliert werden, dass die olfaktorischen Bahnen ihre Projektionsziele im Supraoesophagialganglion haben und die gustatorischen Bahnen auf unterschiedliche Zielregionen im Suboesophagialganglion projizieren [Gerber & Stocker, 2007]. Im Gegensatz zu den sensorischen Bahnen sind die motorischen Bahnen der pharyngealen Nerven in einem geringen Ausmaß untersucht worden. In der Literatur sind die Informationen zu den larvalen motorischen Bahnen der CDM kontrovers. Laut Tissot et al. [1998] projizieren die Axone der Motorneurone durch den MN, wohingegen die Axone bei Gorczyca et al. [1991] durch einen unpaarigen Frontalnerv, der das Suboesophagialganglion mit der CDM verbindet, verlaufen. Des Weiteren wurde der AN, MN und PaN in einer immunhistologischen Untersuchung

an Larven von *Calliphora vicina* erwähnt, in der serotonin-positive Projektionen im AN nachgewiesen wurden [Nässel & Cantera, 1985].

Eine vollständige anatomische Beschreibung der pharyngealen Nerven von Dipteren-Larven existiert in der Literatur nicht, weshalb in dieser Arbeit das Projektionsmuster des AN, MN und PaN, die an der Ausführung des Fressverhaltens beteiligt sind, für alle drei Dipteren-Arten eingehend untersucht und dokumentiert wurde. Kenntnisse über die Morphologie der zu untersuchenden Nerven bilden die Voraussetzung für die Planung von sinnvollen elektrophysiologischen Experimenten, denn über die Nerven innervieren die Axone des jeweiligen Neurons ihre entsprechenden Zielstrukturen. Die Kenntnis über die physiologische Natur der Axone, die durch einen Nerv verlaufen, ist unabdingbar für die Korrelation eines motorischen Musters mit einem Verhalten.

Elektrophysiologie

In früheren Zeiten waren die meisten elektrophysiologischen Untersuchungen des motorischen Systems von Insekten auf relativ große Arten beschränkt (Lepidoptera: [Belton, 1969; Deitmer & Rathmeyer, 1976; Deitmer, 1976; Griss, 1990], Diptera: [Hardie, 1976a,b], Blattodea: [Belton & Brown, 1969; Pearson & Iles, 1971; Usherwood, 1962]), obwohl Motorneurone sich durch ihre Größe und distinkte Gestalt im Gegensatz zu prämotorischen Interneuronen für elektrophysiologische Untersuchungen auch bei relativ kleinen Insekten gut eignen würden [Tissot et al., 1998]. Durch sukzessive Verbesserung der Ableitetechniken und -methoden in den letzten Jahrzehnten wurde die elektrophysiologische Erforschung von kleinen Insektenarten weiter vorangetrieben, so dass aktuell in der Forschung das olfaktorische System von *Drosophila melanogaster* auf intrazellulärer Ebene analysiert werden kann [Wilson et al., 2004].

Aufgrund der einfachen elektrophysiologischen Zugänglichkeit und des repetitiven anatomischen Aufbaus der Körperwandmuskulatur der Abdominalsegmente (A2-A7) wurden die neuromuskulären Strukturen intensiv bei unterschiedlichen Dipteren-Arten erforscht (*Calliphora erythrocephala*: [Hardie, 1976a,b], *Drosophila melanogaster*: [Budnik et al., 1990; Cooper & Neckameyer, 1999; Harrison & Cooper, 2003; Jan & Jan, 1976b,a; Johansen et al., 1989; Koh et al., 2000; Rose et al., 2007]). Elektrophysiologische Untersuchungen der pharyngealen und akzessorischen pharyngealen Muskulatur von Dipteren-Larven sind nur marginal vorhanden. Sie beschränken sich auf die neuromuskuläre Untersuchung der CDM von *Drosophila melanogaster* durch Gorczyca et al. [1991]. Deshalb wurde in der elektrophysiologischen Untersuchung versucht die motorischen Bahnen der für das larvale Fressverhalten relevanten Muskeln im AN, MN und PaN zu belegen. Zusätzlich sollten die sensorischen Bahnen der cephalen Sinnesorgane für *Calliphora vicina* elektrophysiologisch nachgewiesen werden.

Fiktives Fressverhalten

Allgemein ist das Fressverhalten von Insekten charakterisiert durch nahezu stereotype, repetitive Bewegungen der Mundwerkzeuge und des Verdauungsapparates, das durch ein integriertes Impulsmuster des zentralen oder visceralen Nervensystems realisiert wird. Fressen, bzw. Nahrungsaufnahme kann aufgrund der zugrunde liegenden sich wiederholenden Bewegungsabläufe als rhythmisches Verhalten klassifiziert werden, das durch einen zentralen Mustergenerator oder neuronalen Oszillator kontrolliert wird [Delcomyn, 1980]. Bei vielen Insekten sind die neuronalen Netzwerke der zentralen Mustergeneratoren des Fressverhaltens, die im deafferentierten Zustand spontane rhythmische motorische Erregungsmuster erzeugen, im Frontalganglion (*Schistocerca gregaria*: [Ayali et al., 2002; Ayali, 2004; Ayali & Zilberstein, 2004; Zilberstein & Ayali, 2002; Zilberstein et al., 2004, 2006], *Manduca sexta*: [Miles & Booker, 1994, 1998]) oder im Suboesophagialganglion (*Locusta migratoria*: [Aubele & Klemm, 1977; Rast & Bräunig, 1997, 2001a], *Manduca sexta*: [Bowdan & Wyse, 2000; Griss et al., 1991; Rohrbacher, 1994]) lokalisiert. Im Gegensatz dazu zeigten verschiedene Untersuchungen an Larven von Dipteren, dass allem Anschein nach die zentralen Mustergeneratoren für die Lokomotion und das Fressverhalten im zentralen Nervensystem liegen [Cattaert & Birman, 2001; Gorczyca et al., 1991; Spieß et al., 2008].

In der Neurobiologie wurde an klassischen Modellorganismen das Fressverhalten und die Bewegungen des Verdauungsapparats ausgehend vom Verhalten über das zugrunde liegende motorische System und neuronale Netzwerk bis zu den intrinsischen Eigenschaften und synaptischen Verbindungen einzelner Neurone der Netzwerke, die das motorische Erregungsmuster produzieren, analysiert (*Lymnaea stagnalis*. [Benjamin et al., 1979; Benjamin & Rose, 1979; Kyriakides & McCrohan, 1988; Rose & Benjamin, 1979; Straub & Benjamin, 2001; Straub et al., 2002], Stomatogastrisches Nervensystem der Crustaceen: [Harris-Warrick et al., 1992; Heinzl, 1988; Marder & Richards, 1999; Meyrand & Moulins, 1986; Selverston & Moulins, 1987; Weimann et al., 1990]). An diesen klassischen Modellorganismen wurden viele der ubiquitären neuronalen Mechanismen der intrinsischen Fähigkeit zur Mustergenerierung von neuronalen Netzwerken entdeckt [Getting, 1989]. Denn obwohl sich die neuronalen Netzwerke bei Vertebraten und Invertebraten im Detail unterscheiden, basiert die intrinsische Fähigkeit eines Netzwerks zur neuronalen Oszillation auf zellulärer Ebene auf den identischen Mechanismen [Nusbaum & Beenhakker, 2002].

Viele Untersuchungen zum Nachweis von zentralen Mustergeneratoren wurden an reduzierten Präparaten oder am isolierten Nervensystem der Versuchstiere durchgeführt, deren spontane rhythmische Erregungsmuster als neuronales Korrelat von Verhalten interpretiert wurden. Derartige spontane motorische Erregungsmuster, die auf die neuronale Aktivität eines zentralen Mustergenerators zurückzuführen sind, werden als „fik-

tives Verhalten“ bezeichnet [Delcomyn, 1980; Marder & Bucher, 2001; Mizutani et al., 2002]. Durch die Nutzung von reduzierten Präparaten, die ein motorisches Muster ähnlich einem Verhalten des intakten Organismus generieren, ist es möglich biophysikalische und molekularbiologische Eigenschaften der Neurone im Kontext eines neuronalen Netzwerkes und die neuronalen Prinzipien, die adaptivem Verhalten zugrunde liegen, zu erforschen [Chiel & Beer, 1997]. Die Basis von adaptivem Verhalten und Flexibilität eines neuronalen Netzwerkes bildet die Modifizierbarkeit der zellulären und synaptischen Eigenschaften der Neurone eines zentralen Mustergenerators und des assoziierten motorischen Systems durch neuronale Integration sensorischer Informationen und biogenen Amininen, Neuropeptiden oder Hormonen [Harris-Warrick, 1988; Kravitz, 1988].

Obwohl, wie schon erwähnt wurde, viele der Grundprinzipien von neuronalen Netzwerken an den etablierten Modellsystemen erforscht wurden, besitzen diese einen gravierenden Nachteil gegenüber dem putativen Modellsystem *Drosophila melanogaster*: Sie sind genetisch schwer oder gar nicht zugänglich. Die Etablierung eines fiktiven motorischen Musters an *Drosophila melanogaster* war eines der Hauptziele dieser Arbeit, um eine neuro- und molekularbiologische Untersuchung von neuronalen Schaltkreisen in der Zukunft zu ermöglichen.

Ein molekularbiologisches Bindeglied der Integration zwischen extrinsischen und/oder intrinsischen sensorischen Informationen und den zellulären und synaptischen Eigenschaften der Nervenzellen im neuronalen Netzwerk des Fressverhaltens von Dipteren könnte *hugin* sein. Das Gen *hugin* codiert ein Prä-Propeptid dessen Spaltprodukt Pyrokinin 2 (PK2) eine myostimulatorische Wirkung bei *Drosophila melanogaster* besitzt [Meng et al., 2002]. Dem anderen Spaltprodukt des Prä-Propeptids, *hugin- γ* , konnte bisher keine physiologische Funktion zugeordnet werden. 20 *hugin*-Neurone sind im Suboesophagialganglion des zentralen Nervensystems lokalisiert. Es konnte an *Drosophila melanogaster* gezeigt werden, dass die neuronalen Projektionen einzelner *hugin*-Neurone und solche, die gustatorische Informationen zentralnervös integrieren, in einer identischen Region des Suboesophagialganglions terminieren [Bader et al., 2007]. Des Weiteren besitzen die *hugin*-Neurone vier unterschiedliche Projektionsziele, die pharyngeale Muskulatur, das Ventralganglion, das Protocerebrum und das neuroendokrine System [Melcher et al., 2007]. Verhaltensuntersuchungen an adulten *Drosophila*-Fliegen zeigten, dass bei einer Blockade der neuronalen Aktivität der *hugin*-Neurone der Schwellenwert für die Nahrungsaufnahme reduziert wird und bei einer Überexpression von *hugin* der Schwellenwert für die Nahrungsaufnahme erhöht wird [Melcher & Pankratz, 2005]. Diese Ergebnisse suggerieren eine eminente modulatorische Funktion von *hugin* beim Fressverhalten von *Drosophila melanogaster*.

Auf Grundlage eines fundierten Wissens über das Fressverhalten von Dipteren in morphologischer und elektrophysiologischer Hinsicht sollte es in zukünftigen neurogeneti-

sehen orientierten Untersuchungen möglich sein, zentralnervöse Verarbeitungsprozesse anhand des Fressverhaltens von Dipteren zu erforschen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde das dritte Larvenstadium (L3-Stadium) von folgenden Dipteren-Arten untersucht, die primär anhand der Größe unterschieden werden können (siehe Abb. 2.1):

- *Calliphora vicina* (mittlere Länge: 16-18mm),
- *Drosophila virilis* (mittlere Länge: 6-7mm),
- *Drosophila melanogaster* (mittlere Länge: 3-4mm).

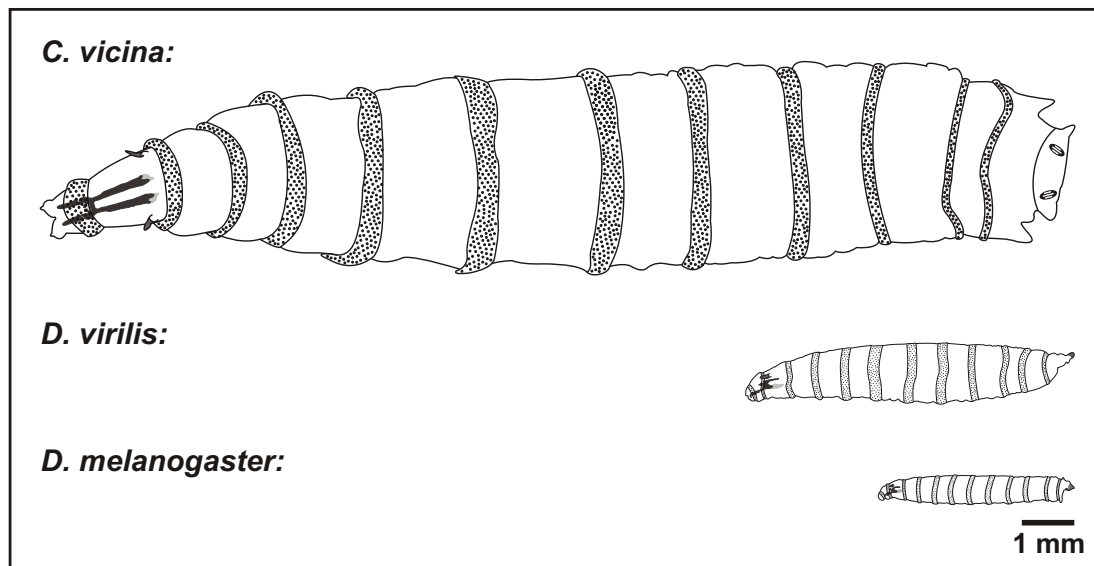


Abb. 2.1: Halbschematische Darstellung der untersuchten Dipteren-Arten: *Calliphora vicina* (obere Darstellung, dorsal Ansicht), *Drosophila virilis* (mittlere Darstellung, lateral Ansicht) und *Drosophila melanogaster* (untere Darstellung, lateral Ansicht).

Die für die anatomischen und elektrophysiologischen Untersuchungen verwendeten Larven aller drei Arten waren in der Fressphase des dritten Entwicklungsstadiums (frühes

bis mittleres L3-Stadium). Das dritte Larvenstadium kann in eine Fress- und eine Wanderphase unterteilt werden [Reiter & Hajek, 1984; Berrigan & Pepin, 1995]. In der Fressphase sind die Larven hauptsächlich mit der Nahrungsaufnahme beschäftigt, um sich ein Nährstoffdepot für die folgende Metamorphose anzufressen. Wohingegen die Larven in der Wanderphase von der Futterquelle emigrieren und einen Ort für die Verpuppung aufsuchen. Mit dem Übergang in die Wanderphase erfolgen gravierende Verhaltensumstrukturierungen, wie z.B. Inhibition der Nahrungsaufnahme [Reiter & Hajek, 1984] und Umkehrung der negativen in eine positive Phototaxis [Sawin et al., 1994]. Ebenso erfolgen verstärkte präpupale, anatomische Prozesse, wie z.B. Ausstülpung des Proventrikels und Wachstum der Imaginalscheiben (eigene Beobachtung). Weil die Auswirkungen resultierend aus den ontogenetischen Umwandlungsprozessen nicht abschätzbar sind, waren „wandernde“ L3-Larven ungeeignet für die neurobiologische Untersuchung des Fressverhaltens.

Die phylogenetische Verwandtschaft von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

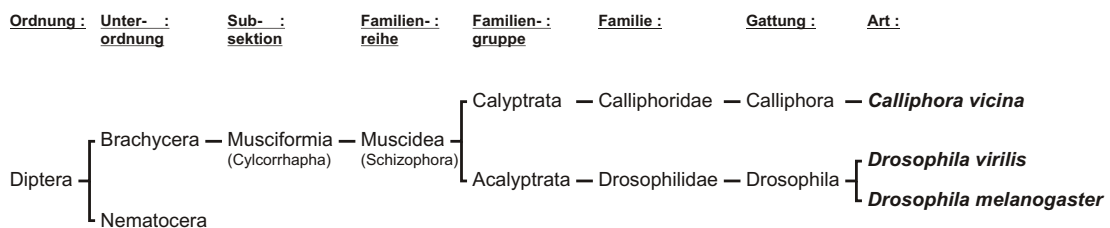


Abb. 2.2: Taxonomie der untersuchten Dipteren-Arten; der phylogenetische Stammbaum von Carl von Linné (1758) wurde bei Reiter & Wollenek [1982] entnommen und modifiziert.

*Calliphora vicina*¹ besitzt ein globales Verbreitungsmuster. Insgesamt umfasst die Gattung *Calliphora* ca. 1000 Arten. Sie wurden erstmals von Brauer und Bergenstamm im Jahre 1889 beschrieben. In Deutschland sind 45 *Calliphora*-Arten bekannt. Das Habitat der Imagines ist die nähere Umgebung von menschlichen Siedlungen, wo ausreichend Nahrung, potentielle Brutplätze und die Möglichkeit zur Fortpflanzung vorhanden sind. Die Eigelege (Geschmeiße), die aus bis zu hundert Eiern bestehen, werden von den weiblichen Imagines primär auf Leichen von Wirbeltieren (Aas, Kadaver) abgelegt, die den geschlüpften Larven aufgrund der nekrophagen Lebensweise als Nahrungsgrundlage für die Entwicklung dient [Hennig, 1973]. Die Nekrophagie der *Calliphora*-Larven hat eine eminente Funktion im ökologischen Stoffkreislauf. In der Forensik sind die Larven der Art *Calliphora vicina* ein wichtiger Parameter bei der Todeszeitpunktbestimmung von Leichen [Higley & Haskell, 2001; Smith, 1986]. Ein besonderes Merkmal der *Calliphoro-*

¹ Die Dipteren-Art *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830) wird in der Literatur teilweise als *Calliphora erythrocephala* (Macquart, 1834) bezeichnet [Reiter, 1984].

ra-Larven ist die exogene bzw. extraintestinale Verdauung, dabei wird die Nahrung mit anal ausgeschütteten Verdauungsenzymen vermischt und danach die angedaute Nahrung aufgenommen [Peters, 1999].

Drosophila virilis und *Drosophila melanogaster* gehören zur Gattung *Drosophila*, die ungefähr 1500 Arten umfasst. *Drosophila melanogaster*, die schwarzbäuchige Tauffliege, wurde erstmals von J. W. Meigen im Jahre 1830 beschrieben. Die Art war ursprünglich in tropischen und subtropischen Regionen beheimatet und hat sich durch den Menschen global verbreitet. Die weiblichen Imagines werden ca. 2,5mm groß, die Männchen sind geringfügig kleiner. Die Weibchen können insgesamt bis zu 400 Eier (Größe: $\approx 0,5\text{mm}$) legen, vorrangig auf verfaulendem, gärendem organischen Material, z.B. Obst. Die Hauptnahrungsquelle der Larven sind Mikroorganismen (Hefen oder Bakterien), die das Obst zersetzen. Sekundär dient das zuckerhaltige Obst als Nahrung. Besondere Bedeutung besitzt *Drosophila melanogaster* im wissenschaftlichen Bereich, weil sie als Modellorganismus der Genetik und Molekularbiologie fungiert. Das Genom von *Drosophila melanogaster*, das vollständig sequenziert wurde, besteht aus vier paarigen Chromosomen (ein paariges Gonosom und drei paarigen Autosomen).

Drosophila virilis wurde erstmals von Sturtevant im Jahre 1916 beschrieben. Sie leben identisch wie *Drosophila melanogaster* und ernähren sich primär von Mikroorganismen und sekundär von gärenden Obst. Allgemein ist über die Lebensweise von *Drosophila virilis* wenig bekannt.

Als Insekten höherer Ordnung durchlaufen alle drei Dipteren-Arten einen holometabolen Entwicklungszyklus. Nach der Eiablage schlüpfen aus den Eiern Larven, die sich wie die meisten cyclorrhaphen Fliegen nach dritte Larvenstadien (L1-L3) verpuppen. Aus dem Puparium schlüpft die Imago. Die Dauer der vollständigen Entwicklung vom Ei zur Imago beträgt bei *Calliphora vicina* ca. 14-21 Tage, wohingegen *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* ca. 9-14 Tage benötigen. Die Ontogenese bei *Calliphora* ist stark von der Umgebungstemperatur abhängig [Reiter & Hajek, 1984].

Die Larven der untersuchten Arten sind acephale Larven. Das allgemeine Segmentierungsmuster der Larven setzt sich zusammen aus einem Pseudocephalon, drei thorakal Segmenten (Pro-, Meso- und Metathorax), sieben abdominalen Segmenten und einem Anal-Segment [Szpila et al., 2008].

2.1.1 Haltung und Zucht

Die verwendeten Larven aller drei Arten wurden in eigener Kultur bei Raumtemperatur (20-25°C) und unter natürlichen Lichtverhältnissen gehalten. Aufgrund der unterschiedlichen Lebensweise zwischen *Calliphora vicina* und den beiden *Drosophila*-Arten wurden die Zuchtbedingungen an die spezifischen Erfordernisse angepasst und werden in den folgenden Abschnitten dargelegt.

2.1.1.1 *Calliphora vicina*

Für den Aufbau der Zucht von *Calliphora vicina* wurde die erste Larvengeneration von einem lokalen Anglerladen² bezogen. Die Larven wurden in Behältnisse überführt, in denen sie sich zu Imagines entwickelten. Weil die erworbenen Larven sich aus mehreren unterschiedlichen Arten zusammensetzten, wurden die adulten Fliegen von *Calliphora vicina* anhand ihrer morphologischen Merkmale aussortiert und als Parentalgeneration für die Zucht verwendet. In regelmäßigen Abständen wurden neue Imagines der Art *Calliphora vicina*, die sich aus Larven vom Anglerladen entwickelt hatten, in die bestehende Zucht eingekreuzt, um einer Degeneration des Genpools vorzubeugen. Die *Calliphora vicina* Imagines wurden in Faunarien (155mm × 85mm × 130mm) mit einer Zuckerlösung (Konzentration: drei Zuckerwürfel auf 100ml Wasser) und einem Gemisch aus Haferflocken und Kaffeeweißer *ad libidum* als Nahrungsquellen überführt. Die männlichen Imagines sind direkt nach der Metamorphose fortpflanzungsfähig [Reiter & Wollenek, 1982], wohingegen die Weibchen zusätzlich Proteine für die Follikelbildung als Nahrungsquelle benötigen [Rachman, 1980] und erst nach 7-14 Tagen geschlechtsreif werden [Reiter & Wollenek, 1982]. Die proteinhaltige Nahrung wurde in Form von Hackfleisch (Gemisch aus Schweine- und Rindfleisch) bereitgestellt, das zusätzlich als Ort für die Eiablage der Weibchen fungierte. Die befruchteten Gelege, bestehend aus 100-200 ovalen weißlichen Eiern, wurden in separate Behältnisse mit Hackfleisch als Nahrungsgrundlage für die schlüpfenden Larven überführt. Die Larven wurden regelmäßig (ca. alle 3-4 Tage) versorgt. Zusätzlich wurde der Zustand, als auch die Entwicklung der Larven kontrolliert. In den Experimente wurden ausschließlich Larven im dritten Larvenstadium und einer Körperlänge von ≥ 16 mm verwendet. Für die Versuche wurden die Larven in Plastikbehältnisse, die mit angefeuchteten Papiertüchern ausgekleidet waren, bei 4°C gehalten. Die restlichen Larven entwickelten sich zu Imagines und bildeten die Parentalgeneration für die nächste Filialgeneration der *Calliphora*-Zucht.

2.1.1.2 *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*

*Drosophila virilis*³ und *Drosophila melanogaster*⁴ wurden in Standardbehältnissen gehalten und mit einem Instant *Drosophila*-Nährmedium (4-24 Instant *Drosophila* Medium; Carolina biological supply) versorgt. Die geschlüpften Imagines wurden alle 14-16 Tage in ein neues Standardbehältnis mit frischem Nährmedium überführt. Alle drei bis vier Tage wurde in den Behältnissen der Zustand der Versuchstiere und der Feuchtigkeitsgehalt des Nährmediums kontrolliert. Für die anatomischen und elektrophysiologischen Versuche wurden *Drosophila*-Larven in der Fressphase des dritten Larvenstadiums ver-

² Angelsport Bonn, Kesselgasse 3, 53111 Bonn

³ Wildtyp; erhalten vom Institut für Neurobiologie (Uwe Rose) der Universität Ulm

⁴ Canton S. Wildtyp; erhalten vom Institut für Entwicklungsbiologie (LIMES) der Universität Bonn

wendet.

2.2 Präparation

2.2.1 Basispräparation

Die in diesem Abschnitt vorgestellte Präparation bildete die Basis für alle Präparationen, die im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführt wurden. In Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Fragestellung wurde die Präparation hinsichtlich der anatomischen oder elektrophysiologischen Erfordernisse abgewandelt. Die Modifikationen der Basispräparation werden in den entsprechenden thematischen Abschnitten erläutert. Grundlegend besteht das sogenannte Basispräparat (siehe Abb. 2.3) der Dipteren-Larve aus dem zentralen Nervensystem, den zu untersuchenden Nerven und dem chepalopharyngealen Skelett (CPS) inklusive der motorischen und sensorischen Innervationsziele der Nerven.

Zu Beginn der Präparation wurden die Larven auf ein Papiertuch überführt und mit physiologischer Ringerlösung gewaschen. Die Präparierschalen waren mit Siliconelastomer (Schichtdicke: 2-3mm, Firma: Wacker Silicones, Elastosil RT 601) ausgegossen, um die Versuchstiere mit feinen Nadeln feststecken zu können. Die Präparation der Larven erfolgte unter physiologischer Ringerlösung (siehe Kap. 2.2.3). Nachdem die Larven in die Präparationsschale überführt worden waren, wurden sie mit einer gekürzten, feinen Akupunkturnadel oder einem spitz-geätzten Wolframpin am Hinterende mit der dorsalen Seite nach oben festgesteckt. Die Nadel wurde medial durch das letzte Abdominalsegment geführt. Als Orientierungshilfe für diesen Schritt dienten die hinteren, rundlich-geformten Stigmenöffnungen, zwischen denen die Nadel mittig platziert wurde. Danach wurde die Larve an den vorderen, fächer-förmigen Stigmenöffnungen mit einer feinen Pinzette festgehalten und in Längsrichtung gestreckt, bevor die Larve anterior mit einer Nadel arretiert werden konnte. Die Nadel wurde zwischen die Mundhaken des CPS durch die Cuticula geführt. Die festgesteckte Larve wurde mit einer Mikroschere entlang der dorso-medialen Körperlängsachse eröffnet. Im Anschluss wurde die Körperwand mit mehreren Wolframnadeln im anterioren (meso- bis metathorakal Segment) und posterioren (viertes bis sechstes Abdominalsegment) Bereich lateral festgesteckt. Danach wurden zuerst die Fettkörper, das Tracheensystem und die Labialdrüsen inklusive des Labialductus entfernt. Des Weiteren wurde der Großteil des Verdauungstraktes ausgehend vom Oesophagus bis zum Enddarm entnommen. Wichtig war es die Ektomie des Verdauungsapparates und der Labialdrüsen möglichst schnell durchzuführen, um die Diffusion von Verdauungsenzymen, vorrangig Proteasen, in die Ringerlösung zu vermeiden, weil diese eventuell die Haltbarkeit des Präparats vermindern könnten. Dann wurde die Körperwand der Larve zwischen dem metathorakalen und ersten Abdominalsegment mit einem

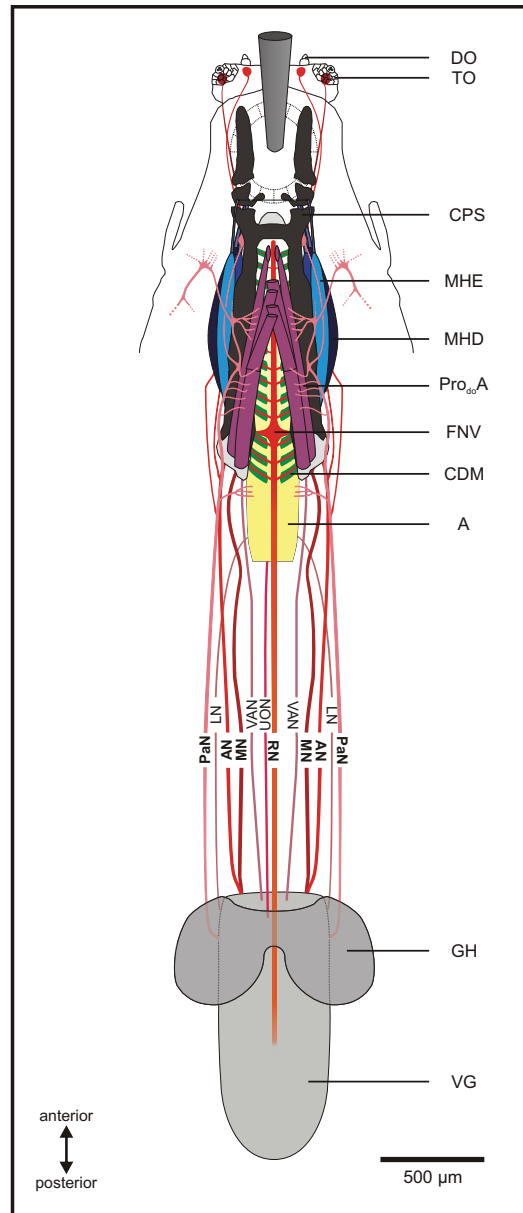


Abb. 2.3: Darstellung der fertigen Basispräparation für die elektrophysiologischen und anatomischen Untersuchungen am Beispiel einer *Calliphora*-Larve; posterior liegt das zentrale Nervensystem mit dem Ventralganglion (VG) und den Gehirnhemisphären (GH); nach anterior projizieren die Nerven [Akzessorischer Prothorakalnerv (PaN), Antennalnerv (AN), Labialnerv (LN), Maxillalnerv (MN), Rekurrenter Nerv (RN), Unpaariger Oesophagialnerv (UON) und Ventraler Arm Nerv (VAN)]; der AN verbindet über die Frontalkonnektive die frontale Nervenverbindung (FNV) mit dem zentralen Nervensystem; diese Nerven innervieren Strukturen des cephalopharyngealen Skeletts (CPS); die Aorta (A) inseriert von posterior in das CPS; mit dem CPS sind funktionell unterschiedliche Muskelgruppen [Cibariale Dilatormuskulatur (CDM), dorsaler Protraktormuskel A (Pro_{do}A), Mundhakenelevator (MHE) und Mundhakendepressor (MHD)] assoziiert; anterior auf den cephalen Loben sind zwei Sinnesorgane [Dorsalorgan (DO) und Terminalorgan (TO)] lokalisiert, die fettgedruckten Nerven wurden anatomisch und elektrophysiologisch untersucht.

Transversalschnitt durchtrennt. Die Cuticula des ersten Abdominalsegments wurde mit einer feinen Pinzette nach posterior geschoben und lateral mit Pins arretiert, um das zentrale Nervensystem sowie die assoziierten Nerven für die weitere Präparation aufzuspannen. Der anteriore Teil der Körperwand wurde bis auf das pseudocephale Segment entfernt. Es war darauf zu achten, dass die ventral verlaufenden Nerven, die einen Teil der Muskulatur des CPS innervieren, nicht durchtrennt oder verletzt wurden. Zu diesem Zweck wurde das CPS leicht angehoben, bevor die Cuticula inklusive der segmentalen Muskulatur entfernt wurde. Im Zuge dieses Präparationsschrittes wurden die paarigen Pro- und Mesothorakalnerven, die vorrangig die Muskeln der pro- und mesothorakalen Segmente innervieren, mit entfernt. Im folgenden Schritt wurden die Nerven, die die Muskulatur des CPS innervieren, freigelegt. Hierzu wurden die Augenantennalscheiben, die dorso-lateral aus den Gehirnhemisphären entspringen und über Bindegewebsstrukturen mit den Antennalnerven (AN) und der Aorta verbunden sind, entfernt. Des Weiteren wurde die Ringdrüse, prä-adultes Fusionsprodukt aus Corpora allata und Corpora cardiaca, inklusive der Aorta entfernt, indem posterior die nervösen Verbindungen und die Tracheen zum zentralen Nervensystem durchtrennt wurden. Anterior wurde der Komplex aus Ringdrüse und Aorta am Übergang in das Cibarium durchtrennt und die gesamte Struktur entfernt. Nach diesem Schritt ist die Basispräparation abgeschlossen.

2.2.2 Perfusion des Präparats mit physiologischer Ringerlösung

In einigen Versuchen wurde das Präparat mit Ringerlösung perfundiert (siehe Abb. 2.4), um die Lebensdauer zu erhöhen. Das Zuflußsystem bestand aus einem Hochbehälter gefüllt mit Ringerlösung, der über ein Schlauchsystem mit der Petri-Schale verbunden war. Das Schlauchsystem war mit einem Durchflussregulator aus dem medizinischen Bedarfssektor ausgestattet, um die Fließgeschwindigkeit einzustellen. Zusätzlich war in das Schlauchsystem ein elektrisch leitendes Kanülenstück eingesetzt worden, über das die Flüssigkeitssäule geerdet wurde. Für die Zuflußvorrichtung in die Petri-Schale wurde eine Ω -förmig gebogene Glasmikropipette verwendet, die am Rand der Petri-Schale festgesteckt werden konnte. Die Zuflussöffnung wurde in die Ringerlösung eingetaucht, um Störungen der extrazellulären Ableitung zu vermeiden. Die Applikation der Ringerlösung erfolgte bei Raumtemperatur (20-25°C) und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1-2ml/s. Das Absaugsystem wurde angetrieben durch eine Pneumatikpumpe (Hersteller: HYFLO), die über den abfließenden Schlauch mit einem Sammelbehälter verbunden war. Als Absaugvorrichtung fungierte eine Kanüle, die auf einen höhenregulierbaren Magnetfuß montiert war. Über die Höhenregulierung konnte der Ringerspiegel in der Petri-Schale während der Versuche eingestellt werden. Zusätzlich wurde über die Pneumatikpumpe die Ringerlösung im Hochbehälter mit Luft durchsprudelt, um einen konstant hohen Sauerstoffgehalt zu gewährleisten.

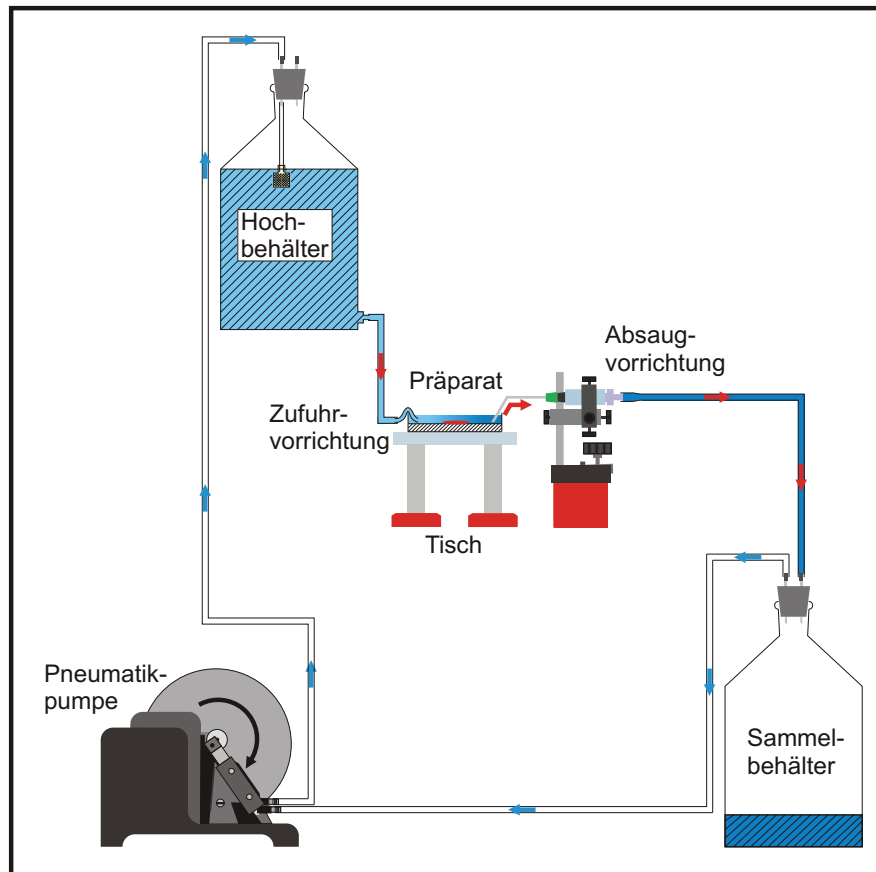


Abb. 2.4: Aufbau der Perfusionsanlage für die electrophysiologischen Untersuchungen (schematische Darstellung); das Präparat wurde über den Hochbehälter mit Ringerlösung überspült. Die Absaugvorrichtung pumpt über eine Pneumatikpumpe die verbrauchte Ringerlösung aus der Petri-Schale und gewährleistet zusätzlich die Sauerstoffversorgung der Ringerlösung. Die roten Pfeile kennzeichnen die Fließrichtung der Perfusionslösung und die blauen Pfeile kennzeichnen die Strömungsrichtung der Luft.

2.2.3 Verwendete physiologische Ringerlösungen

Für die anatomischen und elektrophysiologischen Untersuchungen an *Calliphora vicina* wurde folgende Ringerlösung nach Magazanik & Fedorova [2003] verwendet (Angaben in Klammern hinter den einzelnen Chemikalien beziehen sich auf die Herstellung von 1000ml Ringerlösung):

- 172mM NaCl (10,522g),
- 2,5mM KCl (0,187g),
- 0,5mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ⁵ (0,074g),
- 8mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,626g)
- 0,6mM NaHCO_3 (0,0504g),
- 0,3mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,464g),
- 42mM Saccharose (14,377g),
- ad Aqua bidest. zu 1000ml,
- der pH-Wert sollte mit 1M HCl auf 7,2 bis 7,4 eingestellt werden.

Für *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* wurde der HL3-Ringer nach Stewart et al. [1994] benutzt (Angaben in Klammer hinter den einzelnen Chemikalien beziehen sich auf die Herstellung von 1000ml HL3-Ringerlösung):

- 70mM NaCl (4,091g),
- 5mM KCl (0,373g),
- 1,5mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,221g),
- 20mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4,066g),
- 10mM NaHCO_3 (0,84g),
- 5mM Trehalose (1,712g),
- 115mM Saccharose (39,365g),
- 5mM HEPES (1,192g),
- ad Aqua bidest. zu 1000ml,
- der pH-Wert der Ringerlösung wurde auf 7,2 bis 7,4 eingestellt.

5 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sollte separat in ca. 100ml Aqua bidest. aufgelöst werden und abschließend der Ringerlösung beigelegt werden, um ein Ausflocken zu vermeiden.

2.3 Verhalten

Das Ziel der Verhaltensuntersuchung war es, Einblicke in das Bewegungsmuster des Fressverhaltens von Dipteren-Larven und deren zeitliche Abfolge zu gewinnen. Die Verhaltensbeobachtung erfolgte bei Raumtemperatur (20-25°C) bei abgedunkeltem Licht. Die fressenden L3-Larven wurden in eine Art „Sandwich“-Konstruktion bestehend aus zwei Glasplatten überführt. Der Zwischenraum wurde mit Hackfleisch gefüllt. Das Wegkriechen der Larven wurde durch eine Umrandung aus Knetmasse⁶ verhindert. Die Distanz zwischen den Glasplatten wurde an den Durchmesser der L3-Larven ($\approx 5\text{mm}$) angepasst, um die Bewegungskomponenten des Fressverhaltens optimal zu erfassen. Ein stärkerer Kontrast zwischen der Larve und dem Hackfleisch wurde teilweise durch Einfärben des Hackfleisches mit einem blauen Farbstoff erzielt. Die Verhaltensuntersuchungen beschränkten sich auf L3-Larven von *Calliphora vicina*. Dokumentiert wurde das Verhalten mit einer Digitalkamera (Finepix S9500; Hersteller: Nikon), die auf einem Binokular (Wild M3B, Heerbrugg Switzerland) montiert war. Das Fressverhalten wurde bei 6,4-facher bis 40-facher Vergrößerung aufgezeichnet. Die gewonnenen Daten wurden genutzt, um die Bewegungskomponenten und das zeitliche Aktivitätsmuster der verschiedenen beteiligten Muskelgruppen zu dokumentieren. Zusätzlich wurde das nahezu native Fressverhalten statistisch ausgewertet, indem die Frequenz der Fressbewegung bestimmt wurde. Zur Bestimmung der Rate [Hz] des larvalen Fressverhaltens wurden die Retraktionen des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) pro Minute gemessen (Methode nach Sewell et al. [1974]).

2.4 Anatomie und Funktionsmorphologie

2.4.1 Präparation

In den anatomischen Studien wurde ausgehend vom Basispräparat der Antennal- (AN), der Maxillar- (MN) und der akzessorische Prothorakalnerv (PaN) untersucht und deren motorische, sensorische oder potentiell neurosekretorischen Innervationsziele bestimmt. In allen anatomischen Präparationen wurde die Coomassie-Brilliant-Blue Färbetechnik (siehe Kapitel 2.4.2.3) eingesetzt, um den Kontrast zwischen den feinen neuronalen Strukturen und dem Hintergrund zu erhöhen. Vorrangig wurden die Präparationen an abgetöteten Larven durchgeführt, um Bewegungen zu vermeiden, die sich negativ auf die Qualität der Präparation und die Fotoaufnahmen des Präparats auswirken können. Die Larven wurden getötet, indem sie für ca. 30s in 70°-80°C heißes Wasser eingetaucht wurden (Methode nach Dowding [1968]). Dadurch denaturieren die proteinhaltigen Strukturen, wodurch die Larve über die gesamte Körperlänge gestreckt wird. Zusätzlich erhalten

⁶ erworben beim Puppenkönig, Gangolfstr. 8-10, 53111 Bonn

die Muskeln eine gewisse Festigkeit, ohne die für die Präparation nötige Flexibilität zu verlieren, was sich als vorteilhaft für die anatomische Beschreibung erwies.

Ausgehend vom Basispräparat wurden zuerst die Labialnerven (LN), die ventralen Arm Nerven (VAN) und der unpaarige Oesophagialnerv (UON) entfernt. Diese Nerven waren nicht Gegenstand der anatomischen Untersuchung. In der weiterführenden Präparation des AN, MN und PaN wurden die jeweiligen Projektionsziele freipräpariert. Teilweise wurden die Muskeln, auf die der AN, MN und PaN projizieren, von ihren Ansatzstellen⁷ abgelöst oder Teile des Verdauungstrakts⁸ entfernt, um die feinen Verzweigungen und die Innervationsziele der Nerven erfassen zu können. Im Fall des AN wurde das cephalopharyngeale Skelett (CPS) dorsal eröffnet und die dorsalen Arme lateral mit Nadeln festgesteckt, um den Verlauf des AN im CPS und die Innervation der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) zu dokumentieren. Für die Identifikation der sensorischen Ziele mussten teilweise die Muskelgruppen, die von einem Nerv innerviert werden, entfernt werden. Es war bei der Läsion der Muskeln darauf zu achten, dass die feinen Abzweigungen der Nerven erhalten blieben. Im Fall der anatomischen Untersuchung von *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* wurden die zu untersuchenden Nerven teilweise mit einem feinen Glashaken, der über einen Mikromanipulator bewegt werden konnte, positioniert, um den Nerv in die gewünschte Position zu bringen. Des Weiteren wurden die Nerven für die fotografische Dokumentation mit kurzen Kohlefasern (Durchmesser: $\approx 7\mu\text{m}$) festgesteckt, hierdurch wurden die neuronalen Strukturen nicht durch die größeren Wolframnadeln verdeckt.

Für die anatomische Beschreibung der AN, MN und PaN wurden, wie in diesem Abschnitt erwähnt wurde, Abzweigungen und/oder Innervationsziele der Nerven entfernt, um eine andere Struktur des Nerven detailliert dokumentieren zu können. Die anatomischen Details der einzelnen Präparationen wurden dann zu einem Gesamtbild der Anatomie des Nerven zusammengefügt.

2.4.2 Färbemethoden

2.4.2.1 Kobaltchlorid- und Kobalt-Lysin Füllung

Bei *Calliphora vicina* wurden der Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und der akzessorische Prothorakalnerv (PaN) retro- und anterograd mit 1-2%-iger Kobaltchlorid(CoCl)- oder 2-3%-iger Kobalt-Lysin(CoLy)-Lösung gefüllt. Der Vorteil einer Kobalt-Applikation in Form von komplexierten Kobalt-Lysin ist, dass komplexierte Kobalt-Ionen im Nervengewebe nicht toxisch wirken, wodurch ihr axonaler Transport verbessert wird (Methode

⁷ Beispiel: Für die anatomische Untersuchung des MN wurden die Ansatzstellen des Mundhakendepressors (MHD), des Mundhakenelevators (MHE) und Labialretraktors (LR) vom ventralen Arm des CPS abgetrennt, um die Aufzweigungen des MN auf diese Muskelgruppen dokumentieren zu können.

⁸ Beispiel: Bei der morphologischen Studie am AN wurde der cibariale Teil des Oesophagus entfernt, damit die frontale Nervenverbindung (FNV) eindeutig erfasst werden konnte.

nach Lázár [1978]). Für die Kobalt-Applikation wurde um den gewünschten Nerv ein Vaseline-Töpfchen konstruiert und der Nerv im Töpfchen durchtrennt. Vor Applikation wurde die Ringerlösung im Töpfchen für 10min gegen Aqua bidest. ausgetauscht, damit die Nervenenden aufquellen und die Axone sich öffnen. Dann wurde das Aqua bidest. durch die CoCl/CoLy-Lösung ersetzt und das Töpfchen verschlossen. Die Präparate wurden bei 4°C in Abhängigkeit von der Länge der zu füllenden Nerven für 24-72h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Präparate in eine neue Petri-Schale überführt und in Ringerlösung gewaschen. Die Kobalt-Fällung erfolgte mit einer frisch angesetzten Ammoniumsulfid-Lösung⁹, die maximal für 1-2min den Präparaten zugeführt wurde. Die Fällungsreaktion wurde durch Austausch der Ammoniumsulfid-Lösung gegen Ringerlösung gestoppt. Anschließend wurden die Präparate zwei- bis dreimal mit Ringerlösung gewaschen. Die Präparate wurden in 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur für 1-2h fixiert. Für die mikroskopische Untersuchung wurden sie in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und mit Methylsalicylat aufgeklärt. Im folgenden Schritt wurde unter einem Mikroskop die Qualität der Füllung der Nervenpräparate beurteilt und entschieden, ob die Präparate für die anatomische Untersuchung genutzt werden konnten oder ob zusätzlich eine Optimierung der Füllung durch eine Silber-Intensivierung durchgeführt werden musste.

2.4.2.2 Silber-Intensivierung der Kobaltchlorid/ Kobalt-Lysin Füllungen

Teilweise war eine Silber-Intensivierung (Methode nach Mesce et al. [1993]) der mit CoCl/CoLy-gefüllten Nervenpräparate nötig, um die Füllung durch Kontrastverstärkung zu verbessern. Bevor die gefüllten Nervenpräparate einer Silber-Intensivierung zugeführt werden konnten, mussten diese in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert werden. Des Weiteren musste bei der Silber-Intensivierung auf die Verwendung von metallischen Präparierbesteck und Wolframnadeln zum Feststecken der Nervenpräparate verzichtet werden, weil dies zu unspezifischen Fällungsreaktionen führen kann. Deshalb wurden feine Kaktusstacheln zum Feststecken der Präparate benutzt. Im nächsten Schritt wurden die Nervenpräparate in einer 2%-igen Natrium-Wolframat/1%-igen Triton X-100-Lösung (pH = 10,5) für 20min und einem Gemisch aus Reagenz A und B¹⁰ im Verhältnis 8:1 vorbehandelt. Danach erfolgte die Intensivierung, indem die Präparate in ein Gemisch aus den Reagenzien A, B und C¹⁰ im Mischungsverhältnis 8:1:1 überführt wurden. Die Intensivierung dauerte ungefähr eine bis drei Minuten, wobei der Vorgang unter einem Binokular überwacht wurde, um eine Überintensivierung zu vermeiden. Die Intensivierungsreaktion wurde durch mehrfaches Waschen (min. 3-mal) mit Aqua bidest. abgestoppt. Die Intensivierung wurde als optimal deklariert, wenn die Präparate eine schwach

⁹ 0,01%ige Ammoniumsulfid-Lösung (50µl Ammoniumsulfid auf 5ml Ringerlösung)

¹⁰ Die genaue chemische Zusammensetzung der Reagenzien A, B und C kann dem Durchführungsprotokoll im Anhang entnommen werden.

rot-bräunliche Färbung angenommen hatten. Nach erfolgreicher Intensivierung¹¹ wurden die Nervenpräparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Methylsalicylat aufgeklärt. Die Betrachtung der antero- und retrograden Füllungen von *Calliphora vicina* Larven erfolgte an einem Mikroskop (Zeiss M3B und Leica DMRB/E). Dokumentiert wurden die Nervenfärbungen mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 4500). Teilweise wurden die Helligkeit, der Kontrast oder/und die Schärfe der Fotos mit dem Programm Adobe Photoshop Elements nachbearbeitet.

2.4.2.3 Coomassie-Brilliant-Blue Färbung

Die Präparate aller drei Dipteren-Arten wurden mit 1%-iger Coomassie-Brilliant-Blue Lösung in Calliphora-Ringer (nach Magazanik & Fedorova [2003], für *Calliphora vicina*¹²) oder HL3-Ringer (nach Stewart et al. [1994], für *Drosophila virilis* und *melanogaster*¹³) angefärbt, um den Kontrast zu verbessern. Die Färbelösung wurde oberflächlich auf die Stelle von Interesse appliziert und nach 30 Sekunden mit frischer Ringerlösung ausgewaschen. Coomassie-Brilliant-Blue gehört zur Gruppe der Triphenylfarbstoffe, das unspezifisch Proteine anfärbt, indem es sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert.

2.4.2.4 Protein-Detektion (Antikörperfärbung)

Für die Detektion des Neuropeptids *hugin* wurde eine immunhistologische Methode, Antikörperfärbung, angewendet. Die Larven von *Calliphora vicina* wurden, wie im Kapitel 2.2.1 beschrieben, präpariert. Zuerst mussten die Präparate in 0,5 PBT¹⁴ + 4%-igen Formaldehyd für 1-2 Stunden fixiert werden. Nach mehreren Waschschritten mit 0,5 PBT (2-mal 5min, 2-mal 15min, 2-mal 30min) wurden die Präparate in Methanol (Methanolreihe: 30%, 70% und 100%, für jeweils 5min) überführt. Die Präparate wurden über Nacht in Methanol bei -20°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Präparate in 0,5 PBT (Methanolreihe: 100%, 70% und 30%, jeweils 5min) zurück überführt und gründlich in 0,5 PBT gewaschen (2-mal 5min, 2-mal 15min, 2-mal 30min, 1-mal 60min). Nach einem Blockierungsschritt in 0,5 PBT + 5%-igen Ziegen Serum (30-60min) wurden die Präparate über Nacht bei 4°C mit zwei Primärantikörpern (α -hug-rb und α -22c10-m) in 0,5 PBT + 5%-igen Ziegen Serum inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Präparate gewaschen (2-mal 5min, 2-mal 15min, 2-mal

11 Bei einer Überintensivierung könnten die Präparate durch Überführen in eine 1%-ige Essigsäure-Lösung nach Stoppen der Intensivierungsreaktion reintensiviert werden.

12 Für die chemikalische Zusammensetzung der physiologischen Ringerlösung (Calliphora-Ringer) siehe Kapitel 2.2.3.

13 Für die chemikalische Zusammensetzung der physiologischen Ringerlösung (HL3-Ringer) siehe Kapitel 2.2.3.

14 PBT - Phosphat-gepufferte Salzlösung mit TritonX100

30min, 1-mal 60min) und anschließend mit 0,1 PBT + 5%-igen Ziegenserum blockiert. Dann erfolgte die Inkubation mit den Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörpern (α -rb-Alexa488 und α -m-Cy3) in 0,5 PBT + 5%-igen Ziegenserum bei Raumtemperatur (60-90min). Abschließend wurden die Präparate in 0,1 PBT gewaschen (2-mal 5min, 2-mal 15min, 2-mal 30min) und in Mowiol eingedeckelt. Die Fotografien der Präparate wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (Zeiss LSM 700) erstellt.

2.5 Elektrophysiologie

Basierend auf den Resultaten der anatomischen Untersuchung verfolgten, die elektrophysiologischen Experimente das Ziel die motorischen Bahnen des Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN), die durch die Nerven projizieren, zu identifizieren. Die Kenntnisse über die motorischen Bahnen sollten weiterführend für die Analyse der spontanen neuronalen Rhythmen im AN, MN und PaN genutzt werden, die vermutlich aus der Aktivität von Mustergeneratoren im zentralen Nervensystem resultieren. Abschließend sollte das Wissen über die motorischen Bahnen und deren neuronale Rhythmen von *Calliphora vicina* auf *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* übertragen werden. Zusätzlich wurden bei *Calliphora vicina* die sensorischen Bahnen, die durch den AN, MN (und PaN) verlaufen, anhand elektrophysiologischer Experimente nachgewiesen.

2.5.1 Extrazelluläre Ableittechnik

Die elektrophysiologische Untersuchung der neuronalen Aktivität von Dipteren-Larven stellt neben der präparativen auch eine technische Herausforderung dar. Die Schwierigkeiten bei der Etablierung einer nutzbaren extrazellulären Ableittechnik resultieren aus dem geringen Durchmesser der axonalen Leitungsbahnen und dem Signal/Rausch-Verhältnis der zu detektierenden elektrischen Signale. Im Verlauf meiner Diplomarbeit [Schoofs, 2005] wurden bereits verschiedene extrazelluläre Ableittechniken in Hinsicht auf ihre Anwendbarkeit und Effektivität bei *Calliphora vicina* getestet. Dieses wurde im Rahmen der Doktorarbeit auf *Drosophila virilis* und *melanogaster* ausgeweitet und weiter optimiert. In der Diplomarbeit wurden folgende extrazelluläre Ableittechniken und Elektrodenmaterialien getestet:

- Töpfchenableitung, Ableitung mit einer „Grease“-Elektrode (bzw. Hakenelektrode) und Saugelektrode,
- Silber (bzw. Silber/Silberchlorid), Stahl, Wolfram und Gold.

Von den getesteten Ableittechniken erwies sich die Töpfchenableitung als die am besten geeignete, weil sie einfach zu realisieren und effektiv in der Anwendung war. Aus

diesen Gründen wurde in der Promotionsarbeit die Töpfchenableitung als primäre extrazelluläre Ableittechnik eingesetzt. Des Weiteren wurden in der Diplomarbeit unterschiedliche Elektrodenmaterialien für die extrazellulären Ableitungen getestet. In dieser Testreihe zeigte unter damaligen Gesichtspunkten die Silber/Silberchlorid-Elektrode die besten Eigenschaften, weil sie das beste Signal/Rausch-Verhältnis und gute Praxistauglichkeit besaß. Allerdings ergaben Vorversuche, dass die Silber/Silberchlorid-Elektroden für die extrazellulären Ableitungen an L3-Larven von *Drosophila virilis* und *melanogaster* aufgrund des unzureichenden Signal/Rausch-Verhältnisses ungeeignet waren. Deshalb wurden weitere Tests mit unterschiedlichen Elektrodenmaterialien durchgeführt. Folgende Materialien wurden auf ihre Eignung als Elektroden für die extrazelluläre Ableitungen an den L3-Larven von *Drosophila* getestet:

- Kohlenstoff (Carbonelektrode),
- Gold/Palladium, Gold (Sputter-Elektroden),
- Iridiumoxid (Sputter-Elektroden).

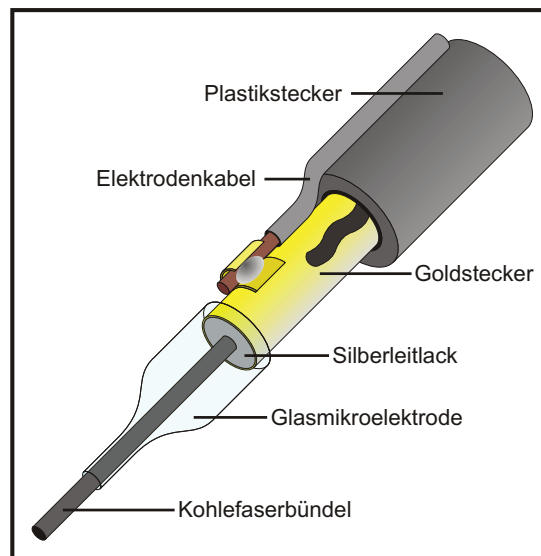


Abb. 2.5: Aufbau einer handgefertigten Carbonelektrode (schematische Darstellung); die Elektrode bestand aus einem Plastikstecker, in den ein Goldstecker eingelassen war; über Silberleitlack wurden die Kohlefasern mit dem Goldstecker leitend verbunden, an den das Elektrodenkabel festgelötet war; die Kohlefasern wurden mit einer Glasmikroelektrode stabilisiert.

Carbonelektrode (siehe Abb. 2.5):

Die Carbonelektroden wurde testweise aus Bleistiftminen und schließlich aus Kohlefasern (Durchmesser: $7\mu\text{m}$) gefertigt. Der Elektrodenhalter bestand aus einem Plastikstab mit einer Bohrung am vorderen Ende. In die Öffnung war ein Goldstecker eingelassen,

an dem das Kabel für die differente Elektrode festgelötet wurde. Ein Bündel aus drei bis fünf Kohlefasern wurde mit Silberleitlack mit dem Goldstecker verbunden. Um das Kohlefaserbündel mechanisch zu stabilisieren und zu schützen, wurde eine Glasmikroelektrode, deren Öffnung an den Gesamtdurchmesser des Kohlefaserbündels angepasst wurde, über die Kohlefasern gezogen und mit Zwei-Komponenten-Kleber am Goldstecker fixiert. Abschließend wurden die Kohlefasern auf die gewünschte Länge gekürzt.

Für extrazelluläre Ableitungen waren die Carbonelektroden ungeeignet, weil die mechanische Instabilität der Kohlefasern die Handhabung erschwerte und das Signal/Rausch-Verhältnis schlechter war als bei den Silber/Silberchloridelektroden.

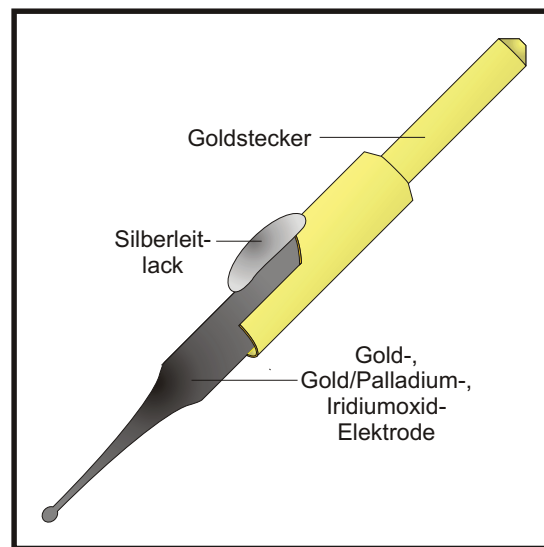


Abb. 2.6: Aufbau einer Sputter-Elektrode (halbschematische Darstellung); mit Epoxydharz wurde an einen Goldstecker eine zugeschmolzene, besputterte Glasmikroelektrode befestigt; die Leitfähigkeit zwischen Elektrode und Goldstecker wurde mit Silberleitlack sichergestellt.

Sputterelektrode (siehe Abb. 2.6):

Für die Herstellung der Gold-, Gold/Palladium- und Iridiumoxidelektroden¹⁵ wurden ausgezogene Glasmikroelektroden verwendet, deren Spitzen kugelförmig zugeschmolzen wurden, um durch die Oberflächenvergrößerung eine höhere Leitfähigkeit der Elektrode zu erzielen. Die zugeschmolzenen Glasmikroelektroden wurden mit einem Glasschneider gekürzt und mit Epoxydharz an einem Goldstecker festgeklebt. Auf diese Elektroden-„Rohlinge“ wurde eine Nanometer-dicke, leitfähige Metallschicht aus den erwähnten Metallen oder dem Metalloxid mittels eines Kathodenzerstäubers (Sputter Coater, Balzers Union SCD 040) aufgetragen.

Beim „Sputtern“ wird ein Prozessgas, vorzugsweise Argon, ionisiert. Die ionisierten positiven Argonatome werden durch das elektrische Feld auf das sogenannte Target, be-

¹⁵ Die Iridiumoxidelektroden wurden in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. André van Ooyen vom Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik (RWTH Aachen) konzipiert und hergestellt.

stehend aus einem Metall oder Metalloxid, beschleunigt und schlagen aus dem Target Atome heraus, die auf allen Oberflächen im Reaktionsraum kondensieren. Durch diese physikalische Verfahren wurden die Elektroden-“Rohlinge“ mit einer 3-20nm dicken Metallschicht überzogen. Die beschichteten Elektroden wurden am Übergang zwischen Glasmikroelektrode und Goldstecker mit Silberleitlack behandelt, um die Leitfähigkeit zwischen den beiden Bestandteilen der Elektrode zu verbessern.

Die hergestellten Elektroden zeigten in Tests ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis als Silber/Silberchlorid-Elektroden und wurden deshalb in den elektrophysiologischen Versuchen an L3-Larven von *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* verwendet.

2.5.2 Extrazelluläre Nervenleitung

Die extrazellulären Ableitungen (siehe Abb. 2.7) wurden am Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und am akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) aller drei Larven-Arten durchgeführt. Alle Nervenleitungen wurden am Basispräparat (siehe Kapitel 2.2.1) mittels einer Töpfchen-Ableitung bei den verschiedenen Arten durchgeführt. Dafür wurde unter die abzuleitenden Nerven, die zwischen dem cephalopharyngealem Skelett (CPS) und dem zentralen Nervensystem aufgespannt waren, ein Parafilmstreifen¹⁶ platziert. Der Parafilmstreifen wurde für das weitere Vorgehen mit zwei Wolframnadeln seitlich festgesteckt. Auf dem Parafilmstreifen wurde mit einer ausgezogenen Spritze ein Vaseline-Töpfchen um den abzuleitenden Nerv hochgezogen. Die restlichen Nerven wurden mit spitz-geätzten Wolframnadeln weggespannt oder entfernt. Nachdem das Töpfchen fertig gestellt worden war, wurde der Ringerspiegel in der Petri-Schale bis unter den Rand des Töpfchens abgesenkt. Die differente Elektrode, die über einen selbstgebauten Elektrodenhalter an einem Mikromanipulator befestigt war, wurde in das Töpfchen abgesenkt. Die indifferente Elektrode und eine zusätzliche Abschirmung, die auf einen höhenregulierbaren Magnetfuß montiert war, wurden in die Ringerlösung in der Petri-Schale eingetaucht. Die zusätzliche Abschirmung sollte potentielle elektrische Störungen in der Ableitung minimieren. Die Potentialdifferenzen an einem Axon resultierend aus einem fortgeleiteten Aktionspotential wurden zwischen dem Nerv im Töpfchen (Ort der differentiellen Elektrode) und der umgebenden Ringerlösung in der Petri-Schale (Ort der indifferenten Elektrode) über den Nerv (elektrischer Leiter) gemessen. Die detektierten Potentialdifferenzen wurden durch einen Differentialverstärker¹⁷ (Eigenbau in Zusammenarbeit mit M. Hofmann, Verstärkungsfaktor: 100), der mit einer Amplifikations-/Filter-Einheit (Verstärkungsfaktor: 50) gekoppelt wurde, verstärkt (gesamter Verstärkungsfaktor: 5000)

¹⁶ Für die Ableitungen an *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* wurde der Parafilmstreifen vor dem Versuch auf einem Objektträger ausplattiert, um die Dicke des Parafilms an die Erfordernisse des Präparats anzupassen.

¹⁷ Der Schaltplan des Differentialverstärkers kann aus der Diplomarbeit von Schoofs [2005] entnommen werden.

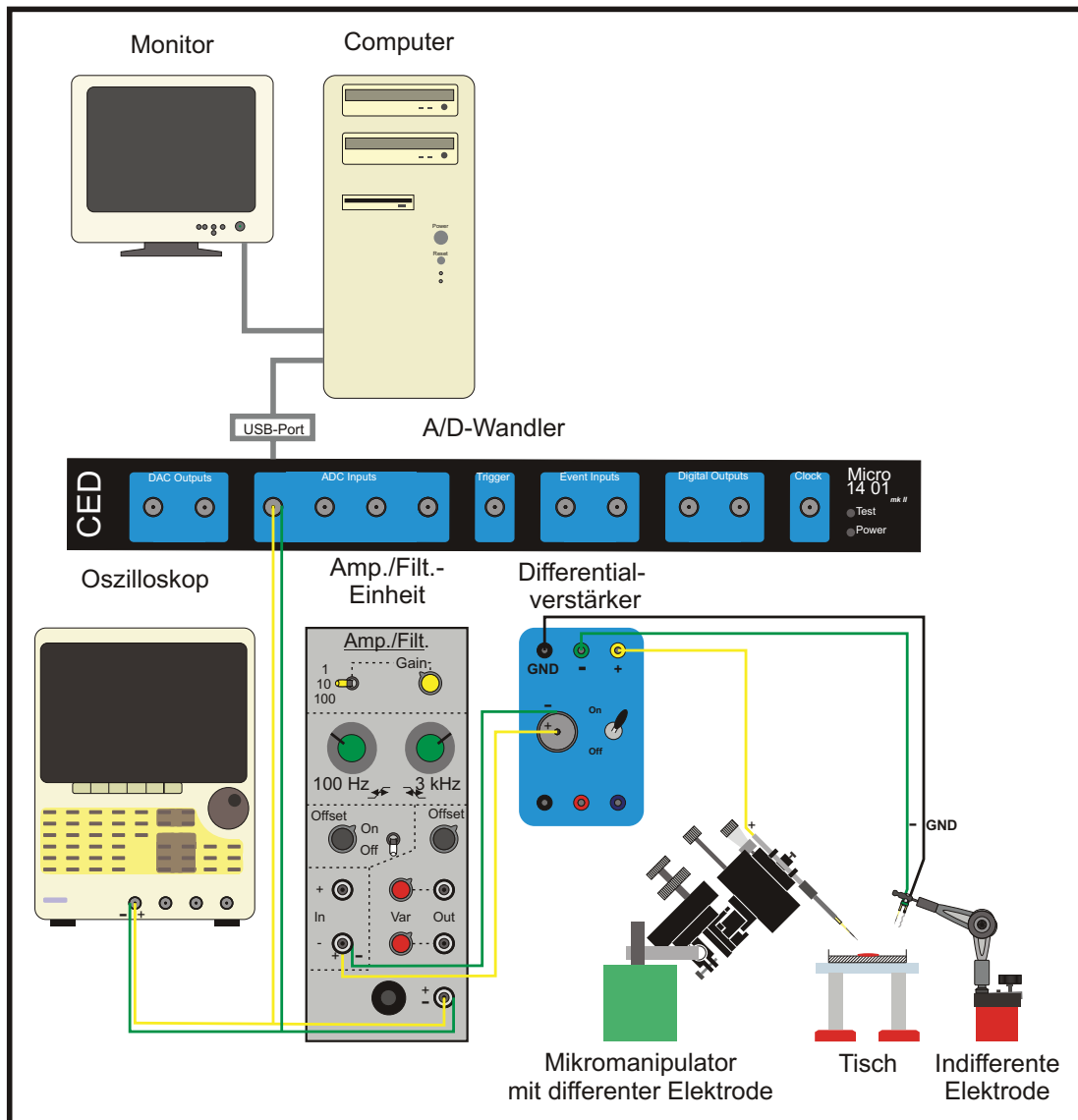


Abb. 2.7: Versuchsaufbau für die extrazellulären Nervenableitungen (schematische Darstellung); die Aktionspotentiale, die mit der Elektrode gemessen wurden, wurden über einen Differentialverstärker vorverstärkt (Verstärkungsfaktor: 100) und mit einer Amplifikations-/Filtereinheit gefiltert und endverstärkt (Filtereinstellung: Tiefpass: 100Hz, Hochpass: 3kHz; Verstärkungsfaktor: 50); mit einem Analog/Digital-Wandler wurde das biologische Signal digitalisiert und über ein USB-Kabel an einen Computer weitergeleitet, auf dem die Daten mit Spike2 aufgezeichnet wurden; ergänzend wurde das biologische Signal auf dem Oszilloskop zur Kontrolle dargestellt; gelbe Leitungswege gehören zur differentiellen Elektrode, grün kennzeichnet den Leitungsweg der indifferenten Elektrode und die schwarzen Leitungswege entsprechen der Abschirmung.

und gefiltert (Tiefpass: 3Hz, Hochpass: 3kHz). Das resultierende Signal wurde über einen 4-Kanal Analog/Digital-Wandler (micro 1401_{mkII}, Hersteller: Cambridge Electronic Design) digitalisiert und mit dem Programm Spike2 auf einem Computer dargestellt und aufgezeichnet. Ein Oszilloskop war ergänzend in den Versuchsaufbau integriert, um das analoge Signal kontrollieren zu können. Teilweise wurden extrazelluläre Doppelableitungen durchgeführt, um Informationen über die Fortleitungsrichtung, den axonalen Verlauf der neuronalen Einheiten oder das Aktivitätsmuster im ipsi- und contralateralen Nerven zu gewinnen.

Die extrazellulären Ableitungen wurden für die Analyse der sensorischen und motorischen Impulse in den verschiedenen Nerven verwendet, dabei wurde die Ableittechnik der experimentellen Fragestellung angepasst.

Elektrophysiologische Untersuchung der Sensorik:

Für die Untersuchung der sensorischen Systeme der Larve wurde versucht den Ableitort möglichst in unmittelbarer Nähe des Sinnesorgans zu platzieren. Dazu war es erforderlich die Nervenabzweigung des entsprechenden Nerves bis zum Sinnesorgan freizupräparieren. Teilweise wurde der abgeleitete Nerv posterior zum Ableitort durchtrennt, um potentiell störende Efferenzen in der Ableitung an einem Sinnesorgan zu vermeiden.

Elektrophysiologische Untersuchung der Motorik:

Für die Untersuchung der motorischen Systeme wurden die Ableitungen möglichst nah am zentralen Nervensystem positioniert. Falls erforderlich wurden störende Afferenzen in den Ableitungen durch Läsion von Nervenabzweigungen eliminiert oder der abzuleitende Nerv wurde deafferentiert.

2.5.3 Intrazelluläre Muskelableitungen

Intrazelluläre Muskelableitungen (siehe Abb. 2.8) wurden bei allen drei Arten am Basispräparat durchgeführt. Dazu wurde das Basispräparat modifiziert, indem das cephalopharyngeale Skelett (CPS) so ausgerichtet wurde, dass der abzuleitende Muskel optimal mit der Elektrode erreicht und penetriert werden konnte.

Cibariale Dilatormuskulatur (CDM):

Im Fall der CDM musste das CPS dorsal geöffnet werden, da die Muskeln im CPS lokalisiert sind. Dazu wurde mit einem spitz-geätzten Wolframdraht zuerst die Bindegewebshaut zwischen den dorsalen Armen des CPS durchtrennt und das CPS über die zur Seite geklappten dorsalen Arme mit zwei feinen Wolframpins aufgespannt. Der Innenraum des CPS wurde von Bindegewebsresten gereinigt. So war die CDM für intrazelluläre Ableitungen zugänglich.

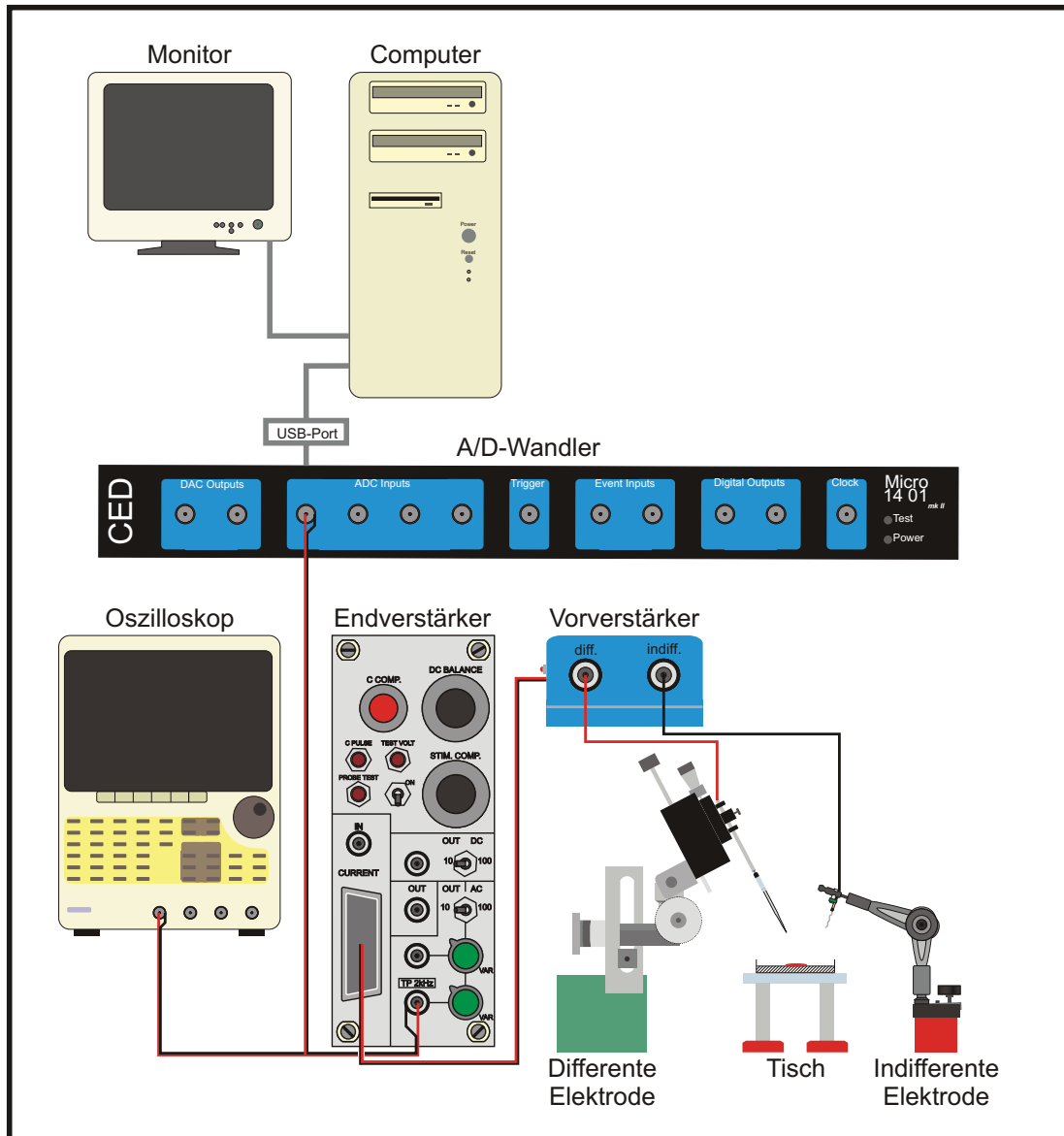


Abb. 2.8: Versuchsaufbau für die intrazellulären Muskelableitungen (schematische Darstellung); die untersuchten Muskeln wurden mit Glasmikroelektroden ($20\text{-}30\text{M}\Omega$) penetriert; die postsynaptischen Potentiale wurden mit einem Intrazellulärverstärker, bestehend aus einem Vor- und Endverstärker, verstärkt (Verstärkungsfaktor: 10); das analoge, biologische Signal wurde durch einen Analog/Digital-Wandler digitalisiert und über ein USB-Kabel an einen Computer weitergeleitet, wo die Daten mit dem Software-Programm Spike2 aufgezeichnet und ausgewertet wurden; ergänzend wird das biologische Signal über ein Oszilloskop zur Kontrolle analog dargestellt; die roten Kabel entsprechen dem Leitungsweg der differentiellen Elektrode und die schwarzen Kabel dem Leitungsweg der indifferenten Elektrode.

Mundhakendepressor (MHD) und -elevator (MHE):

Für Ableitungen am MHD oder MHE wurde das CPS von dorsal auf lateral gedreht und mit Wolframnadeln arretiert, damit die Muskeln des MHD und MHE nach oben zeigten.

Labialretraktor (LR):

Das CPS wurde die auf ventrale Seite gedreht und mit Wolframnadeln arretiert.

Dorsaler Protraktormuskel A ($Pro_{do}A$):

Der $Pro_{do}A$ wurde aufgespannt, indem die Cuticula über eine Wolframnadel zur Seite gespannt wurde. Dadurch wurde die nötige mechanische Spannung auf den $Pro_{do}A$ ausgeübt, um den Muskel mit einer Glasmikroelektroden penetrieren zu können.

Als differente Elektroden für die intrazellulären Muskelableitungen wurden Glasmikroelektroden, befüllt mit 3M Kaliumchlorid-Lösung, verwendet. Der Widerstand der Glasmikroelektroden lag zwischen 20 und 30M Ω . Als Ausgangsmaterial für die Glasmikroelektroden wurde dünnwandiges Borosilikatglass mit Filament (TW 100F-4, Hersteller: World Precision Instruments) verwendet, das mit einem horizontalen Puller (P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Hersteller: Sutter Instruments) ausgezogen wurde. Die indifferente Ag/AgCl-Elektrode war an einem höhenregulierbaren Magnetfuß befestigt und wurde für die intrazellulären Ableitungen in die Ringerlösung abgesenkt. Verstärkt wurden die abgeleiteten postsynaptischen Potentiale mit einem Intrazellulärverstärker (Verstärkungsfaktor: 10, Hersteller: Firma Heinecke), der mit einem 4-Kanal Analog/Digital-Wandler (micro 1401_{mkII}, Hersteller: Cambridge Electronic Design) digital erfasst und über das Programm Spike2 aufgezeichnet wurden.

Für den Nachweis von motorischen Bahnen in einem Nerv wurden simultane extra- und intrazelluläre Doppel- bis Vierfachableitungen durchgeführt. Bei simultanen extra- und intrazellulären Ableitungen des Muskels mit dem entsprechenden Nerv wurden die indifferente Elektroden der extra- und intrazellulären Ableitungen zusammengelegt, um elektrische Störungen zu vermeiden.

2.5.4 Elektrische Stimulation

Die elektrische Stimulation des Antennalnervs (AN) wurde im Rahmen der elektrophysiologischen Untersuchung der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) durchgeführt. Die Larve wurde wie in Kapitel 2.2.1 präpariert und der AN freigelegt. Ein Parafilmstreifen wurde unter den Nerv positioniert und ein Vaseline-Töpfchen mit einer ausgezogenen Spritze um den Nerv hochgezogen. Der physiologische Ringerspiegel wurde bis unter den Rand des Vaseline-Töpfchens abgesenkt, um das mit Ringerlösung gefüllte Lumen im Töpfchen gegen die umgebende Ringerlösung zu isolieren. Eine Reizelektrode ausgestattet mit 200 μ m Silberdraht wurde im Innenraum des Töpfchens positioniert. Die Reizelektrode war mit einer Reiz-Isolationseinheit (World Precision Instrument, A360D-C) verbunden. Die elektrische Stimulation des AN wurde im defferentierten Zustand mit

Rechteckpulsen (Amplitude: 3V, Dauer: 1ms) durchgeführt. Die Reiz-Isolationseinheit konnte mit einem Analog/Digital-Wandler (micro 1401_{mkII}, Hersteller: Cambridge Electronic Design) angesteuert werden.

2.5.5 Extrazelluläre Dreifachableitung am isolierten zentralen Nervensystem

Die simultanen extrazellulären Ableitungen des Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) am isolierten zentralen Nervensystem von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* wurden durchgeführt, um das motorische Muster resultierend aus der rhythmischen Aktivität der drei Nerven zu analysieren.

Grundlage für die Dreifachableitung bildete das Basispräparat. Für *Calliphora vicina* und *Drosophila virilis* konnten die Vaseline-Töpfchen für die Ableitungen ohne weitere Maßnahmen um die entsprechenden Nerven hochgezogen werden. Nachdem die Töpfchen fertig gestellt worden waren, wurden die Nerven anterior vom Vaseline-Töpfchen durchtrennt und der Ringerspiegel in der Petri-Schale bis unter den Rand des Töpfchens abgesenkt und die differenten Elektroden in den Töpfchen positioniert. Dabei wurden alle drei indifferenten Elektroden, als auch die drei Abschirmungen zu einer indifferenten Elektrode und einer Abschirmung zusammengefasst, um Raum zu sparen und elektrische Störungen zu vermeiden. Sie wurden mittels eines Magnetfußes in die Ringerlösung eingetaucht.

Für die Dreifachableitung bei *Drosophila melanogaster* musste eine eigene Präparationsmethode (siehe Abb. 2.9) entwickelt werden, weil die Fläche zwischen dem zentralen Nervensystem und cephalopharyngealen Skelett (CPS) zu klein für drei Ableittöpfchen war. Als Grundlage diente die Basispräparation. Vor Beginn der weiterführenden Präparation wurden der AN, MN und PaN der rechten oder linken Körperhälfte entfernt (siehe Abb. 2.9A). Im ersten Schritt wurde ein Parafilmstreifen asymmetrisch zwischen dem Gehirn und CPS platziert. Darauf folgend wurde um den verbliebenen MN ein Vaseline-Töpfchen hochgezogen. Danach wurde der MN zwischen Töpfchen und CPS durchtrennt. Nun wurde das CPS aus der ursprünglichen Position um ca. 45° zur Seite versetzt, so dass der AN und PaN über den Parafilmstreifen lagen (siehe Abb. 2.9B). Im nächsten Schritt wurde ein Vaseline-Töpfchen um den AN konstruiert und der Nerv nachfolgend anterior vom Töpfchen durchtrennt. Das CPS wurde erneut um 45° zur Seite versetzt (siehe Abb. 2.9C) und ein Vaseline-Töpfchen um den verbliebenen PaN gezogen. Abschließend wurde der PaN mit einer Mikroschere zwischen Töpfchen und CPS durchtrennt. Das CPS konnte aus der Petri-Schale entfernt werden (siehe Abb. 2.9D). Nachdem die differenten und indifferenten Elektroden positioniert waren, konnten der AN, MN und PaN am isolierten zentralen Nervensystem von *Drosophila melanogaster* abgeleitet werden.

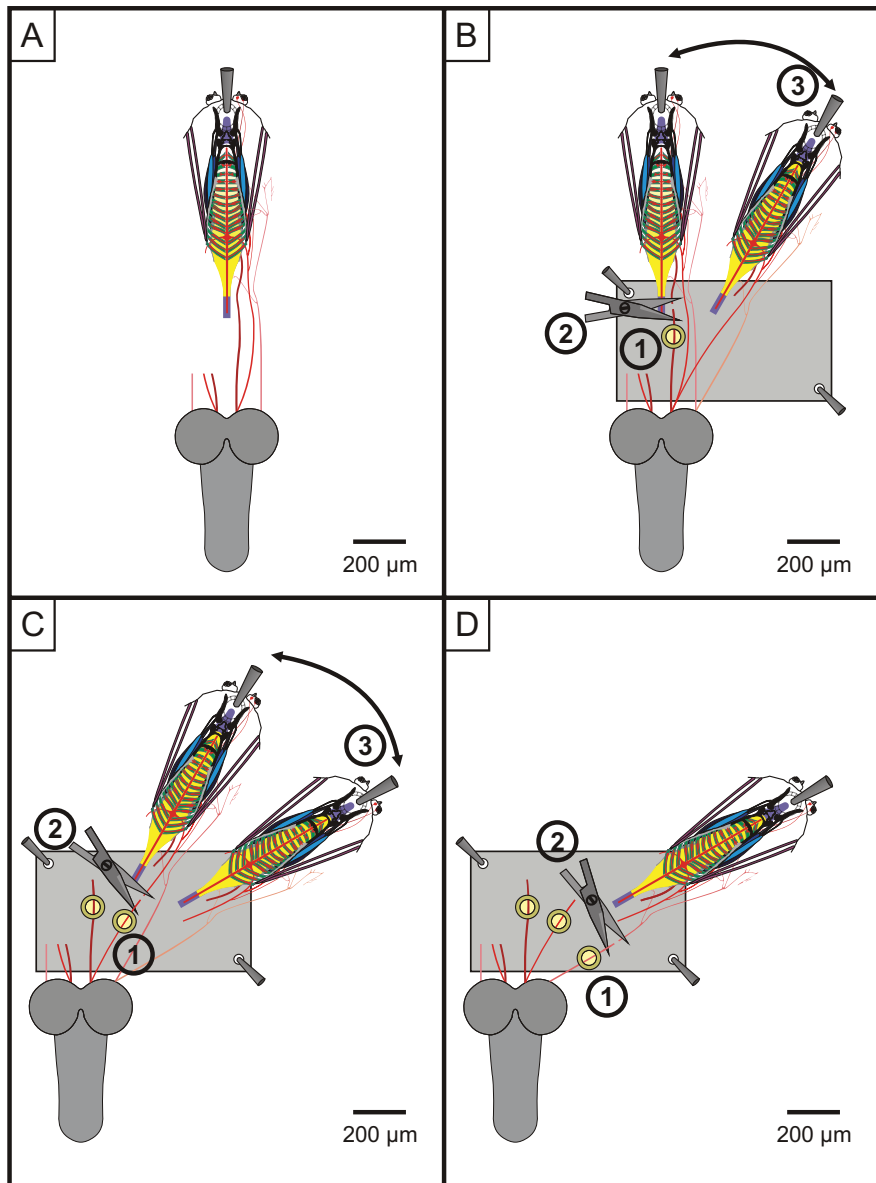


Abb. 2.9: Anleitung für die Präparation von *Drosophila melanogaster* für eine Dreifachableitung des Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) (schematische Darstellung); **A:** Zeigt eine Basispräparation, in der der linke AN, MN und PaN entfernt wurden; **B:** Ein Parafilmstreifen wurde unter die vorhandenen Nerven geschoben, ein Töpfchen um den MN hochgezogen (1) und der Nerv anterior vom Töpfchen mit einer Mikroschere durchtrennt (2), danach wurde das cephalopharyngeale Skelett (CPS) um ca. 45° nach links verschoben (3); **C:** Um den AN wurde ein Töpfchen konstruiert (1) und der Nerv anterior vom Töpfchen durchtrennt (2), das CPS wurde um weitere 45° nach links verschoben (3); **D:** Ein Töpfchen wurde um den PaN hochgezogen (1), der Nerv zwischen Töpfchen und CPS durchtrennt (2), abschließend konnte das CPS mit den assoziierten Strukturen aus der Petri-Schale entfernt werden.

2.5.6 Untersuchung der larvalen Sensorik

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde die Sensorik des Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und des rekurrenten Nervs (RN) der Larven von *Calliphora vicina* untersucht, die möglicherweise das larvale Fressverhalten beeinflussen könnten. Die durchgeführten Untersuchungen waren rein qualitativ und hatten die Intension:

- 1) die mechanosensitiven Eigenschaften der untersuchten sensorischen Organe elektrophysiologisch zu belegen und
- 2) deren Projektionen durch den AN, MN oder RN nachzuweisen.

Zu diesem Zweck wurden extrazelluläre Einfach- und Doppelableitungen an den entsprechenden Nerven durchgeführt und simultan die zugehörigen sensorischen Organe mit unterschiedlichen mechanischen Reizgebern, die im Folgenden erläutert werden, stimuliert.

2.5.6.1 Reizgeber für die Untersuchung des Labial-, Ventral-, Terminal- und Dorsalorgans

Die mechanische Stimulation des Dorsal- (DO), Labial- (LO), Terminal- (TO) und des Ventralorgans (VO) wurde mit einem modifizierten „Microdrive“¹⁸ durchgeführt und simultan der Antennal- (AN) oder Maxillarnerv (MN) extrazellulär abgeleitet. Für den Umbau zum Mechanostimulator wurde die Schreib- und Lesearm-Einheit des „Microdrive“ mit dünnen Kohlefaserröhren versehen, die zur Dämpfung des Lesearms dienen. Im vorderen Teil der Kohlefaserröhre wurde mit Klebewachs eine spitz-geätzte Wolframnadel montiert. Mit der spitz-geätzten Wolframnadel sollte gewährleistet werden, dass die unterschiedlichen Sinnesorgane selektiv mechanisch stimuliert werden. Für die mechanische Stimulation wurde das Sinnesorgan freipräpariert und exponiert, um es mit dem Reizgeber erreichen zu können. Die Exponierung der Sinnesorgane wurde mit Siliconelastomerkeilen und Wolframnadeln bewerkstelligt. Der Reizgeber konnte wahlweise über einen Funktionsgenerator oder den Analog/Digital-Wandler (micro 1401_{mkII}, Hersteller: Cambridge Electronic Design) angesteuert werden.

2.5.6.2 Reizgeber für die Untersuchung der Kropfsensorik

Für die Untersuchung der Kropfsensorik wurde das Volumen des Kropfes manipuliert und simultan der Antennalnerv (AN), der Proventrikularnerv (PVN) und der rekurrente

¹⁸ Ein „Microdrive“ ist der Vorläufer aktueller Speicherkarten, der in seiner Funktionsweise einer miniaturisierten Festplatte entspricht. Die Modifikation des „Microdrives“ zum Mechanostimulator wurde entwickelt und gebaut von Prof. Dr. H.-G. Heinzl. Weitere Informationen über den Reizgeber können der Diplomarbeit von B. Usai [2008] entnommen werden.

Binokular bei 6,4- bis 48-facher Vergrößerung erstellt. Für die Dokumentation der Zeichnungen wurden bei identischer Vergrößerung Fotografien von den Präparaten oder Färbungen erstellt. Die Bilder wurden mit verschiedenen Digitalkameras (Nikon Coolpix 4500, Nikon Finepix S9500 und Canon Powershot A640) aufgenommen, die über spezifische Kameraaufsätze (gebaut von der Feinmechanik-Werkstatt des Instituts für Zoologie der Universität Bonn) in den optischen Strahlengang des Binokulars (Wild M3B, Heerbrugg Switzerland) oder des inversen Mikroskops (Zeiss IM 35 oder Leica DMRB/E) integriert wurden. Für die Erstellung der schematischen Grafiken wurden die in den Zeichnungen und Fotografien festgehaltenen Teilaspekte zu einer Gesamtübersicht zusammengefasst. Die schematischen Darstellungen wurden mit CorelDRAW 12 erstellt und als Grafikdatei gespeichert. Die gezeigten Fotos wurden mit Adobe Photoshop Elements bearbeitet und als Bilddateien gespeichert.

2.6.2 Auswertung der elektrophysiologischen Daten

In der elektrophysiologischen Untersuchung wurde der Antennal- (AN), der Maxillar- (MN) und der akzessorische Prothorakalnerv (PaN) bei allen drei Dipteren-Arten analysiert. Die in den Experimenten gesammelten Daten konnten gegliedert werden in:

- Identifikation von efferenten Bahnen und motorischen Einheiten,
- Identifikation der afferenten Bahnen,
- Rhythmusanalyse des fiktiven larvalen Fressverhaltens.

Der elektrophysiologische Nachweis der afferenten Bahnen, sowie die Identifikation der unterschiedlichen motorischen Einheiten anhand einer Clusteranalyse beschränkte sich auf *Calliphora vicina*.

Identifikation der efferenten Bahnen und motorischen Einheiten

Für die Untersuchung der efferenten Bahnen wurden extrazelluläre Einzelableitungen der Nerven und simultane intrazelluläre Muskelableitungen durchgeführt. Der Nachweis für die motorischen Bahnen in einem Nerv wurde durch 1:1 Korrelation zwischen den Aktionspotentialen und den zugehörigen postsynaptischen Muskelpotentialen erbracht. Zusätzlich wurde die Latenz zwischen den Aktionspotentialen in der extrazellulären Ableitung und den abgeleiteten postsynaptischen Potentialen auf dem Muskel bestimmt. Die Messung der Latenz wurde mit Spike2 durchgeführt und die Daten in SigmaPlot Version 11 statistisch ausgewertet. Teilweise konnten die motorischen Bahnen nicht über eine 1:1 Korrelation nachgewiesen werden. In solchen Fällen erfolgte der Nachweis der motorischen Bahnen anhand von Läsionsexperimenten. Dazu wurde bei laufender simultaner Nerven- und Muskelableitung der Nerv anterior des Ableitorts durchtrennt, so

dass beim Nachweis einer motorischen Bahn die Aktionspotentiale in der Nervenableitung erhalten blieben, aber die postsynaptischen Potentiale der Muskeln durch die Läsion eliminiert wurden. In den Läsionsexperimenten am Antennalnerv (AN) wurden die Läsionen posterior der extrazellulären Ableitung eingefügt, weil die ipsi- und contralaterale Innervation der Muskeln durch die entsprechenden Motorneurone nachgewiesen werden sollte.

Die elektrophysiologischen Experimente wurden mit dem Programm Spike2 aufgezeichnet. Die graphischen Darstellungen der Experimente wurden mit dem Programm CorelDRAW 12 bearbeitet.

Die Clusteranalyse der motorischen Einheiten der Nerven wurde mit dem Softwareprogramm Spike2 durchgeführt. Im ersten Schritt des Verfahrens wurden die Originaldaten einem „Spike Sorting“ unterzogen. Dazu wurden die Aktionspotentiale in sogenannte „Wavemarks“ umgeschrieben und die „Wavemarks“ mit ähnlicher Form und Amplitude einem gemeinsamen „template“ zugeordnet. Im zweiten Schritt wurde an der „Wavemark“-Datei eine „Principal Component Analysis“ durchgeführt. Bei diesem Analyseverfahren werden aus den Daten, also den extrahierten Aktionspotentialen, die drei signifikantesten, unabhängigen Hauptkomponenten mit der größten Varianz berechnet und für die drei-dimensionale Darstellung der Clusteranalyse genutzt. Darauf wurden über den „K Means“-Algorithmus die extrahierten Aktionspotentiale „geclustert“.

Identifikation der afferenten Bahnen

Die afferenten Bahnen wurden durch extrazelluläre Einzelableitungen des Nervs und simultaner Reizung des entsprechenden sensorischen Organs nachgewiesen. Die zeitliche Korrelation zwischen Reizgebung und neuronaler Antwort des Sinnesorgans wurde mit dem Softwareprogramm Spike2 gezeigt und aufgezeichnet. Die graphische Darstellung der Ableitungen wurde mit dem Softwareprogramm CorelDRAW 12 bearbeitet und als Grafikdatei gespeichert. Für die Charakterisierung der afferenten Einheit des akzessorischen Prothorakalnervs von *Calliphora vicina* wurde eine Clusteranalyse, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, durchgeführt.

Rhythmusanalyse des fiktiven larvalen Fressverhaltens

Bei der Rhythmusanalyse des fiktiven Fressverhaltens am isolierten zentralen Nervensystem wurden die Dreifachableitungen des Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) mit Spike2 analysiert. Ziel war es, die zeitliche Beziehung der „fiktiven Muskelkontraktionen/Bewegungen“ zueinander in einem Phasendiagramm darzustellen. Die ausgewerteten fiktiven Bewegungen waren:

- Antennalnerv (AN):
 - Cibariale Dilatormuskulatur (CDM),
- Maxillarnerv (MN):
 - Mundhakenelevator (MHE),
 - Mundhakendepressor (MHD),
 - Labialretraktor (LR),
- Akzessorischer Prothorakalnerv (PaN):
 - Dorsaler Protraktormuskel A ($Pro_{do}A$),
 - Mittlere Einheit (mE).

Für die Auswertung war es notwendig, die neuronalen Rhythmen der verschiedenen efferenten Einheiten aus den Ableitungen zu extrahieren. Dazu wurden im ersten Schritt die efferenten Einheiten anhand ihrer unterschiedlichen Amplituden („Spitze zu Spitze“-Amplitude) sortiert. Für diesen Schritt wurde in den Ableitungen manuell ein „Triggerlevel“ gesetzt und alle Aktionspotentiale mit der entsprechenden Amplitude in einen Ereigniskanal geschrieben.

Im Folgenden wurde mittels einer programm-internen Analysefunktion („Burstmake“) die zeitliche Abfolge der Aktionspotentiale in Bursts umgeschrieben. Ein Burst kann definiert werden als eine Serie von Aktionspotentialen, die ein Minimumintervall zwischen zwei aufeinander folgenden Aktionspotentialen nicht überschreiten (siehe Abb. 2.11). In der Analysefunktion wurde eine Serie von Aktionspotentialen als Burst deklariert (bzw. ein Aktionspotential wurde einem Burst zugeordnet), wenn die Aktionspotentiale folgende Bedingungen erfüllten:

1. das Intervall zwischen zwei aufeinander folgenden Aktionspotentialen war nicht größer als das definierte **Minimumintervall**,
2. die Anzahl der aufeinander folgenden Aktionspotentiale, deren Intervall nicht größer ist als das Minimumintervall, muss größer sein als die definierte **Mindestanzahl** von Aktionspotentialen für die Bildung eines Bursts.

Orientierungswerte für das Minimumintervall und die Mindestanzahl von Aktionspotentialen in einem Burst wurden aus den extrazellulären Nervenableitungen, in denen die unterschiedlichen efferenten Einheiten eindeutig bestimmt worden waren, gewonnen.

Die Bursts der efferenten Einheiten wurden in Hinblick auf folgende Werte in der Rhythmusanalyse vermessen (siehe Abb. 2.12):

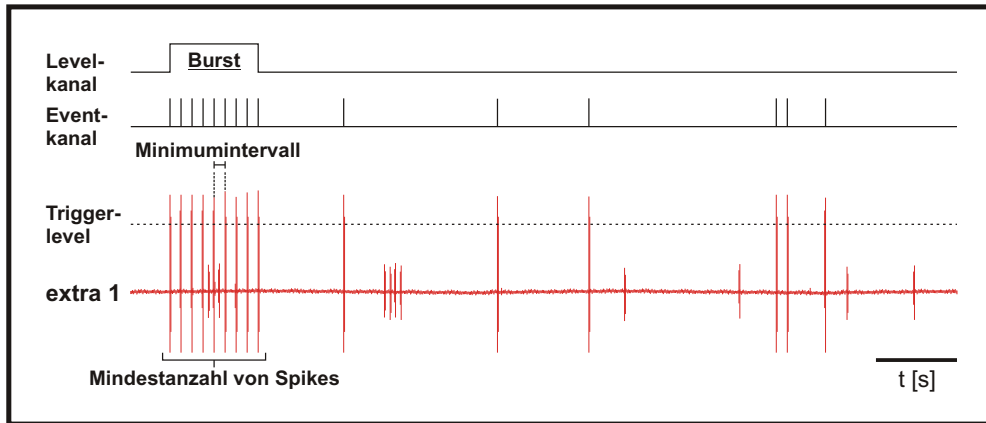


Abb. 2.11: Parameter für die Bildung eines Bursts: Minimumintervall und Mindestanzahl von Spikes (Aktionspotentiale).

- Burstanfang [s],
- Burstende [s],
- Burstdauer [s],
- Interburstdauer [s],
- Periodendauer [s],
- Spikeanzahl pro Brust [Anzahl],
- Burstfrequenz [Hz] und
- die Phasenbeziehung [normiert auf die Periodendauer der CDM-Einheit].

Für die Bestimmung der Phasenbeziehung wurden Burstanfang und -ende der anderen Muskelgruppen auf die Periodendauer der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) normiert, da die CDM im Mittel die längste Periodendauer und die konstanteste neuronale Aktivität der untersuchten efferenten Einheiten zeigte. Für einige motorische Einheiten konnte die Spikeanzahl pro Brust und Burstfrequenz nicht berechnet werden, weil die Aktionspotentiale sich in der Ableitung überlagerten und zum Teil aufsummierten. Alle Werte für die Rhythmusanalyse des fiktiven Fressverhaltens wurden mit Spike2 bestimmt und mit SigmaPlot Version 11 statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Tests auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test), die im Rahmen der Rhythmusanalyse von *Calliphora vicina* durchgeführt wurden, sind mit dem Programm PASW Statistics 17 (Hersteller: SPSS Inc.) durchgeführt worden. Für die Rhythmusanalyse des fiktiven Fressverhaltens bei *Drosophila melanogaster* musste aufgrund der teilweise schlechten Signal/Rausch-Verhältnisse der Nervenableitungen

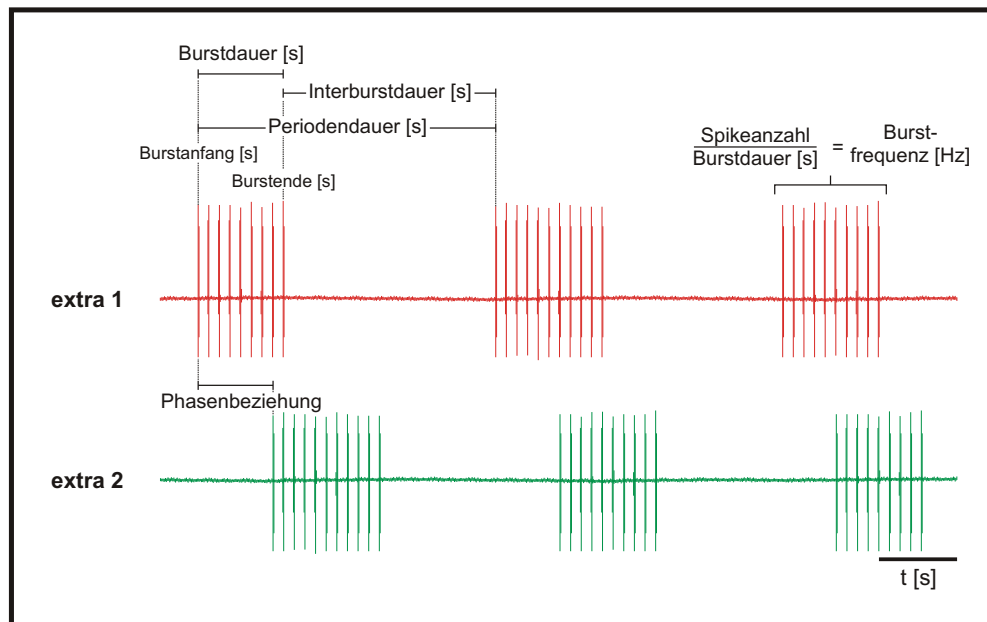


Abb. 2.12: Graphische Darstellung der unterschiedlichen Werte, die im Rahmen der Rhythmusanalyse für die motorischen Einheiten bestimmt wurden.

ein weiteres Analyseverfahren angewendet werden, um die Aktivität der efferenten Einheiten besser bestimmen zu können. Es wurden sogenannte Hüllkurven erstellt, die dem durchschnittlichen Trend der Aktivität der unterschiedlichen neuronalen Einheiten in der extrazellulären Ableitung entsprachen. Für die Generierung einer Hüllkurve wurde zuerst der Gleichspannungsanteil aus der Ableitung entfernt (siehe Abb. 2.14A) und die Ableitung gleichgerichtet (siehe Abb. 2.14B). Dabei wurde der negative Signalanteil in einen positiven Anteil umgeschrieben. Abschließend wurde das gleichgerichtete Signal geglättet (siehe Abb. 2.14C). Als Glättungsalgorithmus wurde der „Root Mean-Square“ verwendet. Der „Root Mean-Square“ ist das quadrierte und integrierte Signal der extrazellulären Ableitung über einen definierten Zeitabschnitt. Die generierte Hüllkurve mittels „Root Mean-Square“ repräsentiert die mittlere neuronale Aktivität der extrazellulären Ableitung im gewählten Zeitfenster.

In der Rhythmusanalyse wurde der „Root Mean-Square“ jeweils über ein Zeitfenster von 20ms bestimmt, um den Informationsverlust durch den Glättungsalgorithmus minimal zu halten. Die Hüllkurve wurde als zusätzliches Hilfsmittel genutzt, um die Aktivität eindeutiger detektieren zu können. Die Hüllkurven wurden mit dem Softwareprogramm Spike2 generiert.

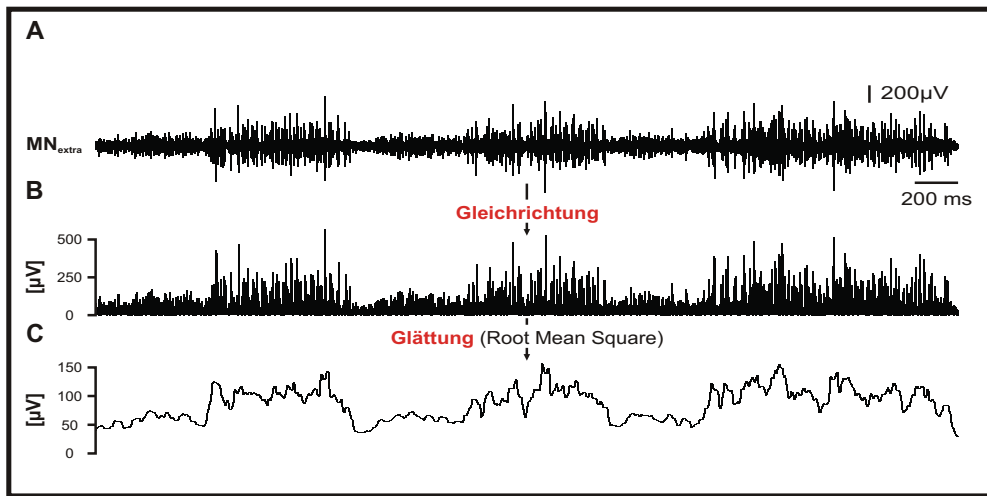


Abb. 2.13: Generierung einer Hüllkurve am Maxillarnerv (MN) von *Drosophila melanogaster*; **A:** Originalableitung des MN; **B:** gleichgerichtete Ableitung des MN; **C:** Hüllkurve der Ableitung des MN durch den Glättungsalgorithmus „Root Mean Square“.

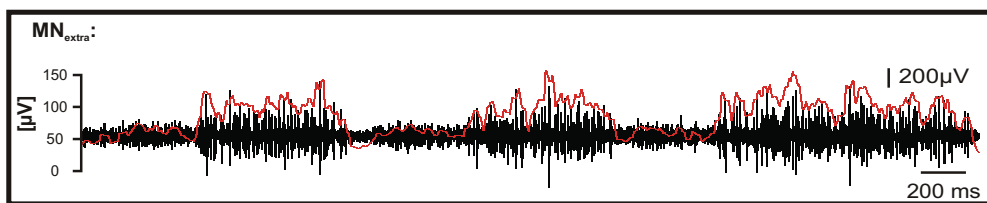


Abb. 2.14: Extrazelluläre Ableitung des Maxillarnervs (MN) von *Drosophila melanogaster* mit Hüllkurve (rot).

3 Ergebnisse

3.1 Verhalten

Im Focus der Verhaltensuntersuchung¹ stand die Analyse des möglichst unbeeinflussten, larvalen Fressverhaltens von *Calliphora vicina*. Das Ziel war es, die sich rhythmisch wiederholenden Bewegungskomponenten, die an der Nahrungsaufnahme beteiligt sind, gegeneinander abzugrenzen. Zusätzlich wurde die Frequenz des Fressverhaltens erfasst, um sie mit den Ergebnissen aus den Versuchen zum fiktiven Fressverhalten der Larven zu vergleichen.

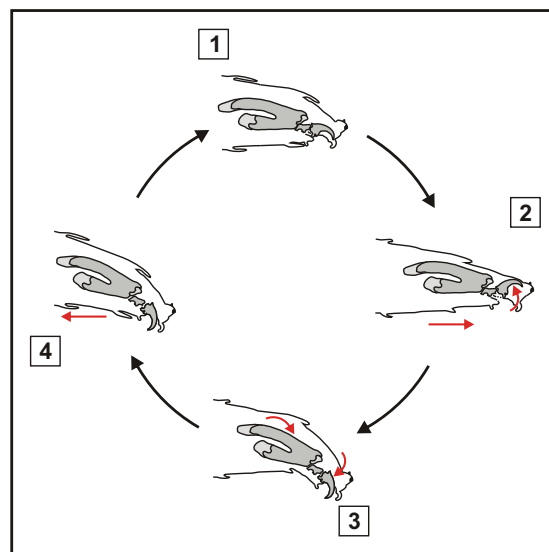


Abb. 3.1: Fresszyklus von *Calliphora vicina*; **1:** Vorderen Segmente der Larve im relaxierten Zustand; **2:** Vorwärtsbewegung der vorderen Segmente und des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) und verzögerte Elevation der Mundhaken; **3:** Ventrale Neigung des CPS und Senken der Mundhaken; **4:** Zurückziehen der vorderen Segmente bei gesenkten Mundhaken und Übergang in den relaxierten Zustand.

¹ Die Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Axel Hinnemann und Fabian Paul im Rahmen eines Blockpraktikums durchgeführt.

Grundlegend besteht das larvale Fressverhalten der Dipteren aus rhythmischen Vorwärts- und Rückwärtsbewegungen des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) relativ zu den anterioren Segmenten der Larve sowie aus koordiniertem Heben und Senken der Mundhaken. Ergänzend sind am Fressverhalten Pro- und Retraktion der Körperwandsegmente beteiligt. Die Verhaltensuntersuchung wurde an den Larven von *Calliphora vicina* in der Fressphase durchgeführt. Die identifizierten rhythmischen Bewegungskomponenten konnten in einem (Fress-) Zyklus dargestellt werden, der in vier Phasen gegliedert ist. Jede Phase ist durch spezifische Bewegungen der Mundhaken und des CPS charakterisiert.

Als Ausgangsstadium des Fresszyklus wurde die Larve im relaxierten Zustand definiert (siehe Abb. 3.1(1)).

In der zweiten Phase werden die thorakalen Segmente, in denen das CPS liegt, nach vorne gestreckt. Simultan wird das CPS aus seiner Grundstellung nach anterior verschoben, so dass es am Ende der Bewegung im pro- und mesothorakalen Segment positioniert ist. Abgeschlossen wird die zweite Phase durch die zeitlich versetzte Elevation der Mundhaken (siehe Abb. 3.1(2)).

Zu Beginn der dritten Phase ist das CPS inklusive den beteiligten Segmenten maximal nach anterior verschoben. Als Nächstes wird das CPS nach ventral geneigt, darauf folgt das Absenken der Mundhaken. Die Bewegungsabfolge aus der ventralen Neigung des CPS und dem verzögerten Senken der Mundhaken ähnelt einem Bagger der seine Schaufel in den Boden eingräbt (siehe Abb. 3.1(3)).

Im Verlauf der vierten Phase wurde das CPS mit gesenkten Mundhaken zurückgezogen. Vollendet wurde der Fresszyklus durch die Relaxation der Mundhaken und Rückführung des CPS in die Ausgangsposition (siehe Abb. 3.1(4)).

Während der dritten und vierten Phase des Fresszyklus wird die Nahrung in Richtung Mundöffnung befördert und vermutlich über einen Pumpmechanismus, der im CPS lokalisiert ist, aufgenommen. Die Tatsache, dass hungrige Larven in der Lage sind, innerhalb von zwei bis drei Minuten ihren Kropf maximal zu füllen, verdeutlicht die Effektivität dieser Form der Nahrungsaufnahme.

Das larvale Fressverhalten zeigt ein hohes Maß an Variabilität. Die Frequenz des Fresszyklus von *Calliphora vicina* schwankte zwischen ein bis drei Hz. Der Mittelwert lag bei 2,1 Hz (Standardfehler: $\pm 0,22$ Hz, N=14). Es wurde oft beobachtet, dass einige Fresszyklen mit energischen Bewegungen ausgeführt wurden, gefolgt von mehreren Zyklen mit weniger intensiven Bewegungskomponenten. Diese „schabenden“ Fressbewegungen waren primär charakterisiert durch eine geringere Streckung der thorakalen Segmente. Der Bewegungszyklus des Fressverhaltens wurde gelegentlich durch Suchbewegungen unterbrochen, in denen die Larve mit ausgestreckten anterioren Segmenten und CPS rhythmische Lateralbewegungen ausführte, wobei sie wiederholt das Substrat mit den

exponierten cephalen Loben berührte.

Das Fressverhalten von *Drosophila virilis* und *melanogaster* wurde nicht eingehend dokumentiert. Verhaltensbeobachtungen zeigten, dass die Bewegungen als auch deren zeitliches Muster während des Fressverhaltens sehr ähnlich sind, aber die Frequenz deutlich höher ist. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde der an *Calliphora vicina* entwickelte Zyklus des Fressverhaltens auf *Drosophila virilis* und *melanogaster* unabhängig von der Frequenz übertragen.

3.2 Anatomie und Funktionsmorphologie

In diesem Kapitel werden Muskeln und Nerven beschrieben, die die charakteristischen Bewegungskomponenten des larvalen Fressverhaltens von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* realisieren.

Im ersten Teil werden die Muskeln, welche die Nahrungsaufnahme, die Rotation der Mundhaken sowie die Neigung und Vorwärtsbewegung des CPS realisieren, anatomisch und funktionsmorphologisch beschrieben. Weil diese Muskeln spezifische, unabhängige Einzelbewegungen ausführen, wurden sie als „Schlüssel-Muskeln“ des Fressverhaltens definiert.

Im zweiten Teil wird die Morphologie der Nerven, welche die „Schlüssel-Muskeln“ innervieren, dargelegt. In der anatomischen Beschreibung wird das gesamte neuronale Projektionsmuster der Nerven aufgezeigt.

Durch retrograde Füllungen des Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) wurden für *Calliphora vicina* die Position der Somata im zentralen Nervensystem bestimmt, deren Axone durch diese Nerven verlaufen.

3.2.1 Anatomie und Funktionsmorphologie der pharyngealen und akzessorischen pharyngealen Muskulatur

Bei den untersuchten Dipteren-Larven wurden Muskeln, die am cephalopharyngealen Skelett (CPS) ansetzen, als pharyngeale Muskeln und Muskeln, die eine Ansatzstelle am CPS und die andere an der Cuticula besitzen, als akzessorische pharyngeale Muskeln definiert. Diese Muskelgruppen sind für viele der Bewegungskomponenten in den vier Phasen des Fresszyklus (siehe Kapitel 3.1) verantwortlich. Sie werden im Folgenden anatomisch und funktionsmorphologisch beschrieben.

In der anatomischen Untersuchung wurden die Muskelgruppen in ihrer Länge und Breite vermessen. Die Werte sind in Form einer Tabelle (siehe Tab.: 4.1) im Anhang aufgeführt.

3.2.1.1 Cibariale Dilatormuskulatur

Die cibariale Dilatormuskulatur (CDM) besteht bei den untersuchten Arten aus mindestens 13 paarigen Muskelbündeln (siehe Abb. 3.2). Die einzelnen Muskelfasern sind im Innenraum des CPS lokalisiert und annähernd vertikal ausgerichtet. Sie inserieren an der dorsalen Oberfläche des Oesophagus und den dorsalen Armen des CPS. Eine Kontraktion der CDM führt zu einer Volumenvergrößerung des cibarialen Teils des Oesophagus, wodurch ein Unterdruck erzeugt wird, der bei geöffnetem Labium flüssige Nahrung ein-saugt. Diese Form der Nahrungsaufnahme stellt einen Pumpmechanismus dar. Bei den drei Arten sind der Aufbau und die Funktion der CDM weitgehend gleich. Die Anzahl der paarigen Muskelbündel der CDM unterscheidet sich zwischen den Arten. Die Larven

von *Calliphora vicina* besitzen 13, *Drosophila virilis* 14 und *Drosophila melanogaster* 15 paarige Muskelbündel. Des Weiteren war die Länge und Breite der Muskelbündel unterschiedlich (siehe Tab.: 4.1).

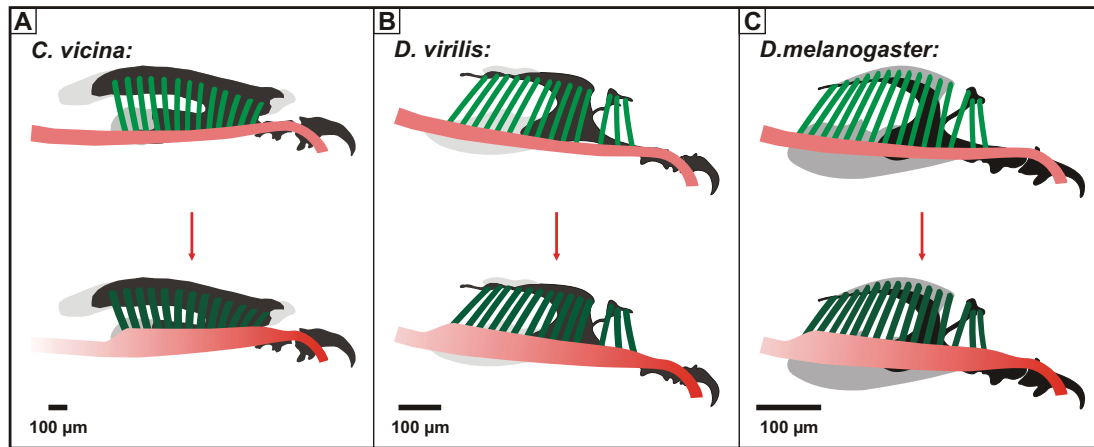


Abb. 3.2: Schematische Zeichnung (lateral Ansicht) der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM, grün) von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*; die CDM ist im Innenraum des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) lokalisiert und zwischen dem dorsalen Dach des Oesophagus und dem dorsalem Arm des CPS aufgespannt; Kontraktion der CDM führt zu einer Volumenvergrößerung des Oesophagus, wodurch über den entstehenden Unterdruck Nahrung eingesaugt wird.

3.2.1.2 Mundhakenelevator und Mundhakendepressor

Die Rotation der Mundhaken wird durch eine antagonistisch aufgebaute Muskulatur bestehend aus den Mundhakenelevator (MHE) und Mundhakendepressor (MHD) bewerkstelligt (siehe Abb. 3.3). Die MHE und MHD liegen lateral dem cephalopharyngealen Skelett (CPS) auf. Die posterioren Ansatzstellen der Mundhakenmuskulatur sind am ventralen Arm des CPS lokalisiert. Der Insertionsbereich des MHE liegt dorsal, der des MHD medial auf dem ventralen Arm. Die anteriore Ansatzstelle des MHE ist auf der dorsalen Seite der Mundhakenbasis lokalisiert. Die Sehne der MHD ist mit dem ventralen Teil der Mundhakenbasis verbunden. Beide anterioren Ansatzstellen sind exponierte sklerotisierte Strukturen der Mundhakenbasis. Der MHE auf einer Seite des CPS setzt sich aus zwei Muskelbündeln zusammen, wohingegen der MHD aus insgesamt vier Muskelbündeln pro Seite besteht. Eine Kontraktion des Depressorsystems bewirkt ein Senken der Mundhaken, wohingegen eine Kontraktion des Elevators die Mundhaken anhebt. Anatomisch und funktionsmorphologisch existierten keine grundlegenden Unterschiede zwischen der Muskulatur der Mundhaken der untersuchten Arten. Die Muskeln unterschieden sich in der Größe bei den untersuchten Dipteren-Larven (siehe Tab.: 4.1, Anhang).

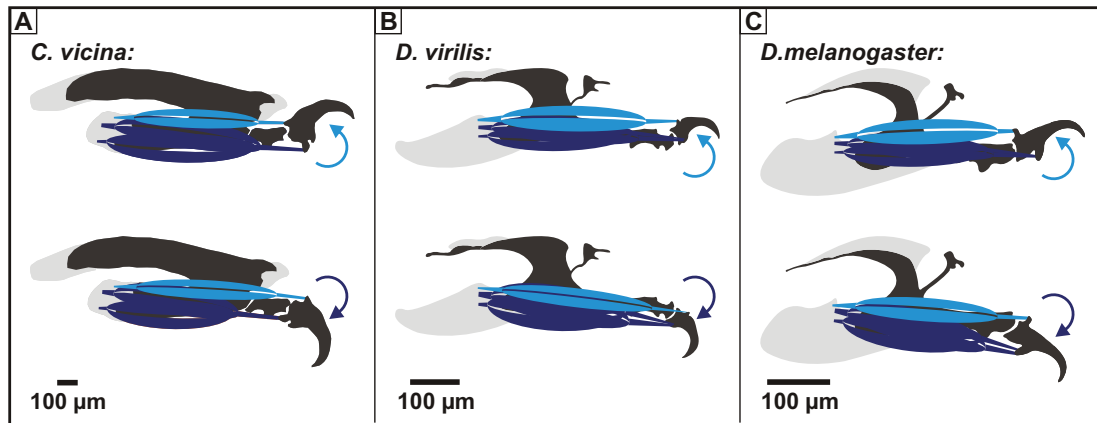


Abb. 3.3: Schematische Zeichnung (lateral Ansicht) der zwei Mundhakenelevator-Muskelbündel (MHE, hellblau) und vier Mundhakendepressor-Muskelbündel (MHD, dunkelblau) von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*; posterior setzt die Mundhakenmuskulatur am ventralen Arm des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) an; anterior ist der MHE mit den dorsalen Bereich und MHD mit den ventralen Bereich der Mundhakenbasis über eine Sehne verbunden; die antagonistisch aufgebaute Muskulatur bewirkt bei Kontraktion eine Rotation des Mundhakens.

3.2.1.3 Labialretraktor

Der Labialretraktor (LR) ist ein paariger Muskel, der auf der ventralen Seite des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) im Bereich der pharyngealen Furchen („pharyngealen ridges“) aufliegt (siehe Abb. 3.4). Die posteriore Ansatzstelle des LR setzt lateral unterhalb der Ansatzstelle der Mundhakenmuskulatur am ventralen Arm des CPS an. Anterior ist die Sehne des LR über eine komplexe sklerotisierte Struktur, die in Bindegewebe eingebettet ist, mit dem Labium verbunden. Die Kontraktion des paarigen LR öffnet vermutlich über einen Hebelmechanismus das unpaarige Labium. Die LR der untersuchten Larven unterschieden sich in der Größe, aber anatomisch und funktionell waren keine Unterschiede feststellbar. Die Länge und Breite des LR konnte nur für *Calliphora vicina* bestimmt werden (siehe Tab.: 4.1).

3.2.1.4 Dorsaler Protraktormuskel A

Der dorsale Protraktormuskel A ($Pro_{do}A$) gehört zur Gruppe der Protraktoren, die für die Vorwärtsbewegung und Neigung des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) verantwortlich sind (siehe Abb. 3.5). Insgesamt besteht diese Gruppe aus den dorsalen Protraktormuskeln A ($Pro_{do}A$) und B ($Pro_{do}B$) sowie dem ventralen Protraktor (Pro_{vent}). Der $Pro_{do}A$ ist wie die beiden anderen Muskeln paarig. Seine posteriore Ansatzstelle ist am posterioren Ende des dorsalen Arms des CPS. Anterior inseriert der $Pro_{do}A$ den dorsalen Bereich der Cuticula des Prothorax. Der $Pro_{do}A$ verläuft parallel zur Körperlängsachse.

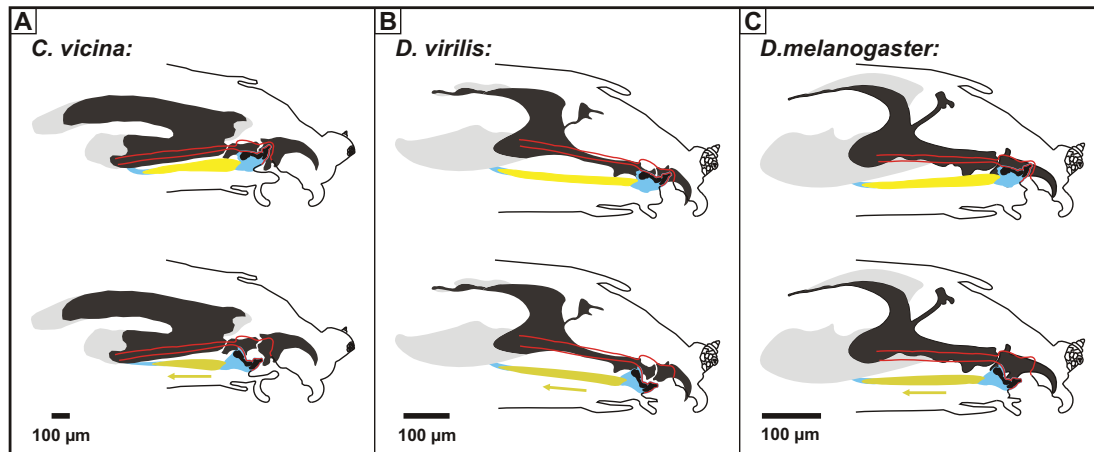


Abb. 3.4: Schematische Zeichnung (lateral Ansicht) des paarigen Labialretraktors (LR, gelb) von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*; die posteriore Ansatzstelle des LR liegt im unteren Bereich des ventralen Arms des cephalopharyngealen Skeletts (CPS); die anteriore Ansatzstelle des LR ist ein sklerotisiertes Hebelsystem, das bei Kontraktion des LR das unpaarige Labium öffnet.

Seine Kontraktion bewirkt eine Neigung des CPS nach ventral sowie eine Vorwärtsbewegung des CPS relativ zum Körper der Larve. Die grundlegenden anatomischen und funktionsmorphologischen Eigenschaften des Pro_{do}A von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* sind sehr ähnlich. Allerdings unterscheidet sich die Größe des Muskels in den einzelnen Larven-Arten aufgrund der unterschiedlichen Körpergröße (siehe Tab.: 4.1).

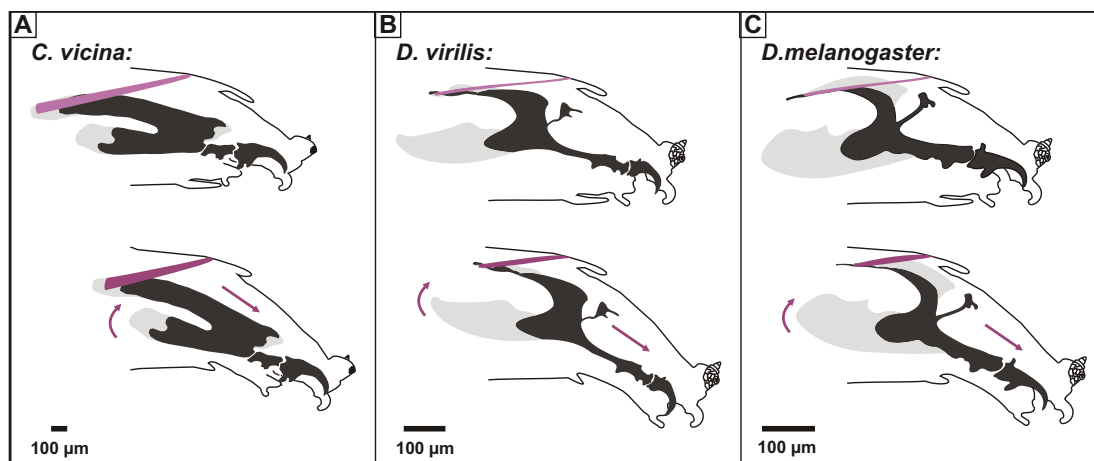


Abb. 3.5: Schematische Zeichnung (lateral Ansicht) des dorsalen Protraktormuskels A (Pro_{do}A, lila) von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*; Pro_{do}A setzt am posterioren Ende des dorsalen Arms des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) und anterior der Cuticula des Prothorax an; eine Kontraktion des Pro_{do}A führt zu einer Vorwärtsbewegung und ventralen Neigung des CPS.

3.2.2 Anatomie der pharyngealen Nerven

In der anatomischen Untersuchung wurden die sensorischen und motorischen Innervationsziele des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* erfasst. Das Hauptziel war die Innervation der im letzten Kapitel beschriebenen Schließmuskulatur zu identifizieren, um auf Basis dieser anatomischen Kenntnisse die motorischen Bahnen in elektrophysiologischen Experimenten nachzuweisen. Des Weiteren war von Interesse, in wie weit die Innervationsschemata des AN, des MN und des PaN der untersuchten Arten aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft sich ähneln bzw. welche anatomischen Unterschiede zwischen den Arten vorhanden sind. Denn eine anatomische Übereinstimmung der Nerven würde die Übertragung der elektrophysiologischen Methoden von *Calliphora*- auf *Drosophila*-Larven absichern.

Diese anatomische Untersuchung wurden entwicklungsbiologische Aspekte nicht berücksichtigt. Die Abzweigungen wurden ausgehend vom Ursprung des Nerves am zentralen Nervensystem von anterior nach posterior mit römischen Ziffern und weitere Verzweigungen mit Kleinbuchstaben benannt.

Die anatomische Beschreibung des AN, des MN und des PaN gliedert sich in zwei Abschnitte:

- Allgemeines Innervationsschema -
Im ersten Abschnitt werden die grundlegenden Projektionsmuster der Nerven und deren anatomischen Merkmale beschrieben, die in den drei Dipteren-Arten übereinstimmen.
- Artspezifisches Innervationsschema -
Im zweiten Abschnitt werden die morphologischen Merkmale aufgezeigt, in denen sich die drei Arten unterscheiden.

Im Rahmen der anatomischen Untersuchungen wurden der Durchmesser oder die Länge und Breite der charakterisierten Strukturen des Nervensystems bestimmt. Die Werte für die drei Arten sind tabellarisch im Anhang aufgeführt (siehe Tab.: 4.2).

3.2.2.1 Antennalnerv

Allgemeines Innervationsschema

Bei *Calliphora vicina* (siehe Abb. 3.6), *Drosophila virilis* (siehe Abb. 3.7) und *Drosophila melanogaster* (siehe Abb. 3.8) entspringt der paarige Antennalnerv (AN) anterior aus dem zentralen Nervensystem, im Übergangsbereich zwischen Gehirnhemisphäre und Suboesophagalganglion, und projiziert nach anterior in Richtung des cephalopharyngealen Skeletts (CPS). Er endet im Ganglion (DOG) des Dorsalorgans (DO), das

im cephalen Lobus lokalisiert ist. Die cephalen Loben sind eine paarige Struktur, die antero-dorsal dem Pseudocephalon aufliegen und Sitz mehrerer exponierter Sinnesorgane sind. Zu diesen gehört das Dorsalorgan (DO) mit dem dazugehörigen Ganglion. Das DO enthält unterschiedliche sensorische Rezeptoren, wobei die Hauptfunktion die Olfaktion ist. Vom AN zweigt posterior vom CPS das Frontalkonnektiv (FK) ab, das lateral in die frontale Nervenverbindung (FNV) mündet. Diese ist eine rhombische Struktur, die dorsal dem Oesophagus (OE) aufliegt und innerhalb des CPS lokalisiert ist. Anterior entspringt aus dem FNV der unpaarige Frontalnerv (FN), der innerhalb des CPS über bilaterale feine Nervenverzweigungen die cibariale Dilatormuskulatur (CDM) innerviert. Posterior mündet der unpaarige rekurrente Nerv (RN) ins FNV. Der RN projiziert entlang des Oesophagus durch das Foramen zwischen den Gehirnhemisphären zum Hypocerebralganglion (HCG), das über den Proventrikulärnerv (PVN) mit dem Proventrikulärganglion (PVG) verbunden ist.

Artspezifisches Innervationsschema

***Calliphora vicina*:** Zwischen dem Antennalnerv (AN) und dem Maxillarnerv (MN) existiert posterior der frontalen Nervenverbindung (FNV) eine neuronale Anastomose (A/AN-MN). Eine weitere neuronale Anastomose (A/AN-FK) besteht zwischen AN und dem Frontalkonnektiv (FK). Der AN besitzt zwei Nervenabzweigungen (AN/I und II). AN/I entspringt lateral von A/AN-FK aus dem AN und projiziert nach anterior entlang der Außenseite des cephalopharyngealen Skeletts (CPS), wo er sich in AN/Ia und AN/Ib aufzweigt. AN/Ia und AN/Ib innervieren den Oesophagus, die physiologische Funktion der Innervationen ist unbekannt. AN/II entspringt in direkter Umgebung zu AN/I und innerviert eine Struktur im posterioren Bereich des ventralen Arms. Die Funktion dieser Struktur wurde nicht untersucht. Vom rekurrenten Nerv (RN), der über FNV und FK mit dem AN verbunden ist, zweigt posterior des FNV der Kropfnerv (KN) ab, der vermutlich Streckrezeptoren des Kropfes (K) innerviert.

***Drosophila virilis*:** Im Gegensatz zu *Calliphora vicina* besitzt der AN von *Drosophila virilis* keine weiteren Nervenabzweigungen bis auf das FK und keine neuronale Anastomose zum MN. Hingegen weist das FK zwei Nervenabzweigungen (FK/I und II) auf. FK/I entspringt in unmittelbarer Umgebung der neuronalen Anastomose zwischen dem FK und MN (A/FK-MN) und endet am ventralen Arm. Die physiologische Funktion von FK/I ist nicht untersucht. Lateral der FNV entspringt FK/II, dessen Innervationsziel in der anatomischen Untersuchung nicht bestimmt werden konnte. Bei *Drosophila virilis* existiert, wie bei *Calliphora vicina*, eine neuronale Anastomose zwischen dem AN und FK (A/AN-FK), die lateral auf Höhe der FNV liegt.

***Drosophila melanogaster*:** Der AN von *Drosophila melanogaster* besitzt außer den FK keine weiteren Nervenabzweigungen. Das FK besitzt drei Nervenabzweigungen (FK/I-III). FK/I entspringt, wie bei *Drosophila virilis*, in der Umgebung der neuronalen Anastomose zwischen dem FK und dem MN (A/FK-MN) und innerviert eine Struktur am ventralen Arm. Welche Funktion das Innervationsziel hat, ist unbekannt. FK/II innerviert den Oesophagus. FK/IIIa und b entspringen lateral zur FNV aus dem FK und projizieren nach anterior. In ihrem Verlauf fusionieren beide Nervenäste (FK/IIIa und b) zum FK/III, der den Oesophagus innerviert. Die physiologische Funktion der oesophagealen Innervationen durch den FK sind nicht untersucht worden. Zwei feine Nervenäste entspringen aus FK/IIIa und FK/IIIb. Die Innervationsziele der Nervenäste konnten nicht bestimmt werden. Im Gegensatz zu *Calliphora vicina* und *Drosophila virilis* ist eine neuronale Anastomose zwischen dem AN und dem FK (A/AN-FK) nicht vorhanden.

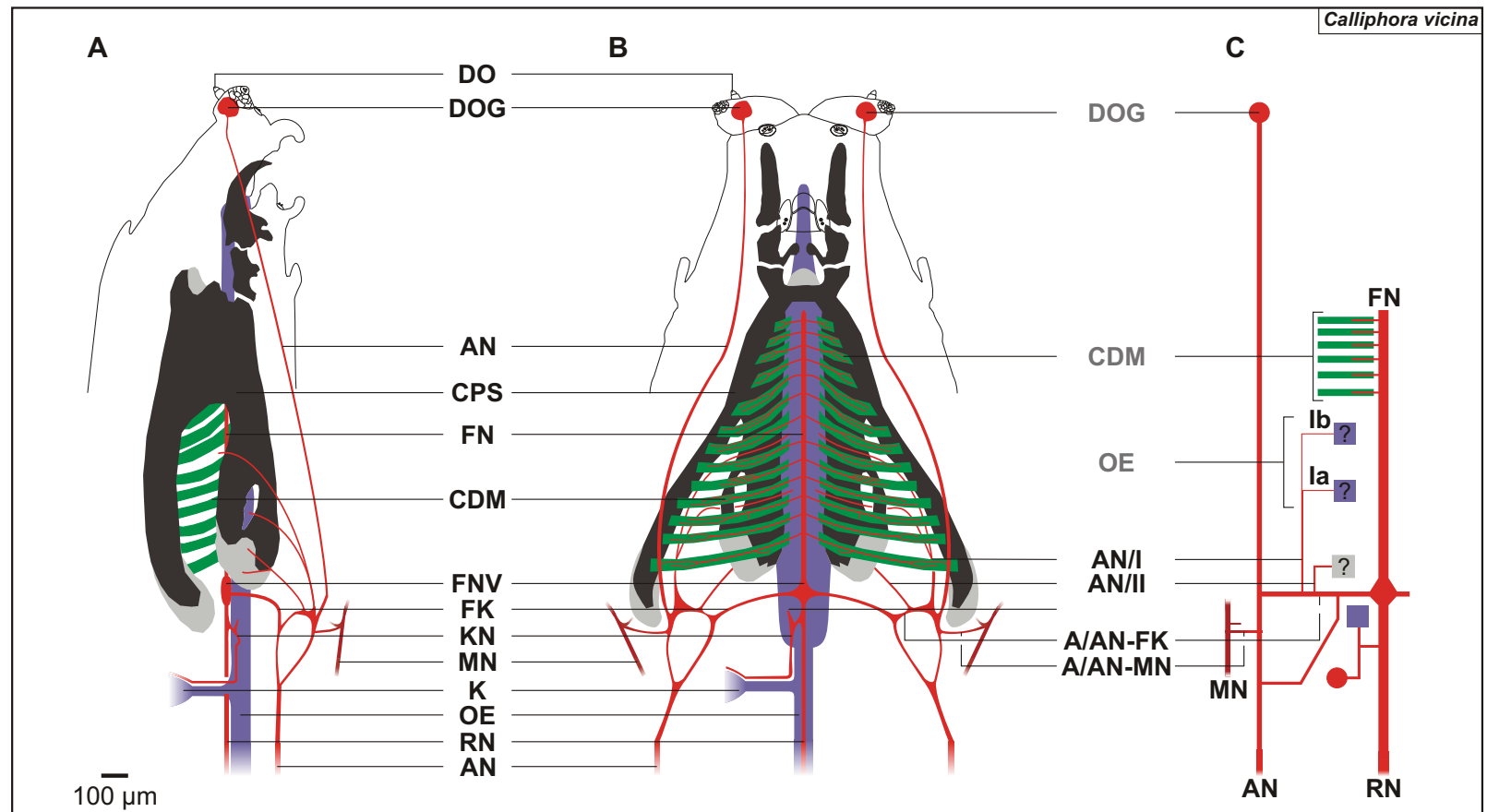


Abb. 3.6: Antennalnerv (AN) von *Calliphora vicina*; **A:** Lateral Ansicht des AN; **B:** Dorsal Ansicht des AN; **C:** Schematische Darstellung des neuronalen Verzweigungsmusters des AN (motorische Innervationsziele (Balken), sensorische Innervationsziele (Kreise), Innervationsziele mit unbekannter Funktion (Rechtecke mit Fragezeichen), alle Innervationsziele sind farbcodiert); verwendete Abk.: AN - Antennalnerv, AN/I und II - Erste und zweite Abzweigung des Antennalnervs, A/AN-FK - Neuronale Anastomose des Antennalnervs und Frontalkonnektivs, A/AN-MN - Neuronale Anastomose zwischen Antennal- und Maxillarnerv, CDM - Cibariae Dilatormuskulatur, CPS - Cephalopharyngeales Skelett, DO - Dorsalorgan, DOG - Dorsalorganganglion, FK - Frontalkonnektiv, FN - Frontalnerv, FNV - Frontale Nervenverbindung, K - Kropf, KN - Kropfnerv, MN - Maxillarnerv, OE - Oesophagus, RN - Rekurruenter Nerv.

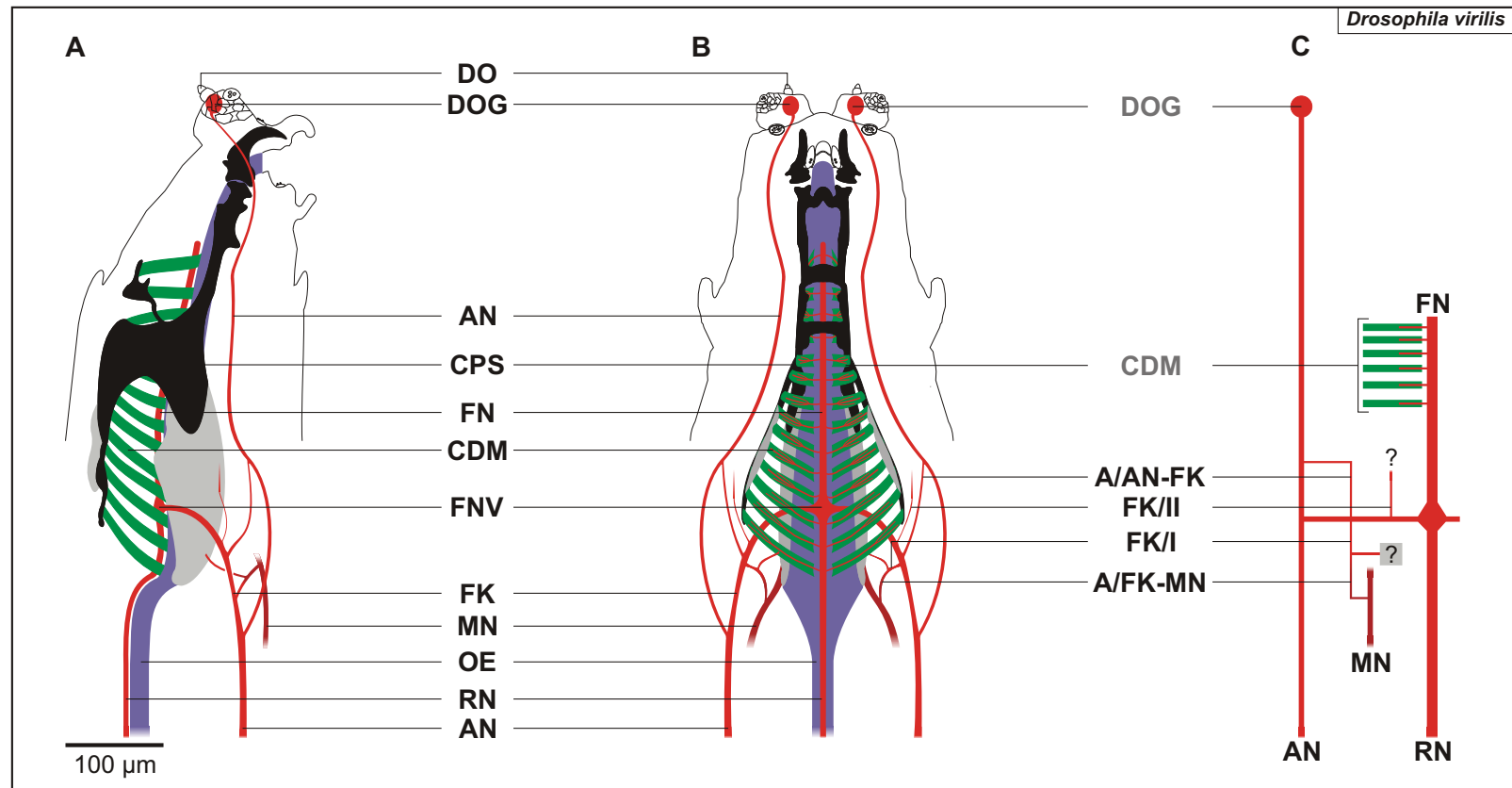


Abb. 3.7: Antennalnerv (AN) von *Drosophila virilis*; **A:** Lateral Ansicht des AN; **B:** Dorsal Ansicht des AN; **C:** Schematische Darstellung des neuronalen Verzweigungsmusters des AN (motorische Innervationsziele (Balken), sensorische Innervationsziele (Kreise), Innervationsziele mit unbekannter Funktion (Rechtecke mit Fragezeichen), alle Innervationsziele sind farbcodiert, unbekannte neuronale Projektionen (Fragezeichen)); verwendete Abk.: AN - Antennalnerv, A/AN-FK - Neuronale Anastomose des Antennalnervs und Frontalkonnectivs, A/FK-MN - Neuronale Anastomose des Frontalkonnectivs und Maxillarnervs, CDM - Cibariale Dilatormuskulatur, CPS - Cephalopharyngeales Skelett, DO - Dorsalorgan, DOG - Dorsalorganganglion, FK - Frontalkonnectiv, FK/I und II - Erste und zweite Abzweigung des Frontalkonnectivs, FN - Frontalnerv, FNV - Frontale Nervenverbindung, MN - Maxillarnerv, OE - Oesophagus, RN - Rekurrenter Nerv.

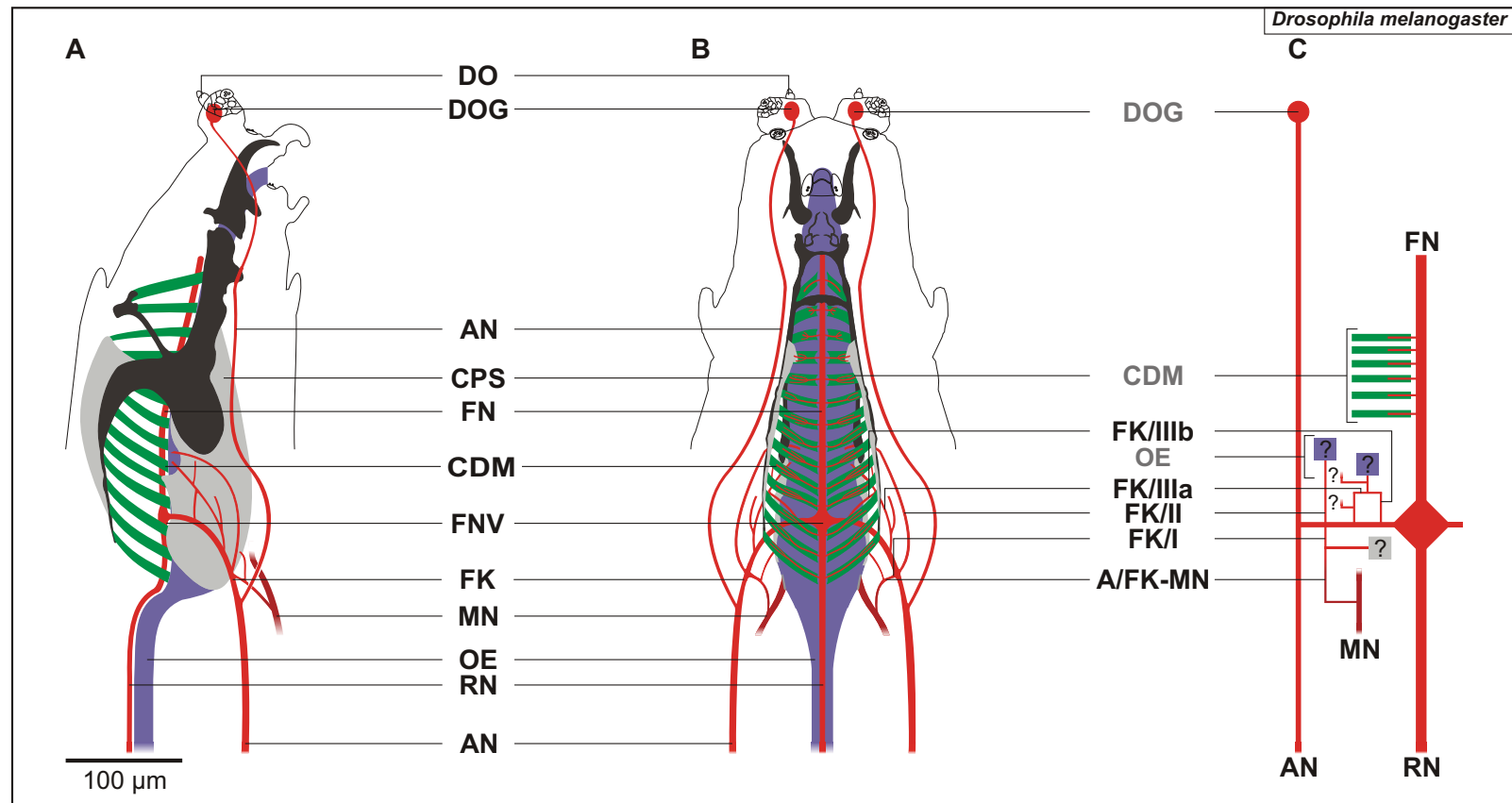


Abb. 3.8: Antennalnerv (AN) von *Drosophila melanogaster*; **A:** Lateral Ansicht des AN; **B:** Dorsal Ansicht des AN; **C:** Schematische Darstellung des neuronalen Verzweigungsmusters des AN (motorische Innervationsziele (Balken), sensorische Innervationsziele (Kreise), Innervationsziele mit unbekannter Funktion (Rechtecke mit Fragezeichen), alle Innervationsziele sind farbcodiert, unbekannte neuronale Projektionen (Fragezeichen)); verwendete Abk.: **AN** - Antennalnerv, **A/FK-MN** - Neuronale Anastomose des Frontalkonnectivs und Maxillarnervs, **CDM** - Cibariale Dilatormuskulatur, **CPS** - Cephalopharyngeales Skelett, **DO** - Dorsalorgan, **DOG** - Dorsalorganganglion, **FK** - Frontalkonnectiv, **FK/I bis III** - Erste bis dritte Abzweigung des Frontalkonnectivs, **FN** - Frontalnerv, **FNV** - Frontale Nervenverbindung, **MN** - Maxillarnerv, **OE** - Oesophagus, **RN** - Rekurrenter Nerv.

3.2.2.2 Maxillarnerv

Allgemeines Innervationsschema

Der paarige Maxillarnerv (MN; *Calliphora vicina*: Abb. 3.9, *Drosophila virilis*: Abb. 3.10 und *Drosophila melanogaster*: Abb. 3.11) entspringt ventral zum Antennalnerv (AN) aus dem suboesophagialen Bereich des zentralen Nervensystems. Er projiziert nach anterior entlang des cephalopharyngealen Skeletts (CPS), wobei er durch die Spalträume zwischen den Muskelbündeln der Mundhakenmuskulatur verläuft. Der MN endet im Ganglion (TOG) des Terminalorgans (TO), das auf dem cephalen Lobus positioniert ist. Das TO setzt sich aus sensorischen Rezeptoren unterschiedlicher Modalität zusammen. Der MN besitzt bis zu sechs Nervenabzweigungen, die motorische und sensorische Strukturen der Larven-Arten innervieren. Die motorischen Ziele des MN sind die Mundhakenmuskulatur (MHD und MHE) und der Labialretraktor (LR). Die sensorischen Innervationsziele sind das TO, das Ventralorgan (VO) und das Labialorgan (LO). Das VO ist ventral am cuticulären Übergang zwischen den cephalen Loben und dem Pseudocephalon der Larven lokalisiert. Das LO liegt lateral des unpaarigen Labiums.

Artspezifisches Innervationsschema

***Calliphora vicina*:** Der Maxillarnerv (MN) besitzt eine neuronale Anastomose (A/MN-AN) mit dem Antennalnerv (AN). Insgesamt hat der MN sechs Nervenabzweigungen (MN/I-VI). MN/I entspringt direkt neben der A/MN-AN und innerviert eine Struktur im posterioren Bereich des ventralen Arms. MN/II projiziert nach anterior und verläuft zwischen der Mundhakenmuskulatur entlang der Außenseite des cephalopharyngealen Skeletts (CPS). In seinem Verlauf zweigt sich der MN/II in drei feine Nervenäste (MN/IIa-c) auf. MN/IIa innerviert ein Muskelbündel des Mundhakenelevators (MHE), MN/IIb innerviert das Labialorgan (LO) und MN/IIc projiziert auf den Labialretraktor (LR) und ein Muskelbündel des MHE. MN/III projiziert nach anterior und innerviert das äußere paarige Muskelbündel des Mundhakendepressors (MHD). Auf gleicher Höhe wie MN/III zweigt MN/IV vom MN ab, der auf eines der inneren Muskelbündel des MHD projiziert. MN/V verläuft nach anterior und innerviert das innere paarige Muskelbündel des MHD. MN/VI entspringt posterior zur Innervation des TOG aus dem MN und projiziert zum Ganglion des VO.

***Drosophila virilis*:** Der MN besitzt posterior zum CPS eine neuronale Anastomose zum FK (A/MN-FK). Unterhalb des CPS zweigt vom MN zwei feine Nerven, MN/I und MN/II, ab. MN/I verläuft außen am CPS entlang nach anterior und innerviert über drei feine Nervenäste das innere paarige Muskelbündel des MHD (MN/Ia-c) sowie über einen weiteren Nervenast den LR (MN/Id). MN/II hat einen ähnlichen Verlauf. Er innerviert

neben einem inneren Muskelbündel des MHD das LO. Anterior von MN/II innerviert der MN über zwei feine neuronale Projektionen die äußere Muskelgruppe des MHD. Ungefähr auf Höhe der dorsalen Brücke des CPS entspringt MN/III aus dem MN und innerviert den MHE. Eine Innervation des Ventralorganganglions durch den MN konnte nicht identifiziert werden.

Drosophila melanogaster: Posterior zum CPS hat der MN eine neuronale Verbindung (A/MN-FK) zum FK. Der MN von *Drosophila melanogaster* besitzt drei neuronale Verzweigungen (MN/I bis MN/III). MN/I und MN/II entspringen auf Höhe des ventralen Arms des CPS aus dem MN. Die erste Abzweigung des MN (MN/I) innerviert über feine neuronale Projektionen einen der inneren Muskelbündel des MHD und den LR. Der weitere Verlauf des MN/I konnte nicht anatomisch bestimmt werden. MN/II verläuft anterior entlang der Außenseite des CPS und innerviert über feine Nervenäste den MHE und das LO. Die dritte Abzweigung des MN (MN/III), dessen komplettes Projektionsmuster nicht identifiziert werden konnten, innerviert über einen feinen Seitenast ein Muskelbündel des MHD. Das äußere, paarige Muskelbündel des MHD wird über zwei feine neuronale Projektionen des MN direkt innerviert. Die Projektionen auf einen inneren Muskel des MHD und das VO konnten nicht anatomisch bestimmt werden.

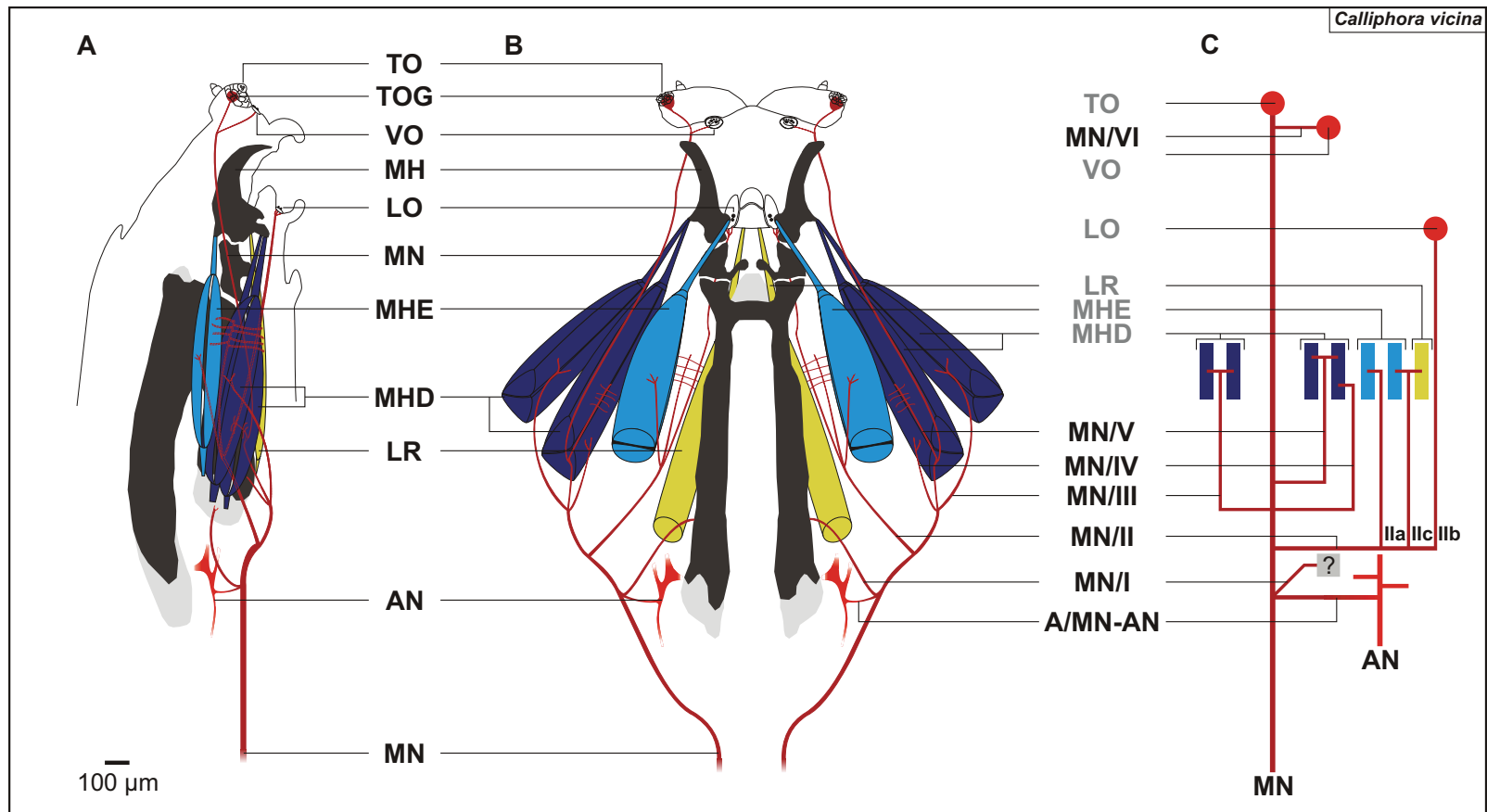


Abb. 3.9: Maxillarnerv (MN) von *Calliphora vicina*; **A:** Lateral Ansicht des MN; **B:** Dorsal Ansicht des MN; **C:** Schematische Darstellung des Projektionsmusters des MN (motorische Innervationsziele (Balken), sensorische Innervationsziele (Kreise), Innervationsziele mit unbekannter Funktion (Rechtecke mit Fragezeichen), alle Innervationsziele sind farbcodiert); verwendete Abk.: **AN** - Antennalnerv, **A/MN-AN** - Neuronale Anastomose des Maxillar- und Antennalnervs, **LO** - Labialorgan, **LR** - Labialretraktor, **MHD** - Mundhakendepressor, **MHE** - Mundhakenelevator, **MH** - Mundhaken, **MN** - Maxillarnerv, **MN/I** bis **VI** - Erste bis sechste Abzweigung des Maxillarnervs, **TO** - Terminalorgan, **TOG** - Terminalorganganglion, **VO** - Ventralorgan.

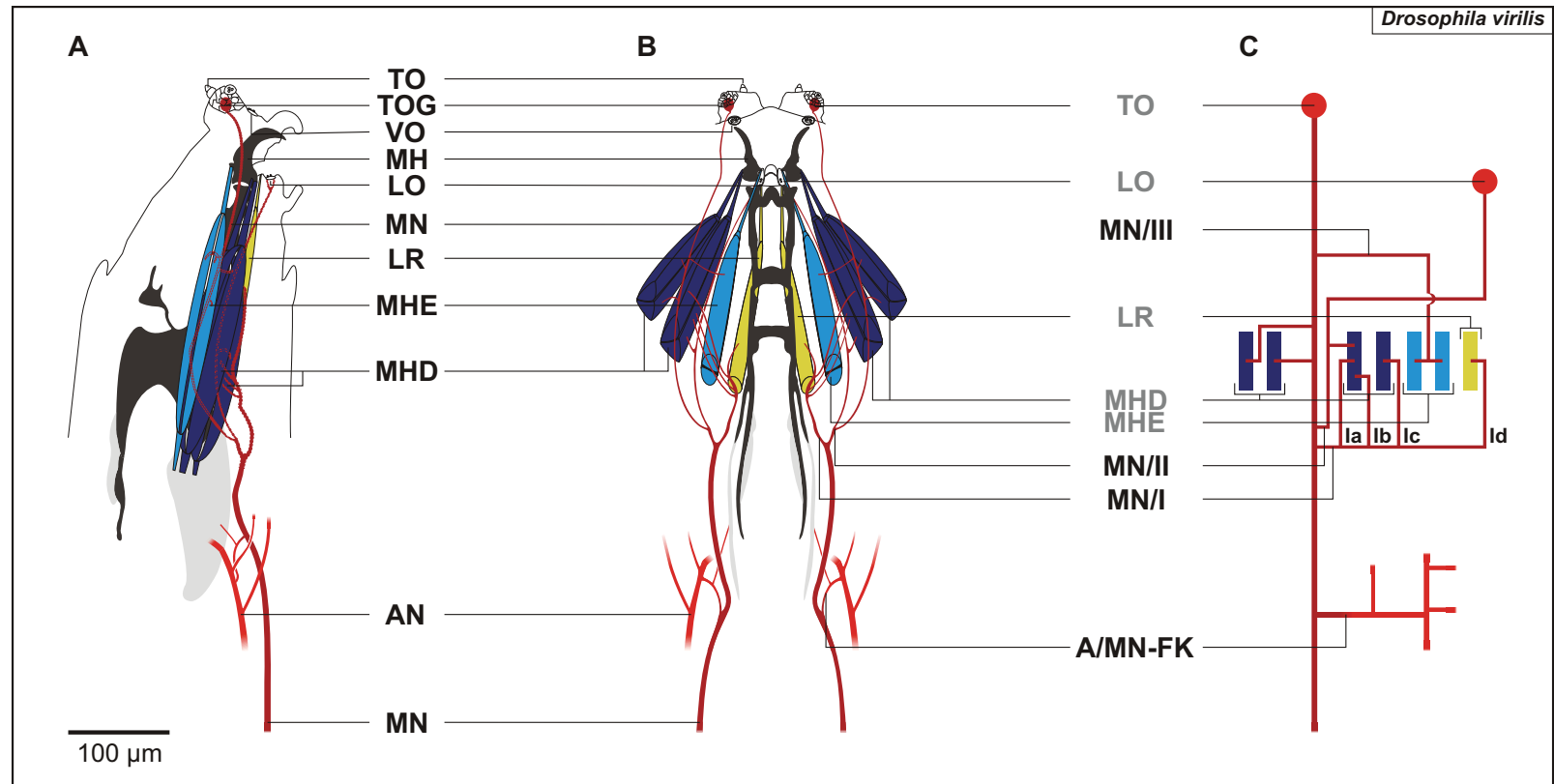


Abb. 3.10: Maxillarnerv (MN) von *Drosophila virilis*; **A:** Lateral Ansicht des MN; **B:** Dorsal Ansicht des MN; **C:** Schematische Darstellung des Projektionsmusters des MN (motorische Innervationsziele (Balken), sensorische Innervationsziele (Kreise), Innervationsziele mit unbekannter Funktion (Rechtecke mit Fragezeichen), alle Innervationsziele sind farbcodiert, unbekannte neuronale Projektionen (Fragezeichen)); verwendete Abk.: **AN** - Antennalnerv, **A/MN-FK** - Neuronale Anastomose des Maxillarnervs und Frontalkonnectivs, **LO** - Labialorgan, **LR** - Labialretraktor, **MHD** - Mundhakendepressor, **MHE** - Mundhakenelevator, **MH** - Mundhaken, **MN** - Maxillarnerv, **MN/I** bis **III** - Erste bis dritte Abzweigung des Maxillarnervs, **TO** - Terminalorgan, **TOG** - Terminalorganganglion, **VO** - Ventralorgan.

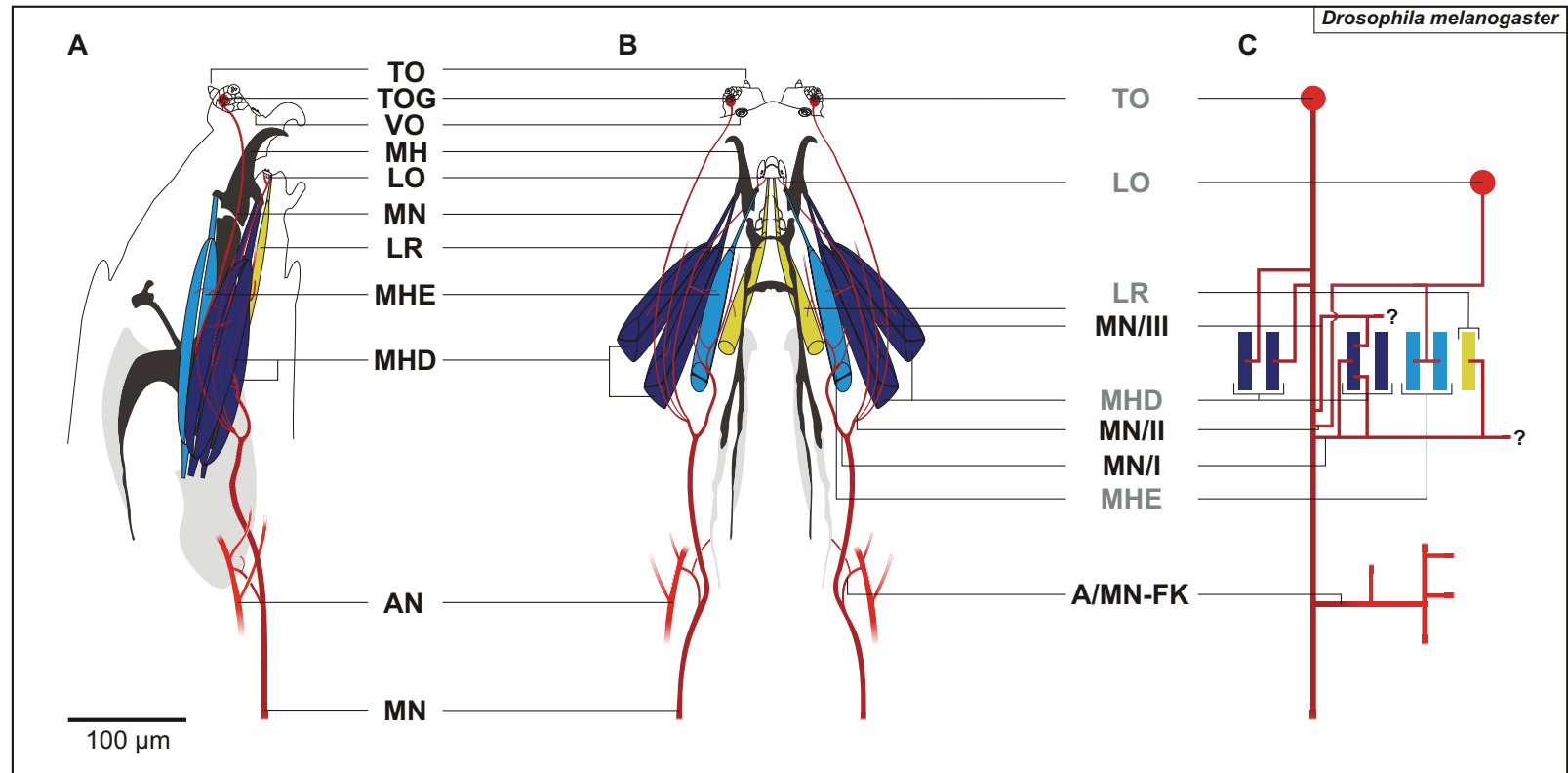


Abb. 3.11: Maxillarnerv(MN) von *Drosophila melanogaster*; **A:** Lateral Ansicht des MN; **B:** Dorsal Ansicht des MN; **C:** Schematische Darstellung des Projektionsmusters des MN (motorische Innervationsziele (Balken), sensorische Innervationsziele (Kreise), Innervationsziele mit unbekannter Funktion (Rechtecke mit Fragezeichen), alle Innervationsziele sind farbcodiert, unbekannte neuronale Projektionen (Fragezeichen)); verwendete Abk.: AN - Antennalnerv, A/MN-FK - Neuronale Anastomose des Maxillarnervs und Frontalkonnectivs, LO - Labialorgan, LR - Labialretraktor, MHD - Mundhakendepressor, MHE - Mundhakenelevator, MH - Mundhaken, MN - Maxillarnerv, MN/I bis III - Erste bis dritte Abzweigung des Maxillarnervs, TO - Terminalorgan, TOG - Terminalorganganglion, VO - Ventralorgan.

3.2.2.3 Akzessorischer Prothorakalnerv

Allgemeines Innervationsschema

Der akzessorische Prothorakalnerv (PaN; *Calliphora vicina*: Abb. 3.12, *Drosophila virilis*: Abb. 3.13 und *Drosophila melanogaster*: Abb. 3.14), benannt nach Ludwig [1949] und Nässel & Cantera [1985], entspringt lateral aus dem suboesophagealen Bereich des zentralen Nervensystems und projiziert nach anterior in den Prothorax. Bei allen drei Arten existiert die Nervenabzweigung, PaN/I, die posterior zum CPS die Aorta innerviert. Die Aorta ist über die Ringdrüse mit dem kontraktilem Herz(-schlauch) verbunden. Sie endet offen im Innenraum des CPS. Der PaN innerviert über bis zu fünf Projektionen zwei der CPS-Protraktoren, den dorsalen Protraktor A ($Pro_{do}A$) und B ($Pro_{do}B$). Beide Muskeln gehören zur akzessorischen pharyngealen Muskulatur. Das einzige potentielle sensorische Innervationsziel des PaN ist das Bolwigorgan (BO). Das BO besteht aus bis zu 12 photosensitiven Rezeptoren, die über den optischen Nerv (Bolwignerv) mit dem zentralen Nervensystem verbunden sind. Es bildet das Lichtsinnesorgan der Larve, das für das phototaxische Verhalten verantwortlich ist.

Der PaN besitzt eine neuronale Anastomose (A/PaN-PN) zum Prothorakalnerv (PN), die bei allen untersuchten Dipteren-Larven vorhanden ist, aber an unterschiedlichen Stellen aus dem PaN entspringt. Der PN entspringt ventral aus dem zentralen Nervensystem und innerviert hauptsächlich die Körperwandmuskulatur des Prothorax, aber vermutlich auch sensorische Strukturen in der Cuticula. Das Projektionsmuster des PN war nicht Gegenstand der anatomischen Untersuchung.

Artspezifisches Innervationsschema

***Calliphora vicina*:** Entlang des CPS entspringen mehrere feine Projektionen aus dem PaN, die zuerst den $Pro_{do}B$ und dann den $Pro_{do}A$ innervieren. Elektrophysiologische Experimente zeigten jedoch, dass der $Pro_{do}B$ durch den PN, wohingegen der $Pro_{do}A$ durch den PaN innerviert wird (siehe Kapitel 3.3.1.3). Basierend auf diesen Ergebnissen gehört der Nervenabschnitt zwischen PaN und PN physiologisch betrachtet zu beiden Nerven (PaN-PN). Aus diesem Nervenabschnitt entspringt der PaN/II und innerviert vermutlich das Bolwigorgan (BO). Das komplette anteriore Projektionsmuster des PaN konnte in der anatomischen Untersuchung nicht geklärt werden.

***Drosophila virilis*:** Im Bereich des CPS entspringt eine Nervenabzweigung aus dem PaN (PaN/II), die sich aufzweigt und sowohl den $Pro_{do}A$, als auch den $Pro_{do}B$ innerviert. Im Gegensatz zu den anatomischen Verhältnissen des PaN bei *Calliphora vicina* wird das BO bei *Drosophila virilis* vom PaN und nicht von einem Seitenast innerviert.

***Drosophila melanogaster*:** Insgesamt besitzt der PaN von *Drosophila melanogaster* drei Nervenabzweigungen (PaN/I bis PaN/III). Neben PaN/I münden auf Höhe des CPS die zwei anderen Seitenäste PaN/II und PaN/III aus dem PaN. PaN/II besitzt ein ähnliches neuronales Verzweigungsmuster wie der PaN von *Drosophila virilis* und innerviert den Pro_{do}A und Pro_{do}B. Anterior zur neuronalen Anastomose von PaN und PN entspringt der Seitenast PaN/III aus dem Nerv. Der neuronale Verlauf und die Innervationsziele des PaN/III konnte in der anatomischen Studie nicht aufgeklärt werden.

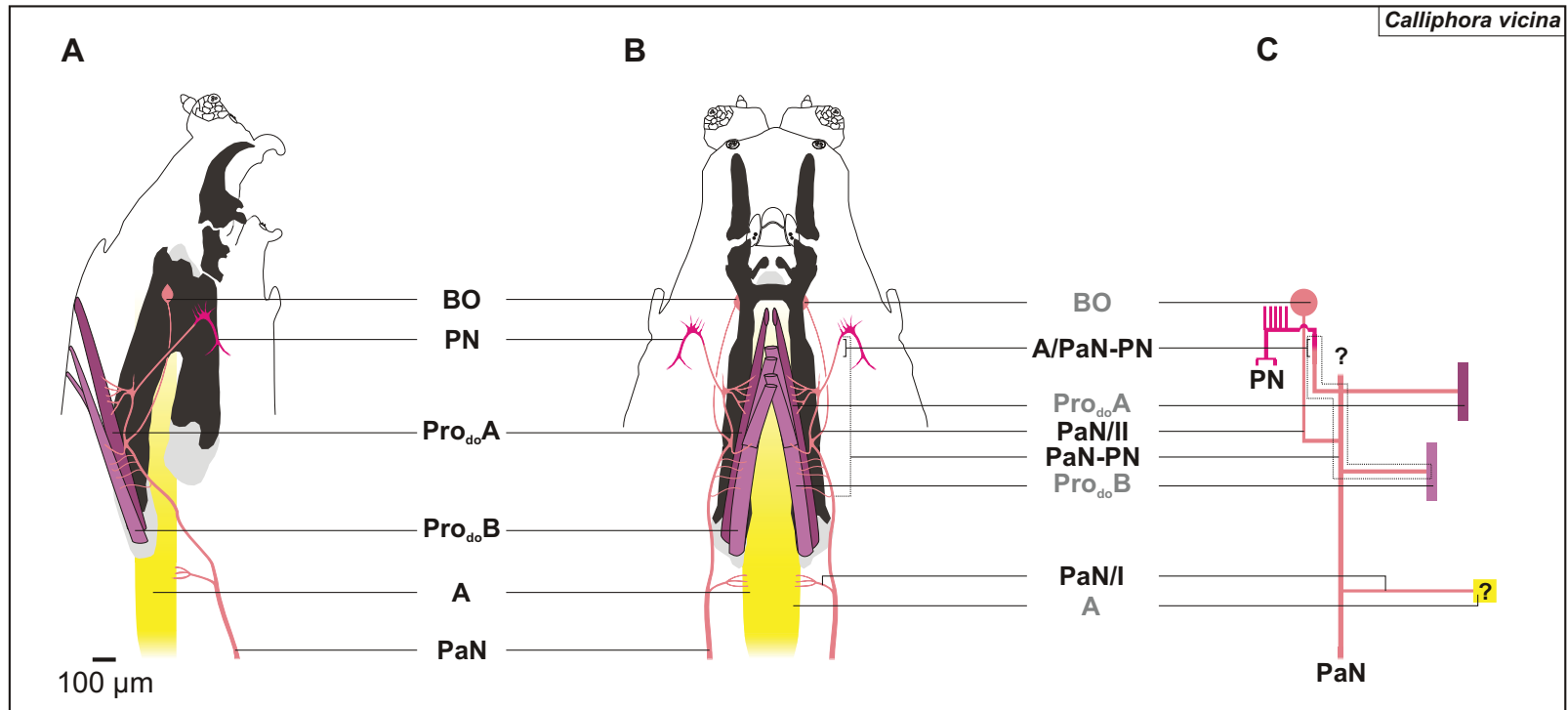


Abb. 3.12: Akzessorischer Prothorakalnerv (PaN) von *Calliphora vicina*; **A:** Lateral Ansicht des PaN; **B:** Dorsal Ansicht des PaN; **C:** Schematische Darstellung des Verzweigungsmusters des PaN (motorische Innervationsziele (Balken), sensorische Innervationsziele (Kreise), Innervationsziele mit unbekannter Funktion (Rechtecke mit Fragezeichen), alle Innervationsziele sind farbcodiert, unbekannte neuronale Projektionen (Fragezeichen)); verwendete Abk.: **A** - Aorta, **A/PaN-PN** - Neuronale Anastomose des akzessorischen Prothorakal- und Prothorakalnervs, **BO** - Bolwigorgan, **PaN** - Akzessorischer Prothorakalnerv, **PaN-PN** - neuronaler Bereich des akzessorischen Prothorakal- und Prothorakalnervs, **PaN/I** und **II** - Erste und zweite Abzweigung des akzessorischen Prothorakalnervs, **PN** - Prothorakalnerv, **Pro_{do}A** - Dorsaler Protraktormuskel A, **Pro_{do}B** - Dorsaler Protraktormuskel B.

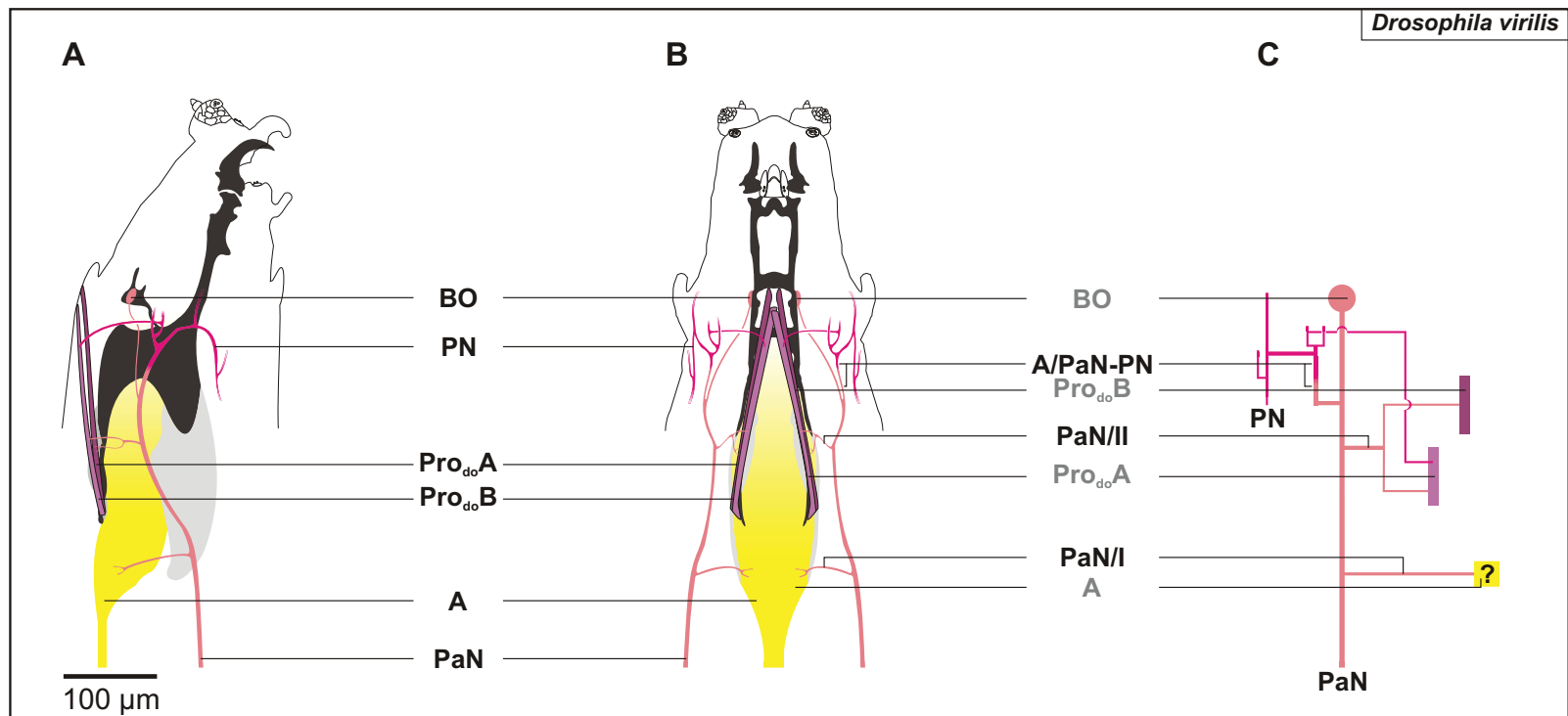


Abb. 3.13: Akzessorischer Prothorakalnerv (PaN) von *Drosophila virilis*; **A:** Lateral Ansicht des PaN; **B:** Dorsal Ansicht des PaN; **C:** Schematische Darstellung des Verzweigungsmusters des PaN (motorische Innervationsziele (Balken), sensorische Innervationsziele (Kreise), Innervationsziele mit unbekannter Funktion (Rechtecke mit Fragezeichen), alle Innervationsziele sind farbcodiert); verwendete Abk.: **A** - Aorta, **BO** - Bolwigorgan, **PaN** - Akzessorischer Prothorakalnerv, **PaN-PN** - neuronaler Bereich des akzessorischen Prothorakal- und Prothorakalnervs, **PaN/I** und **II** - Erste und zweite Abzweigung des akzessorischen Prothorakalnervs, **PN** - Prothorakalnerv, **Pro_{do}A** - Dorsaler Protraktormuskel A, **Pro_{do}B** - Dorsaler Protraktormuskel B.

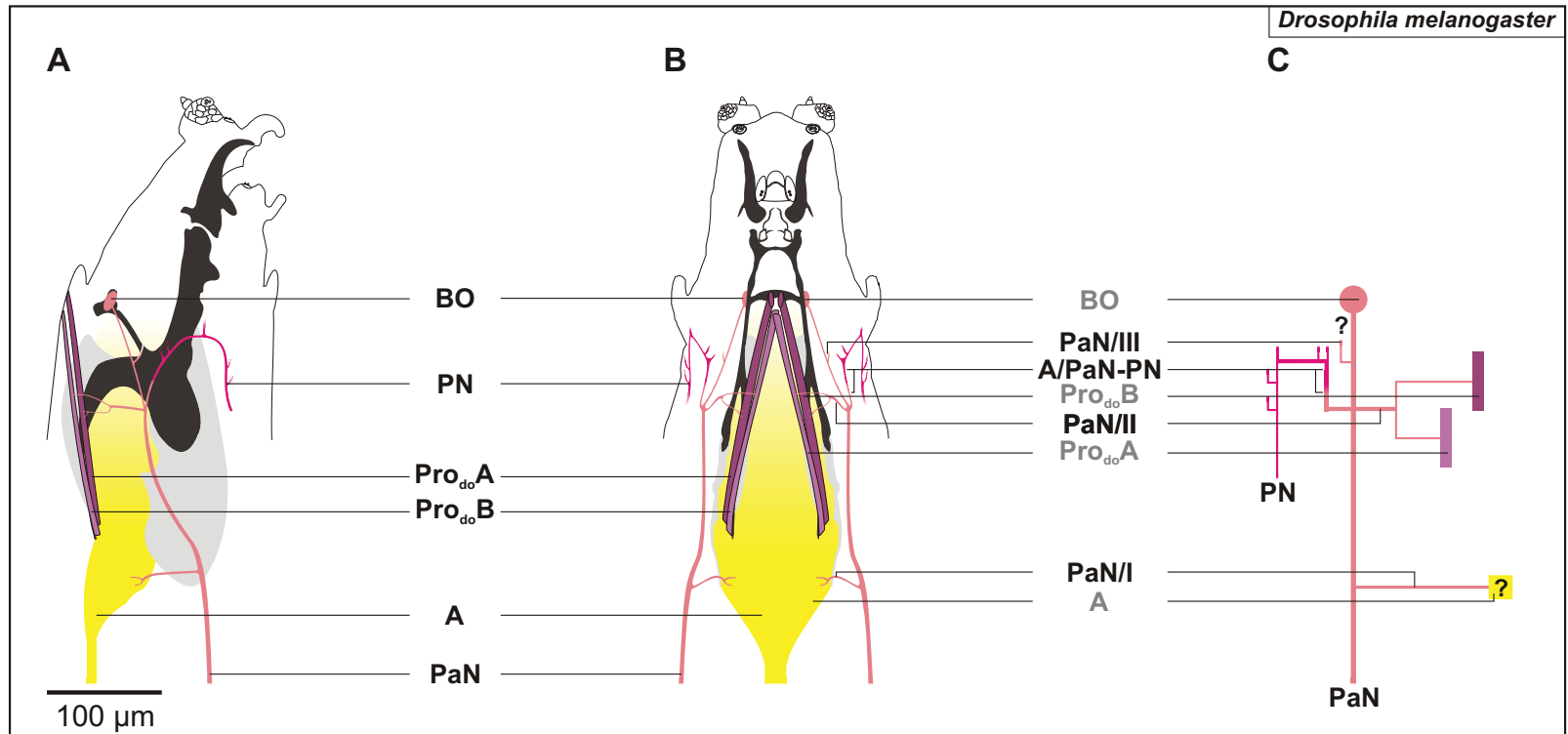


Abb. 3.14: Akzessorischer Prothorakalnerv (PaN) von *Drosophila melanogaster*; **A:** Lateral Ansicht des PaN; **B:** Dorsal Ansicht des PaN; **C:** Schematische Darstellung des Verzweigungsmusters des PaN (motorische Innervationsziele (Balken), sensorische Innervationsziele (Kreise), Innervationsziele mit unbekannter Funktion (Rechtecke mit Fragezeichen), alle Innervationsziele sind farbcodiert); verwendete Abk.: **A** - Aorta, **BO** - Bolwigorgan, **PaN** - Akzessorischer Prothorakalnerv, **PaN-PN** - neuronaler Bereich des akzessorischen Prothorakal- und Prothorakalnervs, **PaN/I** bis **III** - Erste bis dritte Abzweigung des akzessorischen Prothorakalnervs, **PN** - Prothorakalnerv, **Pro_{do}A** - Dorsaler Protraktormuskel A, **Pro_{do}B** - Dorsaler Protraktormuskel B.

3.2.3 Retrograde axonale Füllung der Nerven von *Calliphora vicina*

Bei den L3-Larven von *Calliphora vicina* wurden retrograde axonale Füllungen mit Kobaltchlorid (CoCl) oder Kobalt-Lysin (CoLy) des Antennal- (AN), des Frontal- (FN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) durchgeführt, um die ungefähre Position der Somata im zentralen Nervensystem zu bestimmen und erste Aufschlüsse über die zentralen Projektionsmuster der entsprechenden Nerven zu erhalten.

Die Bestimmung der relativen Position der Somata im zentralen Nervensystem, bzw. Suboesophagialganglion, wurde mit dem Ziel durchgeführt, eventuell in weiterführenden Untersuchungen die Somata intrazellulär abzuleiten. Die dendritischen Projektionen der Somata sollten Hinweise über potentielle neuronale Interaktionen zwischen den verschiedenen sensorischen oder motorischen Subsystemen liefern.

Im Fall der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) konnten die Somata der Motorneurone selektiv über retrograde Füllung des FN bestimmt werden. Bei den Füllungen des MN und des PaN wurde jeweils der gesamte Nerv gefüllt, weshalb keine Aussage getroffen werden konnte, ob die Somata von motorischen oder sensorischen Neuronen angefärbt wurden.

3.2.3.1 Antennal- und Frontalnerv

Die retrograde axonale Füllungen des rechten und linken Antennalnervs (AN) von *Calliphora vicina* (siehe Abb. 3.15B) zeigten zwei symmetrisch angeordnete Zellverbände, die lateral zu den Eintrittsstellen der AN im suboesophagialen Bereich liegen. Latero-distal zu den beiden Zellgruppen sind verstreut einige Somata zu erkennen, die im Suboesophagialganglion lokalisiert sind. Insgesamt wurden bis zu 24 Somata angefärbt. Der Durchmesser der Zellkörper variierte zwischen 10 und 20 μm . Zwischen den linken und rechten Zellverband erstreckt sich eine dendritische, u-förmige Struktur. Des Weiteren projizieren dendritische Strukturen vom Zellverband parallel zur Mittellinie posterior durch das Suboesophagialganglion in Richtung des Ventralganglions. Die dendritischen Projektionen haben eine s-förmige Struktur, die sich im Verlauf der Mittellinie des zentralen Nervensystems annähert. Sie lassen keine Kreuzungspunkte zwischen den nach posterior verlaufenden dendritischen Projektion erkennen.

Für die selektive Lokalisation der Motorneurone der CDM wurde der unpaarige Frontalnerv (FN), der nur die Axone der CDM-Motorneurone enthält, retrograd gefüllt. Die Füllungen des FN bei *Calliphora vicina* (siehe Abb. 3.15C) zeigten zwei Zellverbände. Die Position der Somata im Zellverband, die durch eine Füllung des FN angefärbt wurden, ist mit denen der Füllungen des AN übereinstimmend. Die identifizierten Zellcluster bestanden aus ungefähr 7-8 Zellen. Bei den Füllungen des FN wurden keine Strukturen,

die den dendritischen Projektionen der Somata bei axonaler Füllung des AN entsprechen, gefüllt.

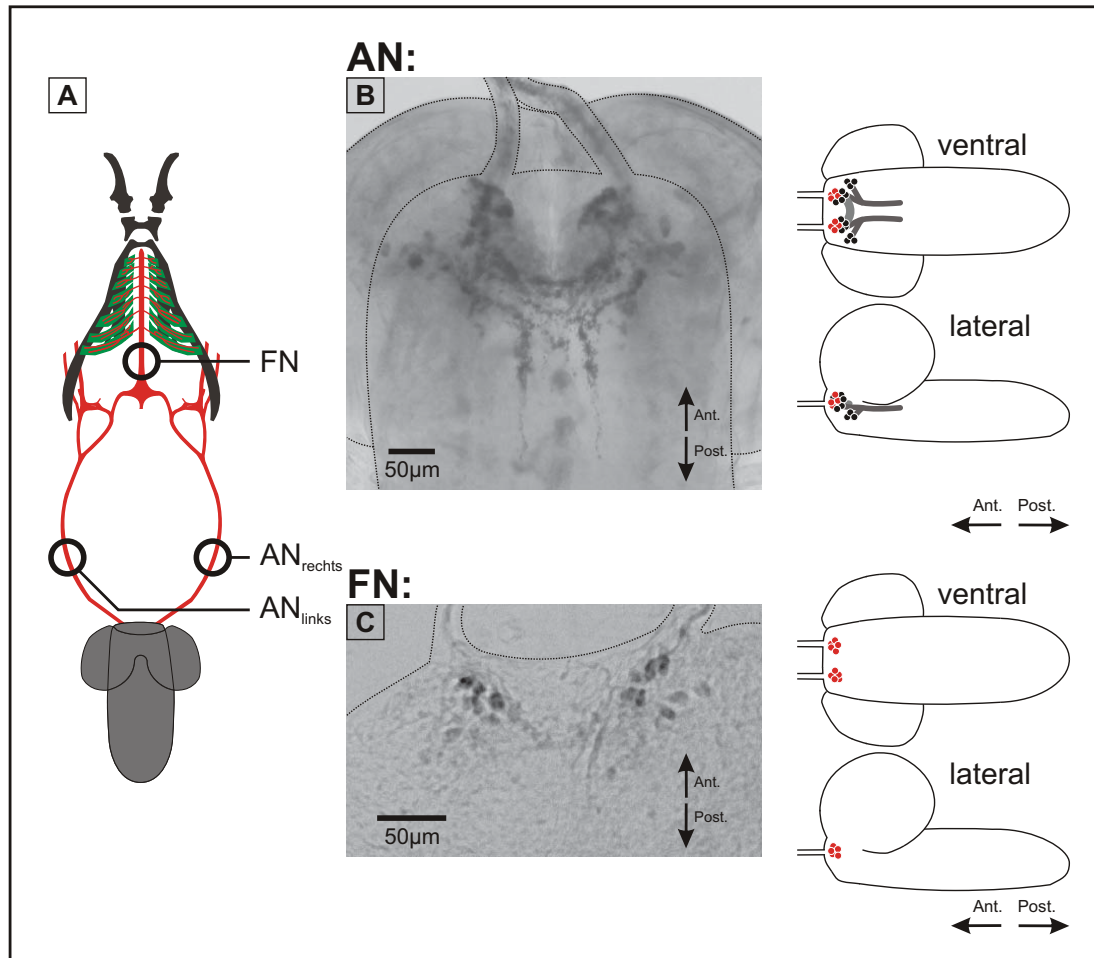


Abb. 3.15: Retrograde axonale Füllung beider Antennal- (AN) und des Frontalnervs (FN) von *Calliphora vicina*; **A:** Versuchsaufbau; **B:** Zwei symmetrisch angeordnete Zellverbände und dendritische Projektionen wurden bei Füllung beider AN angefärbt; die schematische Zeichnung verdeutlicht die Lage der dendritischen Projektionen (grau und dunkelgraue Linien) und der Somata (schwarze Kreise); aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden die Somata der retrograden axonalen Füllung des FN (Abb. 3.15C) auch in der schematischen Darstellung von Abb. 3.15B eingezeichnet; **C:** Bei Füllung des unpaarigen FN wurde eine Teilmenge der Somata des Zellverbandes (gezeigt in Abb. 3.15B) angefärbt. Diese Neurone projizieren durch den AN in den FN und innervieren die cibariale Dilatormuskulatur (CDM); die schematische Darstellung zeigt die relative Lage der Somata (rote Kreise).

3.2.3.2 Maxillarnerv

Bei den retrograden Füllungen des linken oder rechten Maxillarnervs (MN) von *Calliphora vicina* wurden unterschiedliche neuronale Strukturen im Suboesophagalganglion

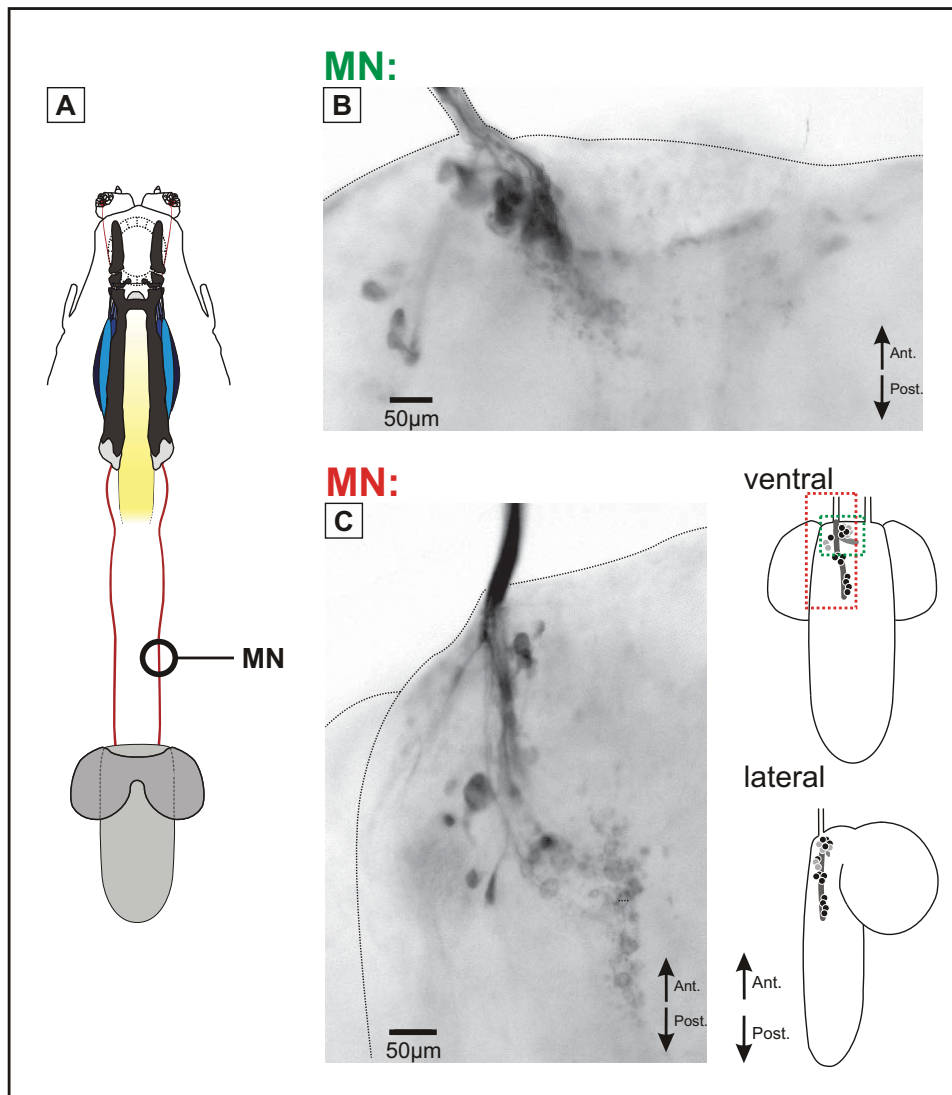


Abb. 3.16: Retrograde Füllung eines Maxillarnervs (MN) von *Calliphora vicina*, insgesamt konnten 13-21 Somata gefärbt werden; **A:** Versuchsaufbau; **B:** Ein großer Zellverband (8-10 Somata) liegt direkt an der Eintrittsstelle des MN in das Subesophagealganglion und ein kleiner Zellverband (3-4 Somata) liegt latero-distal; **C:** Zu erkennen sind Nervenfortsätze mit anterior-lateral gelegenen Somata und posterior liegen Somata zwischen den neuronalen Projektionen; die enthaltene schematische Darstellung verdeutlicht die relative Position der angefärbten Nervenfortsätze (grau und dunkelgrau Linien) und der Somata (Abb. 3.16A - schwarze Kreise, Abb. 3.16B - hellgraue Kreise) im zentralen Nervensystem; die rot gestrichelte Box symbolisiert den Fotoausschnitt in Abb. 3.16B und die grün gestrichelte Box symbolisiert den Fotoausschnitt in Abb. 3.16C.

markiert, welche die Gesamtheit der motorischen und sensorischen Neurone, die durch den MN projizieren, repräsentiert. In Abb. 3.16B ist posterio-lateral zur Eintrittsstelle des MN ins Suboesophagialganglion ein großer Zellverband, bestehend aus acht bis zehn Zellkörpern, zu erkennen. Ein weiteres, kleineres Zellcluster aus drei bis vier Zellen liegt latero-distal. Ausgehend vom großen Zellverband sind Nervenfortsätze sichtbar, die in einem Bogen nach lateral in Richtung der Mittellinie des Ganglions ziehen.

In Abb. 3.16C sind neuronale Projektionen zu erkennen, die aus dem linken Maxillarnerv entspringen und parallel zur Längsachse des zentralen Nervensystems posterior in Richtung des Ventralganglions ziehen. Die Projektionen besitzen einen s-förmigen Verlauf, der sich der Längsachse des zentralen Nervensystems annähert. Im anterioren Bereich sind mehrere Somata sichtbar, wohingegen im posterioren Bereich die Somata zwischen den neuronalen Projektionen lokalisiert sind.

Insgesamt konnten bei den retrograden axonalen Füllungen des linken oder rechten MN von *Calliphora vicina* 13 bis 21 Somata identifiziert werden. Die Zellkörper hatten einen Durchmesser von 10 bis 20 μm . Aufgrund der Füllung des gesamten MN kann keine Aussage getroffen werden, ob die angefärbten Somata sensorische oder motorische Neurone repräsentieren.

3.2.3.3 Akzessorischer Prothorakalnerv

Die retrograden Füllungen der akzessorischen Prothorakalnerven² (PaN) von *Calliphora vicina* (siehe Abb. 3.17B) zeigten 3-4 große Somata, die medio-lateral im Suboesophagialganglion positioniert waren. Diese Zellkörper besaßen einen Durchmesser von 12 bis 16 μm . Die dendritischen Projektionen der Somata hatten eine antero-posteriore Orientierung durch das Suboesophagialganglion und lagen lateral der angefärbten Zellkörper. Entlang der Längsachse des Suboesophagialganglions waren weitere kleinere Somata (Anzahl: \approx 3 bis 4) angefärbt worden, die einen Durchmesser von 8 bis 10 μm hatten. In direkter Umgebung zu den Somata waren vereinzelt neuronale Verzweigungen zu erkennen, die von anterior nach posterior durch das Suboesophagialganglion projizierten.

² Die retrograden Füllungen des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Ulrike Siebenaller erstellt.

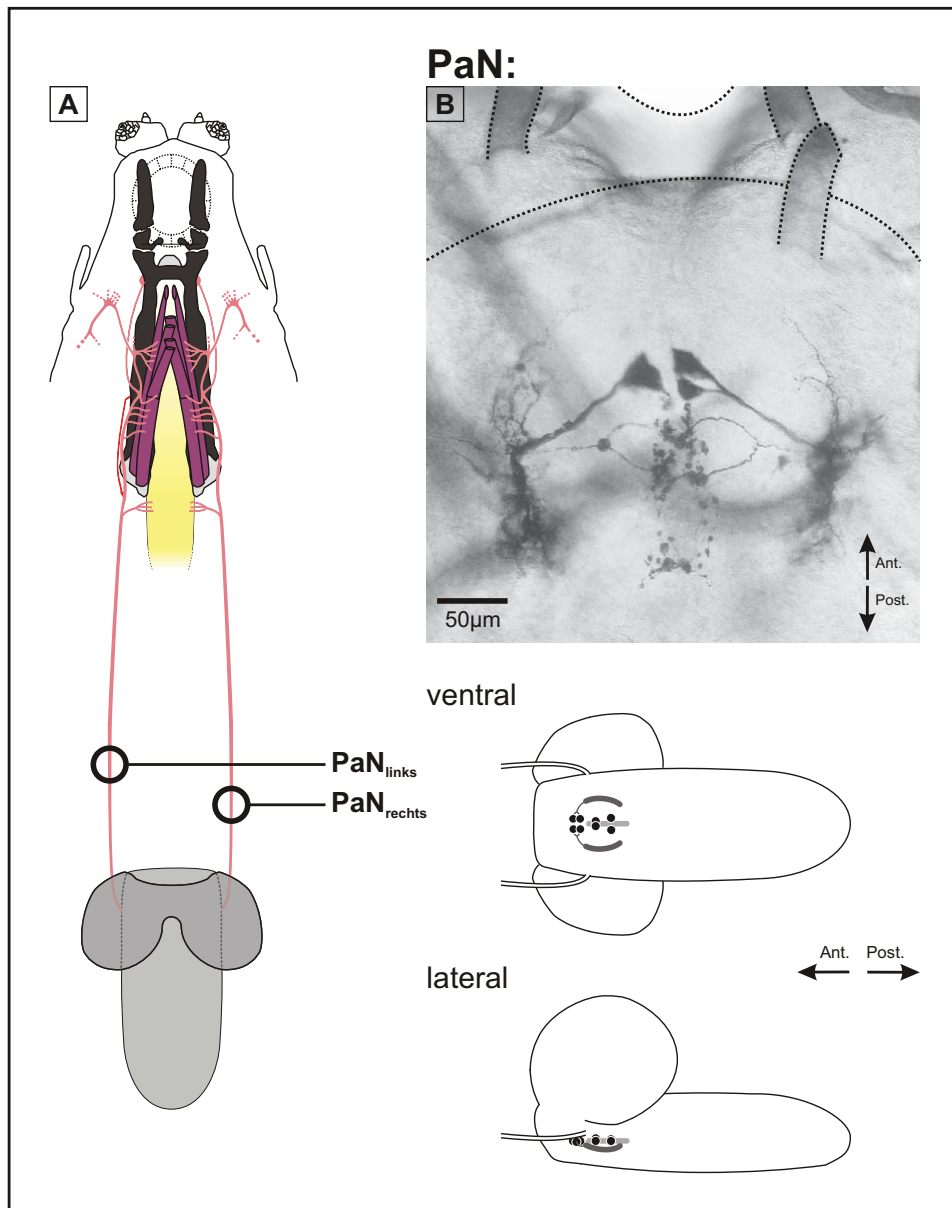


Abb. 3.17: Retrograde Füllung des rechten und linken akzessorischen Prothorakalnervs (**PaN**) von *Calliphora vicina*; **A:** Versuchsaufbau; **B:** auf dem Fotoausschnitt (angefertigt von U. Siebenaller) sind 3-4 große Somata medio-lateral im Suboesophagialganglion und 3-4 kleinere Somata entlang der Mittellinie des zentralen Nervensystems zu erkennen; neuronalen Projektionen weisen von anterior nach posterior und sind medial als auch lateral im Suboesophagialganglion vorhanden; die schematische Darstellung zeigt die relative Lage der neuronalen Projektionen (graue und dunkelgraue Linien) und der angefärbten Somata (schwarze Kreise).

3.2.4 Immunhistologie - *hugin*-Neurone und deren Projektionen bei *Calliphora vicina*

Die Somata im Suboesophagialganglion von *Calliphora vicina*, die durch die retrograde Füllung des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) mit Kobaltchlorid angefärbt wurden, ähneln in ihrer Lage und im Projektionsschema den *hugin*-Neuronen von *Drosophila melanogaster*, die in molekularbiologischen Untersuchungen nachgewiesen wurden [Melcher & Pankratz, 2005]. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurde versucht, durch eine Antikörperfärbung³ *hugin*-exprimierende Neurone im zentralen Nervensystem von *Calliphora vicina* und deren Projektionen durch den PaN nachzuweisen.

Die Abb. 3.18A zeigt 12 bis 14 *hugin*-positive Somata im Suboesophagialganglion von *Calliphora vicina*, die lateral zur medialen Längsachse des zentralen Nervensystems angeordnet sind. Die Projektionen von *hugin*-positiven Neurone ziehen in Form einer Schleife posterio-lateral durch das Suboesophagialganglion und verlassen das zentrale Nervensystem durch den PaN.

Die neuronalen Fortsätze der *hugin*-positiven Neurone im PaN ziehen nach anterior lateral entlang des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) (siehe Abb. 3.18B). Die Projektionen enden zwischen den Mundhaken und der dorsalen Brücke des CPS. Dies deutet daraufhin, dass die Fortsätze der *hugin*-positiven Neurone durch den PaN, über die neuronale Verbindung zwischen PaN und Prothorakalnerv (PN), in den PN projizieren. Das Innervationsziel der *hugin*-positiven Neurone konnte anhand der Antikörperfärbungen nicht bestimmt werden. Vermutlich innervieren sie einen Muskel des Prothorax von *Calliphora vicina*.

3 Die Antikörperfärbungen wurden in Zusammenarbeit mit Rüdiger Bader vom Institut für molekulare Biomedizin (LIMES-Institut) der Universität Bonn durchgeführt.

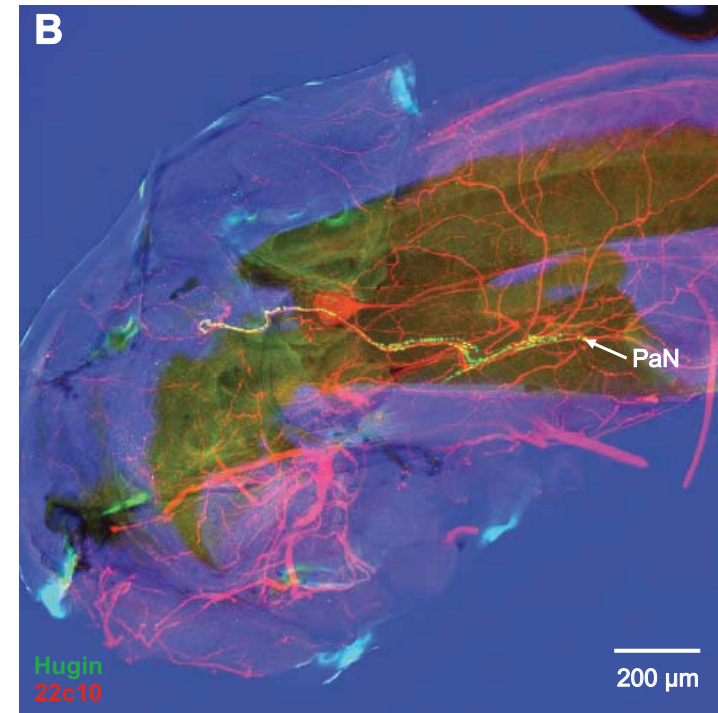
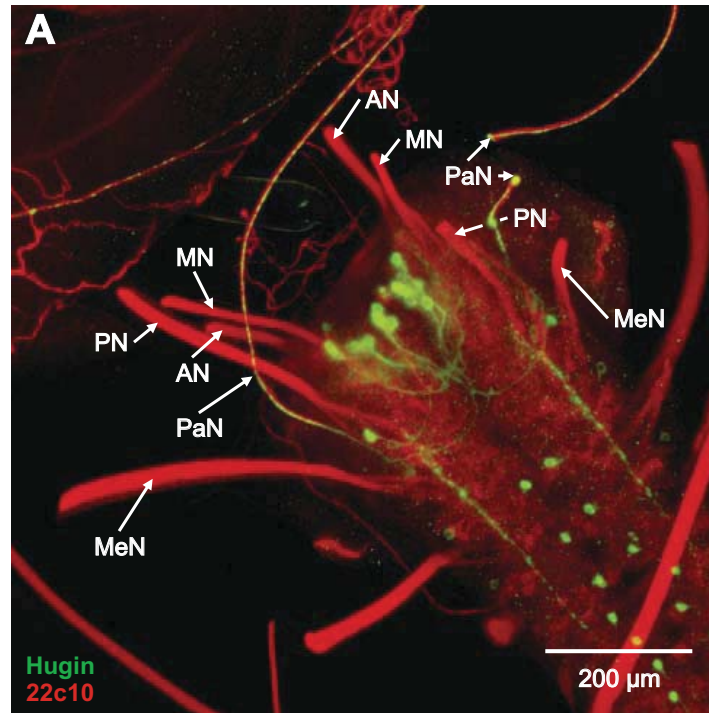


Abb. 3.18: Immunhistologischer Nachweis des Neuropeptids *hugin* im zentralen Nervensystem und akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) von *Calliphora vicina*; *hugin*-positive neuronale Strukturen fluoreszieren grün, Neuropil des Nervensystems (unspezifisch) fluoresziert rot **A:** Ventral Ansicht des zentralen Nervensystems; 12 bis 14 *hugin*-positive Neurone sind im Suboesophagialganglion zu erkennen, *hugin*-positive Neurone besitzen Projektionen, die in den PaN ziehen; **B:** Lateral Ansicht des cephalopharyngealen Skeletts (CPS), die Fortsätze der *hugin*-positiven Neurone projizieren entlang des CPS nach anterior (Fotografien sind in Kooperation mit R. Bader erstellt worden).

3.3 Elektrophysiologie

In der elektrophysiologischen Untersuchung der L3-Larven von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* wurde das efferente (motorische) System des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) anhand von extrazellulären Nervenableitungen und intrazellulären Muskelableitungen charakterisiert.

Zusätzlich wurde das afferente (sensorische) System der cephalen Loben als auch der Schlund- und Kropfregion von *Calliphora vicina* mittels extrazellulärer Nervenableitungen untersucht. Im Vordergrund der Untersuchung stand der qualitative Nachweis von mechanorezeptiven Eigenschaften der cephalen Sinnesorgane (Dorsal- (DO), Ventral- (VO), Terminal- (TO), Labialorgan (LO)) und der Nachweis von Streckrezeptoren in der Kropfregion.

3.3.1 Efferenzen der Nerven von *Calliphora vicina*

Die elektrophysiologische Untersuchung der efferenten Bahnen des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Calliphora vicina* hatte die Funktion, neurobiologische Informationen über das motorische System zu sammeln, die als Basis für entsprechende Untersuchungen an den L3-Larven von *Drosophila virilis* und *melanogaster* dienen sollten.

Die Grundlage für die elektrophysiologische Untersuchung bildeten die anatomischen Erkenntnisse über die Innervationsziele der Nerven. Die Experimente bestanden aus extrazellulären Nervenableitungen zur Bestimmung der efferenten Einheiten. Durch simultane intrazelluläre Ableitungen der zugehörigen Muskulatur wurden die efferenten Einheiten funktionell charakterisiert und die motorischen Bahnen in den Nerven nachgewiesen.

3.3.1.1 Antennalnerv und cibariale Dilatormuskulatur

Die anatomischen Ergebnisse (siehe Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.3.1) deuten stark darauf hin, dass die Motorneurone der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) im zentralen Nervensystem lokalisiert sind und deren Axone über den Antennalnerv (AN), das Frontalkonktiv (FK), die frontale Nervenverbindung (FNV) und den Frontalnerv (FN) die CDM innervieren.

Erste Beobachtungen zeigten, dass bei Durchtrennung der AN die Kontraktionen der CDM aufhörten und bei elektrischer Stimulation des AN Kontraktionen der CDM ausgelöst werden konnten (siehe Abb. 3.19). Bei intrazellulärer Ableitung einzelner Muskelfasern der CDM konnten durch elektrische Stimulation des AN postsynaptische Potentiale der CDM intrazellulär abgeleitet werden, die eine Dauer von ≈ 70 ms hatten und eine Amplitude von zwei bis fünf mV (siehe Abb. 3.19B) aufwiesen. Die elektrischen Stimuli

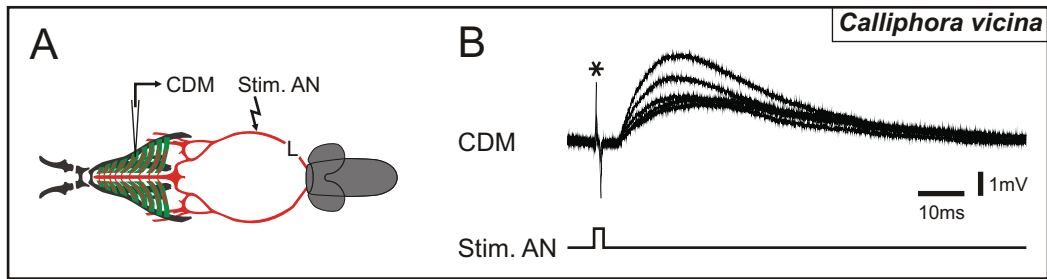


Abb. 3.19: Elektrische Stimulation (**Stim.**) der cibarialen Dilatormuskulatur (**CDM**) von *Calliphora vicina*; **A:** Zeichnung des Versuchsaufbaus (**L** - Läsion); elektrische Stimulation am Antennalnerv (**AN**) erfolgte zwischen dem zentralen Nervensystem und der frontalen Nervenverbindung (**FNV**) mit simultaner intrazellulärer Ableitung der CDM; der AN war in Richtung des zentralen Nervensystems durchgetrennt worden; **B:** fünf übereinander gelegte postsynaptische Potentiale der CDM auf einen identischen Stimulus sind dargestellt (* kennzeichnet das Reizartefakt).

und die generierten postsynaptischen Potentiale korrelierten zeitlich miteinander. Die Latenz zwischen Reizbeginn und postsynaptischen Muskelpotentialen betrug fünf ms. Die Amplituden der postsynaptischen Potentiale bei identischer elektrischer Stimulation konnten variieren. Diese Ergebnisse belegen, dass die Axone der Motorneurone durch den AN auf die CDM projizieren.

An *in vitro* Nerv-Muskelpreparaten von *Calliphora vicina* wurden simultan beide AN extrazellulär und die CDM intrazellulär abgeleitet. Wie in Abb. 3.20B zu sehen, zeigen beide AN neuronale Aktivität in Form von synchronen Multiunitbursts. Diese Bursts korrelieren zeitlich mit den postsynaptischen Muskelpotentialen auf der CDM.

Die Axone der CDM-Motorneurone eines AN innervieren ipsi- und contralateral die Muskelbündel der CDM. Dies wurde gezeigt, indem bei extrazellulären Ableitungen beider AN und simultaner intrazellulärer Muskelableitung der ipsi- und contralateralen CDM sukzessive die AN durchtrennt wurden (siehe Abb. 3.20C). Zu Beginn der Vierfachableitung sind synchron auftretende Multiunitbursts in den AN als auch die korrelierenden postsynaptischen Potentiale der ipsi- und contralateralen CDM zu erkennen. Darauf folgend wurde der rechte AN anterior des zentralen Nervensystems durchtrennt. Resultierend aus der Läsion ist keine neuronale Aktivität mehr im rechten AN zu erkennen, aber die Aktivität im contralateralen AN und die postsynaptischen Potentiale beider CDM-Muskelbündel bleibt unbeeinflusst. Im nächsten Schritt wurde der linke AN durchtrennt, wodurch die postsynaptischen Potentiale auf beiden Seiten der CDM eliminiert wurden. Nach der zweiten Läsion ist keine Aktivität in den Muskeln der CDM erkennbar.

Die CDM besteht aus 13 paarigen Muskelbündeln, die bilateral symmetrisch zwischen Oesophagus und dorsalen Arm des CPS aufgespannt sind. Intrazelluläre Ableitungen der CDM deuteten an, dass sich die Kontraktionsdauer der CDM in Abhängigkeit von der Position im CPS verändert (siehe Abb. 3.21B). Für die Untersuchung wurden die

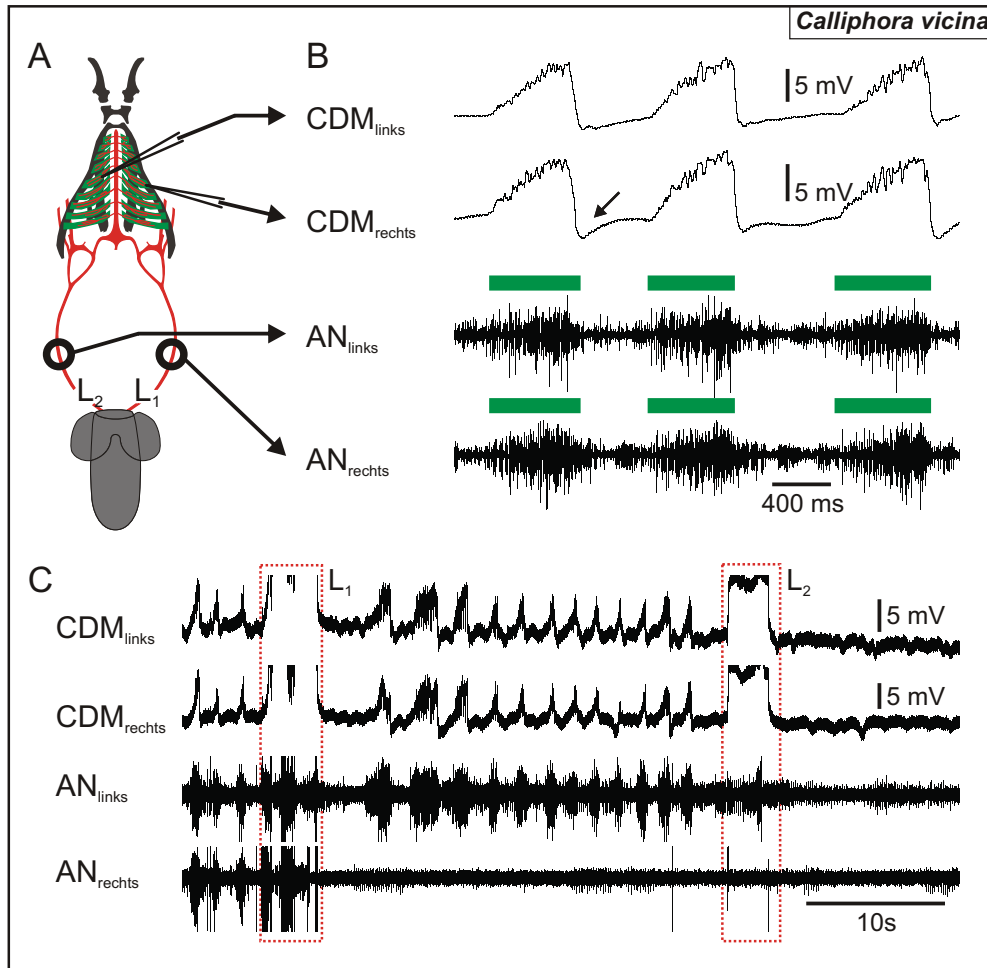


Abb. 3.20: Motorische Bahnen des Antennalnervs (AN) von *Calliphora vicina*; **A:** Darstellung des Versuchsaufbaus; **B:** Motorische Aktivität in beiden AN (farbige Balken) ist synchron und korreliert mit den postsynaptischen Potentialen der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM), der Pfeil markiert ein Bewegungsartefakt in der CDM_{rechts}; **C:** Der AN innerviert ipsi- und contralateral die CDM; nach der ersten Läsion (L₁) ist keine Aktivität im AN_{rechts}, die postsynaptischen Potentiale in CDM_{links} und CDM_{rechts} bleiben von der ersten Läsion unbeeinflusst; nach der zweiten Läsion (L₂) ist keine Aktivität in beiden AN und es sind keine postsynaptischen Potentiale in der CDM_{links} und CDM_{rechts} zu erkennen.

paarigen Muskelbündel der CDM von anterior nach posterior durchnummeriert. Mittels intrazellulärer Muskelableitungen wurde die mittlere Kontraktionsdauer der CDM₁, CDM₃, CDM₆ und CDM₉ bestimmt und gegen die Lage im CPS aufgetragen (siehe Abb. 3.21C). Es war erkennbar, dass die mittlere Kontraktionsdauer der CDM von der ersten Position (anterior) auf die neunte Position (posterior) abnimmt.

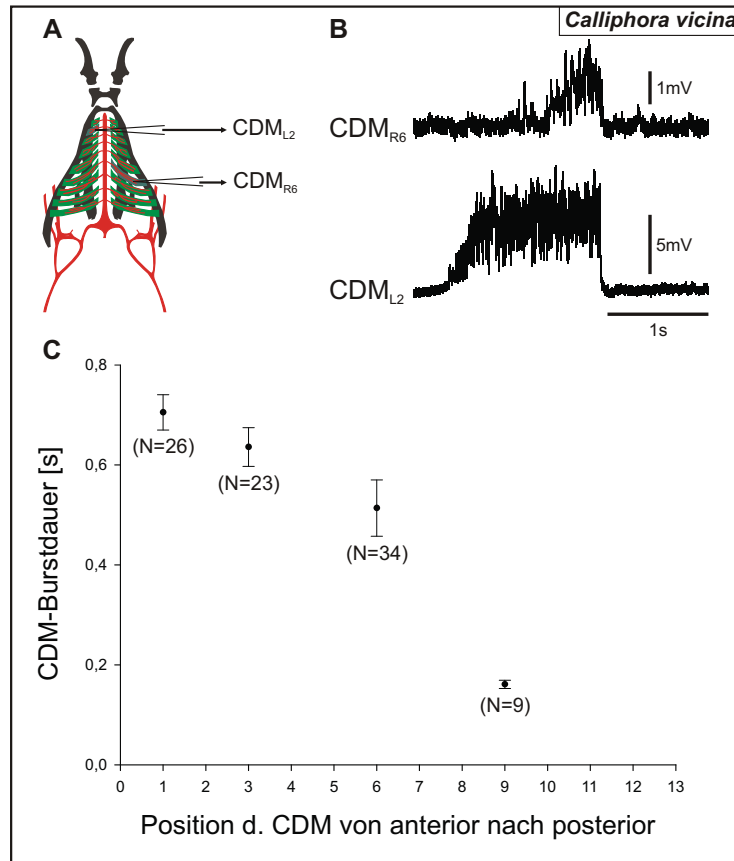


Abb. 3.21: Zusammenhang von Position im cephalopharyngealen Skelett (CPS) und Kontraktionsdauer der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) von *Calliphora vicina*; **A:** Experimenteller Aufbau; **B:** Simultane intrazelluläre Muskelableitung der CDM an Position: Zwei links (CDM_{L2}) und sechs rechts (CDM_{R6}), zu beachten ist die unterschiedliche Burstdauer; **C:** Diagramm, in dem die mittlere CDM-Burstdauer gegen die Position der CDM im CPS aufgetragen wurde.

3.3.1.2 Maxillarnerv und Mundhakendepressor, -elevator und Labialretraktor

Die Erkenntnisse aus der anatomischen Untersuchung des Maxillarnervs (MN) von *Calliphora vicina* lassen vermuten, dass die motorischen Bahnen der Mundhakenmuskulatur (Depressor (MHD) und Elevator (MHE)) sowie des Labialretraktors (LR) durch den MN projizieren (siehe Kapitel 3.2.2.2). Um diese Hypothese zu belegen und das am Fressverhalten beteiligte motorische System der Larve zu charakterisieren, wurden extrazelluläre

Einfach- und Doppelableitungen des MN und simultane intrazelluläre Einfach- und Doppelableitung der innervierten Muskulatur durchgeführt.

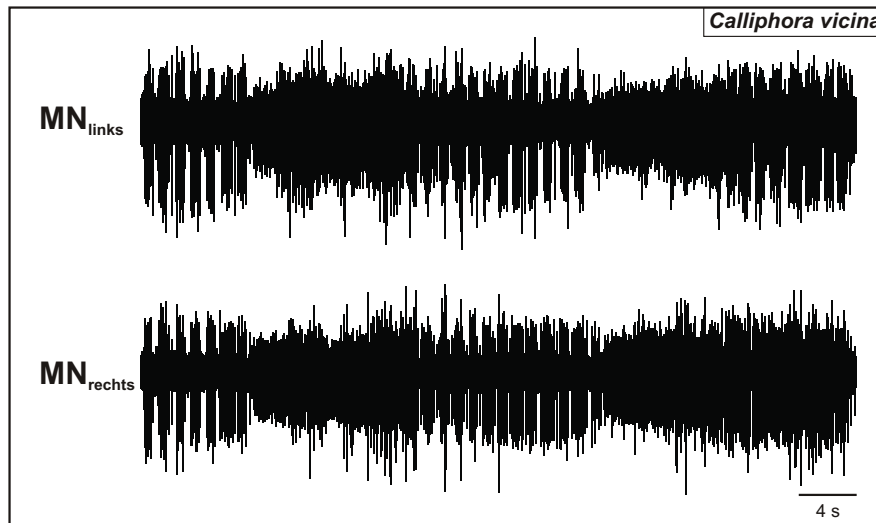


Abb. 3.22: Extrazelluläre Ableitung des linken und rechten Maxillarnervs (MN) von *Calliphora vicina*; zu beachten ist die rhythmische neuronale Aktivität von mindestens zwei efferenten Einheiten, die nahezu synchron in beiden MN auftritt.

Im ersten Schritt wurde extrazellulär vom linken und rechten MN des isolierten zentralen Nervensystems abgeleitet. Es zeigte sich, dass die Efferenzen im MN rhythmisch aktiv waren und synchron im linken und rechten MN auftraten (siehe Abb. 3.22). Des Weiteren waren mindestens zwei efferente Einheiten erkennbar, die sich anhand ihrer Amplituden gegeneinander abgrenzen ließen. Die unterschiedlichen Einheiten mit ihrer alternierenden Aktivität legen nahe, dass es sich um die Aktionspotentiale verschiedener Gruppen von Motorneurone handelt, die über den MN vermutlich antagonistische Muskelgruppen innervieren. Um heraus zu finden, ob sich entsprechend der Anzahl der innervierten Muskelgruppen (MHD, MHE und LR) drei efferente Einheiten klassifizieren lassen, wurde an einer extrazellulären Einzelableitungen des deafferentierten MN eine Clusteranalyse (siehe Kapitel 2.6.1) durchgeführt (siehe Abb. 3.23).

Die Clusteranalyse des MN von *Calliphora vicina* ergab drei efferente Einheiten, die anhand ihrer relativen Amplituden als kleine, mittlere und große neuronale Einheit definiert wurden. Die kleine Einheit hatte eine mittlere (Spitze zu Spitze)-Amplitude von $118,42\mu\text{V}$ (Standardabweichung: $\pm 36,27\mu\text{V}$; $n=10$), die mittlere Einheit von $146,97\mu\text{V}$ (Standardabweichung: $\pm 18,89\mu\text{V}$; $n=10$) und die große Einheit von $242\mu\text{V}$ (Standardabweichung: $\pm 32,14\mu\text{V}$; $n=10$).

In Läsionsversuchen konnte gezeigt werden, dass die postsynaptischen Potentiale von MHE und MHD aufhören, wenn der MN anterior zum Ableitort durchtrennt wurde, während die Aktivität der efferenten Einheiten weiter abgeleitet werden konnte. Auf

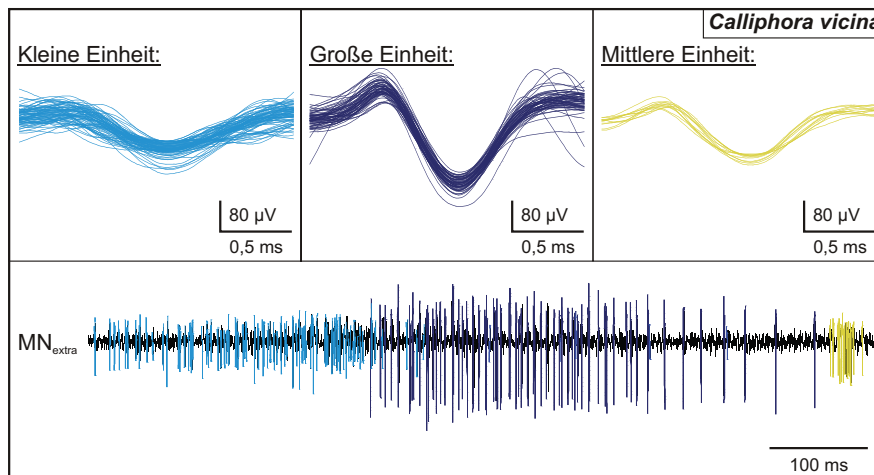


Abb. 3.23: Efferente Einheiten des Maxillarnervs (MN) von *Calliphora vicina*; oben: Identifizierte Aktionspotentiale der drei efferenten Einheiten des MN (kleine Einheit - hellblau, mittlere Einheit - gelb, große Einheit - dunkelblau); unten: Ausschnitt der analysierten extrazellulären Ableitung des MN, in der die drei Einheiten auftraten.

Grundlage dieser Feststellung wurden in den weiterführenden Untersuchungen simultane extrazelluläre Ableitungen des MN und intrazelluläre Ableitungen der innervierten Muskulatur durchgeführt, mit der Intention die detektierten neuronalen Einheiten als motorische Einheiten zu identifizieren.

Abb. 3.24B zeigt eine simultane extra- (MN) und intrazelluläre Ableitung des MHD und MHE. Die extrazelluläre Ableitung des MN zeigt das Aktivitätsmuster der drei efferenten Einheiten, die alternierende Aktivität der kleinen und großen Einheit, in deren Pausen die kurze Aktivität der mittleren Einheit fällt. Die große Einheit zeigte eine zeitliche Korrelation mit den postsynaptischen Potentialen des MHD, wohingegen die kleine neuronale Einheit zeitlich mit dem Auftreten der postsynaptischen Potentiale des MHE korreliert. Die mittlere Einheit (in Abb. 3.24; markiert mit gestrichelten roten Boxen) korreliert mit keiner der beiden Muskelgruppen.

In den simultanen extra- und intrazellulären Ableitungen (siehe Abb. 3.25A) zeigen die Aktionspotentiale der großen Einheit eine 1:1 Korrelation mit den postsynaptischen Potentialen des MHD mit einer Latenz von 5,5ms. Die Aktionspotentiale der kleinen Einheit korrelieren 1:1 mit den postsynaptischen Potentialen des MHE mit einem zeitlichen Versatz von 8,4ms (siehe Abb. 3.25B).

Die 1:1 Korrelationen zwischen den Aktionspotentialen der efferenten Einheiten und den postsynaptischen Potentialen der Mundhakenmuskulatur belegen, dass diese die Aktionspotentiale der Motorneurone der entsprechenden Muskelgruppe sind. Die Aktivität der mittleren Einheit zeigte in simultanen extrazellulären Ableitungen des MN und intrazellulären Ableitungen des Labialretraktors (LR) eine zeitliche Korrelation mit den postsynaptischen Potentialen des LR (siehe Abb. 3.26). In Läsionsexperimenten kann

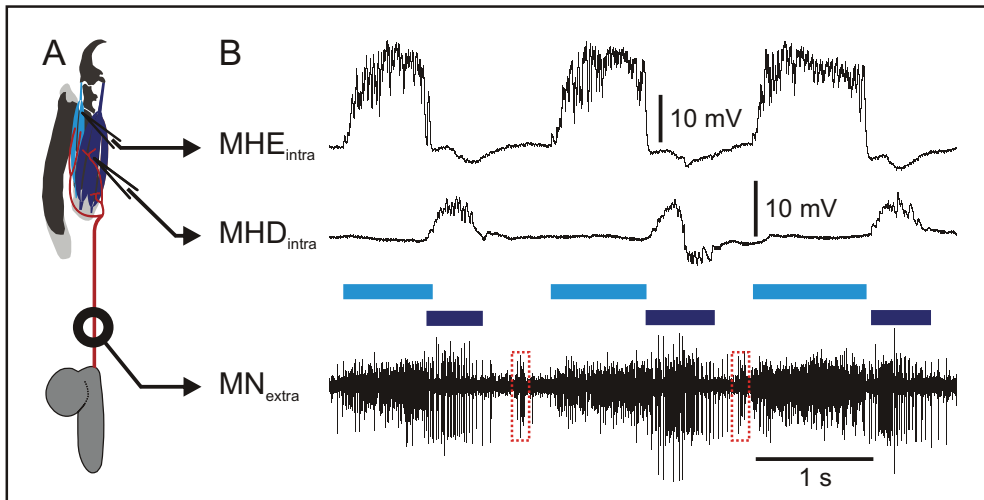


Abb. 3.24: Motorische Bahnen des Maxillarnervs (MN) von *Calliphora vicina*; **A:** Darstellung des Versuchsaufbaus; **B:** Simultane extrazelluläre Ableitung des MN und intrazelluläre Ableitung des Mundhakendepressors (MHD) und -elevators (MHE), zu beachten ist die zeitliche Korrelation zwischen den Aktionspotentialen (dunkelblaue Balken) der großen Einheit und den postsynaptischen Potentialen des MHD und den Aktionspotentialen der kleinen Einheit (hellblaue Balken) und den postsynaptischen Potentialen des MHE, die Aktivität der mittleren Einheit ist durch gestrichelte rote Boxen markiert.

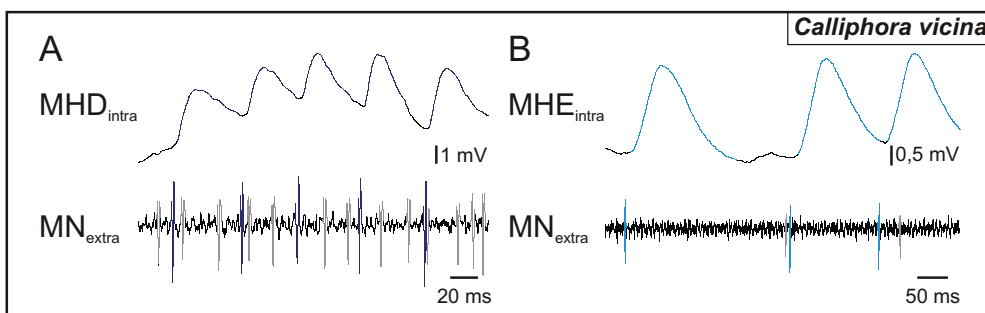


Abb. 3.25: Korrelationsanalyse von extra- und intrazellulären Ableitungen des Maxillarnervs (MN) und der Mundhakenmuskulatur (Depressor - MHD, Elevator - MHE) von *Calliphora vicina*; **A:** und **B:** 1:1 Korrelation der Aktionspotentiale der entsprechenden Einheit des MN und den postsynaptischen Potentialen des MHD und MHE (farblich markiert).

ten die postsynaptischen Potentiale des LR eliminiert werden, während die Aktivität der mittleren Einheit im MN erhalten blieb.

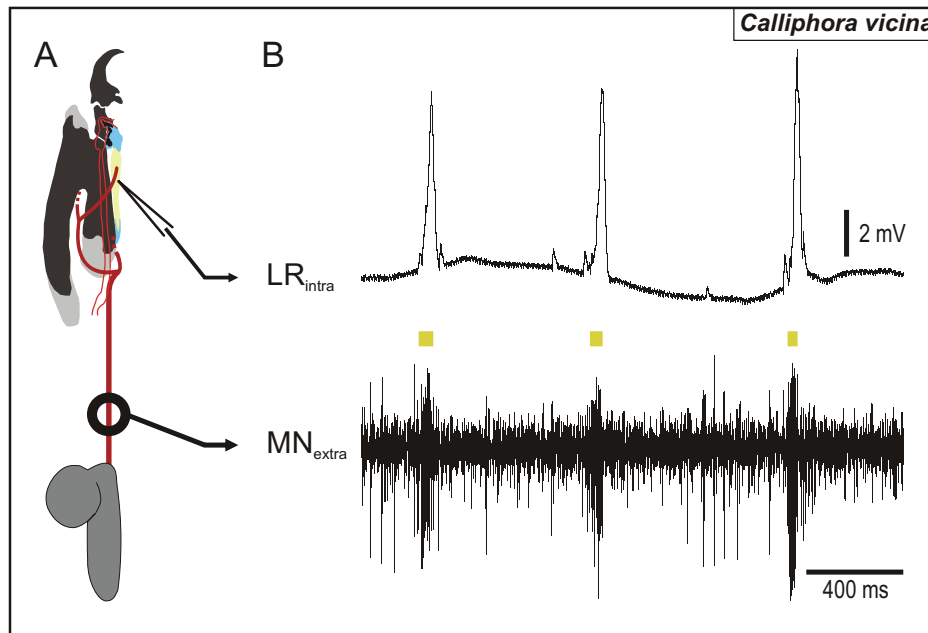


Abb. 3.26: Extrazelluläre Ableitung des Maxillarnervs (MN) und intrazelluläre Ableitung des Labialretraktors (LR) von *Calliphora vicina*; **A:** Darstellung des Versuchsaufbaus; **B:** Die extrazellulär abgeleiteten Aktionspotentiale der mittleren Einheit (gelbe Balken) korrelieren zeitlich mit den postsynaptischen Potentialen des LR.

3.3.1.3 Akzessorischer Prothorakalnerv und dorsaler Protraktormuskel A

Die anatomischen Ergebnisse und die retrograden Füllungen des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Calliphora vicina* zeigten, dass der PaN die dorsalen Protraktoren A und B (Pro_{do}A und Pro_{do}B) innerviert und die Somata, deren Axone durch den PaN projizieren, im zentralen Nervensystem lokalisiert sind. Aus den Erkenntnissen resultierte die Annahme, dass die Motorneurone von Pro_{do}A und Pro_{do}B im zentralen Nervensystem liegen und deren motorische Bahnen durch den PaN verlaufen.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden simultane extrazelluläre Ableitungen des rechten und linken PaN am isolierten zentralen Nervensystem von *Calliphora vicina* durchgeführt. Die Doppelableitungen zeigten eine rhythmische neuronale Aktivität bestehend aus vermutlich zwei Einheiten, deren Aktionspotentiale deutlich unterscheidbare Amplituden aufwiesen (siehe Abb. 3.27) und eine alternierende Aktivität zeigten. Die Aktivität der Einheiten im linken und rechten PaN war in hohem Maße synchron.

Die Clusteranalyse zeigte eindeutig, dass die Ableitungen des PaN zwei efferente Einheiten enthielten (siehe Abb. 3.28), die aufgrund der Amplituden als große und mittlere

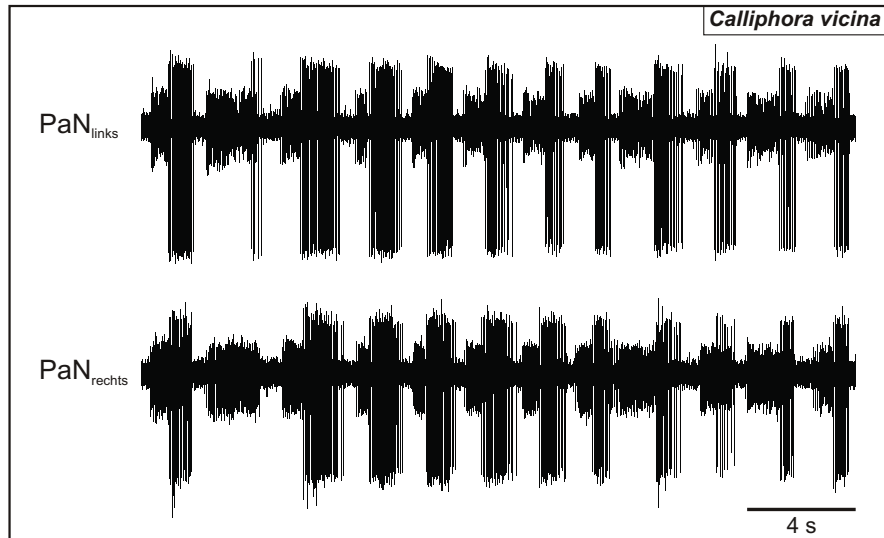


Abb. 3.27: Extrazelluläre Ableitung beider akzessorischer Prothorakalnerven (PaN) von *Calliphora vicina*, beide PaN zeigen fast identische Aktivität.

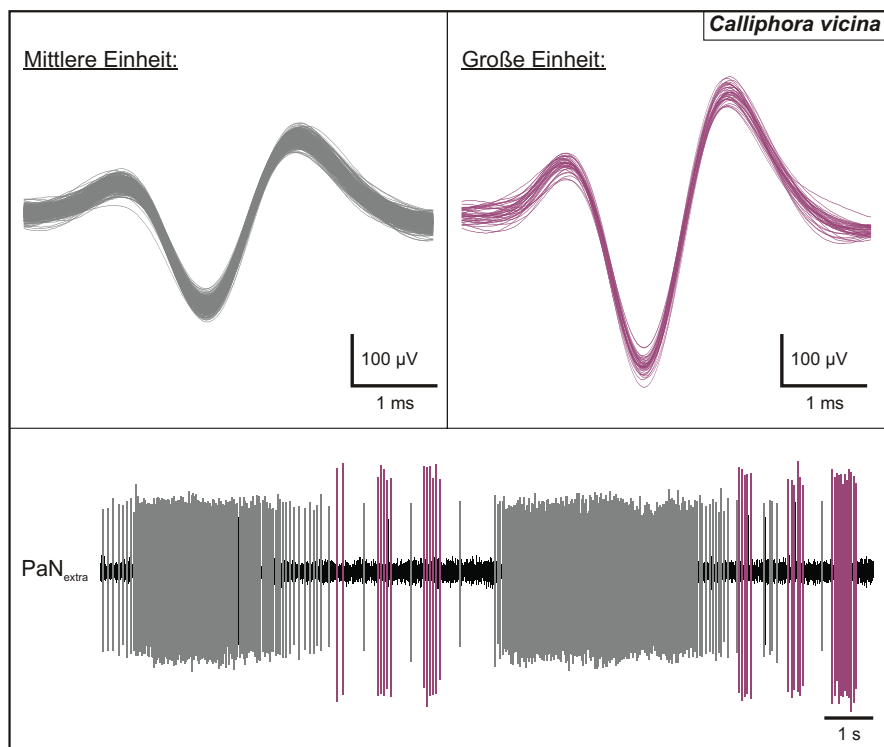


Abb. 3.28: Clusteranalyse des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Calliphora vicina*; oben: Identifizierte Aktionspotentiale der beiden efferenten Einheiten (mittlere Einheit - grau, große Einheit - lila) des PaN aus der analysierten Ableitungssequenz; unten: Aktivitätsmuster beider Einheiten des PaN aus der analysierten Sequenz.

Einheit bezeichnet wurden. Die große Einheit hatte eine mittlere (Spitze-Spitze) Amplitude von $522,71\mu\text{V}$ (Standardabweichung: $\pm 23,91\mu\text{V}$, $n=18$) und die mittlere Einheit eine durchschnittliche (Spitze-Spitze) Amplitude von $290,96\mu\text{V}$ (Standardabweichung: $\pm 23,91\mu\text{V}$, $n=16$). Die These war, dass diese efferenten Einheiten vermutlich die Aktivität der Motorneurone des $\text{Pro}_{do}A$ und $\text{Pro}_{do}B$ darstellen. Zur Bestätigung wurden simultane extrazelluläre Ableitungen des PaN und intrazelluläre Ableitungen des ipsilateralen $\text{Pro}_{do}A$ und $\text{Pro}_{do}B$ durchgeführt.

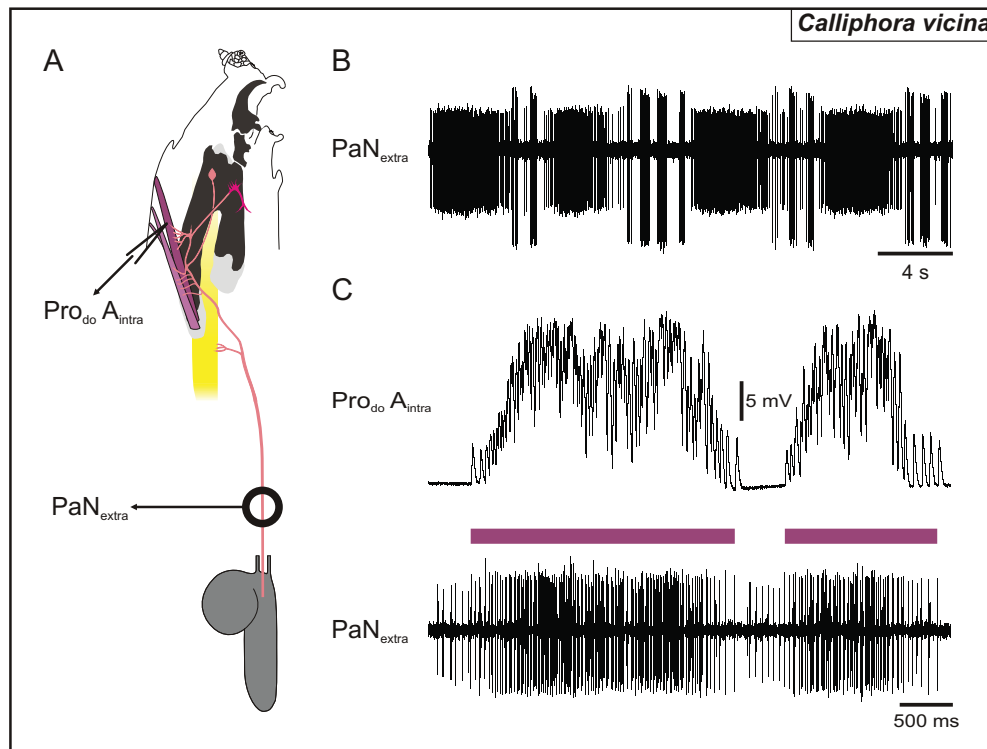


Abb. 3.29: Extrazelluläre Ableitung des akzessorischen Prothorakalnervs (**PaN**) und intrazelluläre Ableitung des dorsalen Protraktormuskels A (**Pro_{do}A**) von *Calliphora vicina*; **A:** Darstellung des Versuchsaufbaus; **B:** Extrazellulär abgeleitete Aktivität des PaN mit zwei efferenten Einheiten; **C:** Extrazelluläre Ableitung des PaN und intrazelluläre Ableitung des Pro_{do}A zeigte eine zeitliche Korrelation zwischen der großen Einheit des PaN und den postsynaptischen Potentialen des Pro_{do}A (farbige Balken).

Die in Abb. 3.29B gezeigte Ableitung des PaN zeigt die spontane rhythmische Aktivität der efferenten Einheiten. Die Aktivität der mittleren Einheit besteht aus lang anhaltenden Bursts, die unterbrochen werden von mehreren kurzen Bursts der großen Einheit. Teilweise ist zwischen den Bursts der großen Einheit Aktivität der mittleren Einheit eingestreut. In simultanen extrazellulären Ableitungen des PaN und intrazellulären Ableitungen des Pro_{do}A war eine zeitliche Korrelation zwischen der großen Einheit und den postsynaptischen Potentialen des Pro_{do}A zu erkennen (siehe Abb. 3.29C).

Eine genauere Analyse der extra- und intrazellulären Ableitungen des PaN und Pro_{do}A

ergab eine 1:1 Korrelation zwischen den Aktionspotentialen und den postsynaptischen Potentialen mit einer konstanten Latenz von 7,1ms (siehe Abb. 3.30), wodurch belegt werden konnte, dass die Axone der Motorneurone, die im zentralen Nervensystem lokalisiert sind, über den PaN den Pro_{do}A innervieren und dessen Kontraktionen regulieren.

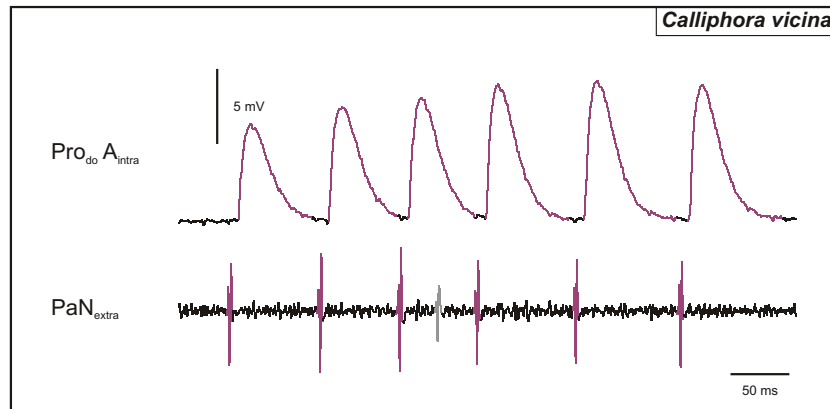


Abb. 3.30: 1:1 Korrelation der großen Einheit des akzessorischen Prothorakalnervs (**PaN**) und den postsynaptischen Potentialen des dorsalen Protraktormuskels (**Pro_{do}A**) von *Calliphora vicina*, die Latenz beträgt 7,1ms.

Bei extra- und intrazellulären Ableitungen des PaN und Pro_{do}B, in denen der Prothorakalnerv (PN) durchtrennt worden war, konnten trotz bestehender Aktivität der beiden efferenten Einheiten des PaN keine postsynaptischen Potentiale im Pro_{do}B abgeleitet werden. Wohingegen bei extrazellulären Ableitungen des PaN und intrazellulärer Doppelableitungen des Pro_{do}A und Pro_{do}B am Basispräparat mit intakten PN neben der Aktivität der Efferenzen des PaN und postsynaptischen Potentialen des Pro_{do}A auch postsynaptische Potentiale am Pro_{do}B auftraten (siehe Abb. 3.31). Jedoch konnte keine Korrelation zwischen den Aktionspotentialen der mittleren Einheit und den postsynaptischen Potentialen des Pro_{do}B festgestellt werden. Diese Resultate führten zu der Annahme, dass die motorischen Bahnen des Pro_{do}B nicht durch den PaN verlaufen, obwohl der PaN den Pro_{do}B innerviert, wie in der anatomischen Untersuchung (siehe Kapitel 3.2.2.3) gezeigt wurde. Vermutlich projizieren die Axone der Motorneurone des Pro_{do}B durch den PN und innervieren über die neuronale Verbindung zum PaN den Pro_{do}B.

In den folgenden Experimenten wurde versucht, den Fortleitungsweg der Aktionspotentiale der mittleren Einheit des PaN zu bestimmen, um Rückschlüsse auf das potentielle Innervationsziel und die physiologische Funktion der mittleren Einheit zu ziehen. Dabei wurde eine „Referenz“-Ableitung jeweils anterior der Austrittsstelle des PaN aus dem zentralen Nervensystem positioniert und eine zweite Ableitung an spezifischen Nervenabzweigungen des PaN platziert, die zu potentiellen Zielstrukturen der mittleren Einheit projizieren könnten. Als potentielle Zielstrukturen wurden die Aorta und das Bolwigor-

gan angenommen. Des Weiteren wurde eine extrazelluläre Ableitung an der neuronalen Anastomose zwischen PN und PaN positioniert, um zu ermitteln, ob die Aktionspotentiale der mittleren Einheit durch den PN auf eine unbekannte Struktur weitergeleitet werden, die durch den PN innerviert wird.

Die Doppelableitungen an unterschiedlichen Nervenabzweigungen des PaN zeigten eindeutig, dass die mittlere Einheit des PaN nicht auf die Aorta projiziert (siehe Abb. 3.32B) und eine Funktion der mittleren Einheit im Zusammenhang mit dem Bolwigorgan (BO) ausgeschlossen werden kann (siehe Abb. 3.32C). Die Doppelableitung, Abb. 3.32D, zeigt, dass die Aktionspotentiale der mittleren Einheit des PaN in den PN projizieren (siehe Abb. 3.32D). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden simultane Ableitungen des PaN und der Muskeln durchgeführt, die vom PN innerviert werden, aber deren motorische Bahnen unbekannt sind. In dieser Versuchsreihe konnte keine 1:1 Korrelation zwischen den Aktionspotentialen der mittleren Einheit und den postsynaptischen Potential auf den abgeleiteten Muskeln nachgewiesen werden. Vermutlich projizieren die Aktionspotentiale auf eine bis dato unbekannte Struktur, die vom PN innerviert wird.

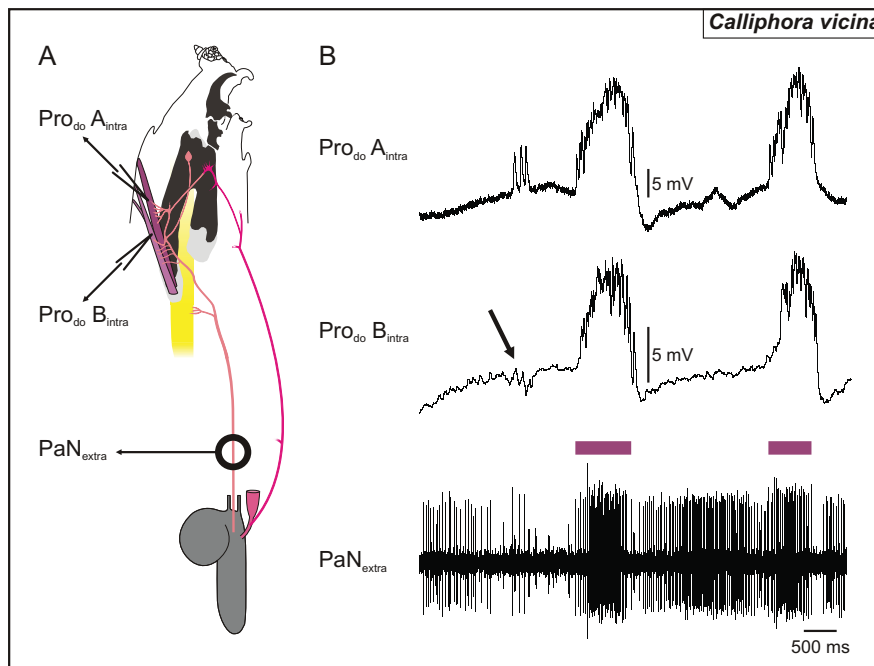


Abb. 3.31: Extrazelluläre Ableitung des akzessorischen Prothorakalnervs (**PaN**) und intrazelluläre Ableitung der dorsalen Protraktormuskeln (**Pro_{do}A** und **Pro_{do}B**) von *Calliphora vicina*; **A:** Versuchsaufbau; **B:** Simultane extrazelluläre Ableitung des PaN und intrazelluläre Ableitung des Pro_{do}A und Pro_{do}B (bei intaktem Prothorakalnerv (**PN**)), zu beachten ist: 1) die zeitliche Korrelation zwischen der großen Einheit des PaN und den postsynaptischen Potentialen des Pro_{do}A (farbige Balken), die nahezu synchron mit den postsynaptischen Potentialen im Pro_{do}B auftreten und 2) es existiert keine zeitliche Korrelation zwischen der mittleren Einheit des PaN und den postsynaptischen Potentialen des Pro_{do}B (Pfeil markiert ein Bewegungsartefakt).

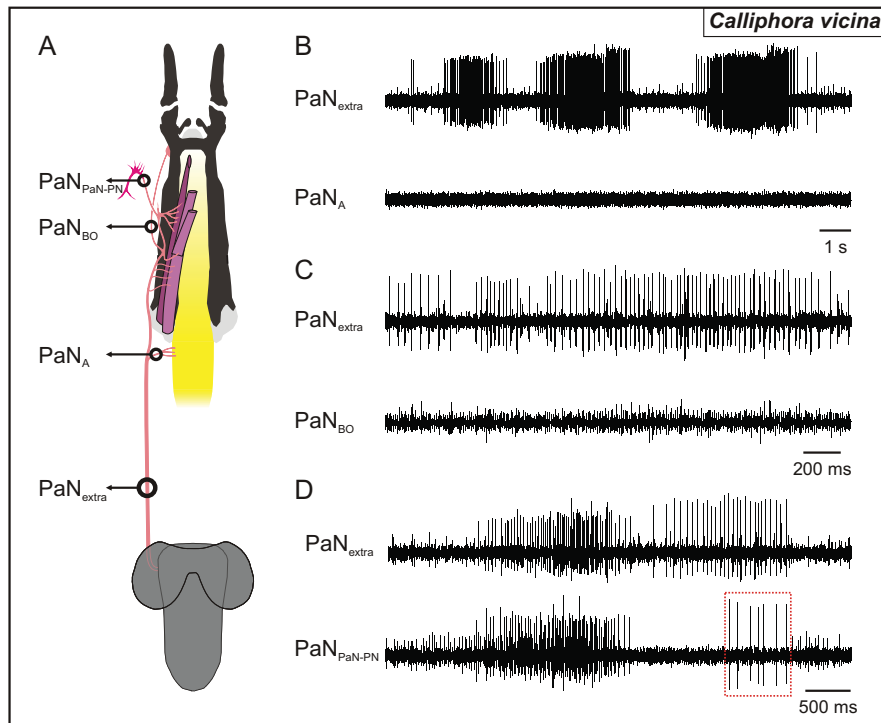


Abb. 3.32: Verlauf der neuronalen Bahnen der mittleren Einheit (**mE**) von *Calliphora vicina* anhand extrazellulärer Doppelableitungen des akzessorischen Prothorakalnervs (**PaN**); **A:** Experimenteller Versuchsaufbau, „Referenz“-Ableitung (**PaN_{extra}**) des PaN wurde bei allen Doppelableitungen anterior des zentralen Nervensystems positioniert; **B:** Ableitung an der Nervenabzweigung zur Aorta (**A**) (**PaN_A**) zeigt keine Korrelation zwischen den Aktionspotentialen der mE in PaN_{extra} und der Aktivität in PaN_A; **C:** Ableitung an der Nervenabzweigung zum Bolwigorgan (**BO**) (**PaN_{BO}**), keine Korrelation zwischen der mE in PaN_{extra} und der Aktivität in PaN_{BO}; **D:** Ableitung (**PaN_{PaN-PN}**) an der neuronalen Anastomose zwischen PaN und Prothorakalnerv (**PN**), die Aktionspotentialen der mE in PaN_{extra} und PaN_{PaN-PN} korrelieren, aber es besteht keine Korrelation zwischen der großen Einheit (**gE**) in PaN_{extra} und PaN_{PaN-PN} (gE in PaN_{PaN-PN} könnten die Aktionspotentialen (rote gestrichelte Box) der Motorneurone des dorsalen Protraktormuskels B (**Pro_{do}B**) sein).

3.3.2 Afferenzen der Nerven von *Calliphora vicina*

In den anatomischen Untersuchungen hat sich herauskristallisiert, dass viele sensorische Organe durch den Antennal- (AN) und den Maxillarnerv (MN) innerviert werden, die möglicherweise neuronale Informationen zur zentralnervösen Regulation des Fressverhaltens liefern könnten. Die elektrophysiologische Untersuchung der afferenten Bahnen der Nerven sollte Aufschluss darüber geben, ob die sensorischen Organe, die durch die jeweiligen Nerven innerviert werden, mechanorezeptive Strukturen enthalten. Zu diesem Zweck wurden extrazelluläre Ableitungen der Nerven im defferenzierten Zustand durchgeführt und die unterschiedlichen sensorischen Strukturen mechanisch gereizt. Obwohl in der anatomischen Untersuchung des akzessorische Prothorakalnervs (PaN) nicht belegt werden konnte, dass der PaN Sinnesorgane innerviert, wurden Afferenzen mit unbekanntem Innervationsziel im PaN nachgewiesen und untersucht. Die Untersuchung des larvalen sensorischen Systems hatte rein qualitativen Charakter.

3.3.2.1 Manipulation des Kropfvolumens

Um zu untersuchen, ob sensorische Strukturen existieren, die Volumenveränderung des Kropfes detektieren und über den Kropfnerv (KN) weiterleiten, wurden Ableitungen des rekurrenten Nervs (RN) durchgeführt, während das Kropfvolumen manipuliert wurde. Zusätzlich wurden der Antennal- (AN) und der Proventrikularnerv (PVN) abgeleitet, um heraus zu finden, ob die neuronalen Informationen ins zentrale oder stomatogastrische Nervensystem weitergeleitet werden und damit an einem potentiellen Rückkopplungsmechanismus beteiligt sein könnten.

Die Manipulation des Kropfvolumens (siehe Abb. 3.33) belegt die Existenz sensorischer Strukturen, eventuell Streckrezeptoren, die anscheinend in das Muskelgewebe des Kropfes eingebettet sind. Die Ableitungen zeigen deutlich die Zunahme der neuronalen Aktivität im RN und PVN, wenn das Volumen des Kropfes vergrößert wird. Bei hoher zeitlicher Auflösung der Ableitungen ist zu erkennen, dass die identischen Aktionspotentiale in beiden Nerven (RN und PVN) mit einer Latenz von 9ms auftreten (siehe Abb. 3.33B). Die Bahnen der sensorischen Struktur des Kropfes verlaufen ausgehend vom Kropfnerv (KN), über den RN, durch das Hypocerebralganglion (HCG) in den PVN. Ein nahe liegender Pfad für die sensorischen Information ins zentrale Nervensystem wäre über den RN, durch die frontale Nervenverbindung (FNV), via dem Frontalkonnektiv (FK) und AN. Extrazelluläre Ableitungen von RN und AN verdeutlichen, dass dieser neuronale Pfad nicht genutzt wird. Eine Volumenveränderung des Kropfes bewirkt eine Reaktion im RN, aber nicht im AN (siehe Abb. 3.33B).

3.3.2.2 Mechanische Stimulation des Dorsalorgans

Das Dorsalorgan (DO) ist über den Antennalnerv (AN) direkt mit dem zentralen Nervensystem verbunden und wird während des Fressverhaltens rhythmisch bei der Vorwärtsbewegung des CPS exponiert (siehe Kapitel 3.1). Potentiell könnte das DO mechanosensorische Informationen an das zentrale Nervensystem weiterleiten, die an der Koordination des Fressverhaltens beteiligt sind. Extrazelluläre Ableitungen des AN im defferenzierten Zustand haben gezeigt, dass geringfügige Auslenkungen der kuppel-ähnlichen Struktur des DO Serien von Aktionspotentialen im AN auslösen (siehe Abb. 3.34B). Die Ergebnisse belegen den anatomischen Befund und zeigen, dass die sensorischen Projektionen des DO durch den AN ziehen.

3.3.2.3 Mechanische Stimulation des Terminal-, Ventral- und Labialorgans

In den anatomischen Studien konnte gezeigt werden, dass das Terminal- (TO), Ventral- (VO) und Labialorgan (LO) über Seitenäste des Maxillarnervs (MN) mit dem zentralen Nervensystem verbunden sind. Potentiell könnten die Sinnesorgane mechanosensorische Informationen für die Koordination des Fressverhaltens vermitteln. Diese Theorie wurde verifiziert, indem extrazelluläre Ableitungen des MN an verschiedenen Nervenabzweigungen im defferenzierten Zustand durchgeführt und die entsprechenden Sinnesorgane mechanisch stimuliert wurden. Für die Ableitung in Abb. 3.35B wurde am MN posterior der Nervenabzweigung MN_{VI} abgeleitet und das TO und VO mechanisch gereizt. Jede Stimulation des TO und VO führte zu einem Burst von Aktionspotentialen. Die sensorischen Antworten von TO und VO können anhand der Amplitude der Aktionspotentiale unterschieden werden. Bei der mechanischen Stimulation des Labialorgans wurde die Ableitung des MN an der Nervenabzweigung MN_{II} platziert. Die Stimulation des LO bewirkte eine Serie von Aktionspotentialen im MN (siehe Abb. 3.35C). Die Daten zeigten, dass die sensorischen Bahnen des TO, des VO und des LO durch den MN verlaufen.

3.3.2.4 Afferenzen des akzessorischen Prothorakalnervs

Anatomische Untersuchungen suggerieren, dass theoretisch der akzessorische Prothorakalnerv (PaN) via der neuronalen Anastomose und den Prothorakalnerv (PN) mit Sinneszellen/Sinnesorganen in der Cuticula verbunden sein könnte. Daraus ergibt sich die Frage, ob sensorische Bahnen im PaN vorhanden sind und welche sensorischen Organe innerviert werden.

Extrazelluläre Doppelableitungen des PaN haben gezeigt, dass neben den zwei efferenten Einheiten eine weitere kleine Einheit im PaN existiert (siehe Abb. 3.36B). In der Clusteranalyse der Ableitung des PaN konnte neben den beiden erwähnten efferenten Einheiten

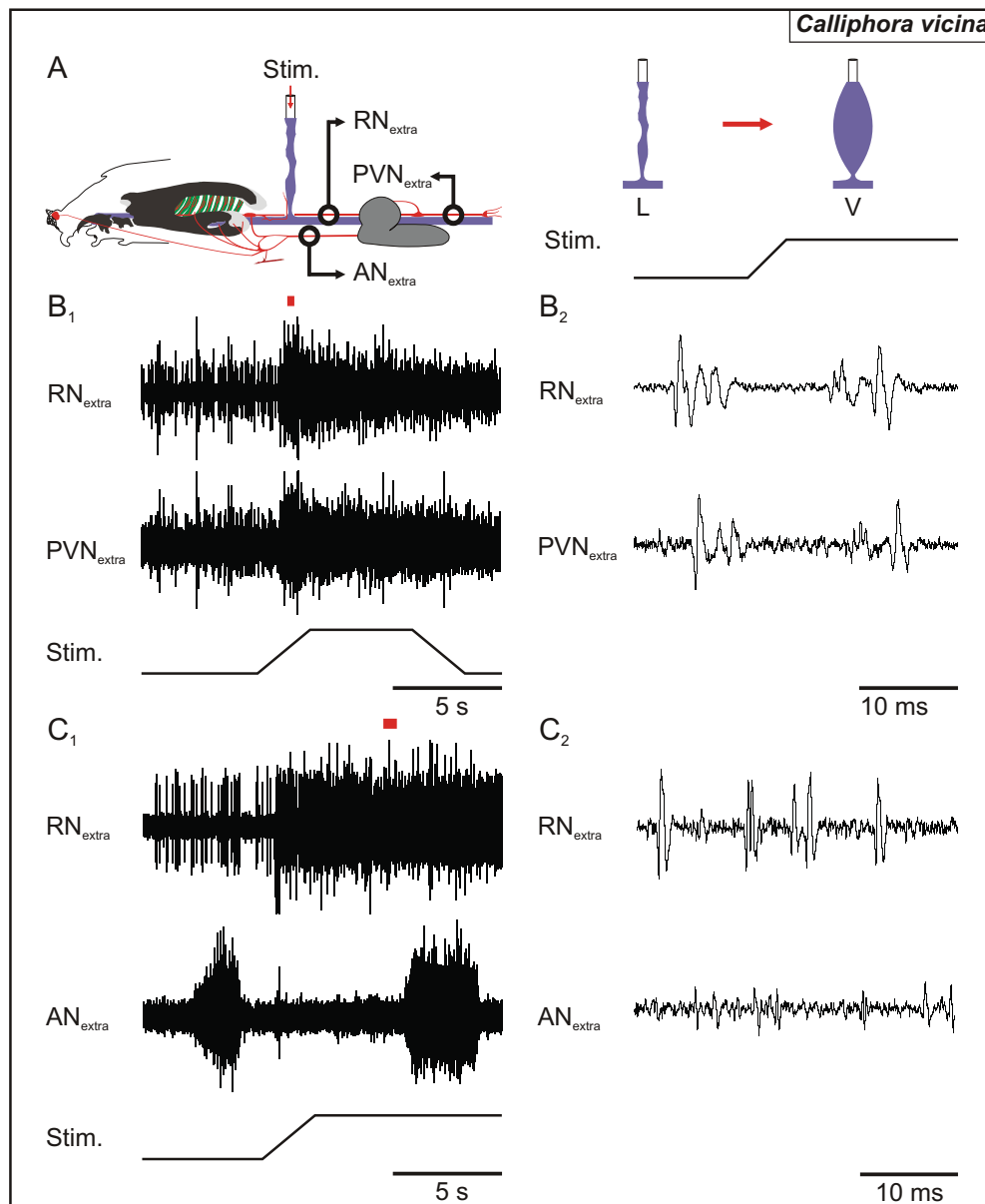


Abb. 3.33: Manipulation des Kropfvolumens bei *Calliphora vicina*; **A:** Versuchsaufbau des Experiments; Es wurden keine quantitativen Experimente durchgeführt, der Kropf wurde als leer (**L**) oder voll (**V**) definiert; **B_{1,2}**: Simultane Ableitung des rekurrenten Nerven (**RN**) und des Proventrikularnervs (**PVN**), die sensorische Antwort auf die Veränderung des Kropfvolumens ist im RN und PVN detektierbar; **C_{1,2}**: Simultane Ableitung des RN und des Antennalnervs (**AN**), die neuronale Aktivität im AN steht nicht im Zusammenhang mit der Manipulation des Kropfvolumens, während im RN eine deutliche Reaktion auf den Reiz vorhanden ist (Die roten Balken in **B₁** und **C₁** zeigen die Position der in **B₂** und **C₂** in hoher zeitlicher Auflösung dargestellten Abschnitte).

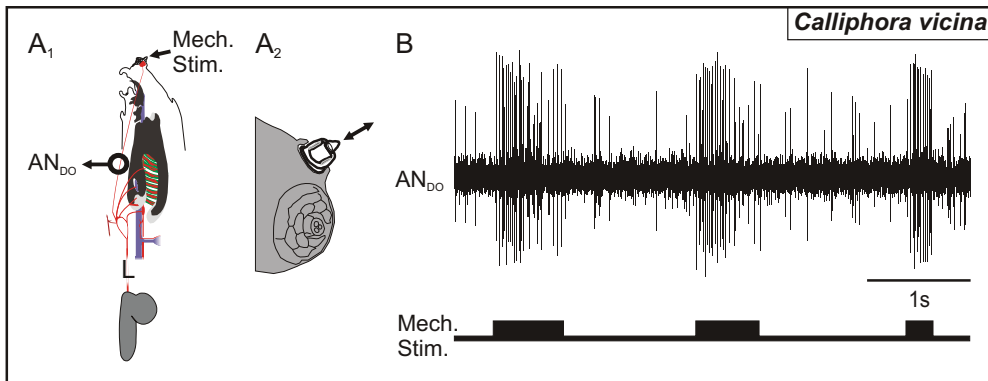


Abb. 3.34: Mechanische Reizung (**Mech. Stim.**) des Dorsalorgans (**DO**) von *Calliphora vicina*; **A₁**: Darstellung des Versuchsaufbaus; **A₂**: Darstellung der mechanischen Reizung der Kuppel des DO; **B**: Extrazelluläre Ableitung des Antennalnervs (**AN**) zeigt die sensorische Antwort des DO bei mechanischer Stimulation der Kuppel des DO.

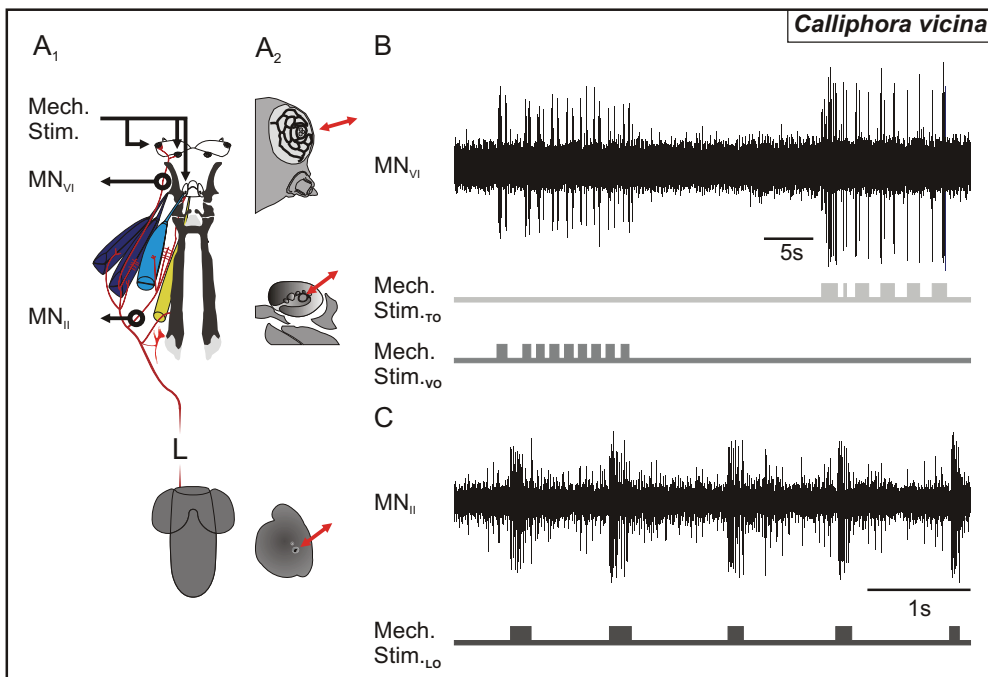


Abb. 3.35: Mechanische Stimulation (**Mech. Stim.**) des Terminal- (**TO**), Ventral- (**VO**) und Labialorgans (**LO**) von *Calliphora vicina*; **A₁**: Experimenteller Versuchsaufbau (**L** - Läsion); **A₂**: Darstellung der Stimulation des TO, VO und LO; **B**: Mechanische Stimulationen des TO oder VO bewirkten Bursts von Aktionspotentialen im Maxillarnerv (**MN**), die sensorischen Antworten von TO und VO können anhand der Amplituden unterschieden werden; **C**: Die mechanische Reizung des LO erzeugte im MN eine Serie von Aktionspotentialen.

(siehe Abschnitt 3.3.1.3) eine weitere Einheit eindeutig identifizieren werden. Diese Einheit besitzt eine mittlere (Spitze-Spitze) Amplitude von $157,5\mu\text{V}$ (Standardabweichung: $\pm 17,53\mu\text{V}$, $n=22$). Bei höherer zeitlicher Auflösung konnte gezeigt werden, dass die Aktionspotentiale der kleinen Einheit mit einer Latenz von 2ms in beiden Ableitungen des PaN auftreten und von der Peripherie zum zentralen Nervensystem fortgeleitet werden (siehe Abb. 3.36C).

Die elektrophysiologischen Daten belegen, dass neben den zwei efferenten Einheiten eine afferente Einheit im PaN vorhanden ist, die vermutlich eine sensorische Funktion erfüllt. Anhand der durchgeführten Doppelableitung des PaN konnte das potentielle sensorische Organ, das der kleinen Einheit zugrunde liegt, nicht ermittelt werden.

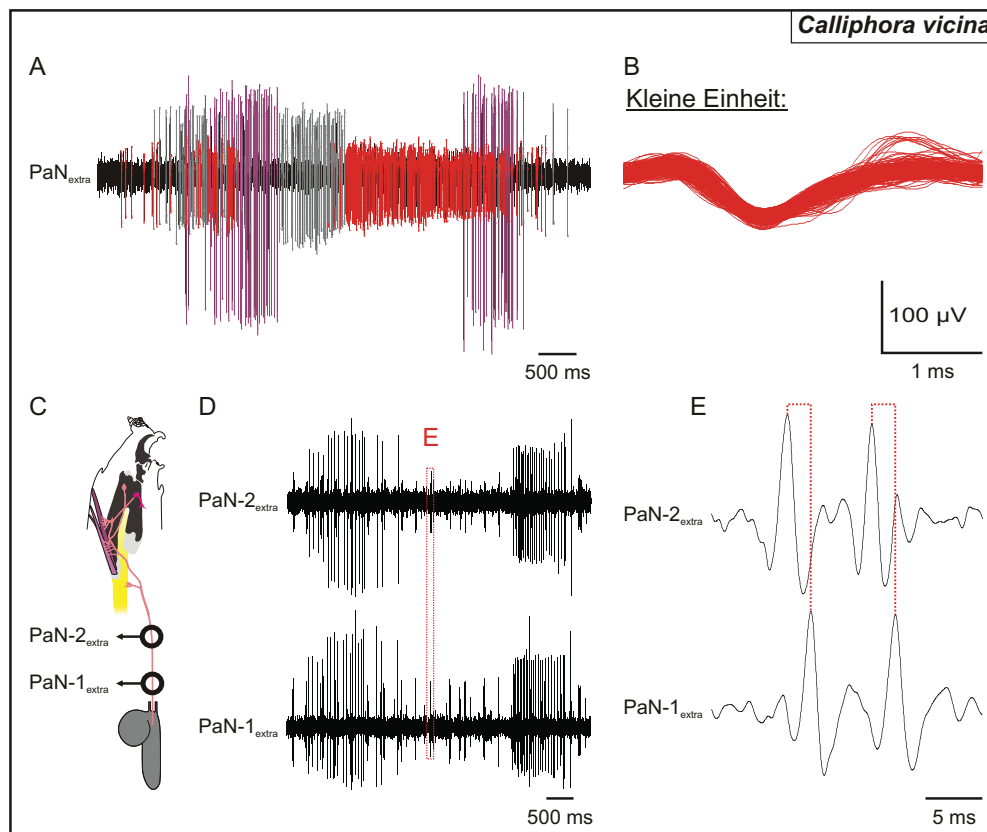


Abb. 3.36: Identifikation von Afferenzen im akessorischen Prothorakalnerv (PaN) von *Calliphora vicina*; **A:** Ausschnitt aus der Clusteranalyse der Ableitung des PaN, die detektierten Aktionspotentiale sind farbig hervorgehoben (kleine Einheit - rot, mittlere Einheit - grau, große Einheit - lila); **B:** Identifizierte Aktionspotentiale der kleinen afferenten Einheit des PaN aus der analysierten Ableitungssequenz; **C:** Versuchsaufbau des Experiments; **D:** Simultane Doppelableitung des PaN (PaN-1_{extra} und PaN-2_{extra}), zeitliche Korrelation zwischen den Aktionspotentialen mit der kleinsten Amplitude in PaN-1_{extra} und PaN-2_{extra}; **E:** Höhere zeitliche Auflösung der Ableitung aus Abb. 3.36D (dargestellter Bereich wurde in 3.36D mit einem roten gestrichelten Kästchen markiert), zu beachten ist die Fortleitungsrichtung der markierten Aktionspotentiale von der Peripherie zum zentralen Nervensystem.

3.3.3 Efferenzen der Nerven von *Drosophila virilis*

Um Zugang zum motorischen System der L3-Larven von *Drosophila* zu erlangen, wurden die Erkenntnisse aus der elektrophysiologischen Untersuchung von *Calliphora vicina* genutzt, um entsprechende Versuche auf die kleineren Larven von *Drosophila virilis* zu übertragen. Zusätzlich wurden die Ergebnisse aus der anatomischen Untersuchung von *Drosophila virilis* benutzt, um die Nerven- und Muskelableitungen analog zu *Calliphora vicina* durchzuführen.

3.3.3.1 Antennalnerv und cibariale Dilatormuskulatur

Die anatomischen Untersuchungen an *Drosophila virilis* haben gezeigt, dass die cibariale Dilatormuskulatur (CDM) über den Frontalnerv (FN), die frontale Nervenverbindung (FNV), die Frontalkonnective (FK) und den Antennalnerven (AN) mit dem zentralen Nervensystem verbunden ist und vermutlich projizieren die motorischen Bahnen der CDM identisch zu *Calliphora vicina* durch diese Nerven und Nervenverbindung.

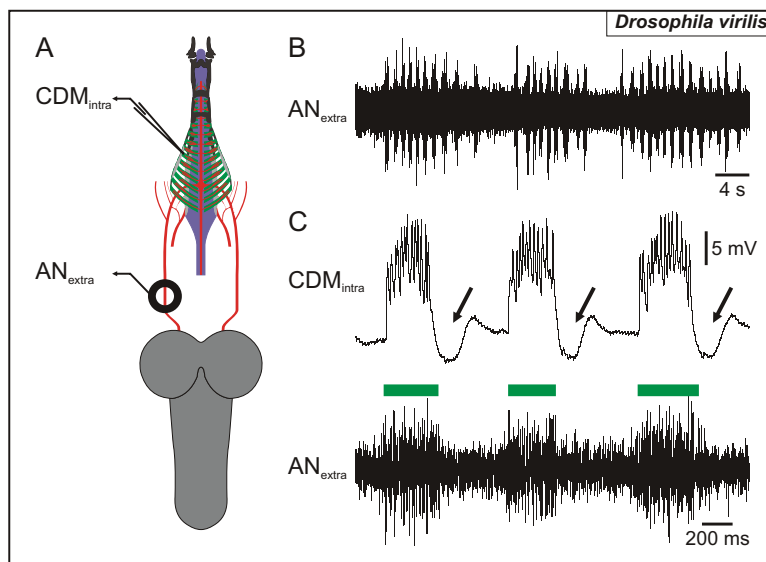


Abb. 3.37: Motorische Bahnen des Antennalnervs (AN) von *Drosophila virilis*; **A:** Versuchsaufbau; **B:** Rhythmisch auftretende Multiunitbursts im AN; **C:** Multiunitbursts im AN (farbige Balken) korrelieren mit den postsynaptischen Potentialen der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM), Pfeile markieren Bewegungsartefakte in CDM_{intra}.

Nervenableitungen am AN von *Drosophila virilis* haben gezeigt, dass rhythmische Aktivität in Form von Multiunitbursts im AN auftritt (siehe Abb. 3.37B), die dem Aktivitätsmuster des AN von *Calliphora vicina* ähnelt (siehe Kapitel 3.3.1.1). Des Weiteren konnte durch simultane Ableitungen des AN und intrazelluläre Ableitungen der CDM belegt werden, dass die postsynaptischen Potentiale der CDM zeitlich mit der Aktivität der Multiunitbursts korrelierten (siehe Abb. 3.37C).

Läsionsexperimente, bei denen die AN anterior des zentralen Nervensystems durchtrennt wurden, führten zur Eliminierung der postsynaptischen Potentiale auf der CDM. Diese Beobachtungen belegen zusätzlich, dass die motorischen Bahnen, identisch zu *Calliphora vicina*, ausgehend vom Suboesophagialganglion über die AN, die FK, die FNV und den FN projizieren und die CDM innervieren.

3.3.3.2 Maxillarnerv und Mundhakendepressor, -elevator

Die anatomische Untersuchung des Maxillarnervs (MN) von *Drosophila virilis* hat gezeigt, dass der MN, wie bei *Calliphora vicina*, auf den Mundhakendepressor (MHD), den -elevator (MHE) und den Labialretraktor (LR) projiziert. Des Weiteren haben die elektrophysiologischen Experimente an *Calliphora vicina* belegt, dass die Axone der MHD-, der MHE- und der LR-Motorneurone via den MN die entsprechenden Muskelgruppen innervieren.

Es wurde vermutet, dass die motorischen Bahnen des MHD, des MHE und des LR, entsprechend zu *Calliphora vicina*, im MN von *Drosophila virilis* lokalisiert sind. Für den Nachweis dieser Vermutung wurden, wie bei *Calliphora vicina*, simultan Ableitungen des MN und intrazelluläre Ableitungen der Muskelbündel des MHD und des MHE durchgeführt. Die neuronale Einheit des LR konnte aufgrund des Signal/Rausch-Verhältnisses der extrazellulären Ableitungen nicht identifiziert werden und war folglich nicht Bestandteil der Untersuchung.

Die Einfachableitung des MN von *Drosophila virilis* in Abb. 3.38B zeigt ein neuronales Muster bestehend aus zwei alternierend aktiven Einheiten. Die Einheiten des MN konnten anhand ihrer Amplituden in eine große und kleine Einheit eingeteilt werden.

In den simultanen Ableitungen des MN und intrazellulären Ableitungen des MHD konnte eine zeitliche Korrelation zwischen der großen Einheit und den postsynaptischen Potentialen des MHD aufgezeigt werden (siehe Abb. 3.38C). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die motorischen Bahnen der MHD-Motorneurone durch den MN von *Drosophila virilis* verlaufen.

In den simultanen Ableitungen des MN und intrazellulären Ableitungen der MHE bei *Drosophila virilis* bestand eine zeitliche Korrelation zwischen der rhythmisch aktiven kleinen Einheit und den postsynaptischen Potentialen des MHE (siehe Abb. 3.39C).

In einer genaueren Analyse der Ableitungen von *Drosophila virilis* konnte gezeigt werden, dass die kleinen Einheit 1:1 mit den postsynaptischen Potentialen des MHE mit einer Latenz von 5,8ms korreliert (siehe Abb. 3.40).

Die intrazellulären Ableitungen der Muskelfasern des MHD setzten sich aus zwei distinkten postsynaptischen Potentialen mit kleiner und großer Amplitude zusammen. Aktionspotentiale der großen Einheit des MN korrelierten 1:1 mit beiden Arten von postsynaptischen Potentialen. Die Latenz zwischen den Aktionspotentialen der großen

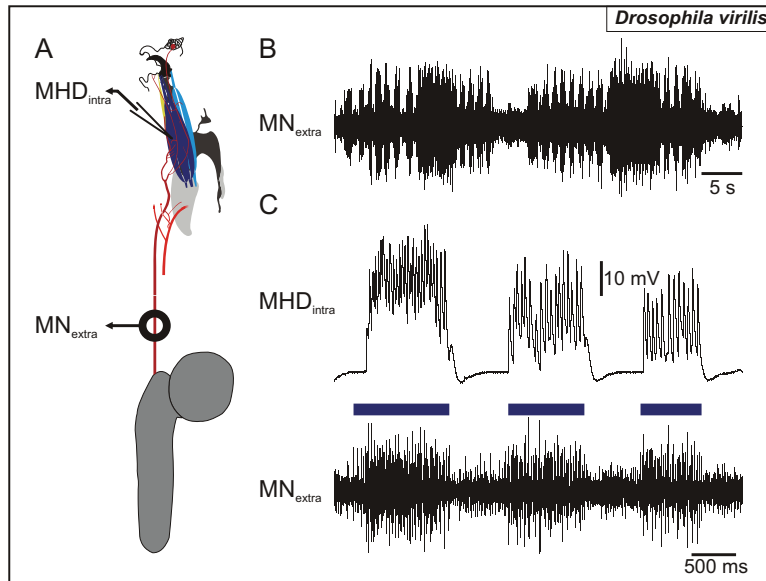


Abb. 3.38: Motorische Bahnen des Mundhakendepressors (MHD) von *Drosophila virilis*; **A:** Experimenteller Aufbau; **B:** Native extrazelluläre Ableitung des Maxillarnervs (MN) mit rhythmischer neuronaler Aktivität; **C:** Simultane extrazelluläre Ableitung des MN und intrazelluläre Ableitung des MHD, zu beachten ist die zeitliche Korrelation zwischen den Aktionspotentialen der großen Einheit (farbige Balken) des MN und den postsynaptischen Potentialen des MHD.

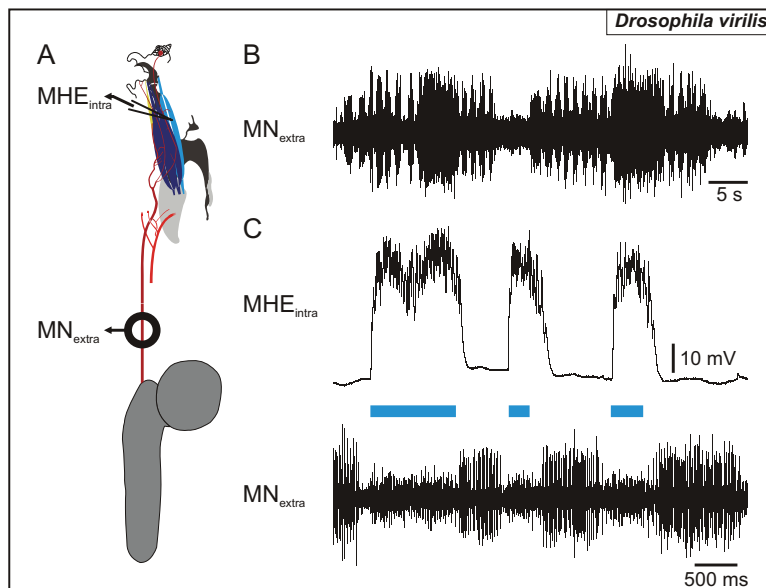


Abb. 3.39: Motorische Bahnen des Mundhakenelevators (MHE) von *Drosophila virilis*; **A:** Experimenteller Aufbau; **B:** Extrazelluläre Ableitung des Maxillarnervs (MN) mit rhythmischer neuronaler Aktivität; **C:** Simultane extrazelluläre Ableitung des MN und intrazelluläre Ableitung des MHE, zu beachten ist die zeitliche Korrelation zwischen den Aktionspotentialen der kleinen Einheit (farbige Balken) des MN und den postsynaptischen Potentialen des MHE.

Einheit und den kleinen postsynaptischen Potentialen betrug 5,8ms, wohingegen die Latenz zwischen der großen Einheit und den großen postsynaptischen Potentialen fünf ms war. Diese Resultate zeigen eindeutig, dass die motorischen Bahnen der Mundhakenmuskulatur von *Drosophila virilis*, wie bei *Calliphora vicina*, durch den MN projizieren.

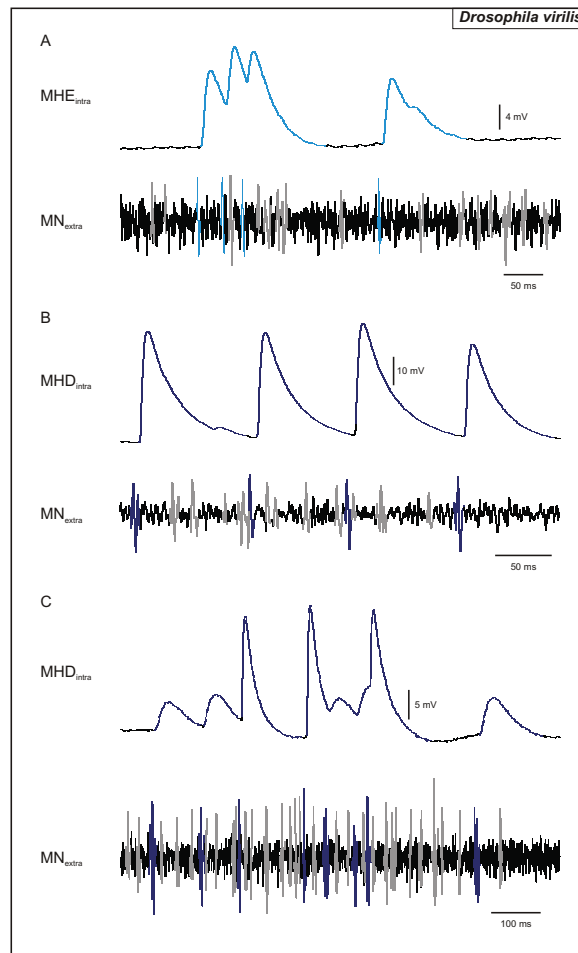


Abb. 3.40: Korrelationsanalyse der extra- und intrazellulären Ableitungen des Maxillarnervs (MN) und der Mundhakenmuskulatur (MHD und MHE) von *Drosophila virilis*; **A:** Simultane Ableitung des MN und MHE zeigt eine 1:1 Korrelation zwischen den markierten Aktionspotentialen (hellblau) und postsynaptischen Potentialen (hellblau); **B:** Simultane Ableitung des MN und MHD zeigt eine 1:1 Korrelation zwischen den markierten Aktionspotentialen (dunkelblau) und den postsynaptischen Potentialen mit großer Amplitude (dunkelblau); **C:** Simultane Ableitung des MN und MHD zeigt eine 1:1 Korrelation zwischen den markierten Aktionspotentialen (dunkelblau) und postsynaptischen Potentialen mit großer und kleiner Amplitude (dunkelblau), grau markierte Aktionspotentiale gehören zu einer anderen motorischen Einheiten der entsprechenden Muskelgruppe.

3.3.3.3 Akzessorischer Prothorakalnerv und dorsaler Protraktormuskel A

Wie die anatomischen und elektrophysiologischen Untersuchungen an *Calliphora vicina* gezeigt haben, verlaufen die motorischen Bahnen des dorsalen Protraktormuskels A ($Pro_{do}A$) durch den akzessorischen Prothorakalnerv (PaN). Die morphologische Untersuchung des PaN bei *Drosophila virilis* belegt, dass $Pro_{do}A$ bei *Drosophila virilis* vom PaN innerviert wird. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde anhand von simultanen extrazellulären Ableitung des PaN und intrazellulären Ableitungen des $Pro_{do}A$ versucht, die motorischen Bahnen der Motorneurone des $Pro_{do}A$ im PaN für *Drosophila virilis* nachzuweisen.

Die Ableitungen des PaN von *Drosophila virilis* zeigten ein rhythmisches Aktivitätsmuster bestehend aus zwei alternierenden efferenten Einheiten, deren Aktionspotentiale sich in ihren Amplituden unterscheiden (siehe Abb. 3.41B). Die dargestellte Ableitung zeigt wiederkehrende lange Bursts einer kleinen Einheit, die unterbrochen werden durch mehrere kurze Bursts einer großen Einheit. Das neuronale Muster der zwei Einheiten des PaN von *Drosophila virilis* ähnelt dem Muster der efferenten Einheiten des PaN von *Calliphora vicina* (siehe Abb. 3.29B). Die in Abb. 3.41C dargestellte Doppelableitung des PaN und $Pro_{do}A$ zeigt, dass die große Einheit 1:1 mit den postsynaptischen Potentialen des $Pro_{do}A$ (Latenz: 1,9ms) korreliert. Dieses Ergebnis belegt, dass die motorischen Bahnen des $Pro_{do}A$ von *Drosophila virilis* durch den PaN projizieren.

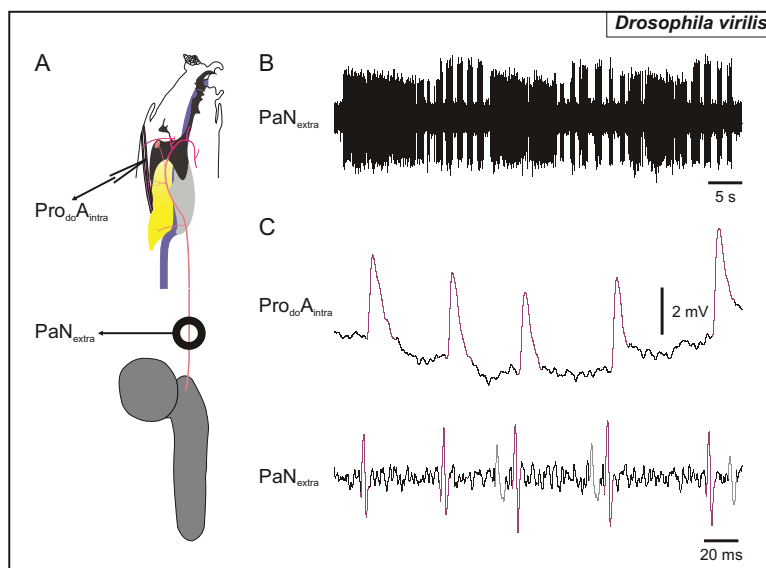


Abb. 3.41: Motorische Bahnen des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Drosophila virilis*; **A:** Versuchsaufbau; **B:** Extrazelluläre Ableitung des PaN mit rhythmischer neuronaler Aktivität; **C:** Simultane extrazelluläre Ableitung des PaN und intrazelluläre Ableitung des dorsalen Protraktormuskels A ($Pro_{do}A$), die Aktionspotentiale mit großer Amplitude zeigen eine 1:1 Korrelation mit den postsynaptischen Potentialen des $Pro_{do}A$ (1:1 Korrelationen zwischen den Aktionspotentialen und den postsynaptischen Potentialen sind farbig markiert).

3.3.4 Efferenzen der Nerven von *Drosophila melanogaster*

Ziel der elektrophysiologischen Untersuchung von *Drosophila melanogaster* war das motorische System des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) zu charakterisieren. Für die Etablierung von extrazellulären Nervenableitungen und intrazellulären Muskelableitungen an L3-Larven von *Drosophila melanogaster* wurden die Erkenntnisse aus den elektrophysiologischen Untersuchungen von *Calliphora vicina* und *Drosophila virilis* angewendet.

3.3.4.1 Antennalnerv und cibariale Dilatormuskulatur

Analog zu den beiden anderen Arten scheinen die Axone der Motorneurone der cibariale Dilatormuskulatur (CDM) von *Drosophila melanogaster* über die Antennalnerven (AN), die Frontalkonnektive (FK), die frontale Nervenverbindung (FNV) und den Frontalnerv (FN) die CDM zu innervieren. In Ableitungen des AN trat rhythmische Aktivität in Form von Multiunitbursts auf (siehe Abb. 3.42B), die den Efferenzen des AN von *Calliphora vicina* (siehe Kapitel 3.3.1.1) und *Drosophila virilis* (siehe Kapitel 3.3.3.1) ähnelt. Die simultanen Ableitungen des AN und intrazelluläre Ableitung der CDM zeigten eine zeitliche Korrelation zwischen den Multiunitbursts im AN und den postsynaptischen Potentialen der CDM (siehe Abb. 3.42C). Läsionen des AN anterior des zentralen Nervensystems führt zur Auslöschung der postsynaptischen Potentiale auf der CDM.

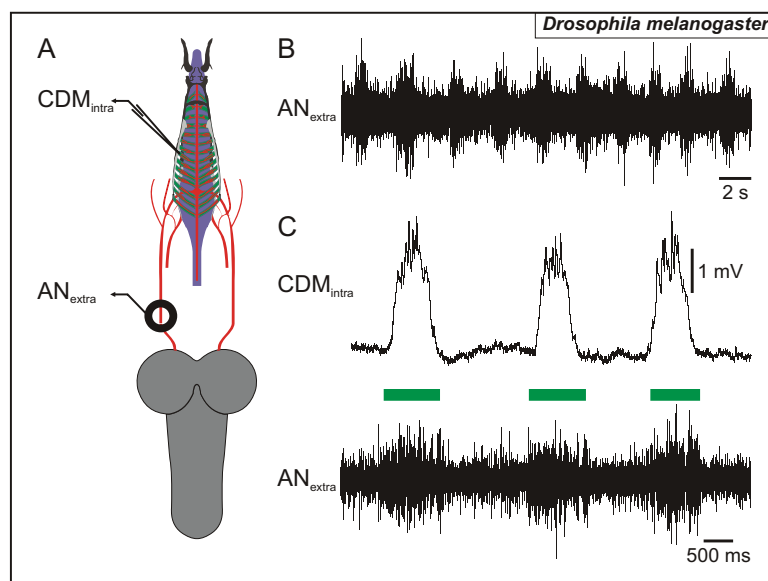


Abb. 3.42: Motorische Bahnen des Antennalnervs (AN) von *Drosophila melanogaster*; **A:** Versuchsaufbau; **B:** Rhythmisch auftretende Multiunitbursts im AN; **C:** Multiunitbursts im AN (farbige Balken) korrelieren mit den postsynaptischen Potentialen der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM).

3.3.4.2 Maxillarnerv und Mundhakendepressor, -elevator

Durch simultane extrazelluläre Ableitungen des Maxillarnervs (MN) und intrazellulären Ableitungen des Mundhakendepressors (MHD) und -elevators (MHE) bei *Drosophila melanogaster* sollte die Vermutung bestätigt werden, dass die motorischen Bahnen der beiden Mundhakenmuskelgruppen durch den MN verlaufen, entsprechend zu den Erkenntnissen über die motorischen Bahnen des MHD und des MHE bei *Calliphora vicina* und *Drosophila virilis*.

Die extrazelluläre Ableitung des MN von *Drosophila melanogaster* (siehe Abb. 3.43B und 3.44B) zeigte spontane alternierende Aktivität von zwei efferenten Einheiten, die als kleine und große Einheit bezeichnet wurden, analog zu *Calliphora vicina* (siehe Abb. 3.24B) und *Drosophila virilis* (siehe Abb. 3.38B und 3.39B). Wahrscheinlich aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses der extrazellulären Ableitungen des MN von *Drosophila melanogaster* konnte die neuronale Einheit des Labialretraktors (LR) in den Ableitungen nicht detektiert werden. Dementsprechend konnte der Verlauf der motorischen Bahnen des LR durch den MN, die für *Calliphora vicina* durch simultane extra- und intrazelluläre Ableitungen bestimmt wurde, nicht ermittelt werden.

In der simultanen Ableitung des MN und intrazellulären Ableitung des MHD von *Drosophila melanogaster* in Abb. 3.43C ist eine zeitliche Korrelation zwischen den Aktionspotentialen der großen Einheit und den postsynaptischen Potentialen des MHD zu erkennen. Die simultane extra- und intrazelluläre Ableitung des MN und des MHE in Abb. 3.44C zeigt, dass die Aktionspotentialserien der kleinen Einheit mit den postsynaptischen Potentialen des MHE korrelieren. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die motorischen Bahnen des MHD und MHE durch den MN verlaufen.

In der intrazellulären Ableitung des MHD und des MHE von *Drosophila melanogaster* (siehe Abb. 3.45A und C) konnten jeweils zwei Arten von postsynaptischen Potentialen mit unterschiedlicher Amplitude festgestellt werden, ein kleines und ein großes postsynaptisches Potential. In einer detaillierten Analyse der simultanen extra- und intrazellulären Ableitungen konnte gezeigt werden (siehe Abb. 3.45B und C), dass die Aktionspotentiale der großen Einheit des MN mit beiden Arten von postsynaptischen Potentialen des MHD und die Aktionspotentiale der kleinen Einheit des MN mit den großen postsynaptischen Potentialen des MHE 1:1 korrelierten. Die Aktionspotentiale der kleinen Einheiten des MN korrelierten mit einer konstanten Latenz von 2,5ms. Die Latenz zwischen den Aktionspotentialen der großen Einheit des MN und den großen postsynaptischen Potentialen des MHD betrug 2,5ms und im Fall der kleinen postsynaptischen Potentiale 4,8ms.

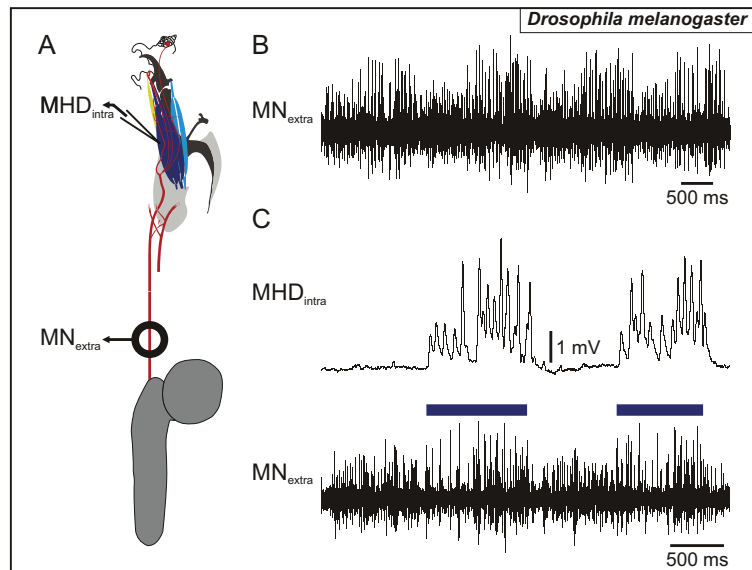


Abb. 3.43: Motorische Bahnen des Mundhakendepressors (MHD) von *Drosophila melanogaster*; **A:** Versuchsaufbau; **B:** Ableitung des Maxillarnervs (MN) mit rhythmischer Aktivität; **C:** Simultane Ableitung des MN und intrazelluläre Ableitung des MHD, die Aktionspotentiale der großen Einheit (farbige Balken) korrelierten zeitlich mit den postsynaptischen Potentialen des MHD.

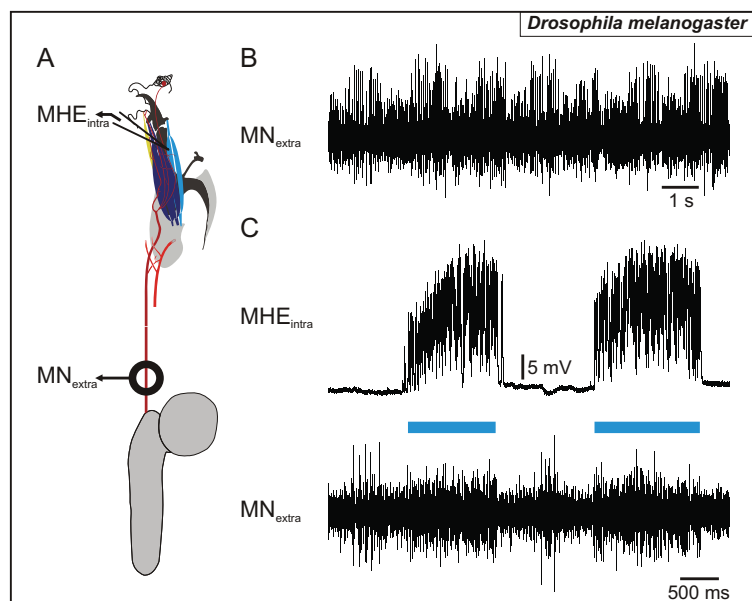


Abb. 3.44: Motorische Bahnen des Mundhakenelevators (MHE) von *Drosophila melanogaster*; **A:** Versuchsaufbau; **B:** Ableitung des Maxillarnervs (MN) mit rhythmischer Aktivität; **C:** Simultane Ableitung des MN und intrazelluläre Ableitung des MHE, die Aktionspotentiale der kleinen Einheit (farbige Balken) korrelierten zeitlich mit den postsynaptischen Potentialen des MHE.

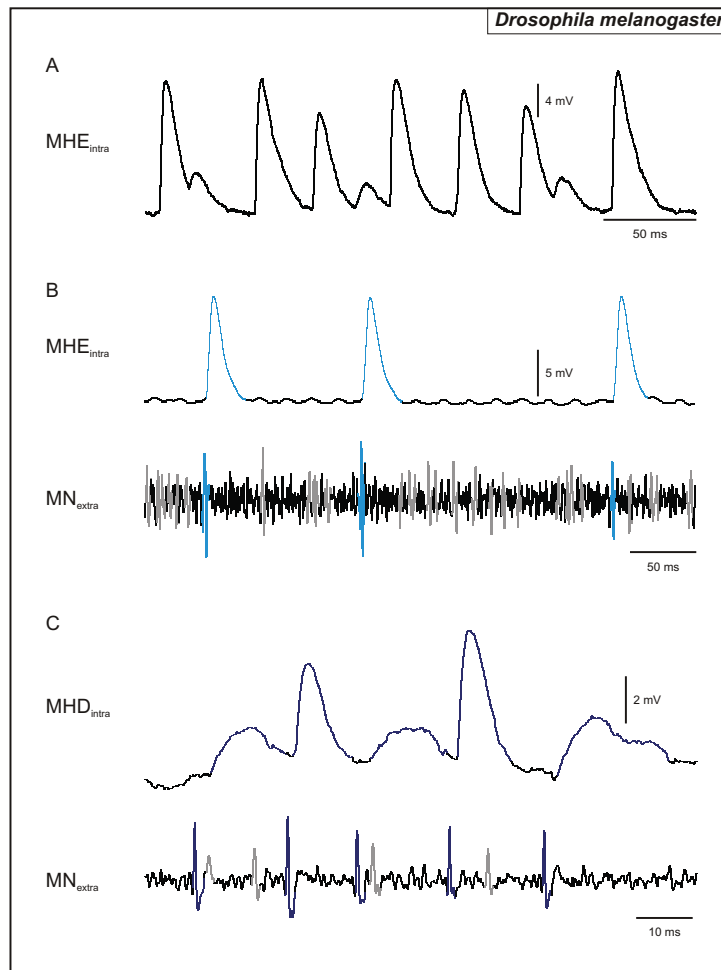


Abb. 3.45: Korrelationsanalyse der extra- und intrazellulären Ableitung des Maxillarnervs (MN) und der Mundhakenmuskulatur (MHD und MHE) von *Drosophila melanogaster*; **A:** Intrazelluläre Ableitung des MHE enthält zwei postsynaptische Potentiale, die anhand der Amplitude unterschieden werden können; **B:** Simultane Ableitungen des MN und MHE zeigten eine 1:1 Korrelation zwischen den markierten Aktionspotentialen (hellblau) und den markierten postsynaptischen Potentialen (hellblau); **C:** Simultane Ableitungen des MN und MHD zeigten eine 1:1 Korrelation zwischen den markierten Aktionspotentialen (dunkelblau) und den markierten postsynaptischen Potentialen (dunkelblau) mit großer und kleiner Amplitude, grau markierte Aktionspotentialen gehören zu einer anderen motorischen Einheiten der entsprechenden Muskelgruppe.

3.3.4.3 Akzessorischer Prothorakalnerv und dorsaler Protraktormuskel A

Aufgrund der Tatsache, dass der dorsale Protraktormuskel A ($Pro_{do}A$) bei allen drei Arten durch den akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) innerviert wird (siehe Kapitel 3.2.2.3) und die motorischen Bahnen des $Pro_{do}A$ von *Calliphora vicina* und *Drosophila virilis* durch den PaN verlaufen (siehe Kapitel 3.3.1.3 und 3.3.3.3), legte die These nahe,

dass die Axone der Motorneurone des $Pro_{do}A$ von *Drosophila melanogaster* durch den PaN projizieren. Zur Verifizierung dieser These wurden extrazelluläre Ableitungen des PaN und intrazellulärer Ableitung des $Pro_{do}A$ an *Drosophila melanogaster* durchgeführt.

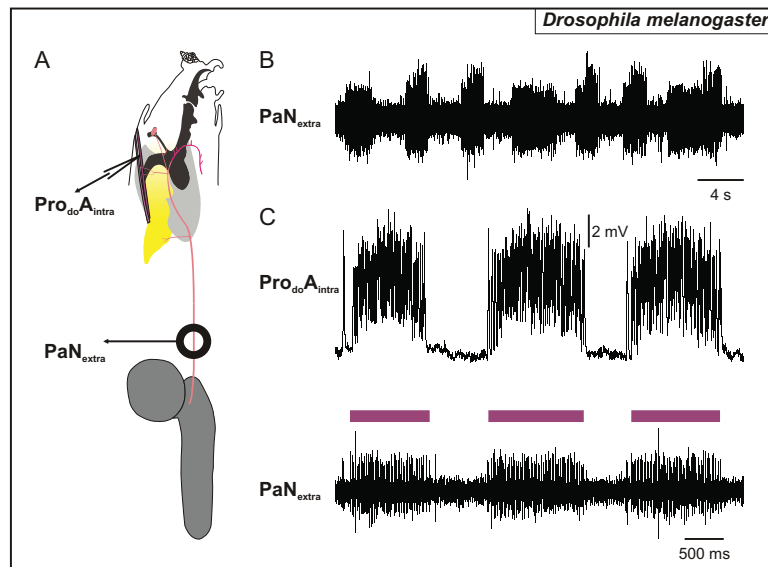


Abb. 3.46: Motorische Bahnen des akzessorischen Prothorakalnervs (**PaN**) von *Drosophila melanogaster*; **A:** Aufbau des Experiments; **B:** Extrazelluläre Ableitung des PaN mit rhythmischer neuronaler Aktivität; **C:** Simultane extra- und intrazelluläre Ableitung des PaN und des dorsalen Protraktormuskels A (**Pro_{do}A**), die Aktionspotentiale mit der großen Amplitude des PaN (farbigen Balken) korrelierten zeitlich mit den postsynaptischen Potentialen des $Pro_{do}A$.

Das Aktivitätsmuster des PaN von *Drosophila melanogaster*, das extrazellulär abgeleitet wurde (siehe Abb. 3.46B), besteht aus zwei Einheiten, die rhythmisch aktiv sind. Aufgrund der unterschiedlichen Amplitude wurden die Einheiten analog zu *Calliphora vicina* und *Drosophila virilis* als kleine und große Einheit bezeichnet. Das dargestellte Muster besteht aus lang anhaltenden Bursts der kleinen Einheit, gefolgt von mehreren kurzen Bursts, die sich aus der kleinen und großen Einheit zusammensetzen. Das Aktivitätsmuster der zwei Einheiten des PaN von *Drosophila melanogaster* besitzt Ähnlichkeiten mit dem Muster des PaN in den Ableitungen von *Calliphora vicina* (siehe Abb. 3.29B) und *Drosophila virilis* (siehe Abb. 3.41B). In der simultanen Ableitung des PaN und intrazelluläre Ableitung des $Pro_{do}A$ zeigte sich eine Korrelation zwischen den Aktionspotentialen der großen Einheit und den postsynaptischen Potentialen des $Pro_{do}A$ (siehe Abb. 3.46C).

Eine detaillierte Analyse der simultanen extra- und intrazellulären Ableitungen ergab eine 1:1 Korrelation zwischen der großen Einheit des PaN und den postsynaptischen Potentialen des $Pro_{do}A$ mit einer konstanten Latenz von 2ms. Die Ergebnisse zeigten, dass die Axone der Motorneurone des $Pro_{do}A$ von *Drosophila melanogaster* über den PaN auf den Muskel projizieren und seine Kontraktion steuern. Diese Erkenntnisse sind

in Einklang mit den Ergebnissen des PaN und des Pro_{do}A von *Calliphora vicina* (siehe Kapitel 3.3.1.3) und *Drosophila virilis* (siehe Kapitel 3.3.3.3).

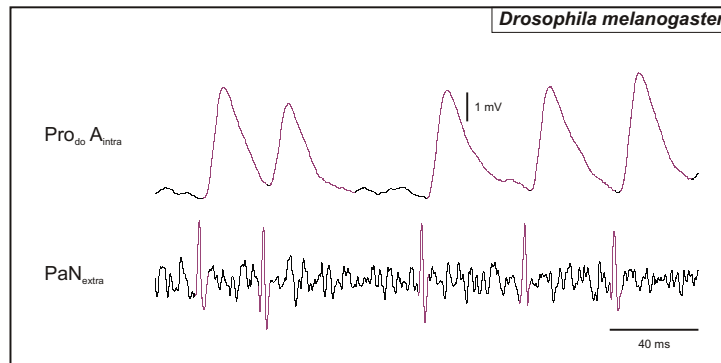


Abb. 3.47: Korrelationsanalyse der großen Einheit des akessorischen Prothorakalnervs (**PaN**) mit den postsynaptischen Potentialen des dorsalen Protraktormuskels A (**Pro_{do}A**) von *Drosophila melanogaster*; die extra- und intrazelluläre Doppelableitung zeigte eine 1:1 Korrelation zwischen den Aktionspotentialen der großen Einheit des PaN und den postsynaptischen Potentialen des Pro_{do}A (1:1 Korrelationen farbig markiert).

3.4 Fiktives Fressverhalten

3.4.1 *Calliphora vicina*

Simultane extrazelluläre Ableitungen des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) am isolierten Nervensystem von *Calliphora vicina* zeigten spontane, rhythmische Aktivität der identifizierten motorischen Einheiten. Aufgrund der gesammelten Daten über die Funktionsmorphologie der am Fressverhalten beteiligten Muskeln und über die Neurobiologie der zugehörigen motorischen Einheiten des AN, MN und PaN war es möglich deren Efferenzen mit distinkten Bewegungen, z.B. Burst der großen Einheit im MN entspricht einem Heben der Mundhaken, gleichzusetzen. Zu Beginn sollte geklärt werden, ob sich das Bewegungsmuster, das aus der zeitlichen Abfolge der Aktivität der motorischen Einheiten ergibt, dem beobachteten Fressverhalten der Larven von *Calliphora vicina* entsprach.

3.4.1.1 Etablierung

Abbildung 3.48B zeigt eine Sequenz aus einer Dreifachableitung des AN, des MN und des PaN am isolierten Nervensystem von *Calliphora vicina*. Die neuronale Aktivität der efferenten Einheiten, respektive das daraus ableitbare fiktive Verhalten, wies grundlegend große Übereinstimmungen zu dem natürlichen Fressverhalten der Larve aus der Verhaltensuntersuchung (siehe Kapitel 3.1) auf. Dieses Erregungsmuster wurde aufgrund der hohen Häufigkeit⁴ bei Dreifachableitungen am isolierten zentralen Nervensystem von *Calliphora vicina* als Standard definiert. Der dargestellte Ausschnitt beginnt mit einigen ausgeprägten Bursts verschiedener Einheiten im AN, MN und PaN. Auf diese Bursts folgen eine große Anzahl von weniger intensiven Bursts (ca. 16), die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Burstdauer geringer ist und die efferente Einheit des Mundhakenelevators (MHE) nicht 1:1 mit der Einheit des Mundhakendepressors (MHD) alternierend aktiv ist, sondern im Verhältnis 1:4 bzw. 1:5.

In Abbildung 3.48C ist ein Ausschnitt aus der extrazellulären Dreifachableitung in höherer zeitlicher Auflösung dargestellt, um die Übereinstimmungen zwischen der Aktivität der efferenten Einheiten des AN, des MN und des PaN bzw. den resultierenden fiktiven Bewegungen mit dem Bewegungsmuster des Fresszyklus (siehe Abb. 3.1) exemplarisch aufzuzeigen. Das neuronale Muster in der gezeigten Ableitung beginnt mit der Aktivität der kleinen Einheit des MN (MHE), die von $\approx 0,1s$ bis $\approx 0,4s$ (Dauer: $\approx 0,3s$) anhält. Nach einer Pause von $\approx 0,1s$ folgt die Aktivität der großen Einheit im MN (MHD) von $\approx 0,5s$ bis $\approx 1,5s$ (Dauer: $\approx 1s$). In die Aktivität der großen Einheit (MHD) fällt die Aktivität der mittleren Einheit des MN (Labialretraktors, (LR)), die bei ca. 1,4s be-

⁴ Bei 55% der durchgeführten Dreifachableitung konnte ein ähnliches Erregungsmuster wie in Abb. 3.48B festgestellt werden.

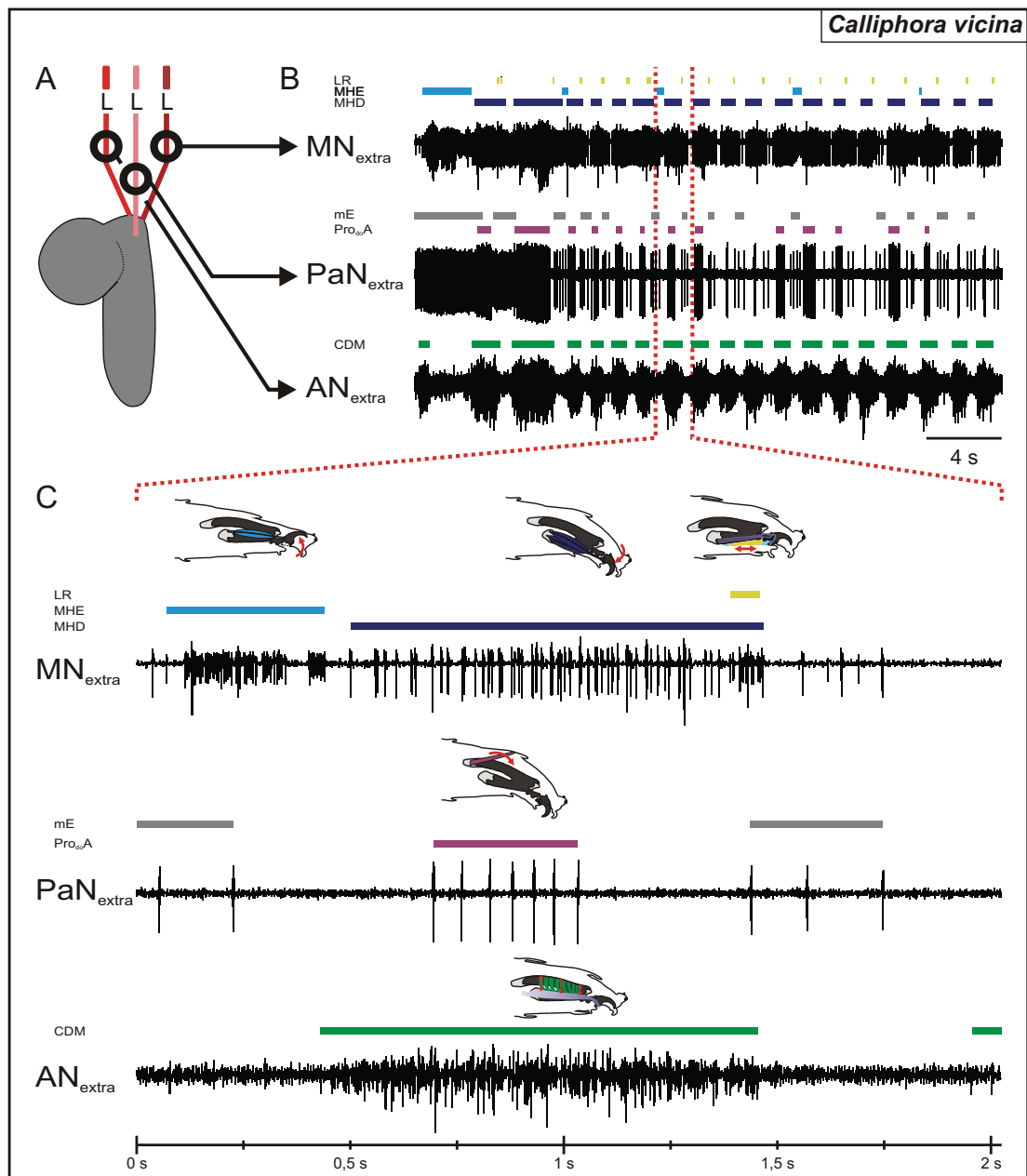


Abb. 3.48: Fiktives Fressverhalten von *Calliphora vicina*; **A:** Experimenteller Aufbau; **B:** Dreifachableitung des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN), die Aktivität der identifizierten motorischen Einheiten ist mit farbigen Balken markiert; **C:** Markierter Ausschnitt der Dreifachableitung bei höherer zeitlicher Auflösung, zusätzlich zur neuronalen Aktivität der motorischen Einheiten (farbige Balken) ist die daraus resultierende Bewegung durch schematische Darstellungen der Larven illustriert; verwendete Abk.: CDM - Cibariale Dilatormuskulatur, L - Läsion, LR - Labialretraktor, mE - mittlere Einheit, MHD - Mundhakendepressor, MHE - Mundhakenelevator, $Pro_{do}A$ - Dorsaler Protraktormuskel A.

ginnt und fast synchron mit der Aktivität der großen Einheit (MHD) zum Zeitpunkt $\approx 1,5\text{s}$ endet (Dauer: $\approx 0,1\text{s}$). Die Einheit im AN (cibariale Dilatormuskulatur, (CDM)) ist von $\approx 0,4\text{s}$ bis $\approx 1,5\text{s}$ (Dauer: $\approx 1,1\text{s}$) aktiv. Nach einem Interburstintervall von $\approx 0,5\text{s}$ beginnt ein neuer Multiunitburst der Einheit, dessen Dauer über das Ende des dargestellten Ausschnitts hinausreicht. Die Aktivität im PaN beginnt mit einem Burst der nicht identifizierten mittleren Einheit (mE), der Burstanfang ist im gewählten Ausschnitt nicht dargestellt und dauert $\approx 0,2\text{s}$ an. Auf den Burst der mE folgt eine Pause von $\approx 0,5\text{s}$ bevor ein Burst der großen Einheit (dorsaler Protraktor A, (Pro_{do}A) für $\approx 0,3\text{s}$ einsetzt. Die Aktivität dieser Einheit ist gleichzeitig mit der großen Einheit im MN (MHD) und der Einheit des AN (CDM) aktiv. Nach einer weiteren Pause von $\approx 0,4\text{s}$ beginnt ein neuer Burst der mE, der von $\approx 1,4\text{s}$ bis $\approx 1,7\text{s}$ andauert. Das fiktive motorische Muster von *Calliphora vicina* hat eine mittlere Frequenz von $0,8\text{Hz}$ (Standardabweichung: $\pm 0,4\text{Hz}$; $n=957$)

Aus der Aktivität der motorischen Einheiten des AN, des MN und des PaN kann, wie die Abb. 3.48C illustriert, ein zeitliches Bewegungsmuster abgeleitet werden. Dieses fiktive Bewegungsmuster konnte teilweise in den Fresszyklus (siehe Kapitel 3.1) eingebunden werden, da nicht alle Muskelgruppen, deren Kontraktion die einzelnen Phasen des Zyklus kennzeichnen, mit der Dreifachableitung erfasst wurden. Dazu gehören die Retraktoren der vorderen Segmente und der ventrale Protraktor des cephalopharyngealen Skeletts (CPS), wodurch die Bewegungen der vierten Phase nicht bestimmt werden können. Des Weiteren ist es nicht möglich die erste Phase des Fresszyklus zu determinieren, weil der relaxierte Zustand der Larve eine Annahme für die Erstellung des Fresszyklus war. Aufgrund dieses Sachverhaltes setzt die Einbindung der Aktivität des AN, des MN und des PaN in den Fresszyklus in der zweiten Phase mit dem Heben der Mundhaken (kleine Einheit des MN) ein. Nach einer kurzen Pause fallen mehrere Einzelbewegungen zu einer koordinierten Bewegungsabfolge zusammen, was an der überlappenden Aktivität von drei motorischen Einheiten in den Nerven erkennbar ist. Zuerst erfolgt die Kontraktion der CDM (Einheit im AN), die für die Nahrungsaufnahme zuständig ist. Direkt auf den Beginn der Kontraktion der CDM folgt das Senken der Mundhaken (große Einheit des MN). Während der Kontraktion der CDM und MHD erfolgt die dorsale Neigung des CPS (große Einheit des PaN). Abgeschlossen wird die Einbindung der Efferenzen der Nerven in den Zyklus durch das Öffnen des Labiums (mittlere Einheit des MN), wodurch die Nahrung in den Pharynx aufgenommen werden kann. Die zeitliche Abfolge und Koordination der Einzelbewegung ist kongruent mit der zweiten bis vierten Phase des Fresszyklus.

Ausgehend von diesen Übereinstimmungen kann die neuronale Aktivität der identifizierten motorischen Einheiten als „fiktives Fressverhalten“ deklariert werden.

3.4.1.2 Variabilität

Die Dreifachableitungen des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) am isolierten zentralen Nervensystem von *Calliphora vicina* zeigten ein hohes Maß an Variabilität des fiktiven Fressverhaltens. Die Beispiele in Abb. 3.49 sollen die Variabilität in der rhythmischen Aktivität bei *Calliphora vicina* verdeutlichen.

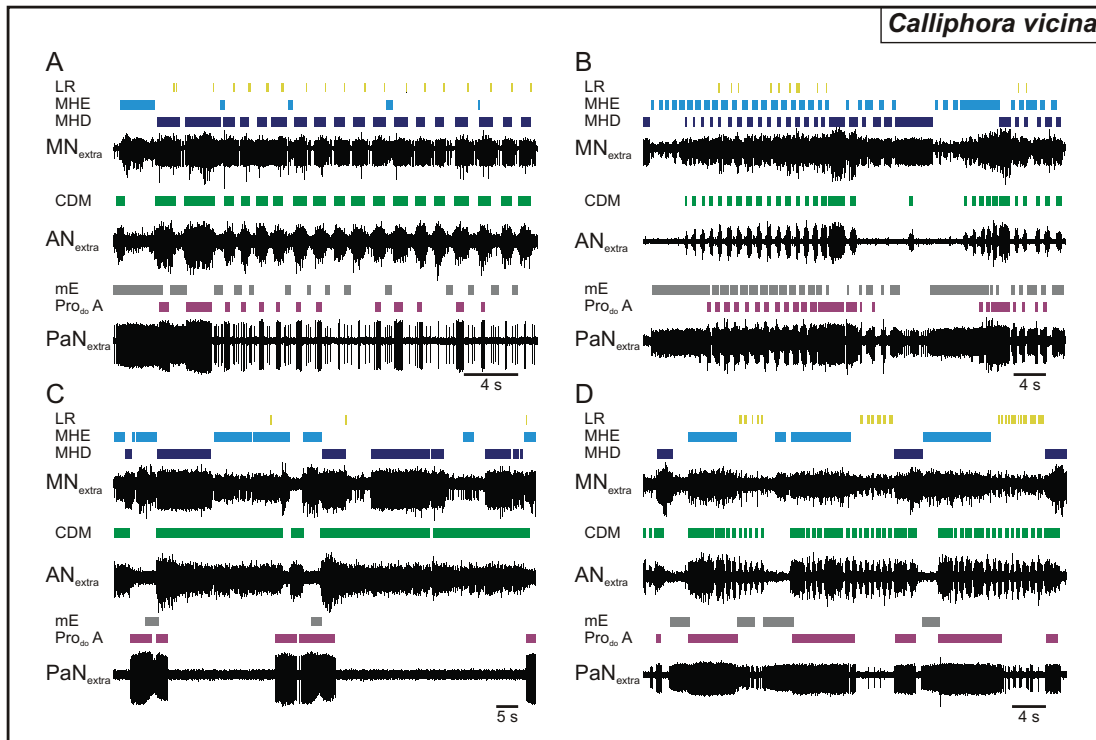


Abb. 3.49: Variabilität des fiktiven Fressverhaltens von *Calliphora vicina*; **A:** Standardrhythmus des fiktiven Fressverhaltens; **B:** Invertierter Rhythmus; **C:** Rhythmus mit lang andauernden Bursts im Antennalnerv (AN) und Maxillarnerv (MN), sowie langen Interburstintervallen im akzessorischen Prothorakalnerv (PaN); **D:** Rhythmus mit kurzen Bursts des AN und lang andauernden Bursts der Einheiten des PaN; verwendete Abk.: **CDM** - Cibariale Dilatormuskulatur, **LR** - Labialretraktor, **mE** - mittlere Einheit, **MHD** - Mundhakendepressor, **MHE** - Mundhakenelevator, **Pro_{do}A** - Dorsaler Protraktormuskel A.

In Abb. 3.49A zeigt die Einheit des Labialretraktors (LR) im fiktiven Fressverhalten eine permanente rhythmische Aktivität, deren Burstanfang mit dem Ende der Aktivität der Einheit des Mundhakendepressors (MHD) überlappt. Der LR kann aber auch sporadisch rhythmisch aktiv sein (siehe Abb. 3.49B) oder der Burst von LR fällt in das Intervall zwischen der Aktivität von MHD und Mundhakenelevator (MHE) (siehe Abb. 3.49D). Des Weiteren zeigte sich, dass bei der Einheit des LR auch keine Korrelation zu einer Einheit der Mundhakenmuskulatur vorliegen kann (siehe Abb. 3.49C). Die Aktivität des LR kann aus einzelnen Bursts (siehe Abb. 3.49A-C) oder Serien von Bursts (siehe Abb.

3.49D) bestehen.

Normalerweise zeigten MHD und MHE eine alternierende Aktivität, die im Verhältnis von MHE-Einheit zu MHD-Einheit von 3:1 (siehe Abb. 3.49D) bis zum Verhältnis 1:5 (siehe Abb. 3.49A) variieren konnte. Ein hohes Maß an Variabilität zeigt das Interburstintervall zwischen MHD-Einheit und MHE-Einheit, das zwischen 0,4s (siehe Abb. 3.49A) und fünf s (siehe Abb. 3.49D) schwanken kann.

Die Aktivität der Einheiten der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) hat zwei Typen von Mustern. Ein Typ besteht aus regelmäßiger rhythmischer Aktivität mit Interburstintervallen von \approx einer s, die von längeren Interburstintervallen mit bis zu \approx sieben s Dauer unterbrochen werden (siehe Abb. 3.49A, B und D). Auffallend ist, dass diese langen Interburstintervalle mit erhöhter Aktivität der nicht identifizierten mittleren Einheit (mE) des PaN korrelieren (siehe Abb. 3.49B und D). Der zweite Typ besteht aus langen Bursts der CDM-Einheit (Burstdauer: \approx 29s), die teilweise mit kurzen Burst alternieren. In zwei der vier Beispiele zeigte die Aktivität der CDM-Einheit eine gewisse zeitliche Korrelation zu der Aktivität der MHD-Einheit (siehe Abb. 3.49A und B), wohingegen in Abb. 3.49D die Aktivität der CDM-Einheit mit der Aktivität der MHE-Einheit und der LR-Einheit korreliert zu sein scheint. In Abb. 3.49C ist die CDM-Einheit während der Bursts der MHD-Einheit und MHE-Einheit aktiv.

Die Aktivität der zwei efferenten Einheiten des PaN besitzt eine hohe Variabilität. In Abb. 3.49A und B sind die zwei efferenten Einheiten nahezu kontinuierlich und alternierend aktiv, wobei sie teilweise mit der Aktivität im AN und MN korrelieren. In beiden Fällen zeigt die Aktivität der Einheit des dorsalen Protraktormuskels A (*Pro_{do}A*) eine gewisse Korrelation zur Aktivität der CDM-Einheit. Das Gegenteil ist in Abb. 3.49C zu erkennen, wo die rhythmische Aktivität der *Pro_{do}A*-Einheit in die Interburstintervalle der CDM-Einheit fällt. In Abb. 3.49D ist die *Pro_{do}A*-Einheit aktiv, wenn die CDM-Einheit rhythmische Aktivität zeigt. Auffällig an der alternierenden Aktivität der *Pro_{do}A*-Einheit und der mE ist die Variabilität der Intervalle zwischen beiden efferenten Einheiten. In Abb. 3.49A ist ein Burstintervall von ca. 0,5s zwischen beiden efferenten Einheiten erkennbar. Wohingegen in Abb. 3.49B und D Intervalle zwischen den Bursts beider Einheiten nur teilweise vorhanden sind und sich in den restlichen Fällen das Burstende der mE und der Burstanfang von der *Pro_{do}A*-Einheit überlappen. In Abb. 3.49C werden teilweise die Bursts der mE durch lange Burst der *Pro_{do}A*-Einheit maskiert.

Die hohe Variabilität der rhythmischen Aktivität der efferenten Einheiten des AN, des MN und des PaN bei *Calliphora vicina* lässt vermuten, dass der neuronale Rhythmus des fiktiven Fressverhaltens durch unbekannte Mechanismen modulierbar ist.

3.4.1.3 Rhythmusanalyse

Begründet durch die hohe Variabilität des fiktiven Fressverhaltens von *Calliphora vicina* fokussierte sich die Analyse der neuronalen Rhythmen in den extrazellulären Ableitungen des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Calliphora vicina* auf Impulsmuster, die dem als Standard definierten Rhythmus aus Abb. 3.49A ähnelten.

In Abb. 3.50 wurde versucht, die Komplexität des neuronalen Rhythmus des AN, des MN und des PaN zu erfassen und charakteristische Merkmale herauszuarbeiten. Die Abbildung zeigt auf der rechten Seite in der Senkrechten die Originalableitung der drei Nerven, die gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die Aktivität der Einheiten ist zu Beginn der Ableitung für das Verständnis mit den entsprechenden Farben markiert worden. Auf der linken Seite ist in der Waagerechten die Aktivität der sechs efferenten Einheiten für die einzelnen Perioden dargestellt. Die Bursts der Einheiten wurden gegen die Periodendauer der CDM-Einheit aufgetragen. Burstabschnitte der efferenten Einheiten, die außerhalb der Periode der CDM-Einheit liegen, wurde durch leere Boxen mit gestrichelten Umrandungslinien gekennzeichnet.

Der neuronale Rhythmus der Ableitungen des AN, des MN und des PaN besteht aus einem komplexen sich wiederholenden Muster. Vergleicht man das Aktivitätsschema der Einheiten in der 1./1'. und 2./2'. Periode, zeigen sich große Übereinstimmungen. Im Besonderen ist die lange Burstdauer der mittleren Einheit (mE) des PaN für die 1. und 1'. Periode markant. In der 2. und 2'. Periode ist die lange Burstdauer der Mundhakendepressor (MHD)-Einheit und das Ausbleiben des Bursts der dorsalen Protraktormuskel A (*Pro_{do}A*)-Einheit charakteristisch.

Die 5. bis 15. Periode des AN, des MN und des PaN kennzeichnet eine starke Übereinstimmung in der zeitlichen Abfolge der Bursts der efferenten Einheiten, deren Aktivitätsmuster im Detail dem in Abb. 3.48C gleichen.

Diese zwei unterschiedlichen wiederkehrenden Motive im neuronalen Rhythmus des AN, des MN und des PaN scheinen sich in der Periodendauer der CDM-Einheit wiederzuspiegeln. Die 1. bis 4. und 16. bis 2'. Periode besitzt die CDM-Einheit eine lange Periodendauer, wohingegen in der 5. bis 15. Periode die Periodendauer der CDM-Einheit kurz ist. Zusammengefasst suggerieren diese Feststellungen, dass das fiktive motorische Muster des Fressverhaltens von *Calliphora vicina* aus zwei fusionierten Rhythmen bestehen könnte. Im Folgenden soll dieses motorische Muster eingehend analysiert werden und die zwei putativen Rhythmen, aus denen sich das Erregungsmuster des fiktiven Fressverhaltens anscheinend zusammensetzt, nachgewiesen werden.

Die Verhaltensuntersuchung von *Calliphora vicina* hat gezeigt, dass häufig ein Umschalten zwischen stark ausgeprägten und schwach ausgeprägten Zyklen im Fressverhalten

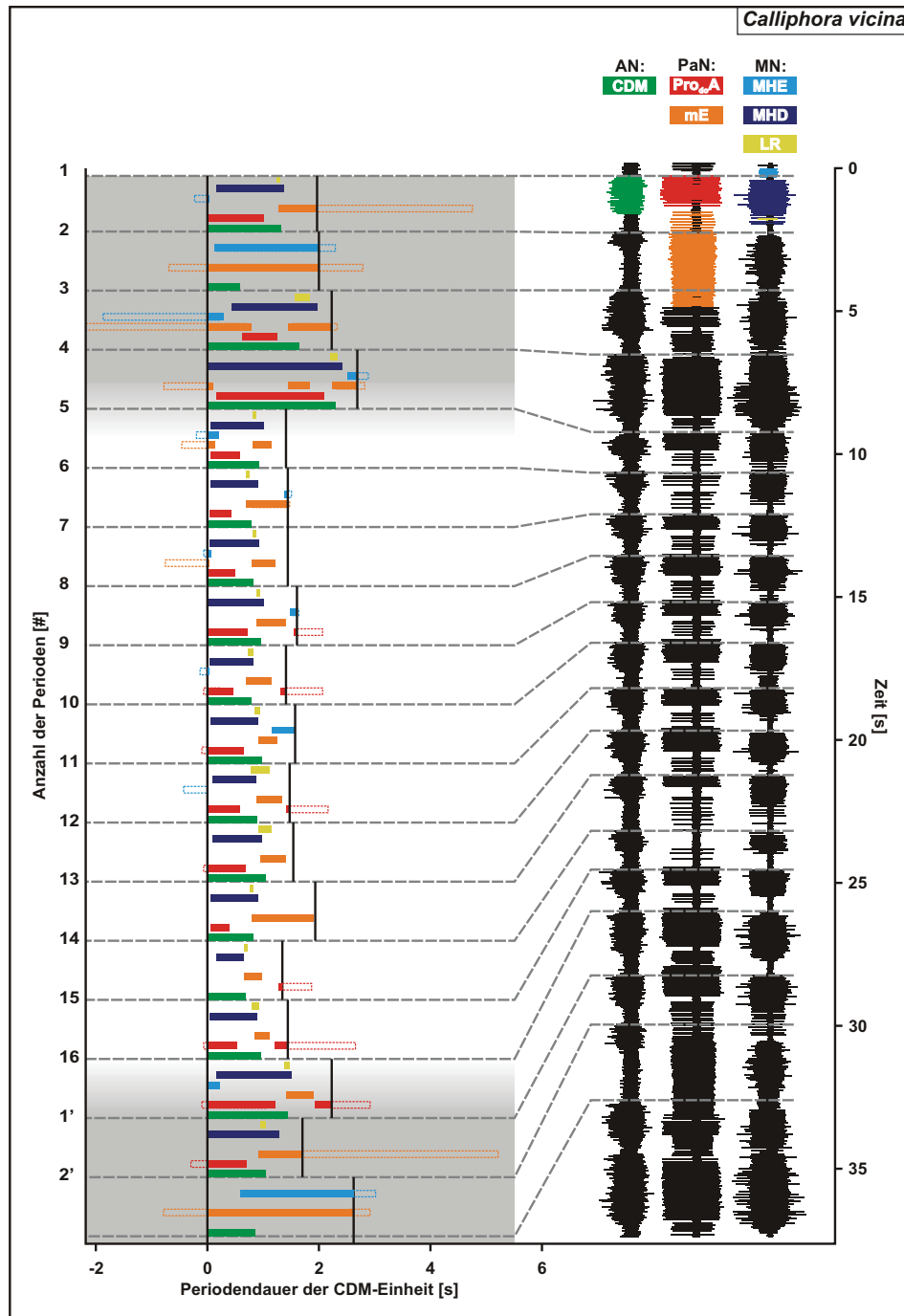


Abb. 3.50: Rhythmusanalyse des fiktiven Fressverhaltens von *Calliphora vicina*; in der senkrechten ist die Originalableitung des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) abgebildet, die gegen die Zeit [s] und die Anzahl der Perioden aufgetragen wurde, auf der Ordinate ist die Periodendauer der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM)-Einheit [s] dargestellt, die Periodendauer der CDM-Einheit und das Erregungsmuster der Einheiten in den Perioden suggerieren zwei sich überlagernde neuronale Rhythmen; verwendete Abk.: LR - Labialretraktor, mE - mittlere Einheit, MHD - Mundhakendepressor, MHE - Mundhakenelevator, $Pro_{do}A$ - Dorsaler Protraktormuskel A.

erfolgt (siehe Kapitel 3.1). Das Erregungsmuster der efferenten Einheiten, dargestellt in Abb. 3.50, stimmt mit den Verhaltensbeobachtungen überein. Es wäre zu vermuten, dass der dargestellte Rhythmus ein Hybrid aus zwei sich überlagernden Rhythmen ist, einem Schnellen und einem Langsamen. Mittels einer statistischen Analyse wurde versucht diese Theorie zu verifizieren. In Abb. 3.51 wurde die Periodendauer der cibariellen Dilatormuskulatur (CDM)-Einheit als Histogramm aufgetragen. Das Histogramm besitzt zwei Maxima. Das erste liegt bei einer Periodendauer von 1,1 bis 1,2s, das zweite bei einer von 3,2 bis 3,3s. Des Weiteren ergab die statistische Analyse, dass die gesamte Periodendauer im Histogramm hoch signifikant nicht normalverteilt⁵ ist. Beide Fakten bestärken die These, dass es sich um einen hybriden Rhythmus handelt.

Für einen weiteren statistischen Nachweis des hybriden Rhythmus wurden definierte Intervalle um die beiden Maxima einem Test auf Normalverteilung unterzogen. Das erste Intervall von 0,6 bis 1,6s ist nicht normalverteilt⁶. Wohingegen das zweite Intervall von 2,7 bis 3,5s normalverteilt⁷ ist. Die durchgeführte deskriptive statistische Analyse der Teilpopulationen der Periodendauer der CDM-Einheit belegt teilweise die Existenz eines hybriden motorischen Rhythmus im fiktiven Fressverhalten von *Calliphora*-Larven. Allgemein kann man festhalten, dass die statistische Analyse der Periodendauer der CDM-Einheit tendenziell ein hybrides motorisches Muster suggeriert.

Die Frage, die durch die Phasenanalyse beantwortet werden sollte, ist, ob der neuronale Rhythmus aus 3.48C ein wiederkehrendes Motiv des fiktiven Fressverhaltens von *Calliphora vicina* ist. Die Datengrundlage für die Phasenanalyse bildeten Sequenzen der durchgeführten Dreifachableitungen des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN), die einen stabilen Rhythmus, wie dem in Abb. 3.48C gezeigten, aufwiesen. Insgesamt wurden zwölf Sequenzen aus den Dreifachableitungen ausgewertet. Für die Phasenanalyse, die in Abb. 3.52 dargestellt ist, wurde die Einheit des AN, die die cibariale Dilatormuskulatur (CDM) repräsentiert, als Referenz benutzt. Dementsprechend sind die im Folgenden angegebenen Werte für die Burstdauer, den Burstanfang und das Burstende sowie die Mittelwerte auf die CDM-Einheit normiert worden.

Die Bursts der CDM beginnen folglich bei Null und enden bei 0,553 (Standardabweichung: $\pm 0,146$; $n=481$).

Übereinstimmend mit der Verhaltensuntersuchung beginnt der Fresszyklus in der Phasenanalyse mit der Aktivität der Einheit des Mundhakenelators (MHE). Sie beginnt bei -0,174 (Standardabweichung: $\pm 0,196$; $n=315$) und endet bei 0,048 (Standardabweichung:

5 Test auf Normalverteilung: 1) Kolmogorov-Smirnov-Test: $W=0,254$, $p \leq 0,0001$; 2) Shapiro-Wilk-Test: $W=0,559$, $p \leq 0,0001$.

6 Test auf Normalverteilung: 1) Kolmogorov-Smirnov-Test: $W=0,17$, $p=0,032$; 2) Shapiro-Wilk-Test: $W=0,914$, $p=0,021$.

7 Test auf Normalverteilung: 1) Kolmogorov-Smirnov-Test: $W=0,067$, $p=0,2$; 2) Shapiro-Wilk-Test: $W=0,976$, $p=0,73$.

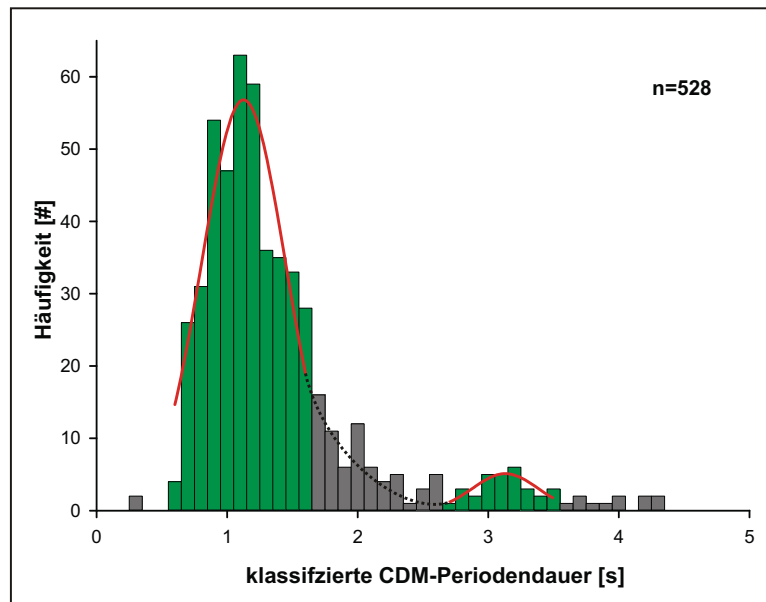


Abb. 3.51: Histogramm der Periodendauer der cibariellen Dilatormuskulatur (CDM) von *Caliphora vicina*; die gesamte Periodendauer der CDM ist hochsignifikant nicht normalverteilt, das erste Intervall (0,6 bis 1,6s) ist nicht normalverteilt, das zweite Intervall (2,7 bis 3,5s) ist normalverteilt.

$\pm 0,172$; $n=315$). Die Burstdauer des MHE beträgt $0,222$ (Standardabweichung: $\pm 0,132$; $n=315$). Auf die Aktivität der MHE-Einheit folgt der Burst der Mundhakendepressor (MHD)-Einheit. Der Burstanfang liegt bei $0,017$ (Standardabweichung: $\pm 0,092$; $n=464$) und das Burstende ist bei $0,484$ (Standardabweichung: $\pm 0,142$; $n=464$). Die Burstdauer beträgt $0,467$ (Standardabweichung: $\pm 0,144$; $n=464$). Die letzte aktive Einheit im MN ist der Labialretraktor (LR). Die Bursts der LR-Einheit hatten von allen Einheiten die geringste Dauer mit $0,081$ (Standardabweichung: $\pm 0,046$; $n=419$). Nach dem Burst der MHD-Einheit folgt die Aktivität der LR-Einheit (Burstanfang: $0,515$ (Standardabweichung: $\pm 0,128$; $n=419$), Burstende: $0,595$ (Standardabweichung: $\pm 0,138$; $n=419$)). Auf die aktive Phase des LR folgt ein Intervall ohne Aktivität im MN, bevor der nächste Burst des MHE einsetzt.

Die Daten zeigen, dass die MHE-, MHD- und LR-Einheit coaktiv sein können. Das zeitliche Muster der motorischen Einheiten des MN, unabhängig von den anderen efferenten Einheiten betrachtet, steht im Einklang mit dem beobachteten Fressverhalten der Larven (siehe Kapitel 3.1).

Die efferenten Einheiten des PaN beginnen mit einem Burst der Einheit, die den dorsalen Protraktor A ($Pro_{do}A$) repräsentiert, zum Zeitpunkt $-0,096$ (Standardabweichung: $\pm 0,145$; $n=334$) und enden bei $0,264$ (Standardabweichung: $\pm 0,145$; $n=334$). Die Burstdauer der $Pro_{do}A$ -Einheit beträgt $0,36$ (Standardabweichung: $\pm 0,13$; $n=334$). Im Zeitraum von Null bis $0,264$ sind die motorischen Einheiten der CDM, des MHD und des

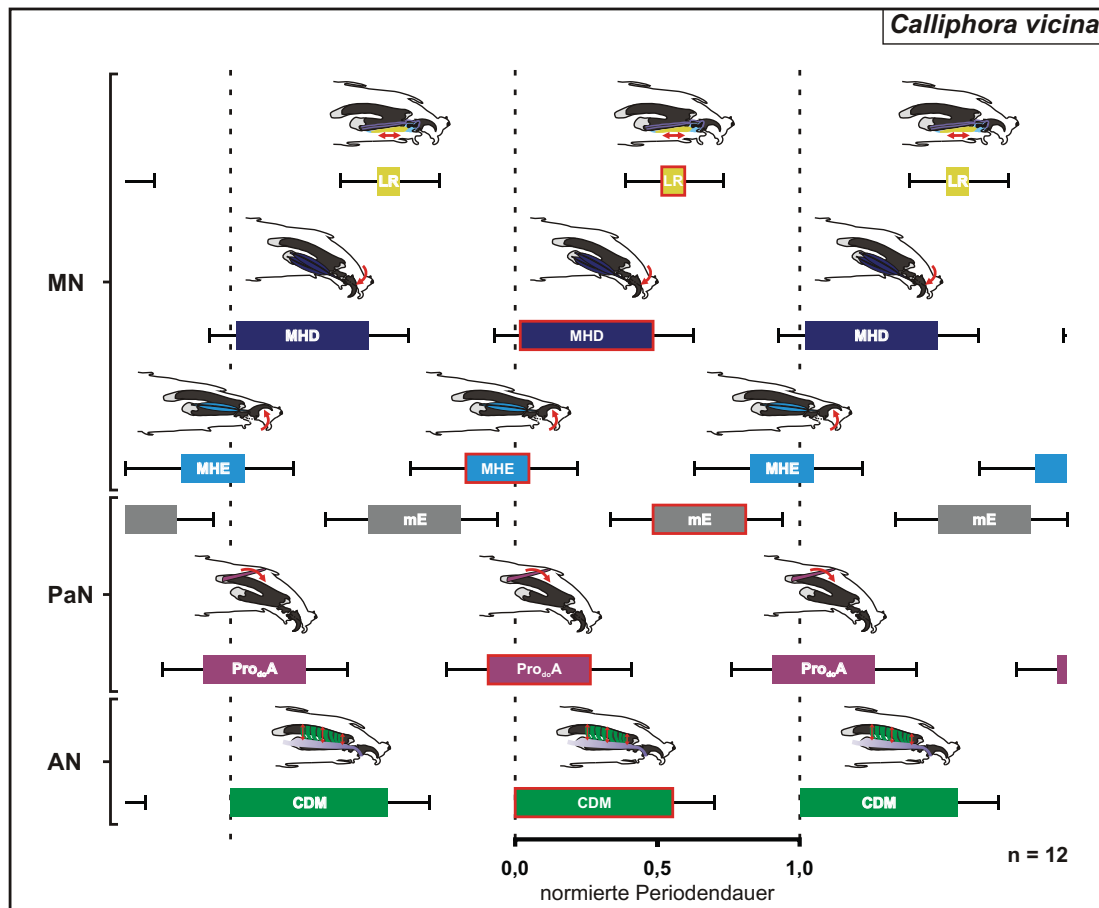


Abb. 3.52: Phasenanalyse des fiktiven Fressverhaltens bei *Calliphora vicina*; dargestellt ist die Aktivität der identifizierten efferenten Einheiten des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnerve (PaN), die Burstdauer (farbige Balken) inklusive der Standardabweichungen sind auf die Periodendauer der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) normiert; die rot umrandeten Bursts, bzw. Balken, kennzeichnen die Aktivität der unterschiedlichen Einheiten innerhalb einer Periode; verwendete Abk.: LR - Labialretraktor, mE - mittlere Einheit, MHD - Mundhakendepressor, MHE - Mundhakenelevator, Pro_{do}A - Dorsaler Protraktormuskel A.

Pro_{do}A gleichzeitig aktiv. Die zeitliche Abfolge der Bewegungen, die sich aus der neuronalen Aktivität der CDM-, der MHD- und der Pro_{do}A-Einheit ergeben würde, entspricht der dritten Phase des Fresszyklus aus der Verhaltensuntersuchung (siehe Kapitel 3.1). Die mittlere Einheit (mE) des PaN ist von 0,484 (Standardabweichung: $\pm 0,15$; n=213) bis 0,809 (Standardabweichung: $\pm 0,13$; n=213) aktiv. Auffällig ist, dass der Burst der mE in das Intervall fällt, in dem die anderen motorischen Einheiten geringe Aktivität (CDM-Einheit) bzw. keine Aktivität (MHE-, MHD- und LR-Einheit) aufweisen.

Die Phasenbeziehungen, die die Bursts der verschiedenen Einheiten zueinander besitzen, ergibt in ihrer zeitlichen Abfolge ein Bewegungsmuster, das große Übereinstimmungen mit der abgeleiteten Bewegungssequenz aus der Aktivität von AN, MN und PaN in Abb. 3.48C und dem Fresszyklus aus der Verhaltensuntersuchung zeigt. Diese Übereinstimmungen belegen statistisch, dass die analysierten Sequenzen aus den simultanen Ableitungen des AN, des MN und des PaN als fiktives motorisches Muster des Fressverhaltens angesehen werden können.

3.4.1.4 Interaktion der neuronalen Einheiten

Bei der Analyse der Dreifachableitungen des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Calliphora vicina* konnte beobachtet werden, dass das Ende von lang andauernden Bursts der mittleren Einheit (mE) im PaN mit der ansteigenden Aktivität der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM)-Einheit im AN zusammenfiel (siehe Abb. 3.53A). Die Regelmäßigkeit in der Beziehung zwischen der Aktivität der mE und CDM-Einheit, deutete darauf hin, dass eine neuronale Kopplung zwischen den beiden efferenten Einheiten bestehen könnte.

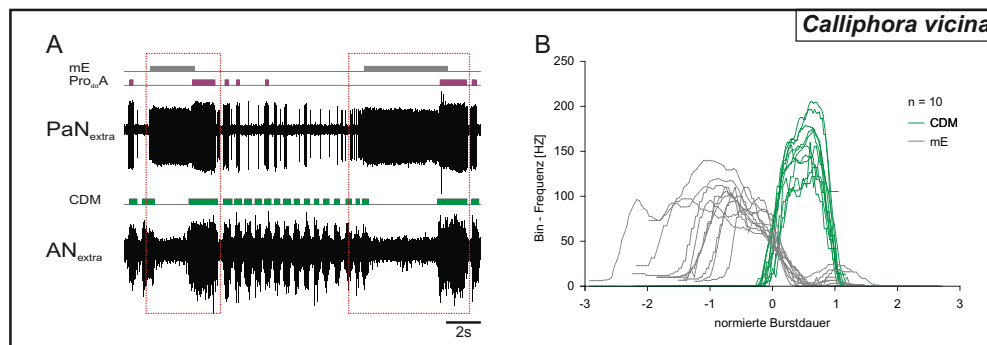


Abb. 3.53: Phasenbeziehung zwischen der Einheit der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) und der mittleren Einheit (mE) von *Calliphora vicina*; **A:** Extrazelluläre Ableitung des Antennalnervs (AN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN), fällt die Aktivität der mE im PaN ab steigt die Aktivität der CDM-Einheit im AN (rot gestrichelte Boxen); **B:** Darstellung der potentiellen Kopplung zwischen der Aktivität der mE und der CDM-Einheit, aufgetragen ist die Periodendauer der Einheit normiert auf die Periodendauer der CDM-Einheit gegen die neuronale Aktivität der efferenten Einheiten in Hz (Bin-Frequenz (Frequenz innerhalb eines Bins) [Hz], Bin-Größe: 100ms)

Für die Untersuchung dieser Beobachtung wurde die Periodendauer der mE auf die Periodendauer der CDM-Einheit normiert und gegen die Aktivität der Einheit aufgetragen (siehe Abb. 3.53B). Die graphische Darstellung belegt die Beobachtung. Fällt die Aktivität der mE im PaN unter einen bestimmten Wert, steigt die Aktivität der CDM-Einheit im AN. Inwieweit dieses Phänomen auf exzitatorische oder inhibitorische Synapsen zwischen der mE und CDM-Einheit beruht, konnte anhand der extrazellulären Ableitung nicht determiniert werden.

3.4.2 *Drosophila virilis*

3.4.2.1 Etablierung

Auf Basis der Erkenntnisse über die Efferenzen des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Calliphora vicina* konnten gleichartige efferenten Einheiten im AN, MN und PaN von *Drosophila virilis* identifiziert werden (siehe Kapitel 3.3.3). Dieses Wissen und die Erkenntnisse aus der Untersuchung des fiktiven Fressverhaltens von *Calliphora vicina* ermöglichten es analoge Versuche durchzuführen, deren Intention es war einen entsprechenden neuronalen Rhythmus bei *Drosophila virilis* zu identifizieren, in ein Bewegungsmuster umzuschreiben und als fiktives Verhalten zu etablieren.

In Abb. 3.54B ist ein Ausschnitt einer Dreifachableitung des AN, des MN und des PaN am isolierten Nervensystem von *Drosophila virilis* zu sehen. Die unterschiedlichen efferenten Einheiten der Nerven zeigen spontane, rhythmische Aktivität. Die dargestellte Sequenz zeigt zu Beginn und am Ende lang andauernde Bursts der Einheit des AN (cibariale Dilatormuskulatur, CDM), der großen Einheit des MN (Mundhakendepressor, MHD) und der mittleren Einheit (mE) im PaN. Die lang andauernden Bursts werden von sieben Bursts mit kürzerer Dauer unterbrochen. Die Bursts der kleinen Einheit im MN (Mundhakenelevatoren, MHE) werden sukzessive im Verlauf der dargestellten Sequenz länger. Die Einheit des MHD und des MHE zeigen alternierende Aktivität. Die Bursts der großen Einheit des PaN (dorsale Protraktormuskel A, *Pro_{do}A*) zeigen trotz konstanter Burstdauer einen unregelmäßigen Rhythmus. Der neuronale Rhythmus im AN, MN und PaN von *Drosophila virilis* besitzt entsprechende Merkmale wie der neuronalen Rhythmus von *Calliphora vicina* (siehe Abb. 3.48).

Zur Illustration des zeitlichen Bewegungsmusters, das aus der Aktivität der motorischen Einheiten gefolgert werden kann, wurde eine Sequenz der Ableitung inklusive der resultierenden Bewegungen in höherer Auflösung dargestellt (siehe Abb. 3.48C). Im diesem Zeitabschnitt sind im AN zwei Bursts der CDM-Einheit zu erkennen, die $\approx 0,4s$ dauern. Die Aktivität der Einheit im AN (CDM) beginnt während des Bursts der MHE-Einheit (1. Burstanfang: $\approx 0,4s$, 2. Burstanfang: $\approx 1,7s$) und endet während des Bursts der MHD-Einheit (1. Burstende: $\approx 0,8s$, 2. Burstende: $\approx 2,1s$).

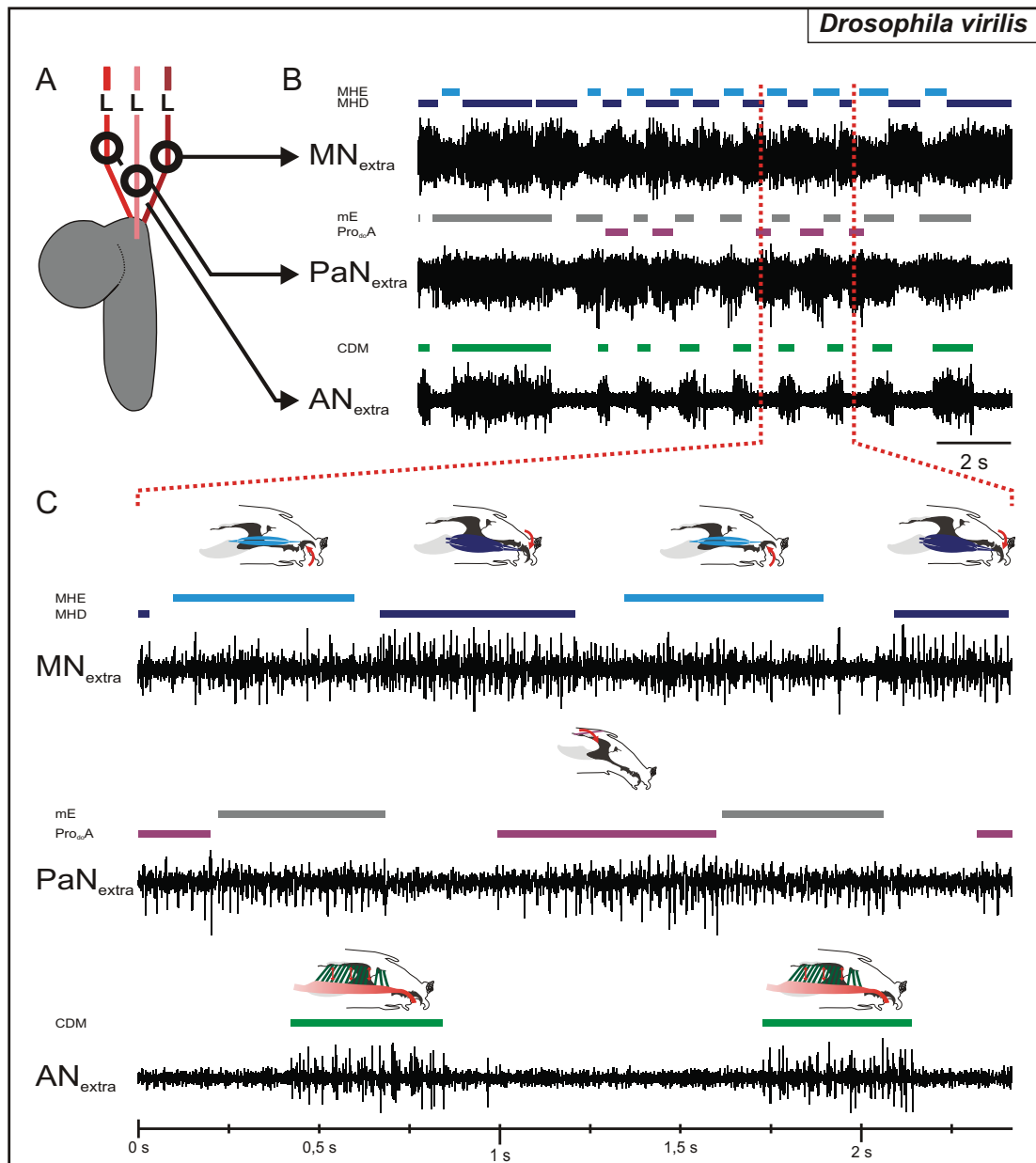


Abb. 3.54: Fiktives Fressverhalten von *Drosophila virilis*; **A:** Versuchsaufbau; **B:** Dreifachableitung des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN), die rhythmische Aktivität der verschiedenen Einheiten wurde mit farbigen Balken markiert; **C:** Darstellung zeigt den markierte Abschnitt aus der Dreifachableitung bei höherer zeitlicher Auflösung, zusätzlich wurden die Bursts der motorischen Einheiten mit den fiktiven Einzelbewegungen der Larven versehen; verwendete Abk.: CDM - Cibariale Dilatormuskulatur, L - Läsion, mE - mittlere Einheit, MHD - Mundhakendepressor, MHE - Mundhakenelevator, $Pro_{do}A$ - Dorsaler Protraktormuskel A.

Die beiden Einheiten des PaN zeigen eine alternierende Aktivität, wobei die Bursts der mE jeweils direkt auf die Bursts der $Pro_{do}A$ -Einheit folgen. Die Bursts der großen Einheit im PaN ($Pro_{do}A$) sind zu Beginn und am Ende der gezeigten Sequenz nicht komplett dargestellt. Der einzige komplett dargestellte Burst der $Pro_{do}A$ -Einheit beginnt bei \approx einer s und endet bei $\approx 1,6s$ (Burstdauer: $\approx 0,6s$). Die Bursts des $Pro_{do}A$ erfolgen vor den Bursts der CDM-Einheit. Die Bursts der mE beginnen nach der Aktivität der $Pro_{do}A$ -Einheit. Der erste Burst der mE beginnt bei $\approx 0,2s$ und endet bei $\approx 0,7s$ (Burstdauer: $\approx 0,5s$). Der zweite Burst beginnt bei $\approx 1,6s$ und endet bei $\approx 2,1s$ (Burstdauer: $\approx 0,5s$). Auffällig ist, dass der Burst der mE jeweils während der Aktivität der Einheit des AN endet.

Die Aktivität im MN beginnt mit einem anhaltenden Burst der großen Einheit (MHD), der zum Zeitpunkt $\approx 0,1s$ endet. Darauf folgt ein Burst der kleinen Einheit (MHE), der von $\approx 0,1s$ bis $\approx 0,6s$ dauert (Burstdauer: $\approx 0,5s$). Nach $\approx 0,1s$ beginnt der Burst der MHD-Einheit, der nach $\approx 1,2s$ endet (Burstdauer: $\approx 0,5s$). Nach einem kurzen Intervall (Dauer: $\approx 0,2s$) folgt ein weiterer Burst der MHE-Einheit, der $\approx 0,6s$ dauert. Nach einer Pause von $\approx 0,2s$ beginnt der nächste Burst der MHD-Einheit. Die Dauer des zweiten Bursts der MHD-Einheit beträgt $\approx 0,3s$. Unabhängig von den anderen Efferenzen lässt sich aus der Aktivität der motorischen Einheiten des MN eine antagonistische Bewegung aus Heben und Senken der Mundhaken folgern.

Die Herleitung der zeitlichen Bewegungsabfolge von *Drosophila virilis* aus der Aktivität der motorischen Einheiten des AN, des MN und des PaN beginnt, wie bei *Calliphora vicina*, mit dem Heben der Mundhaken. Darauf folgt mit einer kurzen Verzögerung die Aktivität der mE, deren Funktion unbekannt ist. Ungefähr nach der Hälfte der aktiven Phase des MHE beginnt die Kontraktion der CDM, die für die Nahrungsaufnahme verantwortlich ist. Während der Kontraktionsphase der CDM endet das Heben und beginnt das Senken der Mundhaken. Nach Beendigung der Kontraktion der CDM ist der MHD noch aktiv. In der Kontraktionsphase des MHD beginnt die dorsale Neigung des cephalopharyngealen Skeletts (CPS). Während der Neigung des CPS endet die Aktivität des MHD und nach einer Pause setzt erneut das Heben der Mundhaken ein.

Die Gegenüberstellung des fiktiven Verhaltens von *Calliphora vicina* und *Drosophila virilis* zeigt, dass auch bei letzteren die rhythmische Aktivität Grundzüge eines fiktiven Fressverhaltens beinhaltet. Denn die CDM ist rhythmisch aktiv, wodurch Nahrung aufgenommen werden könnte. Des Weiteren würde aus der alternierende Aktivität der MHD- und MHE-Einheiten eine Bewegung der Mundhaken folgern, die Nahrung der Schlundöffnung zu führen würde. Wohingegen die Kontraktion des $Pro_{do}A$ zu einem unerwarteten Zeitpunkt im Fresszyklus erfolgte. Allgemein entspricht der neuronale Rhythmus von *Drosophila virilis* den larvalen Fressverhalten und kann als fiktives Fressverhalten bezeichnet werden.

3.4.2.2 Phasenanalyse

Wie bei *Calliphora vicina* stellt sich die Frage, inwieweit die aus der rhythmischen Aktivität von Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) exemplarisch hergeleitete Bewegungszyklus (siehe Abb. 3.54C) ein sich wiederholendes Motiv des fiktiven Fressverhaltens von *Drosophila virilis* darstellt. Die Auswahl der Daten, die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse der Phasenanalyse von *Drosophila virilis* erfolgte analog zur Phasenanalyse bei *Calliphora vicina*. Jedoch war die Variabilität des fiktiven motorischen Musters geringer als bei *Calliphora vicina*. Insgesamt wurden acht Motive aus verschiedenen Dreifachableitungen in der Phasenanalyse ausgewertet.

Die Abb. 3.55 zeigt drei Perioden des neuronalen Rhythmus der Einheiten der untersuchten Nerven von *Drosophila virilis* und deren Phasenbeziehung zueinander. Zusätzlich wurden die fiktiven Bewegungen der motorischen Einheiten in die Abbildung eingefügt. Der Rhythmus beginnt mit dem Burst der dorsalen Protraktormuskel A ($Pro_{do}A$)-Einheit zum Zeitpunkt $-0,15$ (Standardabweichung: $\pm 0,25$; $n=156$) und endet bei $0,25$ (Standardabweichung: $\pm 0,27$; $n=156$). Die Burstdauer beträgt $0,4$ (Standardabweichung: $\pm 0,18$; $n=156$). Von $-0,14$ (Standardabweichung: $\pm 0,18$; $n=165$) bis $0,22$ (Standardabweichung: $\pm 0,17$; $n=165$) dauert die Aktivität der Mundhakenelevator (MHE)-Einheit (Burstdauer: $0,36$; Standardabweichung: $\pm 0,16$; $n=165$). Auffällig ist die nahezu synchrone Aktivität der Einheit von $Pro_{do}A$ und MHE. Während der Aktivität der $Pro_{do}A$ - und MHE-Einheit beginnt der Burst der cibariale Dilatormuskulatur (CDM)-Einheit und dauert von 0 bis $0,38$ (Standardabweichung: $\pm 0,11$; $n=275$). Die Aktivität des Mundhakendepressors (MHD)-Einheit setzt nach der aktiven Phasen von MHE und $Pro_{do}A$ ein, aber während des Bursts der CDM-Einheit. Der Burst der MHD-Einheit beginnt bei $0,25$ (Standardabweichung: $\pm 0,13$; $n=211$) und endet bei $0,72$ (Standardabweichung: $\pm 0,18$; $n=211$). Die nicht identifizierte mittlere Einheit (mE) hat eine Burstdauer von $0,38$ (Standardabweichung: $\pm 0,25$; $n=116$) und bildet die letzte aktive Einheit in der Periode des Rhythmus. Der Burst der mE beginnt bei $0,63$ (Standardabweichung: $\pm 0,26$; $n=116$) und endet zum Zeitpunkt $1,01$ (Standardabweichung: $\pm 0,25$; $n=116$).

Die Ergebnisse der Phasenanalyse von *Drosophila virilis* ergäbe folgenden fiktiven Bewegungszyklus: Der Zyklus startet mit der Neigung des cephalopharyngealen Skeletts (CPS). Auf den Beginn der Neigung setzt das Heben der Mundhaken ein, gefolgt vom Einsaugen der Nahrung durch die Kontraktion der CDM. Für ein kurzes Intervall erfolgen die Neigung des CPS, das Heben der Mundhaken und das Einsaugen der Nahrung zeitgleich. Die Kontraktion des $Pro_{do}A$ endet während MHE und CDM aktiv sind. Nach Beendigung der Kontraktionsphase des MHE beginnt nach einer Pause das Senken der Mundhaken. In die Aktivitätsphase des MHD endet das Einsaugen der Nahrung und beginnt die Aktivität der mE. Der Burst der mE endet zu Beginn der Kontraktion des

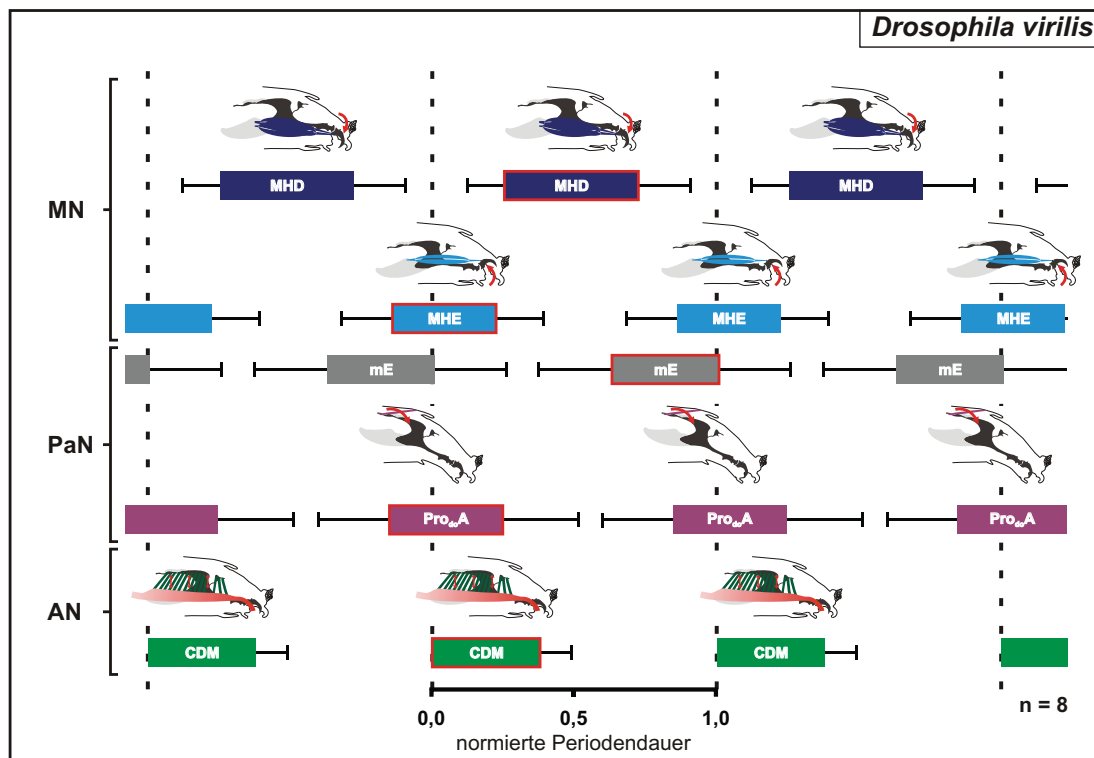


Abb. 3.55: Phasenanalyse des fiktiven Fressverhaltens von *Drosophila virilis*; dargestellt ist die Aktivität der efferenten Einheiten des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akessorischen Prothorakalnervs (PaN), die Burstdauer (farbige Balken) inklusive der Standardabweichungen sind auf die Periodendauer der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) normiert; die rot umrandeten Bursts, bzw. Balken, kennzeichnen die Aktivität der Einheiten innerhalb einer Periode; verwendete Abk.: **mE** - mittlere Einheit, **MHD** - Mundhakendepressor, **MHE** - Mundhakenelevator, **Pro_{do}A** - Dorsaler Protraktormuskel A.

Pro_{do}A, die zum nächsten Zyklus gehört.

Im Vergleich der fiktiven Bewegungszyklen aus dem Fallbeispiel (siehe Abb. 3.54C) und der Phasenanalyse (siehe Abb. 3.55) wird deutlich, dass die Phasenbeziehungen zwischen der CDM-, der MHD-, der MHE- und der Pro_{do}A-Einheit große Übereinstimmungen aufweisen. Wohingegen sich die Phasenlage, bzw. die zeitliche Korrelation der mE des PaN zwischen dem Fallbeispiel und der Phasenanalyse unterscheiden. Im Fallbeispiel erfolgt der Burst der mE fast gleichzeitig mit dem Burst der CDM-Einheit, aber in der Phasenanalyse eilt der Burst der CDM-Einheit dem Burst der mE voraus. Das Motiv bestehend aus der rhythmischen Aktivität der efferenten Einheiten der Nerven kann aufgrund seiner Übereinstimmungen als ein Bestandteil des neuronalen Rhythmus des fiktiven Fressverhaltens von *Drosophila virilis* aufgefasst werden.

Grundlegend zeigt die Phasenbeziehung zwischen den Einheiten des AN, des MN und des PaN große Ähnlichkeit zu den entsprechenden Resultaten von *Calliphora vicina* (siehe Kapitel 3.4.1.3).

3.4.3 *Drosophila melanogaster*

3.4.3.1 Etablierung

Mit den Wissen über die motorische Funktion der Einheiten des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Drosophila melanogaster* war es möglich, wie bei *Calliphora vicina* (siehe Kapitel 3.4.1.1) und *Drosophila virilis* (siehe Kapitel 3.4.2.1) aus der spontanen rhythmischen Aktivität der Nerven fiktive Bewegungen und Bewegungsmuster zu folgern. Im Folgenden wurde, analog zu der Auswertung bei *Calliphora vicina* und *Drosophila virilis* untersucht, inwiefern dieses resultierende fiktive Verhalten dem larvalen Fressverhalten entspricht. Für die Analyse der neuronalen Rhythmen wurden die Ableitungen zusätzlich mit einem Glättungsalgorithmus in eine Hüllkurve umgeschrieben, die dem durchschnittlichen Trend der Aktivität der Einheiten repräsentiert (siehe Kapitel 2.6.2).

In Abb. 3.56B ist die spontane Aktivität der Einheiten der untersuchten Nerven in einer simultanen Dreifachableitung am isolierten zentralen Nervensystem von *Drosophila melanogaster* dargestellt. Zu Beginn der Ableitung sind die Bursts der großen Einheit des MN (Mundhakendepressor, MHD) und der mittleren Einheit des PaN (mE) lang andauernd, wohingegen die Bursts der Einheit im AN (cibariale Dilatormuskulatur, CDM) diesem Trend nicht folgen. Die große Einheit im PaN (dorsaler Protraktormuskel A, Pro_{do}A) und die kleine Einheit des MN (Mundhakenelevator, MHE) sind zu Beginn nicht aktiv. Im weiteren Verlauf der Ableitung zeigen die beiden efferenten Einheiten des MN (MHD und MHE) und des PaN (mE und Pro_{do}A) alternierende Aktivität, wobei die Burstdauer der MHD-Einheit und mE abnimmt. Die Aktivität der Einheit des AN hat in der dargestellten Ableitung einen relativ konstanten Rhythmus mit geringer

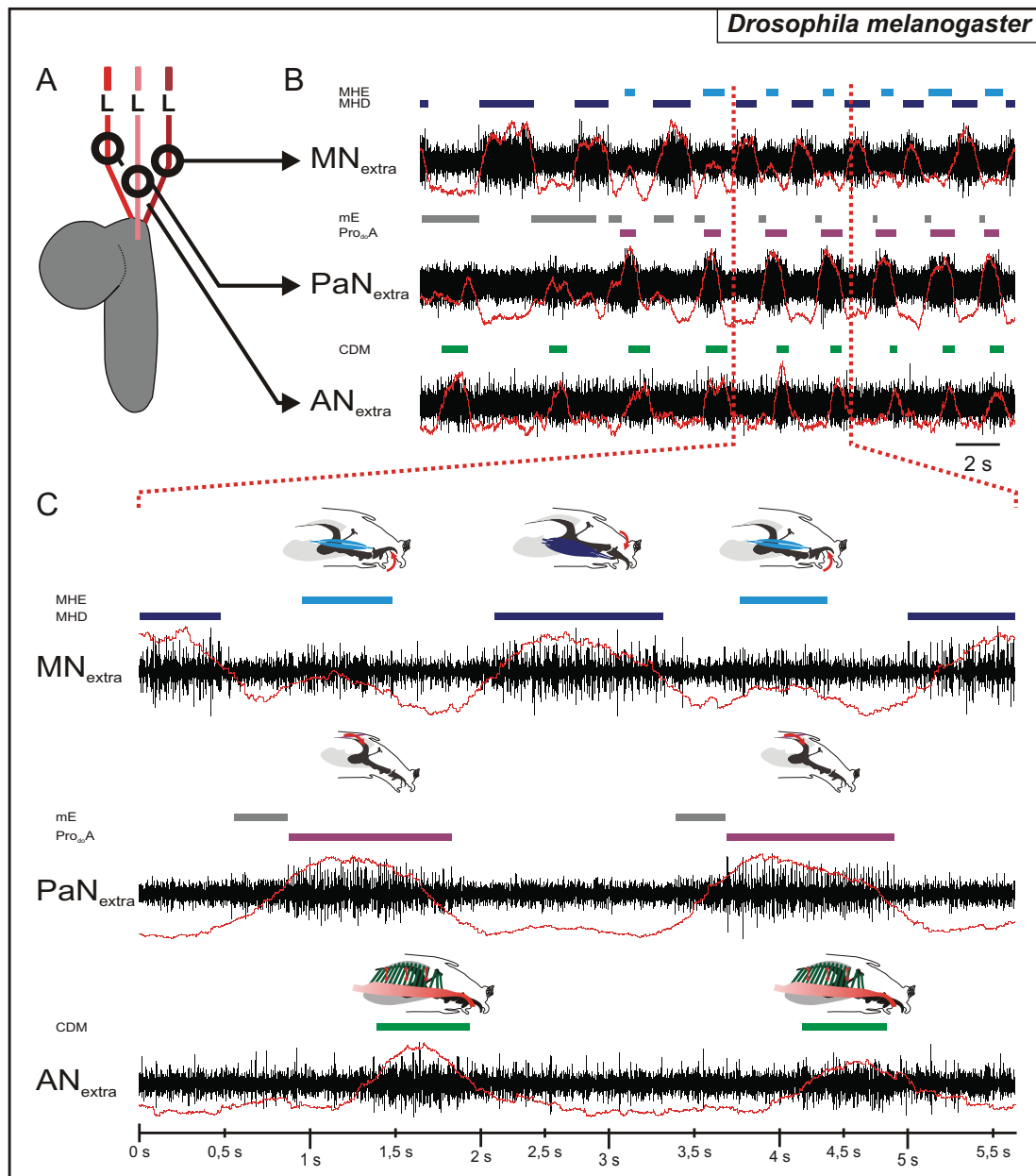


Abb. 3.56: Fiktives Fressverhalten von *Drosophila melanogaster*; **A:** Versuchsaufbau; **B:** Dreifachableitung des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN), die Aktivität der Einheiten wurde mit farbigen Balken markiert; **C:** Darstellung zeigt einen Ausschnitt aus der Ableitung der abgeleiteten Nerven bei höherer zeitlicher Auflösung, zusätzlich zur Markierung der Bursts der Einheiten (farbige Balken) sind die fiktiven Einzelbewegung der Larven dargestellt; verwendete Abk.: CDM - Cibariale Dilatormuskulatur, L - Läsion, mE - mittlere Einheit, MHD - Mundhakendepressor, MHE - Mundhakenelevator, Pro_{do}A - Dorsaler Protraktormuskel A.

Variabilität der Burstdauer.

Der Rhythmus der Efferenzen des AN, des MN und des PaN enthält ein wiederkehrendes Motiv, das in Abb. 3.56C detailliert dargestellt ist. In der Abbildung wurde zur Aktivität der identifizierten Einheiten die entsprechende fiktive Bewegung hinzugefügt. Die Aktivität der Einheit im AN (CDM) besteht aus zwei Bursts, die eine Burstdauer von $\approx 0,5\text{s}$ aufweisen. Der erste Burst der CDM-Einheit beginnt bei $\approx 1,4\text{s}$ und endet bei $\approx 1,9\text{s}$. Der zweite Burst dauert von $\approx 3,9\text{s}$ bis $\approx 4,4\text{s}$.

Im PaN sind beide Einheiten aktiv. Zuerst erfolgt ein kurzer Burst der mE, der von $\approx 0,6\text{s}$ bis $\approx 0,9\text{s}$ anhält. Mit einer kurzen Verzögerung folgt auf die Aktivität der mE der lang andauernde Burst der großen Einheit des PaN (Pro_{do}A). Der Burst der Pro_{do}A -Einheit beginnt bei $\approx 0,9\text{s}$ und endet bei $\approx 1,8\text{s}$ (Burstdauer: $\approx 0,9\text{s}$). Der nächste Burst der mE beginnt bei $\approx 3,1\text{s}$ und endet bei $\approx 3,4\text{s}$ (Burstdauer: $\approx 0,3\text{s}$). Identisch zur ersten Burstabfolge fängt direkt nach dem Burst der mE der Burst der Pro_{do}A -Einheit an, der von $\approx 3,4\text{s}$ bis $\approx 4,4\text{s}$ dauert (Burstdauer: $\approx 1,0\text{s}$).

Die dargestellte Aktivität im MN setzt in einem Burst der großen Einheit (MHD) ein, die nach $\approx 0,5\text{s}$ endet. Darauf folgt ein Burst der kleinen Einheit (MHE), der von $\approx 1,0\text{s}$ bis $\approx 1,5\text{s}$ andauert (Burstdauer: $\approx 0,5\text{s}$). Nach einer Pause beginnt bei $\approx 2,1\text{s}$ ein neuer Burst der MHD-Einheit, der zum Zeitpunkt $\approx 3,1\text{s}$ endet (Burstdauer: $\approx 1\text{s}$). Auf die Aktivität der großen Einheit (MHD) folgt ein Burst der kleinen Einheit (MHE), der von $\approx 3,5\text{s}$ bis $\approx 4\text{s}$ dauert (Burstdauer: $\approx 0,5\text{s}$). Abschließend beginnt bei $\approx 4,5\text{s}$ ein weiterer Burst der MHD-Einheit, dessen Burstende nicht dargestellt ist.

Aus dem erläuterten neuronalen Rhythmus der efferenten Einheiten kann folgendes zyklisches Bewegungsmuster hergeleitet werden (siehe Abb. 3.56C): Der Zyklus beginnt mit dem Burst der Pro_{do}A -Einheit bei $\approx 0,9\text{s}$, wodurch das cephalopharyngeale Skelett (CPS) nach ventral geneigt wird. Kurz nach Beginn der Neigung des CPS setzt das Heben der Mundhaken ein. Während der Neigung des CPS und dem Heben der Mundhaken beginnt die Aufnahme der Nahrung, repräsentiert durch die Aktivität der CDM-Einheit im AN. Nach einem Intervall, indem diese drei aufgeführten Bewegungen coaktiv sind, endet zuerst das Heben der Mundhaken und fast gleichzeitig die Neigung des CPS und die Nahrungsaufnahme. Nach einer Pause werden die Mundhaken gesenkt. Mit dem Ende des Senkens der Mundhaken beginnt die Aktivität der mE, deren physiologische Funktion unbekannt ist. Das Ende des Bursts der mE geht fließend in die Aktivität der Pro_{do}A -Einheit über, die den Beginn des nächsten Bewegungszyklus kennzeichnet. Grundsätzlich sind Übereinstimmungen zwischen dem fiktiven Verhalten von *Calliphora vicina* (siehe Abb. 3.48) und *Drosophila virilis* (siehe Abb. 3.54) und dem von *Drosophila melanogaster* zu erkennen.

3.4.3.2 Phasenanalyse

Die Phasenanalyse der Rhythmen des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Drosophila melanogaster* sollte klären, ob das erläuterte Fallbeispiel in Kapitel 3.4.1.1 ein wiederkehrendes Motiv des fiktiven Fressverhaltens ist. Für die Phasenanalyse sind insgesamt 10 Ableitungen ausgewertet worden. Insgesamt zeigte das motorische Muster von *Drosophila melanogaster* eine geringere Variabilität in Relation zu *Calliphora vicina*. Sie wurde analog zu den Phasenanalysen von *Calliphora vicina* und *Drosophila virilis* durchgeführt. Die Ergebnisse der Phasenanalyse sind in Abb. 3.57 inklusive der fiktiven Bewegungen der motorischen Einheiten dargestellt.

Der neuronale Rhythmus der Phasenanalyse beginnt mit der Pro_{do}A-Einheit, die bei -0,29 (Standardabweichung: $\pm 0,14$; n=210) beginnt und bei 0,16 (Standardabweichung: $\pm 0,11$; n=210) endet (Burstdauer: 0,45; Standardabweichung: $\pm 0,13$; n=210). Mit einer Latenz von 0,08 folgt der Burst der MHE-Einheit, die von -0,21 (Standardabweichung: $\pm 0,14$; n=95) bis 0,12 (Standardabweichung: $\pm 0,14$; n=95) dauern (Burstdauer: 0,33; Standardabweichung: $\pm 0,13$; n=95). Die Pro_{do}A- und MHE-Einheit sind über einen großen Zeitraum gleichzeitig aktiv. Zum Zeitpunkt Null beginnt der Burst der CDM-Einheit, die bis zum Zeitpunkt 0,43 (Standardabweichung: $\pm 0,15$; n=243) dauert (Burstdauer: 0,43; Standardabweichung: $\pm 0,15$; n=243). Für das Intervall von 0 bis 0,12 sind die Einheiten der CDM, des Pro_{do}A und der MHE gleichzeitig aktiv. Der Burst der MHD-Einheit dauert von 0,22 (Standardabweichung: $\pm 0,12$; n=197) bis 0,63 (Standardabweichung: $\pm 0,12$; n=197). Die Burstdauer der MHD beträgt 0,41 (Standardabweichung: $\pm 0,14$; n=197). Zum Ende der Aktivität der MHD-Einheit beginnt der Burst der mE und dauert von 0,47 (Standardabweichung: $\pm 0,18$; n=55) bis 0,7 (Standardabweichung: $\pm 0,15$; n=55). Die Burstdauer beträgt 0,23 (Standardabweichung: $\pm 0,13$; n=55). Das Burstende der mE fällt in die Aktivität der Pro_{do}A-Einheit der nächsten Periode. Vergleicht man die n-Zahlen der ausgewerteten Perioden, die gleich der n-Zahl der CDM-Einheit ist, mit den geringen n-Zahlen der mE und MHE-Einheit, so ergibt sich, dass diese beiden efferenten Einheiten unregelmäßig in den Perioden aktiv waren. Der fiktive Bewegungszyklus, der sich aus der rhythmischen Aktivität der efferenten Einheiten des AN, des MN und des PaN herleitet, beginnt mit der dorsalen Neigung des cephalopharyngealen Skeletts (CPS). Er resultiert aus dem Burst der Pro_{do}A-Einheit. Während der Neigung des CPS fangen die Mundhaken an sich zu heben (MHE), gefolgt vom Einsaugen der Nahrung (CDM). Nach dem Ende der Bewegung des CPS und dem Heben der Mundhaken beginnt das Senken der Mundhaken (MHD). Das Ende der cibarialen Pumpaktivität erfolgt während des Senkens der Mundhaken. Die Aktivität der mE beginnt gegen Ende des Senkens der Mundhaken. Das Ende des Bursts der mE ist während der dorsalen Neigung des CPS der nächsten Periode.

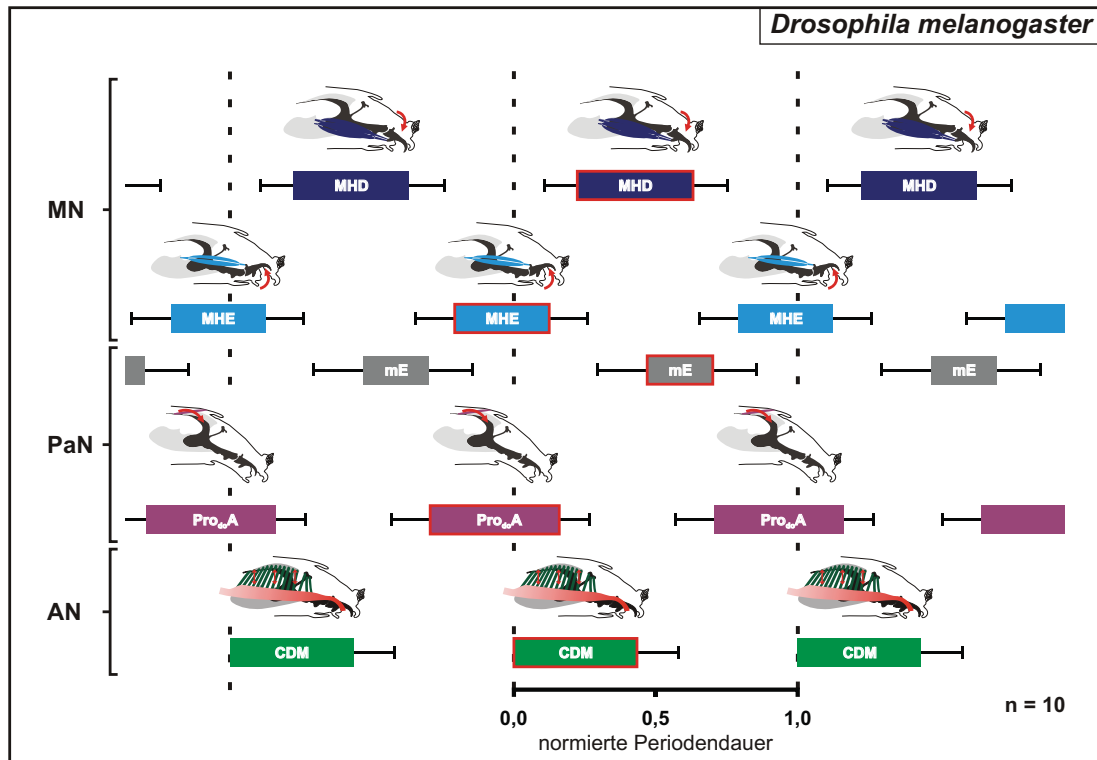


Abb. 3.57: Phasenanalyse des fiktiven Fressverhaltens von *Drosophila melanogaster*; dargestellt ist die Aktivität der efferenten Einheiten des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN), die Burstdauer (farbige Balken) inklusive der Standardabweichungen wurden auf die Periodendauer der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) normiert; die rot umrandeten Bursts, bzw. Balken, kennzeichnen die Aktivität der Einheiten innerhalb einer Periode; verwendete Abk.: mE - mittlere Einheit, MHD - Mundhakendepressor, MHE - Mundhakenelevator, Pro_{do}A - Dorsaler Protraktormuskel A.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen dem als Fressverhalten etablierten fiktiven motorische Muster des Fallbeispiels (siehe Abb. 3.56) und der Phasenanalyse (siehe Abb. 3.57) lässt sich schlussfolgern, dass der etablierte neuronale Rhythmus ein wiederkehrendes Motiv des Erregungsmusters des AN, MN und PaN von *Drosophila melanogaster* ist. Die Phasenbeziehungen zwischen den efferenten Einheiten von *Drosophila melanogaster* zeigt große Übereinstimmungen zu den Resultaten der Phasenanalyse von *Calliphora vicina* (siehe Abb. 3.52) und *Drosophila virilis* (siehe Abb. 3.55), weshalb die untersuchten Impulsmuster von *Drosophila melanogaster* als weiterer Bestandteil des fiktiven Fressverhaltens von Dipteren-Larven gedeutet werden können.

4 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten wurde das dem Fressverhalten zugrunde liegende neuronale und motorische System an verschiedenen Invertebraten intensiv untersucht, wie z.B. bei Crustacea [Harris-Warrick et al., 1992; Selverston & Moulins, 1987; Heinzel et al., 1993], bei Mollusca (*Lymnaea stagnalis*) [Benjamin et al., 1979; Brierley et al., 1997; McCrohan, 1984; McCrohan & Benjamin, 1980; Rose & Benjamin, 1979, 1981], bei Lepidoptera (*Manduca sexta*) [Bowdan, 1988, 1995; Bowdan & Wyse, 1997, 2000; Griss, 1990; Griss et al., 1991; Hanson & Dethier, 1973; Miles & Booker, 1998; Rohrbacher, 1994] und bei Caelifera (*Schistocerca gregaria*) [Ayali et al., 2002; Hill et al., 1966; Rast & Bräunig, 2001a,b; Seath, 1977a,b; Zilberstein & Ayali, 2002]. Insbesondere die Arbeiten an Crustaceen und Mollusken haben zu fundamentalen Erkenntnissen geführt, indem das Fressverhalten ausgehend von den zugrunde liegenden rhythmischen Bewegungen über die muskuläre und neuronale Architektur bis zu intrinsischen Eigenschaften und synaptischen Verschaltungen einzelner Neurone der zentralen Mustergeneratoren aufgeklärt wurde.

Adulte Dipteren haben in den sechziger und siebziger Jahren als Modellsystem für die Untersuchung der Regulation von Fressverhalten gedient [Dethier & Gelperin, 1967; Gelperin, 1966a, 1972]. In den letzten Jahren jedoch hat die Erforschung des Fressverhaltens von Dipteren, vorrangig von *Drosophila melanogaster*, aufgrund der genetischen Zugänglichkeit eine Renaissance erlebt. Das Fressverhalten von *Drosophila* und damit in Verbindung stehendes Verhalten und Strukturen wurden auf multiplen Ebenen untersucht, wie z.B. der entwicklungsbiologischen Entstehung des stomatogastrischen Nervensystems [Hartenstein, 1997], Beteiligung dopaminergischer und octopaminergischer Neurone am Lernverhalten und an den Entscheidungsfindungsprozessen [Schwaerzel et al., 2003], neuronale Verschaltung des gustatorischen [Melcher & Pankratz, 2005] und des olfaktorischen Systems [Wilson et al., 2004; Olsen & Wilson, 2008] und neuromodulatorischer Einfluss auf das Fressverhalten [Melcher et al., 2007]. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass relativ wenig über das larvale Fressverhalten von *Drosophila melanogaster* auf funktionsmorphologischer und elektrophysiologischer Ebene bekannt ist. Ziel dieser Arbeit war es, diese Wissenslücken zu füllen und einen ganzheitlichen Überblick über

das Fressverhalten von Dipteren-Larven zu geben. Ausgehend von den rhythmischen Bewegungen während der Nahrungsaufnahme über die Funktionsmorphologie der ausführenden Muskelgruppen und Identifikation der motorischen Bahnen der zugehörigen Nerven bis zu deren motorischen Output der putativen zentralen Mustergeneratoren sollte das larvale Fressverhalten von Dipteren analysiert werden (siehe Abb. 4.1).

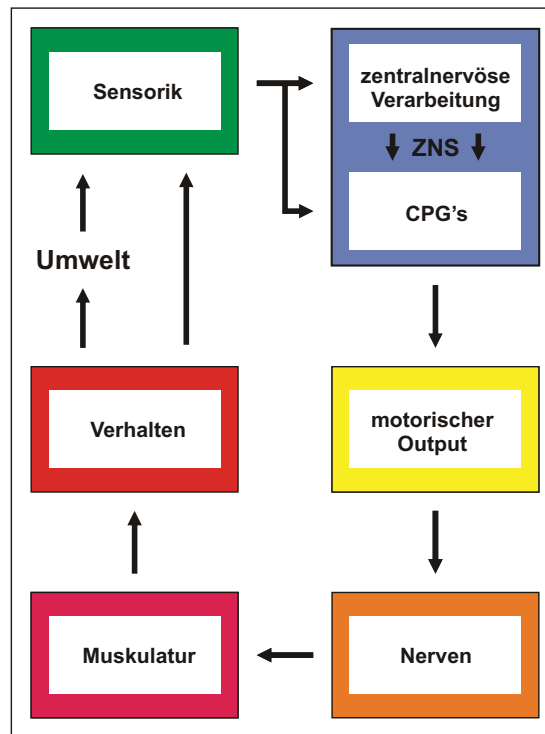


Abb. 4.1: Konzept der Untersuchung des larvalen Fressverhaltens von Dipteren-Larven; Ziel der Arbeit war es, alle Teilaspekte des Fressverhaltens zu untersuchen und einen ganzheitlichen Überblick über das Fressverhalten von Dipteren-Larven zu geben.

Des Weiteren sollten Grundlagen für sensomotorische, neuromodulatorische und intrazelluläre Untersuchungen des Fressverhaltens von Dipteren geschaffen werden. Eine angestrebte Zukunftsperspektive ist die interdisziplinäre Erforschung von Verhalten an *Drosophila melanogaster* durch die Fusion der Molekular- und Neurobiologie, bzw. im Speziellen der Elektrophysiologie.

In der veröffentlichten Arbeit von Spieß et al. [2008] über die Gemeinsamkeiten des stomatogastrischen Nervensystem von *Calliphora*- und *Drosophila*-Larven wurde gezeigt, dass an *Calliphora* gewonnene wissenschaftliche und methodische Erkenntnisse als eine Art von „Schablone“ bzw. „Leitfaden“ dienen können, um diese Erkenntnisse adäquat auf *Drosophila* zu übertragen. Aufbauend darauf wurden die grundlegenden Untersuchungen zunächst an *Calliphora* durchgeführt, um in der folgenden Instanz das gewonnene Wissen für *Drosophila* zu etablieren.

4.1 Verhalten

Dipteren-Larven besitzen im Gegensatz zu Vertebraten ein begrenztes Verhaltensrepertoire, das folgende Verhaltensweisen umfasst: Fressen (feeding), Fortbewegung (locomotion), Beugen (bending), Drehen (turning), Zurückweichen (retreating), Aufbäumen (rearing) und Graben (burrowing) [Green et al., 1983]. Bei *Drosophila*-Larven wurde festgestellt, dass sie durchschnittlich 84% ihrer larvalen Lebenszeit für die Aufnahme von Nahrung aufbringen [Green et al., 1983]. Fasst man diese verhaltensbiologischen Fakten zusammen, können Dipteren-Larven als kontinuierlich fressende Organismen mit einem basalen Verhaltensrepertoire aufgefasst werden. Das larvale Fressverhalten besteht aus einem mehr oder weniger starren, repetitiven Bewegungsmuster, weshalb sie hervorragend als Versuchsobjekte für die Untersuchung dieser rhythmischen Bewegungen geeignet sind. Das Fressverhalten ist bei *Calliphora*- und *Drosophila*-Larven annähernd identisch, obwohl die Larven von *Calliphora vicina* sich von Aas, bzw. Kadaver [Hennig, 1973] und die Larven der beiden *Drosophila*-Arten sich von Mikroorganismen, die auf verfaulem Obst leben, ernähren [Basset et al., 2000; Steinhaus, 1940].

Aufgrund des relativ simplen motorischen Musters, das dem larvalen Fressverhalten zugrunde liegt, wurde es bei *Drosophila* in vielen wissenschaftlichen Arbeiten genutzt, um in so genannten Verhaltensessays genetische Phänotypen zu charakterisieren [Li et al., 2001; Miyakawa et al., 1980; Sewell et al., 1974; Shaver et al., 1998; Sokolowski, 1980; Tissot et al., 1998; Zinke et al., 1999]. Daraus resultierte, dass sich die Beschreibungen des Fressverhaltens in der Literatur auf einzelne charakteristische Bewegungskomponenten beschränken, wie z.B. „propel food through the pharynx“, „rhythmic protraction and retraction of the head“ oder „shoveling movements of the mouth hooks“ [Green et al., 1983; Gorczyca et al., 1991; Harrison & Cooper, 2003; Hobson, 1932; Sewell et al., 1974; Sokolowski, 1982]. In der Literatur existiert keine vollständige Erläuterung des gesamten rhythmischen Fressverhaltens und der beteiligten Bewegungen.

In der Verhaltensuntersuchung von *Calliphora vicina* sollten die aus der Literatur bekannten einzelnen Bewegungskomponenten zu einem Gesamtbild weiterentwickelt werden, was in Form eines Fresszyklus bestehend aus vier Phasen realisiert wurde (siehe Kapitel 2.3). Die einzelnen Phasen werden durch distinkte, stereotype Bewegungen der thorakalen Segmente, des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) und der Mundhaken charakterisiert:

1. Vorwärtsbewegung des CPS und der thorakalen Segmente der relaxierten Larve mit verzögertem Heben der Mundhaken,
2. Ventrale Neigung des CPS und Senken der Mundhaken,
3. Zurückziehen des CPS und der thorakalen Segmente bei gesenkten Mundhaken und

4. Übergang in die relaxierte Ursprungsposition.

Aus den Erkenntnissen der Verhaltensanalyse konnte auf die Muskeln geschlossen werden, die diesen Bewegungen zugrunde liegen. Der dorsale Protraktormuskel A ($Pro_{do}A$) bewerkstelligt die ventrale Neigung und ist beteiligt an der Vorwärtsbewegung des CPS. Der Mundhakendepressor (MHD) und -elevator (MHE) realisieren die Bewegung der Mundhaken. Der Labialretraktor (LR) öffnet das Labium und die vorverdaute Nahrung wird über die Kontraktion der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) aufgenommen. Auf diesen Muskeln lag der Focus der anatomischen und funktionsmorphologischen Untersuchung.

Die Fressrate (Retraktion des CPS, [Hz]) von *Calliphora vicina* variierte zwischen 1 und 3Hz. Sie ist geringfügig niedriger als die Fressrate von *Drosophila melanogaster*, die zwischen 0,3 und 3,5Hz schwankt [Harrison & Cooper, 2003; Sewell et al., 1974; Sokolowski, 1980]. Die große Variabilität resultiert vermutlich primär aus der Abhängigkeit des Fressverhaltens vom Alter der Larven neben anderen endogenen und exogenen Faktoren. Diese Altersabhängigkeit des Fressverhaltens wurde für Larven von *Drosophila melanogaster* durch die Arbeit von Sewell et al. [1974] und bei *Calliphora vicina* durch Reiter & Hajek [1984] belegt. Reiter stellte in seiner Arbeit fest, dass bei heranwachsenden Larven und ausreichenden Nahrungsangebot der Kropf permanent gefüllt ist, wohingegen wenige Stunden nach Erreichen des Wachstumsgipfels der Darm und Kropf keine Nahrung mehr enthalten.

Das häufig beobachtete Umschalten im Fressverhalten zwischen Zyklen mit stark ausgeprägten Bewegungen und Zyklen mit schwach ausgeprägten Bewegungen ähnelt in gewisser Form den endoskopisch untersuchten hybriden Schließbewegungen der lateralen Magenzähne von Crustaceen, dabei erfolgen zwischen den festen Bissen mit großer mehrere Bisse mit kleiner Bewegungsamplitude. Diese hybriden Schließbewegungen resultieren aus einer wechselseitigen Interaktion zwischen unterschiedlichen Netzwerken des stomatogastrischen Nervensystems, dessen neuronale Ausprägung ein so genanntes hybrides Erregungsmuster ist [Böhm et al., 1998]. Inwieweit diese These zutreffend ist, können nur elektrophysiologische Untersuchungen klären.

4.2 Anatomie und Funktionsmorphologie

Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse der anatomischen und funktionsmorphologischen Untersuchung der Muskeln und Nerven, die an der Nahrungsaufnahme beteiligt sind, bilden einen grundlegenden Bestandteil für das Verständnis des larvalen Fressverhaltens von Dipteren. Diese Daten bilden die Voraussetzung für die elektrophysiologische Charakterisierung der Afferenzen und Efferenzen der pharyngealen Nerven auf extra- und intrazellulärer Ebene. Zusätzlich konnten Hinweise bezüglich neuromodulatorischer Effekte auf das Fressverhalten von *Calliphora vicina* gesammelt werden. In dieser funktionsanatomisch orientierten Studie werden nur peripher entwicklungsbiologische Aspekte des larvalen Nervensystems oder Homologien und Analogien der Nervenarchitektur zu anderen Insektengruppen diskutiert.

4.2.1 Muskulatur

Funktional dient der Pharynx von Vertebraten und Invertebraten der Nahrungsaufnahme. Bei den acephalen Dipteren-Larven setzt sich der Pharynx aus der Schlundöffnung und den Cibarium zusammen, die in ein cephalopharyngeales Skelett (CPS) eingebettet sind. Für die Nahrungsaufnahme müssen unterschiedliche Elemente des Pharynx bewegt werden. Diese Bewegungen werden durch zwei Gruppen von Muskel ausgeführt:

1. **Akzessorische pharyngeale Muskulatur;** diese Muskeln besitzen eine Ansatzstelle am Pharynx und eine an der Cuticula, dazu gehören die Pro- und Retraktoren des CPS und die zwei Mundhakenakzessoren. Die Kontraktion der akzessorischen pharyngealen Muskeln resultieren in Relativbewegungen des CPS zum Körper während des Fressverhaltens und der Fortbewegung [Siebenaller, 2008].
2. **Pharyngeale Muskulatur;** diese wird dadurch gekennzeichnet, dass beide Ansatzstellen pharyngealen Ursprungs sind, darunter fallen die cibariale Dilatormuskulatur, Mundhakenelevator und -depressor als auch der Labialretraktor. Die Bewegungen der pharyngealen Muskeln sind direkt an der Nahrungsaufnahme beteiligt.

Die pharyngeale und die akzessorische pharyngeale Muskulatur der Larven ist hauptsächlich für die Nahrungsaufnahme verantwortlich und nur peripher an der Lokomotion beteiligt, die durch die Körperwandmuskulatur realisiert wird.

4.2.1.1 Cibariale Dilatormuskulatur

In einigen wissenschaftlichen Publikationen wurde die cibariale Dilatormuskulatur (CDM) von *Drosophila melanogaster* thematisiert, wobei der Fokus der Arbeiten auf der Onto-

genese [Hartenstein, 1997] oder den Einfluss cholinerges Agonisten auf zentrale Muster-generatoren [Gorczyca et al., 1991] lag. Der Mechanismus der Nahrungsaufnahme wurde für Larven von *Lucilia* erläutert, allerdings wurde die zugrunde liegende Muskulatur nicht erwähnt [Hobson, 1932]. Obwohl es mehrere Arbeiten über die Muskulatur der Kopfkapsel bei Coleoptera gibt [Alarie et al., 2004; Anton & Beutel, 2006; Beutel & Friedrich, 2005], in denen teilweise Muskeln mit ähnlicher Funktion beschrieben werden, gibt es kaum ausführliche anatomische Beschreibung der CDM von Dipteren-Larven. Beispielsweise projiziert bei *M. clypeopatalis* (Coleoptera), einer Larve mit Kopfkapsel, eine Muskelgruppe vertikal auf die dorsale Oberfläche des cibarialen Teils des Oesophagus [Beutel et al., 2008]. Funktionsmorphologisch könnte diese Muskelgruppe als Korrelat der CDM von Dipteren-Larven aufgefasst werden.

Die einzigen Unterschiede zwischen der CDM der untersuchten Larven-Arten bestehen in der Anzahl und Größe der Muskelbündel, ansonsten teilen sie sich folgende anatomischen Merkmale:

1. Sie sind im cephalopharyngealen Skelett (CPS) lokalisiert,
2. Ventral sind die Muskelbündel mit der dorsalen Oberfläche des Oesophagus verbunden und
3. Die dorsale Ansatzstelle der Muskelbündel ist der dorsale Arm des CPS.

Aus der anatomischen Übereinstimmung in Position und Geometrie der CDM resultiert eine analoge Funktion. Die Kontraktion der CDM bewirkt einen Unterdruck im Lumen des Oesophagus, wodurch bei geöffnetem Labium Nahrung eingesaugt wird. Aufgrund der exklusiven Funktion im Fressverhalten von *Calliphora*- und *Drosophila*-Larven ist die CDM eine Schlüsselmuskelgruppe mit besonderer Bedeutung, weil ihre Aktivität als Indikator für die Nahrungsaufnahme genutzt werden kann. Die Funktionsweise der CDM ist vergleichbar mit den cibarialen Pumpmechanismen für Larven von *Bombyx mori* [Sasaki & Asaoka, 2006] und adulten *Manduca sexta* [Miles & Booker, 1998].

4.2.1.2 Mundhakendepressor und -elevator

Die Literatur enthält wenig Information über den Aufbau und die Funktion der Mundhakenmuskulatur bei den untersuchten Larven. Ludwig [1949] hat in seiner morphologischen Studie über den larvalen Kopf von *Calliphora erythrocephala* die Ansatzstellen der Mundhakenmuskulatur am cephalopharyngealen Skelett beschrieben. Er gliederte die Mundhakenmuskulatur in mandibulare Abduktoren und Adduktoren. Hennig [1973] erwähnt in seiner Arbeit über Dipteren die Bewegung der Mundhaken, die durch dorsale Abduktoren und ventrale Adduktoren ausgeführt wird.

Anatomisch und funktionsmorphologisch zeigen die untersuchten Arten in Bezug auf die Mundhakenmuskulatur große Übereinstimmung. Die Bewegung wird durch ein Depressor-Elevator-System realisiert. Bei *Calliphora* und beiden *Drosophila*-Arten besteht die Muskulatur aus vier paarig angeordneten Mundhakendepressormuskeln (MHD) und zwei paarig angeordneten Mundhakenelevatormuskeln (MHE), die außen dem cephalopharyngealen Skelett (CPS) aufliegt. Die Ansatzstellen der Muskeln sind am ventralen Arm des CPS und an der dorsalen und ventralen Basis der Mundhaken lokalisiert.

Aufgrund der unterschiedlichen Größe von *Calliphora*- und *Drosophila*-Larven unterscheidet sich die Mundhakenmuskulatur in der Länge und Breite.

Die ungleiche Disposition zwischen den Muskeln des Depressor- und denen des Elevator-Systems suggeriert, dass das Senken der Mundhaken die kraftintensivere Bewegung ist. Es wurde beobachtet, wie Larven von *Calliphora* mit ihren Mundhaken Kerben in das Siliconelastomer der Petri-Schale geschnitten haben. Im Kontext des Fressverhaltens bestärkt dies die Annahme von Hobson [1932], dass die Larven die Mundhaken einsetzen, um bindegewebsreiches Substrat zu zerkleinern und Nahrung der Mundöffnung zu zuführen. Ein weiterer Beleg für diese Theorie ist, dass die Muskulatur an exponierten Stellen der Mundhakenbasis ansetzt, wodurch der Hebelmechanismus der Bewegung zusätzlich optimiert wird.

Der Beitrag der Mundhakenbewegung zum Fressverhalten und Lokomotion wurde in der Literatur kontrovers diskutiert [Roberts, 1971; Menees, 1962]. In Läsionsversuchen, in denen sie entfernt wurden, krochen Larven ohne Mundhaken und solche mit Mundhaken identisch. Schlussfolgernd aus diesen Versuchen und eigenen Verhaltensbeobachtungen sind die Mundhaken zwar nicht zwingend notwendig bei der Lokomotion, werden aber, wenn vorhanden, eingesetzt, um z.B. ein Hindernis zu überwinden. Des Weiteren sollte festgehalten werden, dass die Bewegungen der Mundhaken eindeutig dem larvalen Fressverhalten zu geordnet werden können, wenn gleichzeitig die cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) als Indikator für die Nahrungsaufnahme aktiv ist.

4.2.1.3 Labialretraktor

Erstmals wurde der Labialretraktor in der Literatur von Ludwig [1949] erwähnt. Die eigenen Ergebnisse zeigten, dass bei allen drei untersuchten Arten der LR ein paariger Muskel ist, der posterior am ventralen Arm des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) ansetzt und anterior über eine komplexe Struktur aus Bindegewebe mit dem Labium verbunden ist. Eine Verkürzung des LR bewirkt vermutlich über einen sklerotisierten Hebelmechanismus das Öffnen des Labiums. Ein Antagonist zum LR konnte nicht identifiziert werden, weshalb das Labium vermutlich passiv durch die Elastizität des Hebelmechanismus geschlossen wird.

Von besonderer Bedeutung für das larvale Fressverhalten ist der LR, weil er als einzige

Muskelgruppe für das Öffnen des Labiums verantwortlich ist und als Indikator für die Nahrungsaufnahme genutzt werden kann.

4.2.1.4 Dorsaler Protraktormuskel A

Obwohl in einer Zeichnung von Weber [1974] die dorsalen und ventralen Protraktoren angedeutet sind und in einer schematischen Darstellung von *Calliphora erythrocephala* zwei Protraktormuskeln in den anterioren Segmenten der Larve eingezeichnet und beschrieben wurden [Ludwig, 1949], existiert in der Literatur keine detaillierte anatomische Beschreibung des dorsalen Protraktormuskels A ($Pro_{do}A$) von *Drosophila virilis* und *melanogaster*.

Die anatomische Untersuchung des $Pro_{do}A$ ergab analog zu den bereits diskutierten Muskelgruppen bei allen drei untersuchten Arten, dass die Muskelansatzstellen posterior am dorsalen Arm des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) und anterior an der Cuticula des Prothorax übereinstimmen. Aus der Geometrie des Muskels ergeben sich für *Calliphora* und *Drosophila* eine übereinstimmende Bewegung. Eine Kontraktion des $Pro_{do}A$ bewirkt eine ventrale Neigung und anteriore Bewegung des CPS relativ zum Körper der Larve. Im Gegensatz zu den anderen diskutierten Bewegungen sind an dieser Bewegung wahrscheinlich noch weitere Muskelgruppen beteiligt, die als eine Art „Widerlager“ fungieren. Die dorsalen und ventralen Protraktoren ($Pro_{do}A$, $Pro_{do}B$ und Pro_{vent}) könnten diese Funktion erfüllen.

Aufgrund seiner Funktion ist der $Pro_{do}A$ sowohl am Fressverhalten als auch an der Lokomotion beteiligt. Denn die Pro- und Retraktion des CPS ist ein integraler Bestandteil der larvalen Fortbewegung [Berrigan & Lighton, 1993; Berrigan & Pepin, 1995; Green et al., 1983]. In einer Videoanalyse müsste das räumliche und zeitliche Muster der Pro- und Retraktion des CPS während des Fressverhaltens und der Lokomotion bestimmt werden, um zu sehen, ob die Bewegungen des CPS verhaltensspezifische Komponenten enthalten. Im Kontext des Fressverhaltens unterstützt die Bewegung des $Pro_{do}A$ das Absenken der Mundhaken, um die Nahrung zu zerkleinern und dem Labium zu zuführen. Der longitudinale Muskel von *M. tentoriohypopharynalis* [Beutel & Friedrich, 2005], einer cephalen Larve der Ordnung Coleoptera, besitzt allgemeine anatomische Gemeinsamkeiten mit den $Pro_{do}A$ der acephalen Larven von Dipteren, die zumindest eine funktionelle Analogie suggerieren.

Zusammenfassung

Die untersuchten Dipteren-Larven besitzen funktionsmorphologisch übereinstimmende pharyngeale (CDM, MHD, MHE und LR) und akzessorische pharyngeale Muskelgruppen ($Pro_{do}A$) (siehe Kapitel 3.2.1). Die Bewegungen des Pharynx, die aus der Aktivität der beschriebenen Muskeln resultieren (Aufsaugen der Nahrung, Heben und Senken der

Mundhaken, Neigung des CPS), sind in *Calliphora* und *Drosophila* identisch.

4.2.2 Pharyngeale Nerven

Alle Nerven von *Calliphora* und *Drosophila*, die vom zentralen Nervensystem nach anterior projizieren und sensorische oder motorische Strukturen des Pharynx innervieren, wurden allgemein als pharyngeale Nerven bezeichnet. Die wichtigsten sind der Antennal- (AN), der Maxillar- (MN) und der akzessorische Prothorakalnerv (PaN), die in den folgenden Abschnitten diskutiert werden. Des Weiteren gehören zu dieser Gruppe: der ventrale Arm Nerv (VAN), der unpaarige Oesophagialnerv (UON), der Labialnerv (LN) und der Bolwignerv (BN), die aber nicht Gegenstand dieser Arbeit waren.

4.2.2.1 Antennalnerv

Bei *Calliphora*- und *Drosophila*-Larven verbindet der Antennalnerv (AN) das Suboesophagialganglion mit dem Ganglion des Dorsalorgans (DO). Ausführlich beschrieben wurde die Morphologie des paarigen DO für die Larven von *Musca domestica* [Chu-Wang & Axtell, 1971]. Bei *Musca domestica* und *Drosophila melanogaster* ist das DO ein sensorisches Organ mit einer kuppelartigen Struktur, die in einen Sockel auf den cephalen Loben eingelassen ist. Das DO von *Drosophila* wurde in zahlreichen Studien intensiv untersucht [Cobb, 1999; Gendre et al., 2004; Heimbeck et al., 1999; Gerber et al., 2004; Gerber & Stocker, 2007; Oppliger et al., 2000; Python & Stocker, 2002a; Stocker, 1994; Tissot et al., 1997], in denen das DO als olfaktorisches Sinnesorgan etabliert und dessen sensorische Bahnen, die durch den AN verlaufen, nachgewiesen wurden. Die schematischen und halb-schematischen Zeichnungen aus diesen Arbeiten vermitteln den Eindruck, der AN enthalte ausschließlich sensorische Bahnen. Auf Grundlage des derzeitigen Wissens scheint das DO und der Verlauf der zugehörigen sensorischen Bahnen für *Calliphora* und *Drosophila* identisch zu sein.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der AN der untersuchten Arten zusätzlich über das Frontalkonnektiv (FK) mit dem stomatogastrischen Nervensystem (SNS) verbunden ist. Die in der Literatur vorhandenen Synonyme: „labro-frontal-connective“ [Baccolo, 1954] und „antennal-labral-frontal-nerve“ [Nässel & Cantera, 1985] für *Calliphora*-Larven belegen die Anbindung an das SNS. Das SNS der Insekten ist Bestandteil des sympathischen Nervensystems und an der Kontrolle der Bewegungen des Pharynx und Vorderdarms beteiligt [Penzlin, 1985; Hartenstein, 1997].

In den anatomischen Studien konnte für *Calliphora* und *Drosophila* eine neuronale Verbindung zwischen den Suboesophagialganglion und der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) identifiziert werden (siehe Kapitel 3.2.2.1). Die Innervation der CDM über den AN, das FK, die frontale Nervenverbindung (FNV) und den Frontalnerv (FN) ist bei allen drei Arten identisch. Die Untersuchung der Nerven des anterioren Endes der Lar-

ven von *Calliphora erythrocephala* bestätigen dieses Innervationsschema [Ludwig, 1949]. Diese Erkenntnis deutete darauf, dass neben den sensorischen Bahnen des DO die motorischen Bahnen der CDM durch den AN projizieren und die Motorneurone im zentralen Nervensystem liegen.

In der Literatur wird der AN als rein sensorischer Nerv dargestellt, der das DO mit dem zentralen Nervensystem verbindet. In meiner anatomischen Untersuchung wurde zum ersten Mal das komplette Innervationsschema des AN von *Drosophila virilis* und *melanogaster* beschrieben.

Die Position der Nervenabzweigungen unterscheiden sich zwischen *Calliphora* und *Drosophila*. Bei *Calliphora* entspringen zwei Seitenäste (AN/I und AN/II) aus dem AN und projizieren auf den Oesophagus innerhalb des CPS. Die Projektionen der Seitenäste terminieren in Regionen, die den Positionen der dorsalen und posterioren pharyngealen Sensillen bei *Drosophila melanogaster* entsprechen [Jürgens et al., 1986; Singh & Singh, 1984; Singh, 1997]. Wohingegen der AN von *Drosophila virilis* und *melanogaster* keine Nervenabzweigungen besitzt. Jedoch zweigen vom FK beider *Drosophila*-Arten zwei bis drei Seitenäste (FK/I - FK/III) ab, deren Projektionsmuster teilweise denen der Seitenäste des AN von *Calliphora* ähneln. Des Weiteren scheint der AN/I dem „labral nerve“ von *Calliphora erythrocephala* zu gleichen, der nach Ludwig [1949] das „labral sense organ“ innerviert. Das „labral sense organ“ ist vermutlich identisch zum dorsalen pharyngealen Sensillum von *Drosophila*. In allen drei Larven-Arten innervieren Nervenabzweigungen eine bis dato nicht identifizierte neuronale Struktur im Bereich des ventralen Arms des CPS. Bei *Calliphora* erfolgt die Innervation über den Seitenast AN/II und bei beiden *Drosophila*-Arten über FK/I.

Eine weitere anatomische Gemeinsamkeit der drei Arten ist die Existenz einer neuronalen Anastomose zwischen dem AN und dem Maxillarnerv (MN), die bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde. Im Gegensatz zu *Calliphora*, wo eine direkte Verbindung zwischen AN und MN (A/AN-MN) besteht, ist bei der Anastomose von *Drosophila* das FK (A/FK-MN) zwischengeschaltet. *Calliphora vicina* und *Drosophila virilis* besitzen eine weitere Anastomose zwischen dem AN und dem FK (A/AN-FK). Eine putative physiologische Funktion konnten den beschriebenen neuronalen Anastomosen des AN nicht zugeordnet werden, ist aber nicht auszuschließen (siehe A/PaN-PN in Kapitel 4.3.3).

4.2.2.2 Maxillarnerv

In der Literatur zur Anatomie der pharyngealen Nerven von Dipteren-Larven wurde der Maxillarnerv (MN) von Hertweck [1931] und Nässel & Cantera [1985] als „suboesophageal nerve“ und von Ludwig [1949] als „mandibular-maxillary-labial nerve“ bezeichnet. Die anatomische Studie des MN zeigte für *Calliphora*- und *Drosophila*-Larven, dass er aus dem Suboesophagealganglion entspringt und das Ganglion des Terminalorgans (TO)

innerviert. Dies ist im Einklang mit den Beschreibungen des Innervationsschemas des MN von *Calliphora erythrocephala* [Ludwig, 1949] und *Drosophila melanogaster* [Colomb et al., 2007; Gerber et al., 2004; Gerber & Stocker, 2007; Python & Stocker, 2002b; Stocker, 1994; Tissot et al., 1997, 1998; Vosshall & Stocker, 2007]. Des Weiteren belegten diese Arbeiten eine neuronale Verbindung des MN zum Suboesophagialganglion, was in der eigenen anatomischen Untersuchung nur für *Calliphora vicina* (MN/VI) nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.2.2.2).

Das paarige TO ist ein Sinnesorgan bestehend aus sechs unterschiedlich Arten von Sensillen, das disto-lateral zum Dorsalorgan (DO) auf den cephalen Loben lokalisiert ist [Bolwig, 1946; Chu-Wang & Axtell, 1972a; Richter, 1962; Singh & Singh, 1984]. Grundsätzlich dient das TO der Gustation [Oppliger et al., 2000]. Allerdings konnten thermosensitive Neurone im TO von *Drosophila* nachgewiesen werden [Liu et al., 2003] und in eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass das TO mechanosensitiv ist (siehe Kapitel 4.3.2). Diese Fakten deuten eine multisensorische Funktion des TO an.

Das paarige Ventralorgan (VO), das eine leichte cuticuläre Ausstülpung mit darauf befindlichen sensorischen Strukturen ist, liegt unterhalb des TO den cephalen Loben auf und besteht aus vier Sensillen, die vermutlich mechano- und chemosensitiv sind [Chu-Wang & Axtell, 1972b; Python & Stocker, 2002b; Stocker, 1994; Szpila et al., 2008].

Das Labialorgan (LO) ist eine sensorische Struktur, die auf den Labialpapillen lateral zu den Labialloben lokalisiert ist [Szpila et al., 2008]. Dieses besteht aus zwei Sensillen. Es wurde unabhängig für mehrere Dipteren-Larven beschrieben [Singh & Singh, 1984; Szpila et al., 2008]. Laut Literatur erfolgt die Innervation des LO durch den Labialnerv, der bei *Calliphora* als ein Seitenast des MN [Ludwig, 1949] und bei *Drosophila* als eigenständiger Nerv beschrieben wurde [Stocker, 1994]. In meiner anatomischen Studie konnte ich zeigen, dass das LO bei allen untersuchten Arten über eine Nervenabzweigung des MN (MN/II) mit dem zentralen Nervensystem verbunden ist (siehe Kapitel 3.2.2.2). Die Nervenabzweigung MN/II entspricht vermutlich dem Labialnerv von Ludwig [1949].

Obwohl die aufgeführten wissenschaftlichen Arbeiten von *Drosophila* suggerieren, dass der MN hauptsächlich sensorische Bahnen enthält, deuten die Ergebnisse eine wesentlich komplexere neuronale Struktur des MN an. Bei den drei Arten innervieren drei bis vier Seitenäste oder feine Projektionen des MN die pharyngealen Muskeln, die außen dem cephalopharyngealen Skelett (CPS) anliegen: Mundhakendepressor, -elevator und Labialretraktor (siehe Kapitel 3.2.2.2). Für die *Drosophila*-Larven konnten teilweise die kompletten neuronalen Strukturen der Seitenäste des MN nicht bestimmt werden. Wahrscheinlich projizieren die nicht identifizierten Seitenäste ebenfalls auf Muskelgruppen, die vom MN innerviert werden, jedoch können auch sensorische Innervationsziele nicht ausgeschlossen werden. Ludwig [1949] beschrieb für *Calliphora erythrocephala*, dass der Labialnerv (MN/II) den so genannten Speicheldrüsenmuskel („salivary muscle“) in-

nerviert. Nach seinen Angaben liegt dieser Muskel ventral dem cephalopharyngealen Skelett (CPS) auf. Er soll posterior im Bereich der pharyngealen Furchen („pharyngealen ridges“) und anterior an der Mündung des Speicheldrüsenkanals in die larvale Mundöffnung inserieren. Der Speicheldrüsenmuskel sowie seine Innervation durch den MN konnten durch die anatomische Untersuchung nicht bestätigt werden.

Eindeutige anatomische Unterschiede zwischen *Calliphora* und *Drosophila* sind:

1. Die Projektion des Seitenasts MN/I an den ventralen Arm des CPS bei *Calliphora*, der bei *Drosophila* fehlt. Ob MN/I möglicherweise ein nicht beschriebenes Sinnesorgan innerviert, müsste in zukünftigen Arbeiten geklärt werden.
2. Die neuronale Anastomose existiert bei *Calliphora* zwischen dem MN und dem Antennalnerv, wohingegen bei *Drosophila* der MN mit dem Frontalkonnektive (FK) verbunden ist. Die Funktion der Anastomose ist nicht bekannt.

In der morphologischen Arbeit von Tissot et al. [1998] über die Motorneurone der pharyngealen Muskulatur von *Drosophila melanogaster* Larven ist eine neuronale Anastomose zwischen den MN und den Frontalnerv (FN) beschrieben, die in meiner anatomischen Untersuchung des MN von *Drosophila melanogaster* eindeutig nicht vorhanden war.

4.2.2.3 Akzessorischer Prothorakalnerv

Das anteriore bzw. cephale Projektionsmuster des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von Dipteren wurde erstmals von Ludwig [1949] für *Calliphora erythrocephala* graphisch dargestellt. Die antero-laterale Austrittsstelle vom zentralen Nervensystem des PaN bei *Calliphora erythrocephala* und *Sarcophaga bullata* wurde von Nässel & Cantera [1985] erwähnt.

In meiner Arbeit wurde zum ersten Mal versucht, das gesamte Innervationsschema des PaN von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* zu erläutern. Der PaN aller untersuchten Arten innerviert die Aorta über die Nervenabzweigung PaN/I. In Dipteren-Larven fungiert die Aorta als Neurohaemalorgan für neurosekretorische Zellen des retrocerebralen Komplexes [Cantera, 1988; Cantera et al., 1994; Siegmund & Korge, 2001]. Allerdings konnte die neurosekretorische Funktion der Innervation durch den PaN/I in elektrophysiologischen Untersuchungen von *Calliphora vicina* nicht verifiziert werden (siehe Kapitel 3.3.1.3).

Die anatomische Untersuchung des PaN konnte in allen Fällen eine Projektion zum Bolwigorgan (BO) bzw. in die unmittelbare Umgebung des BO gezeigt werden. Bei *Calliphora* erfolgt die Innervierung des BO durch den Seitenast PaN/II, wohingegen bei beiden *Drosophila*-Arten der PaN direkt auf das BO projiziert. Die neuronale Verbindung des PaN ist unabhängig vom so genannten Bolwignerv oder optischen Nerv, der für

Calliphora [Bolwig, 1946; Nässel & Cantera, 1985] und *Drosophila* [Gerber et al., 2004; Ito et al., 1995; Tix et al., 1989] beschrieben wurde. Untersuchungen an *Calliphora vicina* haben gezeigt, dass der Bolwignerv über die Augenanntenscheibe die Gehirnhemisphären mit dem BO verbindet. In extrazellulären Ableitungen resultierte eine Beleuchtung des BO in einer reizabhängigen Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz im Bolwignerv [Siebenaller, 2008]. Diese Experimente belegen die These von Sawin et al. [1994], dass das BO ein lichtsensitives Sinnesorgan ist. Die Funktion des PaN/II sollte in zukünftigen Projekten untersucht werden.

Bei *Calliphora* und *Drosophila* besitzt der PaN eine neuronale Anastomose (A/PaN-PN) zum Prothorakalnerv (PN). In einer Zeichnung der prothorakalen motorischen Nerven von Ludwig [1949] ist eine identische neuronale Verbindung zwischen den PaN und ventralen Prothorakalnerv, der anatomisch den PN ähnelt, für *Calliphora erythrocephala* dargestellt.

Der PaN innerviert folgende akzessorische pharyngeale Muskeln: Dorsaler Protraktormuskel A und B ($Pro_{do}A$ und $Pro_{do}B$). Allerdings projiziert bei *Calliphora* der PaN über mehrere feine Nervenäste direkt auf $Pro_{do}A$ und $Pro_{do}B$. Im Gegensatz dazu sind die dorsalen Protraktormuskeln von *Drosophila* über den Seitenast PaN/II mit dem PaN verbunden. Aufgrund der A/PaN-PN ist der neuronale Verlauf der potentiellen motorischen Bahnen des $Pro_{do}A$ und $Pro_{do}B$ unklar, weil die Axone der Motorneurone durch den PaN oder den PN ziehen können. Diese Frage müsste durch elektrophysiologische Experimente analysiert werden. Entsprechende Versuche wurden bei *Calliphora vicina* durchgeführt und haben gezeigt, dass die motorischen Bahnen des $Pro_{do}B$ durch die neuronalen Anastomose, A/PaN-PN, projizieren (siehe Kapitel 3.3.1.3). Daraus resultiert eine physiologische Funktion von A/PaN-PN bei *Calliphora vicina*. Diese Tatsache zeigt, dass eine rein anatomische Beschreibung der Innervationsmuster nicht ausreicht, sondern durch elektrophysiologische Experimente auf funktioneller Ebene untermauert werden muss.

Für *Calliphora vicina* und *Drosophila melanogaster* wurden einige Projektionen des PaN nicht komplett anatomisch beschrieben. Diese Projektionen und ihre Innervationsziele sollten in weiterführenden Arbeiten analysiert werden.

Zusammenfassung

Die eindeutig bestimmten sensorischen und besonders die motorischen Innervationsziele des AN, des MN und des PaN sind in *Calliphora* und *Drosophila* identisch, obwohl die Innervationsschemata der pharyngealen Nerven teilweise gattungsspezifische Unterschiede aufwiesen.

4.2.3 Retrograde axonale Füllung der pharyngealen Nerven

Das Frontalganglion (FG) bildet bei allen Insekten das Zentrum des stomatogastrischen Nervensystems [Penzlin, 1985]. In der Klasse der Insekten ist das FG eine unpaarige neuronale Struktur, die auf der dorsalen Oberfläche des Oesophagus lokalisiert ist und über zwei laterale Nerven mit dem zentralen Nervensystem verbunden ist. Diese grundlegenden anatomischen Merkmale des Frontalganglions wurden für adulte *Periplaneta americana* [Willey, 1961; Gundel & Penzlin, 1978], adulte *Acheta domesticus* [Kirby et al., 1984], adulte *Locusta migratoria* [Burrows, 1996; Ayali, 2004], larvale und adulte *Manduca sexta* [Bell et al., 1974; Miles & Booker, 1994, 1998] und larvale *Apis mellifera* [Boleli et al., 1998] gezeigt. Im Gegensatz dazu wird das FG im späten Embryonalstadium und frühen ersten Larvenstadium von *Drosophila* als u-förmige, paarige Struktur beschrieben, die 25-30 Somata enthält [Campos-Ortega & Hartenstein, 1985; Forjanic et al., 1997; Hartenstein, 1997]. In vielen Insektengruppen enthält das FG die Motorneurone, die an der Erzeugung der motorischen Muster des Fressverhaltens beteiligt sind. In *Schistocerca gregaria* enthält das FG das motorische Netzwerk, das die rhythmischen Bewegungen des Vorderdarms reguliert [Ayali et al., 2002; Ayali, 2004; Ayali & Zilberstein, 2004; Zilberstein & Ayali, 2002]. Im FG der Larven von *Manduca sexta* wurden Motorneurone nachgewiesen, die pharyngeale Muskeln steuern [Miles & Booker, 1994, 1998]. Unsere veröffentlichte Arbeit [Spieß et al., 2008] hat gezeigt, dass im Frontalganglion von *Calliphora*- und *Drosophila*-Larven keine Somata enthalten sind, weshalb der Terminus (Frontal-) „Ganglion“ unpassend ist. Aufgrund der übereinstimmenden anatomischen Merkmale dieser neuronalen Struktur mit dem FG der aufgezählten Insektengruppen wurde die Bezeichnung „frontale Nervenverbindung“ (FNV) als adäquat angesehen.

Die Arbeiten von Rajashekhar & Singh [1994]; Tissot et al. [1998] an adulten *Drosophila* zeigten, dass die pharyngealen Motorneurone im Tritocerebrum lokalisiert sind und nicht im FG. Diese Daten suggerieren, dass auch die Motorneurone der pharyngealen und akzessorischen pharyngealen Muskulatur von Dipteren-Larven im zentralen Nervensystem liegen.

Obwohl das Wissen über das zentrale Nervensystem von adulten Dipteren groß ist, wurde das larvale zentrale Nervensystem nur marginal untersucht [Hertweck, 1931; Ito et al., 1995; Kankel & Hall, 1976; Kankel et al., 1980; White & Kankel, 1978]. Mit ein Grund dafür mag sein, dass retrograde Füllungen der peripheren Nerven bei Dipteren-Larven eine große technische Herausforderung darstellen, die eine anatomische Untersuchung des zentralen Nervensystems zusätzlich erschweren [Thomas et al., 1984]. Dies weckte die Motivation in dieser Arbeit retrograde axonale Füllungen bei *Calliphora vicina* durchzuführen, um die Zellkörper der Neurone, die durch die pharyngealen Nerven projizieren, im Speziellen der Motorneurone, zu identifizieren.

Durch die Füllungen des Antennal- (AN), des Frontal- (FN), des Maxillar- (MN) und

des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Calliphora vicina* konnten Zellkörper angefärbt werden, die alle im Suboesophagialganglion lokalisiert waren. Im Fall der angefärbten Somata, die durch den AN und den MN projizieren, liegt der Locus der Zellverbände im anterioren Bereich des Suboesophagialganglions. Anhand der Füllungen des AN, MN und PaN kann nicht die physiologische Natur der identifizierten Somata geklärt werden, denn die anatomische Untersuchung der pharyngealen Nerven hat gezeigt, dass die untersuchten pharyngealen Nerven auf motorische und sensorische Strukturen projizieren (siehe Kapitel 3.2.2). Demzufolge werden durch eine retrograde axonale Füllung des gesamten Nervs die Axone und Somata der sensorischen und motorischen Neurone angefärbt. Des Weiteren wurde in einer immunhistologischen Untersuchung von *Calliphora erythrocephala* belegt, dass Serotonin-immunoreaktive Neurone im zentralen Nervensystem Axone im AN besitzen [Nässel & Cantera, 1985], demzufolge könnten auch neurosekretorische Neurone zumindest im Fall des AN von *Calliphora vicina* angefärbt worden sein. Über eine selektive Füllung der Motorneurone der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM) von *Calliphora vicina*, die über den Frontalnerv (FN) erfolgte, konnte die Position der entsprechenden Somata im Suboesophagialganglion bestimmt werden. Die selektiv gefüllten Motorneurone entsprechen einer Teilmenge der gefüllten Somata im zentralen Nervensystem der kompletten retrograden Füllung des AN. Dies bestätigt für die Motorneurone der CDM die These, dass die Motorneurone der pharyngealen Muskulatur im zentralen Nervensystem lokalisiert sind. Für die anderen beschriebenen Muskelgruppen müssten in weiterführenden Studien derartige selektive Füllungen durchgeführt werden, um die exakte Position der Motorneurone zu bestimmen.

Die neuritischen Projektionen der pharyngealen Nerven, die in das erste und zweite Thorakalganglion ziehen, verlaufen im Neuropil. Das synaptische Neuropil bildet den zentralen Kern des Gehirns und ist umgeben von einem Cortex aus Nervenzellkörpern. Inwieweit die direkte Nachbarschaft der angefärbten Neurone oder die Projektionen in die Thorakalganglien Interaktionen zwischen dem putativen sensorischen System und den motorischen Netzwerken andeutet, kann auf Basis dieser Resultate nicht beantwortet werden. Eine solche Interaktion kann nur durch intrazelluläre Ableitungen der entsprechenden Neurone nachgewiesen werden.

4.2.4 *hugin*-Neurone und -Projektionen in *Calliphora vicina*

Hugin ist ein Neuropeptid, das in *Drosophila melanogaster* von 20 Neuronen exprimiert wird. Verhaltensuntersuchungen haben gezeigt, dass in der larvalen Fressmutante *klumpfuss* (*klu*) *hugin* überexprimiert wird. *Hugin* wird von Neuronen im zentralen Nervensystem exprimiert. Die *hugin*-exprimierenden Neurone projizieren zur pharyngealen Muskulatur, zum retrocerebralen Komplex, ins Ventralganglion und zu höheren Zentren des Nervensystems (Protocerebrum) [Melcher et al., 2007]. Diese Fakten suggerieren,

dass *hugin* wahrscheinlich im Gehirn das Fressverhalten als Antwort auf gustatorische Signale moduliert [Melcher & Pankratz, 2005]. Eine Homologie-Analyse ergab, dass *Manduca sexta* und *Apis mellifera* ein homologes Prä-Propeptid zu *hugin* von *Drosophila melanogaster* besitzen [Bader, 2008]. Des Weiteren konnten in diesen Arten morphologische ähnliche Neuronenanordnungen, die das Homologon exprimieren, zu den *hugin*-exprimierenden Neuronen-Ensembles in *Drosophila melanogaster* bestimmt werden [Bader, 2008].

Aufgrund der starken Konservierung von *hugin* im Genom von Insekten und der morphologischen Übereinstimmung zwischen den identifizierten *hugin*-Neuronen in *Drosophila melanogaster* und angefärbten Neuronen der CoCl/CoLy-Füllung des akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) von *Calliphora vicina* stellte sich die Frage, ob *hugin*-Neurone im zentralen Nervensystem von *Calliphora vicina* existieren. In der durchgeführten immunohistologischen Untersuchung konnten 12-14 *hugin*-immunoreaktive Zellen im Suboesophagialganglion von *Calliphora vicina* identifiziert werden. Die *hugin*-immunoreaktiven Zellen sind wie die putativen Motorneurone der pharyngealen und akzessorischen pharyngealen Muskulatur im Suboesophagialganglion lokalisiert. Wäre die These zutreffend [Bader, 2008], dass das Neuropeptid *hugin* im Suboesophagialganglion über spezielle Dendriten diffus ausgeschüttet würde, was für Neuropeptide bei Vertebraten nachgewiesen wurde [Ludwig et al., 2002], so könnte es das motorische Netzwerk des larvalen Fressverhaltens modulieren.

Des Weiteren konnten Projektionen von *hugin*-immunoreaktiven Zellen im PaN aufgezeigt werden. Allerdings konnte das Innervationsziel der Projektionen nicht ermittelt werden. Ein Spaltprodukt des *hugin* Prä-Propeptids, das Pyrokinin2 (PK2) besitzt vermutlich eine myostimulatorische Wirkung [Meng et al., 2002], was die Innervation eines oder mehrerer Muskeln im anterioren Bereich der Larve von *Calliphora vicina* nahe legt.

4.3 Elektrophysiologie

Die Experimente an *Calliphora vicina* bildeten den integralen Bestandteil der elektrophysiologischen Untersuchung der Dipteren-Larven, bei denen primär das motorische System des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) detailliert analysiert wurde. Ausgehend von den gewonnenen technischen und physiologischen Erkenntnissen wurden die efferenten Einheiten und deren Funktion in den entsprechenden Nerven von *Drosophila virilis* und *melanogaster* identifiziert.

Die Sensorik wurde nur an Larven von *Calliphora vicina* qualitativ untersucht. Die gewonnenen Daten können als Hilfestellung für die Planung und Konzeptionierung von analogen Versuchen an *Drosophila virilis* und *melanogaster* fungieren. Darüber hinaus sollten die Experimente erste Anhaltspunkte liefern, wie das Nervensystem von *Drosophila melanogaster* in einem interdisziplinären Ansatz, der elektrophysiologische und molekularbiologische Methoden kombiniert, untersucht werden kann.

4.3.1 Antennalnerv

Cibariale Dilatormuskulatur (CDM)

Die Larven von *Calliphora* leben auf und ernähren sich von Kadavern, wohingegen die Larven von *Drosophila* als Lebensraum verfallende Früchte bevorzugen und darauf befindlichen Mikroorganismen, wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, als Nahrungsquelle nutzen. Obwohl die Habitate und die Nahrungsgrundlage bei den untersuchten Larven unterschiedlich sind, wird die Nahrung in einem verflüssigten Zustand aufgenommen. Deshalb kann die cibariale Dilatormuskulatur (CDM) als „Saugpumpe“ aufgefasst werden, die vergleichbar mit den cibarialen Pumpmechanismus bei nektarsaugenden Insekten ist, wie z.B. *Bombyx mori* [Sasaki & Asaoka, 2006] oder *Manduca sexta* [Miles & Booker, 1998]. Das positionsabhängige Aktivitätsmuster der einzelnen CDM-Muskelbündel zeigte, dass die Kontraktionen der CDM-Bündel zeitlich versetzt in Form einer von anterior nach posterior verlaufenden peristaltischen Kontraktionswelle beginnen und synchron enden. Dabei handelt es sich möglicherweise um eine Anpassung zur Optimierung des Pumpmechanismus.

Durch unterschiedliche elektrophysiologische Methoden konnten die motorischen Bahnen der CDM von *Calliphora vicina* nachvollzogen werden. Die Fasern projizieren ausgehend von den Zellkörpern im Suboesophagialganglion durch die Antennalnerven (AN), die Frontalkonnektive (FK) über die frontale Nervenverbindung (FNV) und innervieren die CDM über den Frontalnerv (FN). Der Verlauf der motorischen Bahnen stimmt mit den anatomischen Ergebnissen überein. Der Nachweis für den Verlauf der motorischen Bahnen resultierte aus der zeitlichen Korrelation der Multiunitbursts im AN und den postsynaptischen Potentialen auf der CDM sowie Läsionsexperimenten an den AN.

Durch orthodrome elektrische Stimulation des AN konnten postsynaptische Muskelpotentiale auf der CDM erzeugt werden. Aus aufeinander folgenden elektrischen Stimulationen identischer Reizstärke resultierten postsynaptische Potentiale mit unterschiedlichen Amplituden. Dieses Ergebnis suggeriert eine duale Innervation der CDM von *Calliphora vicina*. Vermutlich wird die CDM von zwei motorischen Einheiten angesteuert, die einen nahezu identischen Schwellenwert besitzen. Dies würde der typischen polyneuronalen Innervation der Skelettmuskulatur von Insekten bestehend aus einem „schnellen“ und einem „langsamen“ exzitatorischen Motorneuron entsprechen [Burrows, 1996]. Unterstützt wird diese Annahme durch die Feststellung, dass die Multiunitbursts Aktionspotentiale mit mindestens drei distinkten Amplituden enthalten. Obwohl in einer elektrophysiologischen Studie an den Larven von *Galleria mellonella* gezeigt wurde, dass die Larven der Wachsmotte Muskelfasern besitzen, die nur von einem „schnellen“ Motorneuron innerviert werden [Belton, 1969]. Die sukzessiven Läsionen der AN bei simultaner extra- und intrazellulärer Ableitung zeigten, dass die Motorneurone die CDM ipsi- und controlateral innervieren. Die motorischen Bahnen der CDM bilden somit eine anatomische Besonderheit, weil bei Insekten die Axone von Motorneuronen normalerweise durch einen Nerv projizieren und die entsprechende Muskulatur unilateral innervieren [Burrows, 1996]. Der Verlauf der motorischen Bahnen der CDM-Motorneurone im AN für *Calliphora vicina* wurde in unterschiedlichen anatomischen und elektrophysiologischen Studien etabliert. Läsionsversuche am AN von *Drosophila* deuteten auf ein entsprechendes Projektionsmuster der CDM-Motorneurone hin. Das übereinstimmende Innervationsschema der CDM durch den AN bei den untersuchten Arten bestärkte diese Annahme. In analogen elektrophysiologischen Versuchen konnte für *Drosophila virilis* und *melanogaster* demonstriert werden, dass eine zeitliche Korrelation zwischen den Multiunitbursts im AN und den postsynaptischen Potentialen der CDM vorhanden ist. Folglich verlaufen die motorischen Bahnen der CDM bei den untersuchten *Drosophila*-Arten ebenfalls durch den AN. Basierend auf diesen Erkenntnissen kann anhand der rhythmischen Aktivität der Multiunitbursts des AN die Nahrungsaufnahme registriert werden, weshalb der AN ein „Schlüsselnerf“ für die Untersuchung von larvalen Fressverhalten ist.

Dorsalorgan

Das Dorsalorgan (DO), das primär ein olfaktorisches Sinnesorgan ist, wurde bei unterschiedlichen Dipteren-Larven intensiv untersucht: *Musca domestica* [Chu-Wang & AxteLL, 1971], *Calliphora erythrocephala* [Richter, 1962] und *Drosophila melanogaster* [Cobb, 1999; Gendre et al., 2004; Heimbeck et al., 1999; Jürgens et al., 1986; Python & Stocker, 2002b; Tissot et al., 1997]. Das Dorsalorganganglion (DOG) bei *Musca domestica* enthält 35-41 Neurone, von denen 21 bipolare Neurone die Kuppel des DO innervieren. Über sieben Axonbündel werden putativen sensorischen Information an das zentrale Nerven-

system weitergeleitet [Chu-Wang & Axtell, 1971]. Wohingegen das DOG von *Drosophila melanogaster* 36-37 sensorische Neurone enthält [Python & Stocker, 2002a], von denen ebenfalls 21 olfaktorische Rezeptorneurone sind, deren sensorische Bahnen durch den Antennalnerv (AN) verlaufen und deren Integration in das zentrale Nervensystem erforscht wurde. Die olfaktorische Funktion des DO wurde für Larven von *Drosophila melanogaster* detailliert von der elektrophysiologischen bis zur Verhaltensebene etabliert [Oppliger et al., 2000; Kreher et al., 2005, 2008]. Für die restlichen sensorischen Neurone im DOG von *Drosophila* wurde vermutet, dass sie eine gustatorische Funktion besitzen, aber auch eine, thermo-, hygro- oder mechanosensorische Perzeption dieser Neurone wurde nicht ausgeschlossen [Gerber & Stocker, 2007]. Basierend auf den Erkenntnissen von Chu-Wang & Axtell [1972a] enthält das DO Skolopidien, die theoretisch Streckrezeptoren sein könnten. Somit könnte auch bei *Musca domestica* vermutet werden, dass eine Teilgruppe der restlichen 15 bis 20 Neurone des DOG mechanosensorisch sind. In den elektrophysiologischen Versuchen am AN von *Calliphora vicina* wurde die Mechanosensitivität und die sensorischen Bahnen des DO qualitativ untersucht. Es konnte eine sensorische Antwort im AN auf eine Auslenkung des DO um $10\mu\text{m}$ detektiert werden. Weil das DO während des Fressens und der Fortbewegung exponiert und durch das Substrat bewegt wird, kann davon ausgegangen werden, dass eine Auslenkung des DO von $10\mu\text{m}$, dies entspricht ungefähr den Kegeldurchmesser des DO, auch beim natürlichen Verhalten auftritt und einen adäquaten Reiz repräsentiert. Theoretisch könnten die durch das DO vermittelten mechanosensorischen Informationen das Fressverhalten von Dipteren-Larven koordinieren. Erste Anhaltspunkte für die Integration der sensorischen Information des DO konnten in der Diplomarbeit von B. Usai [2008] gesammelt werden, jedoch konnten sie nicht quantifiziert werden. Die Daten belegen, dass die sensorischen Bahnen des DO durch den AN verlaufen und deuten eine mechanosensorische Funktion des DO an. Des Weiteren suggerieren die Resultate, dass das DO von *Calliphora vicina* ein multisensorisches Organ ist.

Gerber & Stocker [2007] haben gezeigt, dass die sensorischen Bahnen des DO ins Suboesophagialganglion projizieren. Demzufolge könnte eine Integration der mechanosensorischen Information des DO in die zentralen Mustergeneratoren für die Lokomotion oder das Fressverhalten wahrscheinlich sein. Denn die anatomische Untersuchung hat gezeigt, dass die am Fressverhalten beteiligten Motorneurone ebenfalls im Suboesophagialganglion lokalisiert sind. Des Weiteren wurde für *Drosophila melanogaster* in unterschiedlichen Arbeiten belegt, dass die zentralen Mustergeneratoren für larvales Fressen und Fortbewegung im Ventralganglion lokalisiert sind [Cattaert & Birman, 2001; Gorczyca et al., 1991]. In zukünftigen Versuchen könnten die Neurone im DO durch molekularbiologische Verfahren gezielt ausgeschaltet werden und untersucht werden, inwieweit sich das Fressverhalten oder die Lokomotion der Larven durch die Eliminierung der Neurone

verändert.

Kropfsensorik

Die Regulation des Fressverhaltens von adulten Fliegen (*Phormia regina*) und der potentielle regulative Beitrag von Streckrezeptoren im Verdauungstrakt wurde in Läsionsversuchen, histologischen und elektrophysiologischen Experimenten untersucht [Dethier & Gelperin, 1967; Gelperin, 1966a,b, 1967b,a, 1971b,a, 1972]. Im Gegensatz dazu sind kaum Informationen zur Regulation des larvalen Fressverhaltens bekannt. Grundlegend wird bei adulten Fliegen das Fressverhalten durch exzitatorischen Input des chemosensorischen Systems und inhibitorischen Input der stomatogastrischen Mechanorezeptoren über zentrale Integration moduliert. Erste Experimente an Larven von *Calliphora vicina* zeigten bei Manipulation des Kropfvolumens eine Erhöhung der neuronalen Aktivität im rekurrenten Nerv (RN), die als sensorische Antwort von nicht identifizierten Streckrezeptoren im Kropf gedeutet wurde. Diese Erkenntnisse sind vergleichbar mit den identifizierten Streckrezeptoren im Vorderdarm von adulten Fliegen, die den Füllungsgrad des Kropfes detektieren. Die sensorischen Informationen der putativen Streckrezeptoren könnten einen regulatorischen Eingang in das zentrale Nervensystem darstellen.

Allerdings zeigten extrazelluläre Doppelableitungen, dass die sensorischen Informationen über den Füllungsgrad des Kropf nicht, wie erwartet, über den Antennalnerv (AN) zentralnervös verarbeitet werden, sondern über den Proventrikularnerv (PVN) des stomatogastrischen Nervensystems in Richtung des Proventrikularganglions (PVG) weitergeleitet werden. Bei *Periplaneta americana* projizieren die potentiellen sensorischen Bahnen, die an der physiologischen Funktion des Kropfes beteiligt sind, über den RN, den Oesophagialnerv, durch das Ingluvialganglion und via den Ingluvialnerv zum Proventrikulus [Davey & Treherne, 1963]. Demzufolge scheint der Verlauf der neuronale Bahnen der Kropfsensorik bei *Calliphora vicina* keine anatomische Besonderheit darzustellen.

Anscheinend ist der putative Einfluss der Streckrezeptoren im Kropf indirekt und wirkt nicht direkt inhibitorisch auf die Motorneurone im Suboesophagialganglion. Diese Resultate sind im Einklang mit dem inhibitorischen System zur Regulation des Fressverhaltens von adulten Fliegen, das von Bowdan & Dethier [1986] postuliert wurde. Dabei erfolgt die inhibitorische Regulation des Fressverhaltens durch zeitlich wirkende Subsysteme bestehend aus Streckrezeptoren im Vorderdarm mit einer verzögerten, lang andauernden inhibitorischen Wirkung und abdominalen Streckrezeptoren mit kurz andauernder, direkter inhibitorischen Wirkung. Des Weiteren vermuteten Bowdan & Dethier [1986], dass der inhibitorische Beitrag der Vorderdarmstreckrezeptoren möglicherweise durch einen Neuromodulator vermittelt wird. Dieses Postulat ist im Einklang mit den elektrophysiologisch bestimmten sensorischen Bahnen der Kropfstreckrezeptoren, weil vermutlich das Innervationsziel die neurosekretorischen Neurone im PVG oder der Ringdrüse sind. Un-

sere Läsionsexperimente, in denen an unterschiedlichen Position das stomatogastrische Nervensystem durchtrennt wurde, zeigten, dass trotz der zugefügten Läsionen die Motorik des Proventrikels erhalten blieb, was suggeriert, dass neurosekretorische Neurone im PVG vorhanden sein könnten [Schoofs & Spieß, 2007].

4.3.2 Maxillarnerv

Mundhakenelevator, -depressor und Labialretraktor

Bei der Clusteranalyse des deafferentierten Maxillarnervs (MN) von *Calliphora vicina* konnten drei distinkte efferente Einheiten bestimmt werden. Diese Einheiten konnten über zeitliche als auch teilweise über 1:1 Korrelation zwischen den Aktionspotentialen und den postsynaptischen Potentialen den Motorneuronen des Mundhakendepressors (MHD), -elevators (MHE) und Labialretraktors (LR) zugeordnet werden (siehe Kapitel 3.3.1.2). Entsprechend den Annahmen aus der anatomischen Untersuchung zeigten die elektrophysiologischen Experimente, dass die motorischen Bahnen des MHD, des MHE und des LR im MN lokalisiert sind.

Die physiologischen Ergebnisse, insbesondere der Clusteranalyse, deuten nicht an, dass eine vierte motorische Einheit in den extrazellulären Ableitungen des MN vorhanden ist. Demzufolge suggerieren die elektrophysiologischen Experimente nicht die Existenz des von Ludwig [1949] beschriebenen Speicheldrüsenmuskels („salivary muscle“), obwohl theoretisch die mittlere Einheit des MN die Aktionspotentiale des LR und des Speicheldrüsenmuskels enthalten könnte.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen und dem Projektionsmuster des MN bei *Drosophila*-Larven wurden identische physiologische Einheiten für den MHD und MHE anhand von 1:1 Korrelationen bestimmt. Demzufolge ist der Verlauf der motorischen Bahnen des Depressor-Elevator-Systems der Mundhaken bei den untersuchten Dipteren-Arten identisch.

Die intrazellulären Muskelableitungen des MHD und des MHE von *Drosophila virilis* und *melanogaster* zeigten zwei distinkte Amplituden der postsynaptischen Potentiale (siehe Tab. 4.3). In der Literatur ist eine duale Innervation für die Körperwandmuskulatur von unterschiedlichen larvalen Dipteren-Arten nachgewiesen worden (*Calliphora erythrocephala*: [Hardie, 1976a], *Musca domestica*: [Irving & Miller, 1980], *Drosophila melanogaster*: [Cooper & Neckameyer, 1999; Jan & Jan, 1976b; Kurdyak et al., 1994]). Die Resultate meiner Arbeit belegen zum ersten Mal eine polyneuronalen Innervation für Muskeln, die nicht an der Motorik der Körperwand beteiligt sind. Aufgrund der großen Übereinstimmung des motorischen Systems der Mundhaken zwischen den Larven von *Calliphora* und *Drosophila* ist es verwunderlich, dass eine duale Innervation nur für *Drosophila* nachgewiesen werden konnte.

Obwohl die anatomische Untersuchung andeutete, dass die Axone der Motorneurone des

LR durch den MN projizieren, konnte dies anhand von simultanen extra- und intrazellulären Ableitungen für *Drosophila virilis* und *melanogaster* nicht bestätigt werden. Die efferente Einheit des LR konnte in den extrazellulären Ableitungen der *Drosophila*-Larven nicht identifiziert werden, weil die Amplitude der Aktionspotentiale zu klein und das Signal/Rausch-Verhältnis zu schlecht war. Eine technische Herausforderung für die Zukunft wäre die Verbesserung der Ableitqualität mit der Intention alle drei efferenten Einheiten bei *Drosophila melanogaster* extrazellulär zu erfassen. Der MN wäre ein idealer „Schlüsselnerv“, weil man gleichzeitig drei unterschiedliche Muskelgruppen, den Labialretraktor (LR) für die Nahrungsaufnahme und den MHD sowie den MHE für das Fressverhalten oder die Lokomotion, mit einer Ableitung am MN registrieren könnte.

Terminal-, Ventral- und Labialorgan

Die Ultrastruktur des Terminal- (TO) und des Ventralorgans (VO) wurde bei mehreren Larven-Arten detailliert untersucht: *Musca domestica* [Chu-Wang & Axtell, 1972b,a] und *Drosophila melanogaster* [Singh & Singh, 1984] und dokumentiert eine hohe Übereinstimmung im Aufbau der beiden cephalen Sinnesorgane für Dipteren-Larven. TO und VO von *Drosophila melanogaster* besitzen separate Ganglien, die über den Maxillarnerv (MN) mit dem zentralen Nervensystem verbunden sind [Colomb et al., 2007; Gerber et al., 2004; Gerber & Stocker, 2007; Python & Stocker, 2002a; Stocker, 1994; Voshall & Stocker, 2007].

Das Labialorgan (LO) wurde für mehrere Arten beschrieben (*Calliphoridae* [Szpila et al., 2008], *Drosophila melanogaster* [Kankel et al., 1980]) und die zugehörige Feinstruktur des Sinnesorgans bei *Drosophila melanogaster* analysiert [Singh & Singh, 1984]. Die neuronale Verbindung des LO via dem Labialnerv, wie sie von Stocker [1994] für *Drosophila*-Larven beschrieben wurde, konnte in der durchgeführten anatomischen Studie nicht verifiziert werden. Meine Daten suggerieren, dass die sensorischen Bahnen des LO durch den MN in das zentrale Nervensystem projizieren (siehe Kapitel 3.2.2.2).

Obwohl das larvale gustatorische System in Relation zum olfaktorischen wenig untersucht ist, wurde den TO, den VO und den LO eine putative gustatorische Funktion zugeordnet [Gerber & Stocker, 2007]. Allerdings wird in der Literatur diesen drei cephalen Sinnesorganen eine duale bis multi-sensorische Funktion zugeschrieben. Denn sie bestehen aus mindestens zwei Klassen von Sensillen. Eine Klasse dieser Sensillen weist die anatomischen Merkmale eines für Insekten typischen Mechanorezeptors auf [Singh & Singh, 1984; Thurm, 1964, 1965]. Derartige mechanorezeptive Sensillen werden durch nur einen einzelnen Dendriten innerviert und besitzen an der Basis einen Tubularkörper. Die Ergebnisse für *Calliphora*-Larven belegen, dass die sensorischen Bahnen des TO, des VO und des LO via den MN mit dem Suboesophagialganglion verbunden sind. Des Wei-

teren konnte eine eindeutige sensorische Antwort auf einen mechanischen Stimulus bei allen drei untersuchten Sinnesorganen abgeleitet werden, was eine putative mechanorezeptive Eigenschaften des TO, des VO und des LO belegt. In weiteren Untersuchungen müsste die Frage geklärt werden, inwiefern sich die Erkenntnisse über das Projektionsmuster der sensorischen Bahnen und Mechanoperzeption der cephalen Sinnesorgane des MN auf *Drosophila* übertragen lässt. Weil die Motorneurone, die am larvalen Fressverhalten beteiligt sind, im Suboesophagialganglion liegen und die sensorischen Neurone des TO, des VO und des LO in den identischen Locus projizieren, könnte dies eine Integration der mechanosensorischen Information in den motorischen Output des Fressverhaltens andeuten. Für zukünftigen elektrophysiologischen Untersuchungen des Fressverhaltens ist der MN ein interessantes und vielseitiges Forschungsobjekt, weil theoretisch anhand einer extrazellulären Ableitung am MN drei motorische und drei sensorische Einheiten detektiert werden können.

4.3.3 Akzessorischer Prothorakalnerv

Dorsaler Protraktormuskel A

Die extrazellulären Ableitungen des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Calliphora vicina* im deafferentierten Zustand¹ zeigten die alternierende Aktivität von zwei efferenten Einheiten, die durch die Clusteranalyse nachgewiesen wurden. Basierend auf diesen Fakten und den anatomischen Daten wurde vermutet, dass die Efferenzen des PaN den Aktionspotentialen von zwei antagonistischen motorischen Einheiten entsprechen. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung entsprachen dieser These jedoch nur teilweise (siehe Kapitel 3.3.1.3). Durch eine 1:1 Korrelation zwischen den Aktionspotentialen der großen Einheit (gE) und den postsynaptischen Potentialen des dorsalen Protraktormuskels A (*Pro_{do}A*) konnte der Verlauf der motorischen Bahn des *Pro_{do}A* belegt werden. Die Ableitungen zeigen für die mittlere Einheit (mE) des PaN, dass diese ausgehend vom zentralen Nervensystem durch den PaN in die Peripherie fortgeleitet wird, aber weder an der Aorta (A), dem dorsalen Protraktormuskel B (*Pro_{do}B*) noch am Bolwigorgan (BO) nachweisbar ist. Allerdings demonstrierten die Doppelableitungen, dass die mE über die neuronale Anastomose (A/PaN-PN) zwischen PaN und Prothorakalnerv (PN) in den PN weitergeleitet wird. Die Resultate der Bestimmung der Fortleitungsrichtung deuteten daraufhin, dass die Bahnen der mE auf einen Muskel, der durch den PN innerviert wird, projizieren. Dies konnte in entsprechenden Versuchen nicht verifiziert werden. Diese Ergebnisse widersprechen der Annahme, dass die mE des PaN einem antagonistischen Motorneuron entspricht. Eine alternative Theorie, die sich aus den Daten der immunohistologischen Untersuchung ergab, wäre, dass es sich bei der mE

¹ Im nicht deafferentierten Zustand zeigen Ableitungen des PaN von *Calliphora vicina* drei neuronale Einheiten (zwei efferente und eine afferente Einheit)

um modulatorische Motorneurone handelt. Diese Theorie ist im Einklang mit der nachgewiesenen myostimulatorischen Wirkung von Pyrokinin 2 (PK2), einem Spaltprodukt des *hugin* Prä-Propeptids [Meng et al., 2002]. Aufgrund der genetischen Unzugänglichkeit von *Calliphora vicina* wurden erste Vorversuche an einer *Drosophila melanogaster*-Mutante, bei der die *hugin*-Neurone ausgeschaltet wurden, durchgeführt. Jedoch konnten bisher keine eindeutigen Ergebnisse gewonnen werden. Wenn die mE der Aktivität eines *hugin*-Neurons entspricht, müsste durch eine Eliminierung der *hugin*-Neurone die mE in der Ableitung des PaN wegfallen. Im Verlauf der elektrophysiologischen Untersuchung der mE des PaN konnte gezeigt werden, dass die motorischen Bahnen des Pro_{do}B durch den PN, über die A/PaN-PN, in den PaN projizieren. Zusätzlich wurde eine zeitliche Korrelation zwischen einer Efferenz des PN und den postsynaptischen Potentialen des Pro_{do}B aufgezeigt [Siebenaller, 2008]. Damit konnte gezeigt werden, dass die A/PaN-PN eine physiologische Funktion besitzt und kein ontogenetisches Artefakt ist. Demzufolge verlaufen durch einen definierten Bereich des PaN bei *Calliphora* motorische Bahnen, deren Ursprung der PaN (Einheit des Pro_{do}A) und PN (Einheit des Pro_{do}B) ist, deshalb wurde dieser Abschnitt auf Basis der physiologischen Funktion dem PaN und dem PN zugeordnet.

Analog zu den elektrophysiologischen Versuchen an *Calliphora* wurden durch eine 1:1 Korrelation, die motorischen Bahnen des Pro_{do}A im PaN von beiden *Drosophila*-Larven nachgewiesen. Die intrazellulären Ableitungen des Pro_{do}A von allen drei Dipteren-Arten enthielten einheitliche postsynaptische Potentiale, weshalb der Pro_{do}A anscheinend von einem einzigen Motorneuron innerviert wird. In der Literatur wurde entsprechende mononeuronale Innervationen bei Insekten beschrieben [Belton, 1969; Deitmer, 1976].

Afferente Einheit

Im akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) konnte durch extrazelluläre Doppelableitungen und in der Clusteranalyse eine kleine, afferente Einheit (kE) identifiziert werden. Durch elektrophysiologische Experimente konnte der Ursprung der Afferenz im PaN nicht bestimmt werden. Dies lässt vermuten, dass die sensorischen Bahnen von kE durch die neuronale Anastomose (A/PaN-PN) in den Prothorakalnerv (PN) projizieren, dessen Nervenendigungen teilweise in der Cuticula des Prothorax enden [Siebenaller, 2008]. Möglicherweise innervieren diese Nervenendigungen externe sensorische Strukturen oder Chordatonalorgane in der Cuticula [Ghysen et al., 1986; Hartenstein, 1988; Schrader & Merrit, 2007; Singh & Singh, 1984].

Aspekte des neuromuskulären Systems von Dipteren-Larven

Auffällig war, dass bei keiner der drei untersuchten Dipteren-Arten inhibitorische postsynaptische Potentiale in den intrazellulären Muskelableitungen gemessen wurden. Diese

Tatsache deutet darauf hin, dass keine inhibitorischen Motorneurone an der Steuerung der untersuchten Muskelgruppen beteiligt sind. Bei Larven von *Manduca sexta* besitzen die Muskelgruppen, die für die Bewegung der Mandibeln verantwortlich sind, auch keine inhibitorischen Motorneurone [Griss, 1990]. Man vermutet, dass das Fehlen einer inhibitorischen Muskelkontrolle aus dem simplen Bewegungsmuster der Mandibeln resultieren könnte, jedoch kann ein zentralnervöser inhibitorischer Einfluss auf das motorische Muster nicht ausgeschlossen werden.

Das hohe Maß der Synchronität zwischen den bilateralen efferenten Einheiten und die stabile Koordination der antagonistischen motorischen Einheiten des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) am isolierten zentralen Nervensystem der Larven von *Calliphora vicina* deuten daraufhin, dass die zugrunde liegenden neuronalen Oszillatoren keine sensorischen Rückkopplungsmechanismen für die Koordination der entsprechenden motorischen Muster benötigen. Wahrscheinlich erfolgt die stabile Koordination der Bewegungen durch zentralnervöse synaptischen Verbindungen zwischen den neuronalen Oszillatoren und nur untergeordnet durch indirekte Kopplung über Propriozeptoren. Rast & Bräunig [2001a] zeigten, dass ebenfalls keine sensorischen Rückkopplungsmechanismen für die komplexe Koordination der Bewegungen der Mundwerkzeuge bei *Locusta migratoria* erforderlich sind.

Hardie [1976a] hat bei seiner Untersuchung der larvalen Körperwandmuskulatur von *Calliphora erythrocephala* ein Ruhepotential zwischen -35mV und -50mV gemessen, was mit den gemessenen Werten, -33mV bis -42mV, für die abgeleiteten Muskelgruppen der Larven von *Calliphora vicina* übereinstimmt. Wohingegen die Ruhepotentiale der untersuchten Muskelgruppen bei *Drosophila*-Larven, die zwischen -33mV und -52mV schwankten, im Vergleich zu den Literaturwerten mit -50mV bis -80mV niedriger sind. Die Unterschiede zu den Werten aus der Literatur könnten im Fall von Gorczyca et al. [1991] aus der unterschiedlichen Ionen-Konzentration der verwendeten Ringerlösung resultieren oder wie bei Cattaert & Birman [2001] darin begründet sein, dass nicht identische Muskelgruppen, sondern abdominale Körperwandmuskeln abgeleitet wurden. Des Weiteren könnte die divergierenden Ruhepotentiale eine Folge unterschiedlicher Nährmedien sein, weil nachgewiesen wurde, dass sich die Ruhepotentiale der Muskeln von herbi- und carnivoren Insekten unterscheiden [Griss, 1990].

Zusammenfassung

Durch die elektrophysiologischen Versuche konnten die motorischen Bahnen von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*, die durch den Antennal- (AN), den Maxillar- (MN) und den akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) verlaufen, belegt werden. Die efferenten Einheiten in den untersuchten Nerven konnten durch zeitliche Korrelation als motorische Einheiten der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM), des

Mundhakenelevators (MHE) und -depressors (MHD), des Labialretraktors² (LR) und des dorsaler Protraktormuskels A ($Pro_d\alpha A$) identifiziert werden. Des Weiteren konnten durch Experimente qualitativ die mechanosensorischen Bahnen des Dorsal- (DO), des Labial- (LO), des Terminal- (TO) und des Ventralorgans (VO) in den entsprechenden Nerven von *Calliphora vicina* nachgewiesen werden. Im Kropf von *Calliphora vicina* wurden Mechanorezeptoren nachgewiesen, deren neuronale Information über den Füllungsgrad des Kropfes vermutlich an das Proventrikularganglion weitergeleitet werden. Demzufolge können für *Calliphora vicina* der AN, der MN und der PaN als „Schlüsselnerve“ definiert werden, weil über den AN die Nahrungsaufnahme und die Sensorik des DO registriert werden kann. Anhand des MN kann sowohl die Mundhakenbewegung und die Nahrungsaufnahme als auch die Sensorik des LO, TO und VO detektiert werden. Der PaN bietet die Möglichkeit die Protraktion des cephalopharyngealen Skeletts (CPS) für die Fortbewegung oder das Fressverhalten zu erfassen. Für die Larven von *Drosophila* kann der Begriff „Schlüsselnerve“ derzeit nur für das motorische System des AN, des MN und des PaN angewendet, weil die Qualität der extrazellulären Ableitungen von *Drosophila* nicht ausreichend ist für die Detektion der sensorischen Impulse. Aber in der Zukunft könnte durch eine weitere Optimierung der Ableittechnik das gesamte neurobiologische Potential dieser „Schlüsselnerve“ auf die Larven von *Drosophila* übertragen werden.

2 Die motorische Einheit des Labialretraktors konnte nur bei *Calliphora vicina* bestimmt werden.

4.4 Fiktives Fressverhalten

In der Neurobiologie werden rhythmische Entladungsmuster eines zentralen Mustergenerators an einem reduzierten Präparat, die unter natürlichen Bedingungen die Bewegungen der Muskulatur steuern würden, als fiktive motorische Muster bezeichnet [Marder, 2002]. Derartige Erregungsmuster, die an einem isolierten zentralen Nervensystem oder Ganglion abgeleitet werden, können als neuronales Korrelat eines Verhaltens des intakten Organismus interpretiert werden [McClellan, 1982b]. Motorische Impulsmuster eines deafferentierten Nervensystems wurden genutzt, um die intrinsische Fähigkeit eines neuronalen Schaltkreises zur Erzeugung von rhythmischen Bewegungen ohne sensorische Rückkopplung zu demonstrieren. Einige der ersten erfolgreichen Experimente an Insekten wurden von Wilson [1961]; Wilson & Wyman [1965]; Wilson [1966] an deafferentierten Heuschrecken durchgeführt, die ein fiktives rhythmisches Flugmuster zeigten.

Etablierung des fiktiven Fressverhaltens bei Dipteren-Larven

In den elektrophysiologischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein spontanes motorisches Muster simultan am Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) des isolierten zentralen Nervensystems von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* abgeleitet werden konnte (siehe Kapitel 3.4.1.1, 3.4.2.1 und 3.4.3.1). Wie schon beschrieben, sind im Vorfeld die motorischen Einheiten des AN, des MN und des PaN, die einzelne Bewegungskomponenten des larvalen Fressverhaltens steuern, identifiziert worden. Dementsprechend demonstrieren die Ergebnisse, dass die am isolierten zentralen Nervensystem aufgezeichnete spontane rhythmische Aktivität ein fiktives motorisches Muster ist [Marder, 2002].

Aufgrund der unterschiedlichen Amplituden der Aktionspotentiale konnten aus der rhythmischen Aktivität der Nerven die individuellen Impulsmuster der motorischen Einheiten extrahiert werden und zu einem fiktiven motorischen Muster für die einzelnen Dipteren-Larven zusammengesetzt werden. Die resultierende Bewegungsabfolge korreliert mit dem zeitlichen Ablauf der Bewegungen des natürlichen larvalen Fressverhaltens. Das abgeleitete motorische Muster kann als neuronales Korrelat des larvalen Fressverhaltens von Dipteren-Larven gedeutet werden [McClellan, 1982b].

Beim Vergleich der natürlichen und fiktiven Fressrate von *Calliphora vicina* zeigte sich eine Abnahme der Zyklusfrequenz von 2,1Hz (natürliche Fressrate) auf 0,8Hz (fiktive Fressrate). Vermutlich resultiert die Reduktion des Fresszyklus bei den Larven aus dem Verlust der sensorischen Eingänge. Denn ein zentraler Mustergenerator erzeugt das motorische Grundmuster für ein rhythmisches Verhalten, der bei Integration der Sensorik auf ein den Umweltbedingungen angepasstes Frequenzlevel angehoben wird. Die Abnahme der Frequenz eines fiktiven motorischen Musters in Relation zum nativen Verhalten

wurde beim fiktiven Kauen von *Manduca sexta*-Larven [Rohrbacher, 1994] und beim fiktiven Flug von Heuschrecken [Robertson, 1986] gezeigt.

Nach Delcomyn [1980] besitzen Studien am komplett isolierten zentralen Nervensystem die stärkste Beweiskraft für die Existenz zentraler Mustergeneratoren, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

1. Das Experiment sollte demonstrieren, dass ein motorisches Muster bei Fehlen aller potentiellen sensorischen Eingänge vorhanden ist - dies ist der Fall;
2. Das aufgezeichnete motorische Muster sollte eindeutig einem Verhalten zugeordnet werden können - auch dies ist der Fall;
3. Unwillentliche „künstliche“ Afferenzen, die das motorische Muster beeinflussen können, wie z.B. „Quetsch-Aktivierung“ von Nerven oder elektrische Stimulation von sensorischen Neuronen, sollten ausgeschlossen werden. Eine „Quetsch-Aktivierung“ der Nerven kann ausgeschlossen werden, weil das motorische Muster teilweise über 60min stabil war (eigene Beobachtung) und in den Versuchen wurden keine elektrischen Reizgeber verwendet (siehe Kapitel 2.5.5).

Folglich wurde das fiktive larvale Fressverhalten der untersuchten Dipteren vom isolierten zentralen Nervensystem ohne sensorische Afferenzen abgeleitet, was eindeutig belegt, dass die Neurone mit der intrinsischen Fähigkeit zur Erzeugung des motorischen Musters im zentralen Nervensystem (zentraler Mustergenerator) lokalisiert sein müssen. Im Gegensatz zu dieser Feststellung sind bei Crustaceen die Neurone, die die motorischen Muster der Bewegungen der gastrischen Mühle generieren, im stomatogastrischen Ganglion lokalisiert [Selverston, 1974]. Bei den cephalen Larven von *Manduca sexta* sind die neuronalen Schaltkreise, die die rhythmische Aktivität des Fressverhaltens erzeugen, im Frontal- und Suboesophagialganglion positioniert [Miles & Booker, 1994, 1998; Rohrbacher, 1994]. Die Position der zentralen Mustergeneratoren des larvalen Fressverhaltens von *Manduca sexta* ist vergleichbar der bei den untersuchten Dipteren-Larven. Denn die retrograden Füllungen des AN, des MN und des PaN von *Calliphora vicina* suggerieren, dass die Neurone, die das motorische Muster des Fressverhaltens generieren, im Suboesophagialganglion lokalisiert sein müssen. Bei den Larven der untersuchten Dipteren-Arten ist im Gegensatz zu den Larven von *Manduca sexta* das Suboesophagialganglion mit dem zentralen Nervensystem fusioniert. Bei *Drosophila*-Larven zeigt die Arbeit von Gorczyca et al. [1991] für die Nahrungsaufnahme und die von Cattaert & Birman [2001] für die Lokomotion, dass die zugehörigen zentralen Mustergeneratoren im zentralen Nervensystem bzw. Suboesophagialganglion lokalisiert sind.

Variabilität des fiktiven Fressverhaltens bei *Calliphora vicina*

Das motorische Muster des fiktiven Fressverhaltens von *Calliphora*-Larven unterlag einer großen Variabilität (siehe Kapitel 3.4.1.2), was eine hohe Flexibilität des neuronalen Netzwerks andeutet. Diese resultiert aus dem Modifikationsspektrum der zellulären und synaptischen Eigenschaften der netzwerk-bildenden Neurone, die durch sensorische oder modulatorische Eingänge induziert werden können. Anzumerken bleibt, dass durch einen optimalen Versuchsaufbau die extrinsischen Faktoren, die ein motorisches Erregungsmuster beeinflussen, relativ konstant gehalten werden können, aber die intrinsischen Faktoren, die den physiologischen Zustand des Versuchstieres beeinflussen, nicht. Dieses Phänomen, das mitverantwortlich für die Variabilität des fiktiven Fressverhaltens sein kann, wird allgemein als „state-dependency“ bezeichnet. Denn einige Neurone, die Bestandteil eines zentralen Mustergenerators sind, können unter verschiedenen neuromodulatorischen Bedingungen agieren wie ein endogener Oszillator. Sie können Plateau-Potentiale und/oder postinhibitorische Rebounds generieren oder auch keine dieser Eigenschaften zeigen, was enorme Auswirkungen auf das generierte motorische Erregungsmuster haben kann [Marder & Calabrese, 1996].

Bei den adulten Fliegen von *Phormia regina* und *Protophormia terraenovae* verstärken Octopamine-Agonisten das Fressverhalten, wohingegen Octopamine-Antagonisten das Fressverhalten reduzieren [Long & Murdock, 1983; Angioy et al., 1989]. Bei Heuschrecken wurden während des Fressverhaltens die motorischen Muster der Mundwerkzeuge in Abhängigkeit von der Konsistenz der Nahrung stark modifiziert, was den großen Einfluss von sensorischen Rückkopplungsmechanismen auf die Bewegungen der Mundwerkzeuge demonstriert [Blaney & Simmonds, 1987; Seath, 1977a,b]. Für die adäquate Ausführung von Bewegungen in einem Verhalten stellt die Flexibilität des zugrunde liegenden motorischen Musters und der Muskelfunktion eine Grundvoraussetzung dar. Die Anpassungsfähigkeit des Verhaltens eines Organismus wird durch sensorische Eingänge und Neuromodulation, die die neuronale und muskuläre Ebenen des Verhaltens modulieren können, gewährleistet [Johnston et al., 1999].

Die Prinzipien und Mechanismen der Interaktion zwischen neuronalen Netzwerken wurden am stomatogastrischen Nervensystem von Crustaceen in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht. Eine grundlegende Erkenntnis war, dass hier die zentralen Mustergeneratoren keine diskreten morphologisch begrenzten Einheiten darstellen [Dickinson et al., 1990; Meyrand et al., 1991]. Vielmehr können durch sensorische oder modulatorische Eingänge Neurone in zwei [Dickinson & Marder, 1989; Hooper & Moulins, 1989] oder mehreren Netzwerken [Marder & Weimann, 1991] partizipieren, zu zwei funktionsnahen Netzwerken fusionieren [Dickinson et al., 1990] oder sich mehrere Netzwerke zu einem neuen Netzwerk rekonfigurieren [Meyrand et al., 1991]. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Mustergeneratoren des stomatogastrischen Nervensystems durch das generierte

Verhalten definiert werden und nicht durch die neuronalen Komponenten aus denen sie bestehen [Dickinson, 1995]. Demzufolge sollte das stomatogastrische System als „multiple task processor“ aufgefasst werden und nicht als Zusammenschluss von mehreren separaten zentralen Mustergeneratoren [Marder & Weimann, 1991]. In elektrophysiologischen Studien an *Pleurobranchaea californica* konnte ein Netzwerk identifiziert werden, dass durch Rekonfiguration die motorischen Muster für unterschiedliche Verhaltensweisen generiert [McClellan, 1982a]. Ob ähnliche neuronale Mechanismen und Prinzipien, wie sie für den stomatogastrischen „multiple task processor“ der Crustaceen nachgewiesen werden konnten, für die Variabilität des fiktiven Fressverhaltens der Larven von *Calliphora vicina*, respektive Dipteren-Larven verantwortlich sind, stellt eine Herausforderung für zukünftige intrazelluläre Ableitung im Hinblick auf eine Netzwerkanalyse dar.

Phasenanalyse des fiktiven Fressverhaltens

Verhalten ist die zeitliche und räumliche Manifestation definierter neuronaler Aktivität [Kitamoto, 2001]. Der koordinative oder zeitliche Aspekt des larvalen Fressverhaltens der Dipteren sollte durch eine Phasenanalyse eingehend beleuchtet werden, wofür definierte Sequenzen der simultanen Ableitungen des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN), die dem beschriebenen Fressverhalten der Larven entsprachen, verwendet wurden.

Die Phasenanalyse der motorischen Muster der verschiedenen Dipteren-Arten enthüllte einen Unterschied in der Phasenbeziehung der CDM-Einheit und MHE-/MHD-Einheiten zwischen *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster* (siehe Abb. 3.52, 3.55 und 3.57). Bei *Calliphora* erfolgte die Aktivität der CDM-Einheit fast synchron mit dem Burst der MHD-Einheit, wohingegen bei *Drosophila* die Aktivität der CDM-Einheit früher einsetzt. Sie beginnt während der Aktivität der MHE-Einheit und endet innerhalb des Bursts der MHD-Einheit.

McClellan [1982b] zeigte in seiner Studie an *Pleurobranchaea*, dass die Assoziation von motorischen Mustern mit einem Verhalten eines Organismus umsichtig durchgeführt werden muss, vor allem wenn unterschiedliche Verhaltensweisen durch ähnliche Muskelaktivität ausgeführt werden. Ein Erklärungsansatz wäre, dass es sich bei den aufgezeichneten motorischen Mustern von *Drosophila* um Kriechverhalten und nicht um Fressverhalten handelt. Diesem Erklärungsansatz widerspricht die Tatsache, dass die CDM-Einheit, als Indikator für larvales Fressverhalten, in den analysierten Sequenzen rhythmisch aktiv war. Folglich können die motorischen Muster nicht einem Kriechverhalten der Larve zugeordnet werden, obwohl die Mundhaken untergeordnet während der Lokomotion eingesetzt werden können [Roberts, 1971].

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich bei den analysierten motorischen Mustern theoretisch um eine funktionsverwandte Verhaltensweise handelt, wie z.B. Erbrechen

oder ablehnendes Fressverhalten [McClellan, 1982a]. Jedoch sollten die Unterschiede in den motorischen Mustern bei diesen Verhaltensarten gravierender sein.

Die plausibelste Erklärung für die unterschiedliche Phasenbeziehung der CDM- und der MHE-/MHD-Einheit im fiktiven Fressverhalten ergibt sich aus dem unterschiedlichen Nahrungssubstrat und der Ernährungsweise. Die Larven von *Calliphora vicina* leben auf Kadavern und ernähren sich von vorverdauten Fleisch [Hobson, 1931, 1932], wohingegen die Larven der beiden *Drosophila*-Arten als Habitat verfaulendes Obst bevorzugen und sich von Mikroorganismen ernähren [Basset et al., 2000; Steinhaus, 1940]. Daraus resultiert möglicherweise ein unterschiedlicher Einsatz der Mundhaken während der Nahrungsaufnahme. Bei *Calliphora* fungieren die Mundhakenbewegungen als eine Art von „Baggerschaufel“, die Nahrung zerschneidet und zum Labium befördert. Im Gegensatz dazu scheinen die Larven von *Drosophila* die Mundhaken zum Abschaben der Mikroorganismen einzusetzen. Für den eindeutigen Nachweis dieser These müsste simultan von den Nerven abgeleitet werden, während das Verhalten der möglichst intakten Larve gefilmt wird, um die Beziehung zwischen neuronalen motorischen Muster und resultierenden Verhalten exakt analysieren zu können. Denn die Vorhersagbarkeit von Bewegungen aus einem motorischen Muster ist problematisch, weil aus der myostimulatorischen Wirkung von Neuromodulatoren [Cooper & Neckameyer, 1999; Orchard et al., 1989] und frequenz-abhängigen Modifikationen an den motorischen Synapsen [Hardie, 1976a] ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen den motorischen Mustern und den Bewegungen der Larve resultieren kann. Entsprechende Experimente sind beispielsweise am stomatogastrischen Nervensystem von *Cancer pagurus* durchgeführt worden, wobei die Versuchstiere endoskopisch und elektrophysiologisch mit großem Erfolg untersucht wurden [Heinzel et al., 1993]. Eine Umsetzung dieser Methode für die Untersuchung von Verhalten bei Dipteren-Larven stellt eine Herausforderung für zukünftige Studien dar.

Rhythmusanalyse des fiktiven Fressverhaltens von *Calliphora vicina*

Das im Kapitel 3.4.1.3 beschriebene motorische Muster des Antennal- (AN), des Maxillar- (MN) und des akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) von *Calliphora vicina* scheint sich, laut der deskriptiven statistischen Analyse, aus zwei neuronalen Rhythmen zusammzusetzen. Vermutlich werden diese Rhythmen durch zwei zentrale Mustergeneratoren im Suboesophagialganglion der Larve generiert. Derartige hybride Rhythmen sind aus den Studien am stomatogastrischen Nervensystem von Crustaceen bekannt [Heinzel et al., 1993]. Hybride Erregungsmuster beruhen häufig auf wechselseitiger Interaktion zwischen verschiedenen Netzwerken [Böhm et al., 1998]. Wenn das abgeleitete motorische Muster einem hybriden Rhythmus entspricht, stellt sich die Frage, welche verhaltensrelevante Funktion ein solches Impulsmuster im Fressverhalten besitzt. Hypothetisch könnte das hybride motorische Muster den gleichmäßigen Transfer der aufgenommenen Nah-

rung von einem Kompartiment des Verdauungstrakts der Larve in den nächsten koordinieren, was eine wechselseitige Interaktion zwischen den verantwortlichen neuronalen Netzwerken voraussetzen würde [Harris-Warrick et al., 1992]. Interaktion zwischen funktionsverwandten Mustergeneratoren sind vom stomatogastrischen Nervensystem der Crustaceen bekannt [Mulloney, 1977; Robertson & Moulins, 1984]. Interaktionen zwischen verschiedenen neuronalen Netzwerken können auch durch sensorische Eingänge oder Neuromodulatoren induziert werden. Weil aber der fiktive Fressrhythmus am zentralen Nervensystem abgeleitet wurde, können sensorische Eingänge als „Trigger“ für die Interaktion der Netzwerke ausgeschlossen werden. Vermutlich beruht die Interaktion auf einem zentralnervösen neuromodulatorischen Effekt. Ein potentieller Neuromodulator, der das Fressverhalten bei Dipteren-Larven zentral beeinflussen könnte, wäre *hugin* bzw. dessen Expressionsprodukte. Eine Modulation des Fressverhaltens durch *hugin* wurde für adulte *Drosophila melanogaster* in Verhaltensversuchen nachgewiesen [Melcher & Pankratz, 2005]. Obwohl *hugin*-Neurone das gustatorische System der Larve mit höheren Hirnzentren verbinden, könnte *hugin* status-abhängig das Fressverhalten einer Larve modulieren. Oder *hugin* induziert durch seine neuronale Verbindung zum endokrinen System der Larve die Freisetzung der entsprechenden Neuromodulatoren. In Untersuchungen am isolierten Suboesophagialganglion von *Locusta migratoria* konnte gezeigt werden, dass bei Applikation des muskarinen Agonisten Pilocarpin eine stabile und funktional adäquate Kopplung der motorischen Muster der Mundwerkzeuge und der Neurone, die die Speicheldrüse innervieren, erfolgte [Rast & Bräunig, 2001a].

Eine weitere potentielle verhaltensrelevante Funktion dieses hybriden Erregungsmusters könnte sein, dass dieser Rhythmus einen bestimmten Typ von Fressmodus (siehe Abschnitt 4.1) der Larve darstellt. Ähnlich den unterschiedlichen Fressmodi der gastrischen Mühle bei Crustaceen, die durch unterschiedliche Neuromodulatoren hervorgerufen werden [Heinzel, 1988; Turrigiano & Selverston, 1990]. Jedoch sind für eine eindeutige Bestimmung der Verhaltensrelevanz des hybriden motorischen Musters Versuche am semi-intakten Präparat erforderlich, in denen simultan das motorische Muster und das erzeugte Verhalten aufgezeichnet werden.

Interaktion zwischen Einheiten des fiktiven Fressverhaltens von *Calliphora vicina*

Die extrazellulären Ableitungen des fiktiven Fressverhaltens von *Calliphora vicina* suggerierten einen Zusammenhang zwischen der neuronalen Aktivität der mittleren Einheit (mE) im akzessorischen Prothorakalnerv (PaN) und der motorischen Einheit der cibarialen Dilatormuskulatur (CDM-Einheit) im Antennalnerv (AN). Die statistische Auswertung dieses Phänomens deutet daraufhin, dass eine Interaktion zwischen den Einheiten auf neuronaler Ebene vorhanden ist. Möglicherweise besteht eine synaptische Verbindung zwischen der mE- und der CDM-Einheit. Jedoch ermöglichen die Daten keine Aussage

über die Art der Synapse, ob exzitatorisch oder inhibitorisch. Denn beide Arten von synaptischer Verbindung könnten eine identische wechselseitige Beeinflussung der neuronalen Aktivität zwischen den efferenten Einheiten realisieren. Dieses neuronale Phänomen bietet eine interessante Ansatzmöglichkeit für eine intrazelluläre Untersuchung des fiktiven Fressrhythmus von *Calliphora*-Larven, obwohl die physiologische Funktion der mE des PaN bisher noch nicht bestimmt werden konnte. Denn die Loci der Neuronen im zentralen Nervensystem, die die mE und die CDM-Einheit repräsentieren, sind relativ gut bestimmt. Jedoch stellen intrazelluläre Ableitungen von Neuronen am zentralen Nervensystem von Dipteren-Larven hohe methodische Ansprüche, die in zukünftigen Studien gemeistert werden sollten.

Zusammenfassung

Durch die elektrophysiologischen Untersuchungen des Antennal- (AN), Maxillar- (MN) und akzessorischen Prothorakalnervs (PaN) am isolierten zentralen Nervensystem von Dipteren-Larven konnte ein fiktives motorisches Muster etabliert werden, das in den untersuchten Arten nahezu identisch ist. Das fiktive motorische Muster konnte durch zeitliche Korrelationen mit dem natürlichen larvalen Fressverhalten assoziiert werden, weshalb es als fiktives Fressverhalten definiert wurde. Die Daten bestärken die Annahme, dass im zentralen Nervensystem ein neuronales Netzwerk vorhanden sein muss, das durch die intrinsischen Eigenschaften der beteiligten Neurone für die Erzeugung des fiktiven motorischen Musters verantwortlich ist. Die Hinweise für die Existenz eines hybriden Erregungsmusters und synaptischer Interaktion zwischen den neuronalen Einheiten des zentralen Mustergenerators in *Calliphora vicina* bieten ideale Ansatzmöglichkeiten für eine weiterführende Untersuchung auf intrazellulärer Ebene innerhalb der untersuchten Dipteren-Arten.

Die Etablierung des fiktiven Fressverhaltens bei *Drosophila melanogaster* bietet aufgrund der genetischen Manipulationsmöglichkeiten eine Vielzahl von experimentellen Anwendungen, z.B. könnte durch räumlich und zeitlich definierte Über- oder Unterexpression von Genen die spezifische Wirkung der Genprodukte auf das larvale Fressverhalten in Form eines „functional read-out“ untersucht werden. In der Zukunft könnten durch einen derartigen methodischen Ansatz neue Erkenntnisse auf Ebene der zentralnervösen Realisierung von rhythmischen Verhalten gewonnen werden, weil die Etablierung des fiktiven Fressverhaltens von *Drosophila melanogaster* das Potential bietet, die neurobiologische und molekularbiologische Ebene von Verhalten synergetisch zu untersuchen.

Anhang

Kobaltchlorid-Färbung inklusive Silber-Intensivierung

Protokoll:

- die Präparate werden retro- und anterograd mit 2-3% Kobalt-Lysin³ oder 1-2% Kobaltchlorid-Lösung gefüllt (Dauer: 24-48h);
- die Fällungsreaktion erfolgt mit frisch angesetzter 0,01% Ammoniumsulfid-Lösung (50 μ l Ammoniumsulfid auf 5ml physiologische Ringerlösung); das Ausfällen des Kobalts sollte unter einem Binokular beobachtet werden (Dauer: \approx 1-2min)
- Präparate mit 4% Paraformaldehyd-Lösung fixieren (Dauer: 1-1,5h);
- Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydrieren (pro Schritt \approx 10min) und mit Methylsalicylat aufhellen; Qualität der Kobalt-Füllung unter dem Mikroskop kontrollieren;
- Nervenpräparate in einer absteigenden Alkoholreihe rehydrieren (pro Schritt ca. 10min);
- Vorbehandlung mit 2% Natrium-Wolframat-Lösung (pH = 10,5) inklusive 1% Triton X-100 (Dauer: 20min);
- 15min mit Lösung A und B (Zusammensetzung siehe unten) prä-inkubieren;
- Präparate mit Lösung A, B und C (Zusammensetzung siehe unten) intensivieren (Dauer: 1-3min), Intensivierungsreaktion unter einem Binokular beobachten;
- Intensivierungsreaktion mit Aqua bidest. stoppen (Dauer: 2-mal 1min und 1-mal 10min);

³ Herstellung des Kobalt-Lysin-Komplexes (Stammlösung): 1,76g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ mit 3,57g L-Lysin in 18ml Aqua bidest. ansetzen und 8-10 Stunden rühren. Der pH-Wert wird mit HCl auf 7,5 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 20ml aufgefüllt. Für die Kobalt-Applikation wurde bei den untersuchten Dipteren-Larven die Kobalt-Lysin-Stammlösung um den Faktor 3 verdünnt.

- Nervenpräparate dehydrieren und mit Methylsalicylat aufklaren.

Chemische Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

Lösung A:

- 355ml Aqua bidest.
- 15ml 1%-iges Triton X-100
- 1,5g Natriumacetat ($\cdot\text{H}_2\text{O}$)
- 30ml Eisessigsäure
- 0,5g Silbernitrat

Lösung B:

- 5% Natrium-Wolframat-Lösung

Lösung C:

- 0,25% Ascorbinsäure-Lösung (jedes Mal frisch ansetzen)

Dehydratation

Die Präparate der Nervenfärbungen (Kobaltchlorid-Färbung inklusive Silber-Intensivierung) wurden für die morphologische Betrachtung der neuronalen Strukturen unter dem Mikroskop in folgenden Arbeitsschritten entwässert:

- Überführung in 30% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 50% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 60% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 70% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 80% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 90% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 96% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 100% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 100% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min).

Aufhellung der Präparate

Nachdem die Präparate vollständig entwässert worden sind, wurden die Präparate auf einen Objektträger übertragen und entsprechend der zu studierenden neuronalen Struktur ausgerichtet. Folgende Schritte wurden für die Aufhellung des Präparats durchgeführt:

- Zufuhr des Aufhellungsmediums: Methylsalicylat (Dauer: 10min),
- erneute Zufuhr des Aufhellungsmediums: Methylsalicylat (Dauer: \approx 10min; bis die gefärbten Nervenpräparate transparent und nicht „milchig“ sind).

Nach der Aufhellung konnten die Präparate unter einem Mikroskop untersucht werden.

Rehydratation

Nach der Kobaltchlorid-Fällung wurden die gefärbten Präparate unter dem Mikroskop begutachtet, um die Qualität der Kobaltchlorid-Fällung zu beurteilen und zu entscheiden, ob die Präparate intensiviert werden sollen. Bevor die Färbungen intensiviert werden konnten, mussten die Präparate in nachstehenden Verfahren rehydriert werden:

- Überführung in 100% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 96% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 90% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 80% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 70% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 60% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min);
- Überführung in 50% Ethanol-Lösung (Dauer: 10min).

- Überführung in Aqua bidest.; auftreibende Präparate mit einer Pinzette vorsichtig unter die Wasseroberfläche drücken (Dauer: 10min)
- Überführung in Aqua bidest. (Dauer: \approx 10min; bis die Nervenpräparate unter der Wasseroberfläche schwimmen)

Die Präparate können nun der Silber-Intensivierung zugeführt werden.

Protein-Detektion (Antikörperfärbung)

Für den immunhistologischen Nachweis von *hugin* wurden bei Larven von *Calliphora vicina* das zentrale Nervensystem mit den pharyngealen Nerven freipräpariert (siehe Kapitel 2.2.1). Die Präparate wurden, wie folgt, immunhistochemisch behandelt:

1.Tag:

- fixieren 0,5 PBT und 4% Formaldehyd (FA) (2ml PBT + 200 μ l FA (37%));
- 1-2 Stunden fixieren (auf einem Drehrad);
- Waschen mit 0,5 PBT (2-mal 5min, 2-mal 15min, 2-mal 30min, 1-mal 60min);
- in Methanol überführen (Methanolreihe: 1. 30% Methanol-Lösung, 2. 70% Methanol-Lösung, 3. 100% Methanol-Lösung);
- über Nacht bei -20°C aufbewahren.

2.Tag:

- Präparate von Methanol in 0,5 PBT zurück überführen (je 5min, Methanolreihe: 1. 100% Methanol-Lösung, 2. 70% Methanol-Lösung, 3. 30% Methanol-Lösung);
- ausgiebig waschen mit 0,5 PBT (2-mal 5min, 2-mal 15min, 2-mal 30min);
- Blockieren in 0,5 PBT + 5% Ziegen Serum (2ml 0,5 PBT + 100 μ l Ziegen Serum) für 30-60 Minuten;
- Inkubation mit Primärantikörpern (α -hug-rb, 1:500 und α -22c10-m, 1:500) in 0,5 PBT und Ziegen Serum (1:1000) über zwei bis fünf Nacht bei 4°C.

2.Tag:

- Waschen mit 0,1 PBT (2-mal 5min, 2-mal 15min, 2-mal 30min);
- Blockieren mit 5% Ziegen Serum (2ml 0,1 PBT + 1000 μ l Ziegen Serum) für 30-60 Minuten;
- Inkubation mit Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörpern (α -rb-Alexa488, 1:200 und α -m-Cy3, 1:200) in 0,1 PBT und 5% Ziegen Serum bei Raumtemperatur für 1 Stunde;
(**wichtig:** Ab diesem Arbeitsschritt muss im Dunkeln gearbeitet werden, weil das Fluorochrom zerfällt!)
- Waschen in 0,1 PBT (2-mal 5min, 2-mal 15min, 2-mal 30min);

- Eindeckeln in Mowiol⁴.

Verwendete Lösungen:

- 0,1 PBT: 0,1% (v/v) Triton X-100 in Phosphat-gepufferter Salzlösung
- 0,5 PBT: 0,5% (v/v) Triton X-100 in Phosphat-gepufferter Salzlösung

⁴ Mowiol ist ein Polyvinylalkohol (künstlicher, thermoplastischer Kunststoff).

Muskulatur von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*

	<i>Calliphora vicina</i>	<i>Drosophila virilis</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Muskulatur:	Länge × Breite [μm]		
Cibariale Dilator-muskulatur (CDM)	$\approx 219 \times \approx 46$	$\approx 131 \times \approx 15$	$\approx 118 \times \approx 12$
Mundhaken-elevator (MHE)	$\approx 695 \times \approx 49$	$\approx 282 \times \approx 23$	$\approx 217 \times \approx 14$
Mundhaken-depressor (MHD)	$\approx 813 \times \approx 107$	$\approx 283 \times \approx 26$	$\approx 259 \times \approx 21$
Labial-retraktor (LR)	$\approx 557 \times \approx 47$	-	-
Dorsaler Pro-traktormuskel A (Pro_{do}A)	$\approx 930 \times \approx 90$	$\approx 448 \times \approx 18$	$\approx 329 \times \approx 11$

Tab. 4.1: Messwerte der Muskelgruppen bei *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*; angegebenen Werte beziehen sich auf die Länge [μm] und die Breite [μm] der unterschiedlichen Muskelgruppen.

**Nerven und neuronale Strukturen von *Calliphora vicina*,
Drosophila virilis und *Drosophila melanogaster***

	<i>Calliphora vicina</i>	<i>Drosophila virilis</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Nerven:	Durchmesser [μm]		
Frontal- nerv (FN)	≈ 27	≈ 7	≈ 6
Antennal- nerv (AN)	≈ 30	≈ 8	≈ 8
Frontal- konnektiv (FK)	≈ 23	≈ 7	≈ 5
Rekurrenter Nerv (RN)	≈ 26	≈ 6	≈ 5
Kropf- nerv (KN)	≈ 11	-	-
Maxillar- nerv (MN)	≈ 33	≈ 8	≈ 8
Akzessorischer Prothorakalnerv (PaN)	≈ 14	≈ 5	≈ 4
Proventrikular- nerv (PVN)	≈ 11	-	-
Neuronale Strukturen:	Länge \times Breite [μm]		
Frontale Nerven- verbindung (FNV)	$\approx 81 \times \approx 85$	$\approx 23 \times \approx 28$	$\approx 22 \times \approx 22$
Hypocerebral- ganglion (HCG)	$\approx 34 \times \approx 68$	-	-
Proventrikular- ganglion (PVN)	$\approx 31 \times \approx 81$	-	-

Tab. 4.2: Abmessungen der Nerven und neuronalen Strukturen von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*; gemessen wurde der Durchmesser [μm] der Nerven sowie die Länge [μm] und Breite [μm] der neuronalen Strukturen.

Physiologische Eigenschaften der untersuchten Muskelgruppen von *Calliphora vicina*, *Drosophila virilis* und *Drosophila melanogaster*

<i>Calliphora vicina:</i>						
	AN	MN			PaN	
	CDM	MHD	MHE		Pro _{do} A	
Ruhepotential [mV]	-33,4 (±4,9) N=4	-41,8 (±3,1) N=5	-41,5 (±7,3) N=3		-38,1 (±3,3) N=6	
postsynaptische Potential [mV]	4,1 (±0,2) N=33(4)	8 (±0,8) N=41(5)	3,1 (±0,2) N=47(3)		9,1 (±1) N=26(3)	
Dauer d. postsynaptischen Potentials [ms]	41 (±1,5) N=33(4)	86 (±4,2) N=41(5)	53 (±4,6) N=47(3)		61 (±1,5) N=26(3)	
<i>Drosophila virilis:</i>						
	AN	MN			PaN	
	CDM	MHD	MHE		Pro _{do} A	
Ruhepotential [mV]	-45,9 N=1	-51,9 (±8,5) N=3	-51,6 (±8,5) N=3		-42,9 (±4,3) N=3	
postsynaptische Potential [mV]	7,3 (±0,4) N=12(1)	15,8 (±1,1) N=35(3)	4,9 (±0,7) N=12(3)	7,2 (±0,6) N=39(3)	2,5 (±0,1) N=59(3)	15 (±2,9) N=21(2)
Dauer d. postsynaptischen Potentials [ms]	53 (±3,4) N=12(1)	77 (±6,7) N=35(3)	108 (±7,3) N=12(3)	51 (±6,5) N=39(3)	22 (±1,5) N=59(3)	38 (±2,3) N=21(2)
<i>Drosophila melanogaster:</i>						
	AN	MN			PaN	
	CDM	MHD	MHE		Pro _{do} A	
Ruhepotential [mV]	-32,5 N=1	-42,7 (±8,4) N=3	-46 (±3,6) N=3		-36,2 (±1) N=1	
postsynaptische Potential [mV]	3,6 (±0,2) N=21(1)	10,1 (±0,4) N=41(3)	2,2 (±0,2) N=23(3)	11,2 (±0,9) N=37(4)	2,4 (±0,2) N=23(4)	6,4 (±0,7) N=30(1)
Dauer d. postsynaptischen Potentials [ms]	-	76 (±7,8) N=41(3)	83 (±7,4) N=23(3)	42 (±4,2) N=37(4)	59 (±4,1) N=23(4)	43 (±5,2) N=30(1)

Tab. 4.3: Physiologische Parameter der untersuchten Muskelgruppen der Dipteren-Larven; angegeben Werte für das Ruhepotential des Muskels [mV], postsynaptische Muskelpotential [mV] und die Dauer des postsynaptischen Muskelpotentials [s] sind die berechneten Mittelwerte (±Standardabweichung) inklusive der N-Zahl; verwendete Abk.: **AN** - Antennalnerv, **CDM** - Cibariale Dilatormuskulatur, **MHD** - Mundhakendepressor, **MHE** - Mundhakenelevator, **MN** - Maxillarnerv, **PaN** - akzessorischer Prothorakalnerv, **Pro_{do}A** - Dorsaler Protraktormuskel A.

Danksagung

Prof. Dr. Hans-Georg Heinzl danke ich für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit in seinem Labor die Arbeit anzufertigen und insbesondere für die kleinen und großen Inspirationen, die mein wissenschaftliches Arbeiten geprägt und gefördert haben.

Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Stein danke ich für die kurzfristige Bereitschaft meine Promotionsarbeit zu begutachten.

Dr. Roland Spieß danke ich für die vorbildliche Betreuung und Hilfe in allen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Angelegenheiten als auch dafür, dass er Roland ist und hoffentlich immer bleibt.

Dr. Rüdiger Bader danke ich für die Hilfe bei der Antikörperfärbung.

Dipl.-Biol. Ulrike Hanslik danke ich für die gute Laune, mit der Sie den teilweise tristen Alltag erhellt hat und für ihre kompetenten wissenschaftlichen Hinweise und Ratschläge im Verlauf der Arbeit.

Dipl.-Ing. André van Ooyen möchte ich für die Herstellung der Iridiumoxid-Elektroden danken.

Meiner Mutter und Horst Koppetsch danke ich für die Unterstützung und die stetige Anteilnahme am Fortgang dieser Arbeit.

Der Arbeitsgruppe, insbesondere den derzeitigen Mitgliedern Sonja Zens, Axel Hinneemann und Sebastian Hückesfeld, möchte ich für die Unterstützung und die immer gute und herzliche Atmosphäre danken.

Der "Kolchose" und insbesondere Jochen danke ich für alle nicht-wissenschaftlichen Annehmlichkeiten während der Promotionszeit.

Abkürzungen

A - Aorta,
AN - Antennalnerv,
AN/I u. II - Erste und zweite Abzweigung des Antennalnervs,
Ant. - Anterior,
Amp./Filt.-Einheit - Amplifikations-/Filtereinheit,
A/D-Wandler - Analog/Digital-Wandler,
A/AN-FK - Neuronale Anastomose zwischen Antennalnerv und Frontalkonnektiv,
A/AN-MN - Neuronale Anastomose zw. Antennal- und Maxillarnerv,
A/FK-MN - Neuronale Anastomose zw. Frontalkonnektiv und Maxillarnerv,
A/MN-AN - Neuronale Anastomose zw. Maxillar- und Antennalnerv,
A/MN-FK - Neuronale Anastomose zw. Maxillarnerv und Frontalkonnektiv,
A/PaN-PN - Neuronale Anastomose zw. akzessorischem Prothorakal- und Prothorakalnerv,
BO - Bolwigorgan,
CDM - Cibariale Dilatormuskulatur,
CPS - Cephalopharyngeales Skelett,
DO - Dorsalorgan,
DOG - Dorsalorganganglion,
FK - Frontalkonnektiv,
FK/I-III - Erste bis dritte Abzweigung des Frontalkonnektives,
FNV - Frontale Nervenverbindung,
FN - Frontalnerv,
gE - große Einheit,
GH - Gehirnhemisphäre,
HCG - Hypocerebralganglion,
K - Kropf,
kE - kleine Einheit,
KN - Kropfnerv,
L - Läsion,

LN - Labialnerv,
LO - Labialorgan,
LR - Labialretraktor,
mE - mittlere Einheit,
Mech. Stim. - Mechanischer Stimulus,
MeN - Mesothorakalnerv,
MH - Mundhaken,
MHD - Mundhakendepressor,
MHE - Mundhakenelevator,
MN - Maxillarnerv,
MN/I-VI - Erste bis sechste Abzweigung des Maxillarnervs,
OE - Oesophagus,
OS - Optischer Stiel,
PaN - Akzessorischer Prothorakalnerv,
PaN/I-III - Erste bis dritte Abzweigung des akzessorischen Prothorakalnervs,
PaN-PN - neuronaler Bereich des akzessorischen Prothorakal- und des Prothorakalnervs,
PN - Prothorakalnerv,
Post. - Posterior,
Pro_{do}A - Dorsaler Protraktormuskel A,
Pro_{do}B - Dorsaler Protraktormuskel B,
PVG - Proventrikularganglion,
PVN - Proventrikularnerv,
RN - Rekurrenter Nerv,
SNS - Stomatogastrisches Nervensystem,
Stim. - Stimulus,
TO - Terminalorgan,
TOG - Terminalorganganglion,
UON - Unpaariger Oesophagialnerv,
VAN - Ventraler Arm Nerv,
VG - Ventralganglion,
VO - Ventralorgan.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Zeichnung des zentralen Nervensystems von Dipteren-Larven	9
2.1	Halbschematische Darstellung der untersuchten Dipteren-Arten	15
2.2	Taxonomie der untersuchten Dipteren-Arten	16
2.3	Darstellung der fertigen Basispräparation	20
2.4	Aufbau der Perfusionsanlage	22
2.5	Aufbau einer Carbonelektrode	29
2.6	Aufbau einer Sputter-Elektrode	30
2.7	Versuchsaufbau für die extrazellulären Ableitungen	32
2.8	Versuchsaufbau für die intrazellulären Muskelableitungen	34
2.9	Anleitung für die Präparation von <i>Drosophila melanogaster</i> für eine Dreifachableitung des Antennal-, Maxillar- und akzessorischen Prothorakalnervs	37
2.10	Reizgeber für die Untersuchung der Kropfsensorik	39
2.11	Parameter für die Bildung eines Bursts	43
2.12	Graphische Darstellung der gemessenen Werte für die Rhythmusanalyse	44
2.13	Generierung einer Hüllkurve	45
2.14	Extrazelluläre Ableitung des Maxillarnervs mit Hüllkurve	45
3.1	Fresszyklus von <i>Calliphora vicina</i>	47
3.2	Cibariale Dilatormuskulatur der untersuchten Dipteren-Larven	51
3.3	Mundhakenelevator und -depressor der untersuchten Dipteren-Larven	52
3.4	Labialretraktor der untersuchten Dipteren-Larven	53
3.5	Dorsale Protraktormuskel A der untersuchten Dipteren-Larven	53
3.6	Antennalnerv von <i>Calliphora vicina</i>	57
3.7	Antennalnerv von <i>Drosophila virilis</i>	58
3.8	Antennalnerv von <i>Drosophila melanogaster</i>	59
3.9	Maxillarnerv von <i>Calliphora vicina</i>	62
3.10	Maxillarnerv von <i>Drosophila virilis</i>	63
3.11	Maxillarnerv von <i>Drosophila melanogaster</i>	64

3.12	Akzessorischer Prothorakalnerv von <i>Calliphora vicina</i>	67
3.13	Akzessorischer Prothorakalnerv von <i>Drosophila virilis</i>	68
3.14	Akzessorischer Prothorakalnerv von <i>Drosophila melanogaster</i>	69
3.15	Retrograde axonale Füllung beider Antennal- und des Frontalnervs von <i>Calliphora vicina</i>	71
3.16	Retrograde Füllung des Maxillarnervs von <i>Calliphora vicina</i>	72
3.17	Retrograde Füllung des rechten und linken akzessorischen Prothorakal- nervs von <i>Calliphora vicina</i>	74
3.18	Immunhistologischer Nachweis des Neuropeptids <i>hugin</i> im zentralen Ner- vensystem und akzessorischen Prothorakalnerv von <i>Calliphora vicina</i> . . .	76
3.19	Elektrische Stimulation der cibarialen Dilatormuskulatur von <i>Calliphora</i> <i>vicina</i>	78
3.20	Motorische Bahnen des Antennalnervs von <i>Calliphora vicina</i>	79
3.21	Zusammenhang von Position im cephalopharyngealen Skelett und Kon- traktionsdauer der cibarialen Dilatormuskulatur von <i>Calliphora vicina</i> . .	80
3.22	Extrazelluläre Ableitung beider Maxillarnerven von <i>Calliphora vicina</i> . .	81
3.23	Efferente Einheiten des Maxillarnervs von <i>Calliphora vicina</i>	82
3.24	Motorische Bahnen des Maxillarnervs von <i>Calliphora vicina</i>	83
3.25	Korrelationsanalyse von extra- und intrazellulären Ableitungen des Ma- xillarnervs und der Mundhakenmuskulatur von <i>Calliphora vicina</i>	83
3.26	Extrazelluläre Ableitung des Maxillarnervs und intrazelluläre Ableitung des Labialretraktors von <i>Calliphora vicina</i>	84
3.27	Extrazelluläre Ableitung beider akzessorischer Prothorakalnerven von <i>Cal-</i> <i>liphora vicina</i>	85
3.28	Clusteranalyse des akzessorischen Prothorakalnervs von <i>Calliphora vicina</i>	85
3.29	Extrazelluläre Ableitung des akzessorischen Prothorakalnervs und intra- zelluläre Ableitung des dorsalen Protraktormuskels A von <i>Calliphora vicina</i>	86
3.30	1:1 Korrelation der großen Einheit des akzessorischen Prothorakalnervs und den postsynaptischen Potentialen des dorsalen Protraktormuskels A von <i>Calliphora vicina</i>	87
3.31	Extrazelluläre Ableitung des akzessorischen Prothorakalnervs und intra- zelluläre Ableitung der dorsalen Protraktormuskeln A und B von <i>Calli-</i> <i>phora vicina</i>	88
3.32	Verlauf der neuronalen Bahnen der mittleren Einheit von <i>Calliphora vici-</i> <i>na</i> anhand extrazellulärer Doppelableitungen des akzessorischen Protho- rakalnervs	89
3.33	Manipulation des Kropfvolumens bei <i>Calliphora vicina</i>	92
3.34	Mechanische Reizung des Dorsalorgans von <i>Calliphora vicina</i>	93

3.35	Mechanische Stimulation des Terminal-, Ventral- und Labialorgans von <i>Calliphora vicina</i>	93
3.36	Identifikation von Afferenzen im akzessorischen Prothorakalnerv von <i>Calliphora vicina</i>	94
3.37	Motorische Bahnen des Antennalnervs von <i>Drosophila virilis</i>	95
3.38	Motorische Bahnen des Mundhakendepressors von <i>Drosophila virilis</i>	97
3.39	Motorische Bahnen des Mundhakenelevators von <i>Drosophila virilis</i>	97
3.40	Korrelationsanalyse der extra- und intrazellulären Ableitungen des Maxillarnervs und der Mundhakenmuskulatur von <i>Drosophila virilis</i>	98
3.41	Motorische Bahnen des akzessorischen Prothorakalnervs von <i>Drosophila virilis</i>	99
3.42	Motorische Bahnen des Antennalnervs von <i>Drosophila melanogaster</i>	100
3.43	Motorische Bahnen des Mundhakendepressors von <i>Drosophila melanogaster</i>	102
3.44	Motorische Bahnen des Mundhakenelevators von <i>Drosophila melanogaster</i>	102
3.45	Korrelationsanalyse der extra- und intrazellulären Ableitung des Maxillarnervs und der Mundhakenmuskulatur von <i>Drosophila melanogaster</i>	103
3.46	Motorische Bahnen des akzessorischen Prothorakalnervs von <i>Drosophila melanogaster</i>	104
3.47	Korrelationsanalyse der großen Einheit des akzessorischen Prothorakalnervs mit den postsynaptischen Potentialen des dorsalen Protraktormuskels A von <i>Drosophila melanogaster</i>	105
3.48	Fiktives Fressverhalten von <i>Calliphora vicina</i>	107
3.49	Variabilität des fiktiven Fressverhaltens von <i>Calliphora vicina</i>	109
3.50	Rhythmusanalyse des fiktiven Fressverhaltens von <i>Calliphora vicina</i>	112
3.51	Histogramm der Periodendauer der cibarialen Dilatormuskulatur von <i>Calliphora vicina</i>	114
3.52	Phasenanalyse des fiktiven Fressverhaltens bei <i>Calliphora vicina</i>	115
3.53	Phasenbeziehung zwischen der Einheit der cibarialen Dilatormuskulatur und der mittleren Einheit von <i>Calliphora vicina</i>	116
3.54	Fiktives Fressverhalten von <i>Drosophila virilis</i>	118
3.55	Phasenanalyse des fiktiven Fressverhaltens von <i>Drosophila virilis</i>	121
3.56	Fiktives Fressverhalten von <i>Drosophila melanogaster</i>	123
3.57	Phasenanalyse des fiktiven Fressverhaltens von <i>Drosophila melanogaster</i>	126
4.1	Konzept der Untersuchung des larvalen Fressverhaltens von Dipteren-Larven	128

Tabellenverzeichnis

4.1	Messwerte der Muskelgruppen der Dipteren-Larven	167
4.2	Abmessungen der Nerven und neuronalen Strukturen der Dipteren-Larven	168
4.3	Physiologische Parameter der untersuchten Muskelgruppen der Dipteren- Larven	169

Literaturverzeichnis

- Alarie, Y., Beutel, R., & Watts, C. (2004). Larval morphology of three species of hygrobiidae (Coleoptera: Adephaga: Dytiscoidea) with phylogenetic considerations. *European Journal of Entomology*, *101*, 293–311.
- Angioy, A. M., Barbarossa, I. T., Crnjar, R., & Liscia, A. (1989). Effects of octopaminergic substances on the labellar lobe spreading response in the blowfly *Protophormia terraenovae*. *Neuroscience Letters*, *103*, 103–107.
- Anton, E. & Beutel, R. (2006). On the head morphology of Lepiceridae (Coleoptera: Myxophaga) and the systematic position of the family and suborder. *European Journal of Entomology*, *103*, 85–95.
- Aubele, E. & Klemm, N. (1977). Origin, destination and mapping of tritocerebral neurons of locust. *Cell and Tissue Research*, *178*, 199–219.
- Ayali, A. (2004). The insect frontal ganglion and stomatogastric pattern generator networks. *Neurosignals*, *13*, 20–36.
- Ayali, A. & Zilberstein, Y. (2004). The locust frontal ganglion: a multi tasked central pattern generator. *Acta Biologica Hungarica*, *55*, 1–4.
- Ayali, A., Zilberstein, Y., & Cohen, N. (2002). The locust frontal ganglion: a central pattern generator network controlling foregut rhythmic motor patterns. *The Journal of Experimental Biology*, *205*, 2825–2832.
- Baccolo, S. (1954). Il sistema stomatogastrico nella larva di *Calliphora erythrocephala* (Meigen). *Bolletino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura, Milano*, *20*, 89–94.
- Bader, R. (2008). Molekulargenetische Untersuchung eines nahrungsabhängigen, neuronalen Schaltkreises in *Drosophila*. *Promotionsarbeit, Universität Karlsruhe (TH)*.
- Bader, R., Colomb, J., Pankratz, B., Schroeck, A., Stocker, R., & Pankratz, M. J. (2007). Genetic dissection of a neural circuit anatomy underlying feeding behavior in *Droso-*

- phila*: distinct classes of *hugin* expressing neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 502, 848–856.
- Basset, A., Ranjiv S. Khush, R. S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J. A., & Lemaitre, B. (2000). The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 3376–3381.
- Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development*, 110, 791–804.
- Bauer, S. J. & Sokolowski, M. B. (1984). Larval foraging behavior in isofemale lines of *Drosophila melanogaster* and *D. pseudoobscura*. *The Journal of Heredity*, 75, 131–134.
- Bell, R. A., Borg, T. K., & Ittycheriah, P. I. (1974). Neurosecretory cells in the frontal ganglion of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, 20, 669–678.
- Belton, P. (1969). Innervation and neural excitation of ventral muscle fibres of the larva of the waxmoth *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 15, 731–741.
- Belton, P. & Brown, B. (1969). The electrical activity of cockroach visceral muscle fibres. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 28, 853–863.
- Benjamin, P. R. & Rose, R. M. (1979). Central generation of bursting in the feeding system of the snail, *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Experimental Biology*, 80, 93–118.
- Benjamin, P. R., Rose, R. M., Slade, C. T., & Lacy, M. G. (1979). Morphology of identified neurones in the buccal ganglion of *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Experimental Biology*, 80, 119–135.
- Berrigan, D. & Lighton, J. (1993). Bioenergetic and kinematic consequences of limblessness in larval diptera. *The Journal of Experimental Biology*, 179, 245–259.
- Berrigan, D. & Pepin, D. J. (1995). How maggots move: allometry and kinematics of crawling in larval diptera. *Journal of Insect Physiology*, 41, 329–337.
- Beutel, R. & Friedrich, F. (2005). Comparative study of larvae of Tenebrionoidea (Coleoptera: Cucujiformia). *European Journal of Entomology*, 102, 241–264.
- Beutel, R., Friedrich, F., & Whiting, M. (2008). Head morphology of *Caurinus* (Boridae, Mecoptera) and its phylogenetic implications. *Arthropod Structure and Development*, 37, 418–433.

- Böhm, H., Eitner, P., & Heinzel, H.-G. (1998). Neuronale Netze des Magensystems bei Krebsen als Modellsystem in den Neurowissenschaften. *Neuroforum*, *4*, 275–282.
- Blaney, W. M. & Simmonds, M. S. J. (1987). *Arthropod brain: its evolution, development, structure and function - Control of mouthparts by the suboesophageal ganglion*. J. Wiley and Sons.
- Boleli, I. C., Simoes, Z. L. P., & Hartfelder, K. (1998). The stomatogastric nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. *Journal of Morphology*, *236*, 139–149.
- Bolwig, N. (1946). Senses and sense organs of the anterior end of the house fly larvae. *Videnskabelige Meddelelser Dansk Naturhistorisk Forening*, *199*, 81–127.
- Bowdan, E. (1988). Microstructure of feeding by tobacco hornworm caterpillars, *Manduca sexta*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *47*, 127–136.
- Bowdan, E. (1995). The effects of a phagostimulant and a deterrent on the microstructure of feeding by *Manduca sexta* caterpillars. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *77*, 297–306.
- Bowdan, E. & Dethier, V. G. (1986). Coordination of a dual inhibitory system regulating feeding behaviour in the blowfly. *Journal of Comparative Physiology A*, *158*, 713–722.
- Bowdan, E. & Wyse, G. A. (1997). Removing antennae and maxillae has little effect on feeding on normal host plants by two species of caterpillar. *Journal of Insect Physiology*, *43*, 1053–1063.
- Bowdan, E. & Wyse, G. A. (2000). Temporally patterned activity recorded from mandibular nerves of the isolated subesophageal ganglion of *Manduca*. *Journal of Insect Physiology*, *46*, 709–719.
- Brierley, M., Yeoman, M., & Benjamin, P. (1997). Glutamatergic N2v cells are the central pattern generator interneurons of *Lymnaea* feeding system: new model for rhythm generation. *Journal of Neurophysiology*, *78*, 3396–3407.
- Budnik, V., Zhong, Y., & Wu, C. (1990). Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *The Journal of Neuroscience*, *10*, 3754–3768.
- Burrows, M. (1996). *The Neurobiology of an Insect Brain*. Oxford University Press.
- Campos-Ortega, J. A. & Hartenstein, V. (1985). *The embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Berlin/Heidelberg/New-York/Tokyo: Springer-Verlag.

- Cantera, R. (1988). Serotonin and gastrin/cholecystokinin-like immunoreactive neurons in the larval retrocerebral complex of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Cell and Tissue Research*, 253, 425–433.
- Cantera, R., Veenstra, J. A., & Nässel, D. R. (1994). Postembryonic development of corazonin-containing neurons and neurosecretory cells in the blowfly *Phormia terrae-novae*. *The Journal of Comparative Neurology*, 350, 559–572.
- Cattaert, D. & Birman, S. (2001). Blockade of the central generator of locomotor rhythm by noncompetitive NMDA receptor antagonists in *Drosophila* larvae. *The Journal of Neurobiology*, 48, 58–73.
- Chiel, H. J. & Beer, R. D. (1997). The brain has a body: adaptive behavior emerges from interactions of nervous system, body and environment. *Trends in Neuroscience*, 20, 553–557.
- Chu-Wang, I. & Axtell, R. C. (1971). Fine structure of the dorsal organ of the house fly larva, *Musca domestica* L. *Zeitschrift für Zellforschung*, 117, 17–34.
- Chu-Wang, I. & Axtell, R. C. (1972a). Fine structure of the terminal organ of the house fly larva, *Musca domestica* L. *Zeitschrift für Zellforschung*, 127, 287–305.
- Chu-Wang, I. & Axtell, R. C. (1972b). Fine structure of the ventral organ of the house fly larva, *Musca domestica* L. *Zeitschrift für Zellforschung*, 130, 489–495.
- Cobb, M. (1999). What and how do maggots smell. *Biological Reviews*, 74, 425–459.
- Colomb, J., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., & Stocker, R. (2007). Architecture of the primary taste center of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology*, 502, 834–847.
- Cooper, R. L. & Neckameyer, W. S. (1999). Dopaminergic modulation of motor neuron activity and neuromuscular function in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 122, 199–210.
- Corfas, G. & Dudai, Y. (1990). Adaptation and fatigue of a mechanosensory neuron in wild-type *Drosophila* and in memory mutants. *Journal of Neuroscience*, 10, 491–499.
- Crossley, C. (1978). *The Morphology and Development of the Drosophila Muscular System*. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. TRF Wright.
- Davey, K. G. & Treherne, J. E. (1963). Studies on crop function in the cockroach (*Periplaneta americana* L.) II. The nervous control of crop emptying. *The Journal of Experimental Biology*, 40, 775–780.

- Deitmer, J. & Rathmeyer, W. (1976). Calcium action potentials in larval muscle fibres of the moth *Ephestia kühniella* Z. (Lepidoptera). *Journal of Comparative Physiology A*, 112, 123–132.
- Deitmer, J. W. (1976). Electrical properties of skeletal muscle fibres of the flour moth larva *Ephestia kühniella*. *Journal of Insect Physiology*, 23, 33–38.
- Delcomyn, F. (1980). Neural basis of rhythmic behavior in animals. *Science*, 210, 492–498.
- Dethier, V. G. & Gelperin, A. (1967). Hyperphagia in the blowfly. *The Journal of Experimental Biology*, 47, 191–200.
- Dickinson, P. S. (1995). Interactions among neural networks for behavior. *Current Opinion in Neurobiology*, 5, 792–798.
- Dickinson, P. S. & Marder, E. (1989). Peptidergic modulation of a multioscillator system in the lobster. I. Activation of the cardiac sac motor pattern by the neuropeptides proctolin and red pigment concentrating hormone. *Journal of Neurophysiology*, 61, 833–844.
- Dickinson, P. S., Meccas, C., & Marder, E. (1990). Neuropeptide fusion of two motor pattern generator circuits. *Nature (London)*, 344, 155–158.
- Dowding, V. M. (1968). The formation of the cuticular ridges in the larval pharynx of the blowfly (*Calliphora vicina* R.-D.). *Parasitology*, 58, 683–690.
- Forjanic, J. P., Chen, C. K., Jäckle, H., & Gonzales Gaitan, M. (1997). Genetic analysis of stomatogastric nervous system development in *Drosophila* using enhancer trap lines. *Developmental Biology*, 186, 139–154.
- Gelperin, A. (1966a). Control of crop emptying in the blowfly. *Journal of Insect Physiology*, 12, 331–345.
- Gelperin, A. (1966b). Investigations of a foregut receptor essential to taste threshold regulation in the blowfly. *Journal of Insect Physiology*, 12, 829–841.
- Gelperin, A. (1967a). Function of some type II neurons in the stomatogastric nervous system of the blowfly. *The Journal Of General Physiology*, 50, 2484–2485.
- Gelperin, A. (1967b). Stretch receptors in the foregut of the blowfly. *Science*, 157, 208–210.
- Gelperin, A. (1971a). Abdominal sensory neurons providing negative feedback to the feeding behavior of the blowfly. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 72, 17–31.

- Gelperin, A. (1971b). Regulation of feeding. *Annual Reviews of Entomology*, 16, 365–378.
- Gelperin, A. (1972). Neural control systems underlying insect feeding behavior. *American Zoologist*, 12, 489–496.
- Gendre, N., Lüer, K., Friche, S., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., Technau, G. M., & Stocker, R. F. (2004). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development*, 131, 83–92.
- Gerber, B., Scherer, S., Neuser, K., Michels, B., Hendel, T., Stocker, R. F., & Heisenberg, M. (2004). Visual learning in individually assayed *Drosophila* larvae. *The Journal of Experimental Biology*, 207, 179–188.
- Gerber, B. & Stocker, R. F. (2007). The *Drosophila* larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning: A review. *Chemical Senses*, 32, 65–89.
- Getting, P. A. (1971). The sensory control of motor output in fly proboscis extension. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 74, 103–120.
- Getting, P. A. (1989). Emerging principles governing the operation of neural networks. *Annual Review of Neuroscience*, 12, 185–204.
- Getting, P. A. & Steinhardt, R. A. (1972). The interaction of external and internal receptors on the feeding behaviour of the blowfly, *Phormia regina*. *Journal of Insect Physiology*, 18, 1673–1681.
- Ghysen, A., Dambly-Chaudiere, C., Aceves, E., Jan, L., & Jan, Y. (1986). Sensory neurons and peripheral pathways in *Drosophila* embryos. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 195, 281–289.
- Gonzalez-Gaitan, M. & Jäckle, H. (2001). Tip cell-derived RTK signalling initiates cell movements in the *Drosophila* stomatogastric nervous system anlage. *EMBO Reports*, 1, 366–371.
- Gorczyca, M. G., Budnik, V., White, K., & Wu, C. F. (1991). Dual muscarinic and nicotinic action on a motor program in *Drosophila*. *Journal of Neurobiology*, 22, 391–404.
- Green, C. H., Burnet, B., & Connolly, K. J. (1983). Organization and pattern of inter- and intraspecific variation in the behaviour of *Drosophila* larvae. *Animal Behaviour*, 31, 282–291.
- Griss, C. (1990). Mandibular motor neurons of the caterpillar of the hawk moth *Manduca sexta*. *The Journal of Comparative Neurology*, 296, 393–402.

- Griss, C., Simpson, S. J., Rohrbacher, J., & Rowell, C. H. F. (1991). Localization in the central nervous system of larval *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) of areas responsible for aspects of feeding behaviour. *Journal of Insect Physiology*, *37*, 477–482.
- Gundel, M. & Penzlin, H. (1978). The neuronal connections of the frontal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *Cell and Tissue Research*, *193*, 353–371.
- Gundel, M. & Penzlin, H. (1980). Identification of neural pathways between the stomatogastric nervous system and the retrocerebral complex of the cockroach *Periplaneta americana* (L.). *Cell and Tissue Research*, *208*, 283–297.
- Hanson, F. E. & Dethier, V. G. (1973). Role of gustation and olfaction in food plant discrimination in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, *19*, 1019–1034.
- Hardie, J. (1976a). Motor innervation of the supercontracting longitudinal ventro-lateral muscles of the blowfly larva. *Journal of Insect Physiology*, *22*, 661–668.
- Hardie, J. (1976b). The tension/length relationship of an insect (*Calliphora erythrocephala*) supercontracting muscle. *Experientia*, *32*(6), 714–716.
- Harris-Warrick, R. M. (1988). *Chemical modulation of central pattern generators*. In: *Neural Control of Rhythmic Movements*. New York: John Wiley.
- Harris-Warrick, R. M., Marder, E., Selverston, A. I., & Moulins, M. (1992). *Dynamic Biological Networks: The Stomatogastric Nervous System*. The MIT Press, Cambridge Massachusetts.
- Harrison, D. A. & Cooper, R. L. (2003). Characterization of development, behavior and neuromuscular physiology in the phorid fly, *Megaselia scalaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, *136*, 427–439.
- Hartenstein, V. (1988). Development of *Drosophila* larval sensory organs: spatiotemporal pattern of sensory neurones, peripheral axonal pathways and sensilla differentiation. *Development*, *102*, 869–886.
- Hartenstein, V. (1997). Development of the insect stomatogastric nervous system. *Trends in Neuroscience*, *20*, 421–427.
- Hartenstein, V., Tepass, U., & Gruszynski-Defeo, E. (1994). Embryonic development of the stomatogastric nervous system in *Drosophila*. *The Journal of Comparative Neurology*, *350*, 367–381.

- Hückesfeld, S. (2009). Elektrophysiologische Charakterisierung der anterioren Sinnesorgane bei Larven von *Calliphora vomitoria* und deren Einfluss auf die motorischen Muster des ZNS (vorläufiger Titel). *Diplomarbeit (aktuell nicht abgeschlossen)*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Heimbeck, G., Bugnon, V., Gendre, N., Häberlin, C., & Stocker, R. F. (1999). Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: toxin expression studies in chemosensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, *19*, 6599–6609.
- Heinzel, H. G. and Selverston, A. (1988). Gastric mill activity in the lobster. III. Effects of proctolin on the isolated central pattern generator. *Journal of Neurophysiology*, *59*, 566–585.
- Heinzel, H. G., Weimann, J. M., & Marder, E. (1993). The behavioral repertoire of the gastric mill in the crab, *Cancer pagurus*: an in situ endoscopic and electrophysiological examination. *The Journal of Neuroscience*, *13*(4), 1793–1803.
- Hennig, W. (1973). *Handbuch der Zoologie (Eine Naturgeschichte der Stämme des Tierreiches): IV. Band: Arthropoda - 2. Hälfte: Insecta 2. Teil: Spezielles 31. Diptera (Zweiflügler)*. Helmecke, J. G. and Starck, D. and Wermuth, H.
- Hertweck, H. (1931). Anatomie und Variabilität des Nervensystems und der Sinnesorgane von *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, *139*, 560–663.
- Higley, L. G. & Haskell, N. H. . (2001). *Insect development and forensic entomology . Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hill, L., Mordue, W., & Highnam, K. C. (1966). The endocrine system, frontal ganglion, and feeding during maturation in the female desert locust. *Journal of Insect Physiology*, *12*, 1197–1208.
- Hobson, R. P. (1931). Studies on the nutrition of blow-fly larvae I. Structure and function of the alimentary tract. *The Journal of Experimental Biology*, *8*, 109–123.
- Hobson, R. P. (1932). Studies on the nutrition of the blow-fly larvae III. The liquefaction of muscle. *The Journal of Experimental Biology*, *9*, 359–365.
- Hooper, J. (1986). Homeotic gene function in the muscles of *Drosophila* larvae. *The EMBO Journal*, *5*, 2321–2329.
- Hooper, S. & Moulins, M. (1989). Switching of a neuron from one network to another by sensory-induced changes in membrane properties. *Science*, *244*, 1587–1589.

- Irving, S. N. & Miller, T. A. (1980). Ionic differences in "fast" and "slow" neuromuscular transmission in body wall muscles of *Musca domestica* larvae. *Journal of Comparative Physiology*, 135, 291–298.
- Ito, K., Urban, J., & Technau, G. (1995). Distribution, classification and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral cord. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 204, 284–307.
- Jan, L. & Jan, Y. (1976a). L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 262, 215–236.
- Jan, L. Y. & Jan, Y. N. (1976b). Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Physiology*, 262, 189–214.
- Johansen, J., Halpern, M., Johansen, K., & Keshishian, H. (1989). Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae. *The Journal of Neuroscience*, 9, 710–725.
- Johnston, R. M., Consoulas, C., Pflüger, H. J., & Levine, R. B. (1999). Patterned activation of unpaired median neurons during fictive crawling in *Manduca sexta* larvae. *The Journal of Experimental Biology*, 202, 103–113.
- Jürgens, G., Lehmann, R., Schardin, M., & Nüsslein-Volhard, C. (1986). Segmental organisation of the head in the embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 195, 359–377.
- Kankel, D. & Hall, J. (1976). Fate mapping of nervous system and other internal tissues in genetic mosaics of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 48, 1–24.
- Kankel, D. R., Ferrus, A., Garen, S. H., Harte, P. J., & Lewis, P. E. (1980). *The Genetics and biology of Drosophila: The Structure and Development of the Nervous System*. Academic Press.
- Kirby, P., Beck, R., & Clarke, K. U. (1984). The stomatogastric nervous system of the house cricket *Acheta domesticus* L. I. The anatomy of the system and the innervation of the gut. *Journal of Morphology*, 180, 81–103.
- Kitamoto, T. (2001). Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive *shibire* allele in defined neurons. *Journal of Neurobiology*, 47, 81–92.
- Koh, Y., Gramates, L., & Budnik, V. (2000). *Drosophila* larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity. *Microscopy Research and Technique*, 49, 14–25.

- Kravitz, E. A. (1988). Hormonal control of behavior: amines and the biasing of behavioral output in lobster. *Science*, *241*, 1775–1780.
- Kreher, S., Kwon, A., & Carlson, J. (2005). The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* larva. *Neuron*, *46*, 445–456.
- Kreher, S. A., Mathew, D., Kim, J., & Carlson, J. R. (2008). Translation of sensory input into behavioral output via an olfactory system. *Neuron*, *59*, 110–124.
- Kurdyak, P., Atwood, H., Stewart, B., & Wu, C.-F. (1994). Differential physiology and morphology of motor axons to ventral longitudinal muscles in larval *Drosophila*. *Journal of Comparative Neurology*, *350*, 463–472.
- Kyriakides, M. & McCrohan, C. (1988). Central coordination of buccal and pedal neuronal activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Experimental Biology*, *136*, 103–123.
- Lee, K., You, K., Choo, J., Han, Y., & Yu, K. (2004). *Drosophila* short neuropeptide F regulates food intake and body size. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*, 50781–50789.
- Li, H., Harrison, H., Jones, G., Jones, D., & Cooper, R. L. (2001). Alterations in development, behavior, and physiology in *Drosophila* larva that have reduced ecdysone production. *Journal of Neurophysiology*, *86*, 98–104.
- Liu, L., Yermolaieva, O., Johnson, W. A., Abboud, F. M., & Ish, M. J. (2003). Identification and function of thermosensory neurons in *Drosophila* larvae. *Nature Neuroscience*, *6*, 267–273.
- Long, T. F. & Murdock, L. L. (1983). Stimulation of blowfly feeding behavior by octopaminergic drugs. *Neurobiology*, *80*, 4159–4163.
- Ludwig, C. E. (1949). Embryology and morphology of the larval head of *Calliphora erythrocephala* (Meigen). *Microentomology*, *14*, 75–111.
- Ludwig, M., Sabatier, N., Bull, P., Landgraf, R., Dayanithi, G., & Leng, G. (2002). Intracellular calcium stores regulate activity-dependent neuropeptide release from dendrites. *Nature*, *418*, 85–89.
- Luo, L., Callaway, E. M., & Svoboda, K. (2008). Genetic dissection of neural circuits. *Neuron*, *57*, 634–660.
- Lázár, G. (1978). Application of cobalt-filling technique to show retinal projections in the frog. *Neuroscience*, *3*, 725–736.

- Magazanik, L. G. & Fedorova, I. M. (2003). Modulatory role of adenosine receptors in insect motor nerve terminals. *Neurochemical Research*, *28*, 617–624.
- Marder, E. (2002). Senseless motion. *Nature*, *416*, 131–132.
- Marder, E. & Bucher, D. (2001). Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Current Biology*, *11*, 986–996.
- Marder, E. & Calabrese, R. L. (1996). Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiological Reviews*, *76*, 687–717.
- Marder, E. & Richards, K. S. (1999). Development of the peptidergic modulation of a rhythmic pattern generating network. *Brain Research*, *848*, 35–44.
- Marder, E. & Weimann, J. M. (1991). *Modulatory control of multiple task processing in the stomatogastric nervous system. In: Neurobiology of Motor Programme Selection: New Approaches to Mechanism of Behavioral Choice*. Manchester: Manchester University Press.
- McClellan, A. D. (1982a). Movements and motor patterns of the buccal mass of Pleurobranchaea during feeding, regurgitation and rejection. *The Journal of Experimental Biology*, *98*, 195–211.
- McClellan, A. D. (1982b). Re-examination of presumed feeding motor activity in the isolated nervous system of Pleurobranchaea. *The Journal of Experimental Biology*, *98*, 213–228.
- McCrohan, C. & Benjamin, P. (1980). Synaptic relationship of the cerebral giant cells with motorneurons in the feeding system of *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Experimental Biology*, *85*, 169–186.
- McCrohan, C. R. (1984). Initiation of feeding motor output by an identified interneurone in the snail *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Experimental Biology*, *113*, 351–366.
- Melcher, C., Bader, R., & Pankratz, M. J. (2007). Amino acids, taste circuits, and feeding behavior in *Drosophila*: towards understanding the psychology of feeding in flies and man. *Journal of Endocrinology*, *192*, 467–472.
- Melcher, C. & Pankratz, M. (2005). Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the *Drosophila* brain. *PLoS Biology*, *3*, e305.
- Menees, J. (1962). The skeletal elements of the gnathocephalon and its appendages in the larvae of higher diptera. *Annals of the Entomological Society of America*, *55*, 607–616.

- Meng, X., Wahlstrom, G., Immonen, T., Kolmer, M., Tirronen, M., Predel, R., Kalkkinen, N., Heino, T., Sariola, H., & Roos, C. (2002). The *Drosophila hugin* gene codes for myostimulatory and ecdysis-modifying neuropeptides. *Mechanisms of Development*, *117*, 5–13.
- Mesce, A. M., Amos, T. M., & Clough, S. M. (1993). A light insensitive method for contrast enhancement of insect neurons filled with a cobalt-lysine complex. *Biotechnic & Histochemistry*, *68*, 222–228.
- Meunier, N., Hadj Belgacem, Y., & Martin, J. R. (2007). Regulation of feeding behaviour and locomotor activity by *takeout* in *Drosophila*. *The Journal of Experimental Biology*, *210*, 1424–1434.
- Meyrand, P. & Moulins, M. (1986). Myogenic oscillatory activity in the pyloric rhythmic motor system of Crustacea. *Journal of Comparative Physiology*, *158*, 489–503.
- Meyrand, P., Simmers, J., & Moulins, M. (1991). Construction of a pattern-generating circuit with neurons of different networks. *Nature (London)*, *351*, 60–63.
- Miles, C. I. & Booker, R. (1994). The role of the frontal ganglion in foregut movements of the moth, *Manduca sexta*. *The Journal of Comparative Physiology A*, *174*, 174.
- Miles, C. I. & Booker, R. (1998). The role of the frontal ganglion in the feeding and eclosion behavior of the moth *Manduca sexta*. *The Journal of Experimental Biology*, *201*, 1785–1798.
- Miyakawa, Y., Fujishori, N., Kijima, H., & Morita, H. (1980). Differences in feeding response to sugars between adults and larvae in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, *26*, 685–688.
- Mizutani, K., Ogawa, H., Saito, J., & Oka, K. (2002). Fictive locomotion induced by octopamine in the earthworm. *The Journal of Experimental Biology*, *205*, 265–271.
- Mulloney, B. (1977). Organisation of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. V. Coordination of the gastric and pyloric system. *Journal of Comparative Physiology*, *122*, 227–240.
- Nässel, D. R. & Cantera, R. (1985). Mapping of serotonin-immunoreactive neurons in the larval nervous system of the flies *Calliphora erythrocephala* and *Sarcophaga bullata*, a comparison with ventral ganglia in adult animals. *Cell and Tissue Research*, *239*, 423–434.
- Nusbaum, M. P. & Beenhakker, M. P. (2002). A small-systems approach to motor pattern generation. *Nature*, *417*, 343–350.

- Olsen, S. R. & Wilson, R. I. (2008). Cracking neural circuits in a tiny brain: new approach for understanding the neural circuits of *Drosophila*. *Trends in Neuroscience*, *31*, 512–520.
- Oppliger, F. Y., Guerin, P. M., & Vlimant, M. (2000). Neurophysiological and behavioural evidence for an olfactory function for the dorsal organ and a gustatory one for the terminal organ in *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Insect Physiology*, *46*, 135–144.
- Orchard, I., Belanger, J. H., & Lange, A. B. (1989). Proctolin - a review with emphasis on insects. *Journal of Neurobiology*, *20* (5), 470–496.
- Pearson, K. G. & Iles, J. F. (1971). Innervation of coxal depressor muscles in the cockroach, *Periplaneta americana*. *The Journal of Experimental Biology*, *54*, 215–232.
- Penzlin, H. (1985). Stomatogastric nervous system. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 5 Oxford Pergamon*, 371–407.
- Peters, W. (1999). *Lehrbuch der Entomologie: Ernährung und Verdauung (Kapitel 4)*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Pino, F. D. & Godoy-Herrera, R. (1999). The development of larval behaviours in the mesophragmatic group of species of *Drosophila*. *Behaviour*, *136*, 391–409.
- Python, F. & Stocker, R. F. (2002a). Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *D. melanogaster* despite markedly low number of odorant receptor neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, *445*, 374–387.
- Python, F. & Stocker, R. F. (2002b). Immunoreactivity against choline acetyltransferase, g-aminobutyric acid, histamine, octopamine, and serotonin in the larval chemosensory system of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology*, *453*, 157–167.
- Rachman, N. J. (1980). Physiology of feeding preferences patterns of female black blowflies (*Phormia regina* Meigen) I. The role of carbohydrate reserves. *Journal of Comparative Physiology*, *139*, 59–66.
- Rajashekhar, K. P. & Singh, R. N. (1994). Organization of motor neurons innervating the proboscis musculature in *Drosophila*. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, *23*, 225–242.
- Rast, G. F. & Bräunig, P. (1997). Pilocarpine-induced motor rhythms in the isolated locust suboesophageal ganglion. *The Journal of Experimental Biology*, *200*, 2197–2207.

- Rast, G. F. & Bräunig, P. (2001a). Feeding-related motor patterns of the locust suboesophageal ganglion induced by pilocarpine and IBMX. *Journal of Insect Physiology*, *47*, 43–53.
- Rast, G. F. & Bräunig, P. (2001b). Insect mouthpart motor patterns: central circuits modified for highly derived appendages? *Neuroscience*, *108*, 167–176.
- Reiter, C. (1984). Zum Wachstumsverhalten der Maden der blauen Schmeißfliege *Calliphora vicina*. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, *91*, 295–308.
- Reiter, C. & Hajek, P. (1984). Zum altersabhängigen Wandel der Darmtraktfüllung bei Schmeißfliegenmaden - eine Untersuchungsmethode im Rahmen der forensischen Todeszeitpunktbestimmung. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, *92*, 39–45.
- Reiter, C. & Wollenek, G. (1982). Bemerkungen zur Morphologie forensisch bedeutsamer Fliegenmaden. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, *89*, 197–206.
- Richter, S. (1962). Unmittelbarer Kontakt der Sinneszellen cuticulärer Sinnesorgane mit der Aussenwelt. Eine Licht- und Elektronenmikroskopische Untersuchung der Chemo-rezeptorischen Antennensinnesorgane der *Calliphora* Larven. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, *52*, 171–196.
- Roberts, M. J. (1971). On the locomotion of cyclorrhaphan maggots (Diptera). *Journal of Natural History*, *5*, 583–590.
- Robertson, R. M. (1986). Neuronal circuits controlling flight in the locust: central generation of the rhythm. *Trends in Neuroscience*, *9*, 278–280.
- Robertson, R. M. & Moulins, M. (1984). Oscillatory command input to the motor pattern generators of the crustacean stomatogastric ganglion. II. The gastric rhythm. *Journal of Comparative Physiology*, *154*, 473–491.
- Rohrbacher, J. (1994). Fictive chewing activity in motor neurons and interneurons of the suboesophageal ganglion of *Manduca sexta* larvae. *Journal of Comparative Physiology A*, *175*, 629–637.
- Rose, R. & Benjamin, P. (1981). Interneuronal control of feeding in the pond snail *Lymnaea stagnalis* II. The interneuronal mechanism generating feeding cycles. *The Journal of Experimental Biology*, *92*, 203–228.
- Rose, R. M. & Benjamin, P. R. (1979). The relationship of the central motor pattern to the feeding cycle of *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Experimental Biology*, *80*, 137–163.

- Rose, U., Derst, C., Wanischek, M., Marinc, C., & Walther, C. (2007). Properties and possible function of a hyperpolarisation-activated chloride current in *Drosophila*. *The Journal of Experimental Biology*, *210*, 2489–2500.
- Sasaki, K. & Asaoka, K. (2006). Swallowing motor pattern triggered and modified by sucrose stimulation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, *52*, 528–537.
- Sawin, E. P., Harris, L. R., Campos, A. R., & Sokolowski, M. B. (1994). Sensorimotor transformation from light reception to phototactic behavior in *Drosophila* larvae (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Insect Behavior*, *7*, 553–567.
- Schoofs, A. (2005). Anatomische und elektrophysiologische Untersuchung des stomatogastrischen Nervensystems von *Calliphora*-Larven unter Einfluß von Neuromodulatoren. *Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*.
- Schoofs, A. & Spieß, R. (2007). Anatomical and functional characterisation of the stomatogastric nervous system of blowfly (*Calliphora vicina*) larvae. *Journal of Insect Physiology*, *53*, 349–360.
- Schrader, S. & Merrit, D. (2007). Dorsal longitudinal stretch receptor of *Drosophila melanogaster* larva - fine structure and maturation. *Arthropod Structure and Development*, *36*, 157–169.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., & Heisenberg, M. (2003). Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, *23*, 10495–10502.
- Seath, I. (1977a). The effects of increasing mandibular load on electrical activity in the mandibular closer muscles during feeding in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Physiological Entomology*, *2*, 237–240.
- Seath, I. (1977b). Sensory feedback in the control of mouthpart movements in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Physiological Entomology*, *2*, 147–156.
- Selverston, A. I. (1974). Structural and functional basis of motor pattern generation in stomatogastric ganglion of lobster. *American Zoologist*, *14*, 957–972.
- Selverston, A. I. & Moulins, M. (1987). *The crustacean stomatogastric system*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sewell, D., Burnet, B., & Connolly, K. J. (1974). Genetic analysis of larval feeding rate in *Drosophila melanogaster*. *Genetics Research*, *24*, 163–173.

- Shaver, S., Varnam, C., Hilliker, A., & Sokolowski, M. (1998). The foraging gene affects adult but not larval olfactory-related behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural Brain Research*, *95*, 23–29.
- Siebenaller, U. (2008). Funktionsmorphologie, Neurophysiologie und Neuroanatomie der Schlund- und Körpermuskulatur bei Schmeißfliegenlarven *Calliphora vicina*. *Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*.
- Siegmund, T. & Korge, G. (2001). Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology*, *431*, 431.
- Singh, R. N. (1997). Neurobiology of the gustatory systems of *Drosophila* and some terrestrial insects. *Microscopy Research and Technique*, *39*, 547–563.
- Singh, R. N. & Singh, K. (1984). Fine structure of the sensory organs of *Drosophila melanogaster* Meigen larva (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Insect Morphology and Embryology*, *13*, 255–273.
- Smith, K. G. V. . (1986). *A Manual of Forensic Entomology*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Sokolowski, M. B. (1980). Foraging strategies of *Drosophila melanogaster*: a chromosomal analysis. *Behavior Genetics*, *10*, 291–302.
- Sokolowski, M. B. (1982). *Drosophila* larval foraging behaviour: digging. *Animal Behaviour*, *30*, 1252–1261.
- Sokolowski, M. B., Kent, C., & Wong, J. (1984). *Drosophila* larval foraging behaviour: developmental stages. *Animal Behaviour*, *32*, 645–651.
- Spieß, R., Schoofs, A., & Heinzl, H. G. (2008). Anatomy of the stomatogastric nervous system associated with the foregut in *Drosophila melanogaster* and *Calliphora vicina* third instar larvae. *Journal of Morphology*, *269*, 272–282.
- Steinhaus, E. A. (1940). The microbiology of insects: with special reference to the biologic relationships between Bacteria and Insects. *Bacteriological Reviews*, *4*, 17–57.
- Stewart, B. A., Atwood, H. L., Renger, J. J., & Wang, J. (1994). Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solution. *Journal of Comparative Physiology A*, *175*, 179–191.
- Stocker, R. F. (1994). The organisation of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell and Tissue Research*, *275*, 3–26.

- Straub, V., Staras, K., Kemenes, G., & Benjamin, P. (2002). Endogenous and network properties of *Lymnaea* feeding central pattern generator interneurons. *Journal of Neurophysiology*, *88*, 1569–1583.
- Straub, V. A. & Benjamin, P. R. (2001). Extrinsic modulation and motor pattern generation in a feeding network: a cellular study. *Journal of Neuroscience*, *21*, 1767–1778.
- Szpila, K., Pape, T., & Rusinek, A. (2008). Morphology of the first instar of *Calliphora vicina*, *Phormia regina* and *Lucilia illustris* (Diptera, Calliphoridae). *Medical and Veterinary Entomology*, *22*, 16–25.
- Thomas, J., Bastiani, M., Bate, C., & Goodman, C. (1984). From grasshopper to *Drosophila*: a common plan for neuronal development. *Nature*, *310*, 203–207.
- Thurm, U. (1964). Mechanoreceptors in the cuticle of the honey bee: fine structure and stimulus mechanism. *Science*, *145*, 1063–1065.
- Thurm, U. (1965). An insect mechanoreceptor, part I: fine structure and adequate stimulus. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology*, *30*, 75–82.
- Tissot, M., Gendre, N., & Stocker, R. F. (1998). *Drosophila* P[Gal4] lines reveal that motor neurons involved in feeding persist through metamorphosis. *Journal of Neurobiology*, *37*, 237–250.
- Tissot, M. and Gendre, N., Hawken, A., Störtkuhl, K. F., & Stocker, R. F. (1997). Larval chemosensory projections and invasion of adult afferents in the antennal lobe of *Drosophila*. *Journal of Neurobiology*, *32*, 281–297.
- Tix, S., Minden, J. S., & Technau, G. M. (1989). Pre-existing neuronal pathways in the developing optic lobes of *Drosophila*. *Development*, *105*, 739–746.
- Turrigiano, G. & Selverston, A. (1990). A cholecystokinin-like hormone activates a feeding-related neural circuit in lobster. *Nature (London)*, *344*, 866–868.
- Usai, B. (2008). Elektrophysiologische Untersuchung von sensorischen Eingängen und deren Einfluss auf rhythmische motorische Muster der Pharynx-, und Körpermuskulatur bei Larven von *Calliphora vicina*. *Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*.
- Usherwood, P. N. R. (1962). The nature of “slow“ and “fast“ contractions in the coxal muscles of the cockroach. *Journal of Insect Physiology*, *8*, 31–52.
- Vosshall, L. & Stocker, R. (2007). Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *The Annual Review of Neuroscience*, *30*, 505–533.

- Weber, H. (1974). *Grundriß der Insektenkunde, 5. Auflage*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Weimann, J., Meyrand, P., & Marder, E. (1990). Neurons that form multiple pattern generators: Identification and multiple activity patterns of gastric/pyloric neurons in the crab stomatogastric system. *Journal of Neurophysiology*, *65*, 111–122.
- White, K. & Kankel, D. (1978). Patterns of cell division and cell movement in the formation of the imaginal nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, *65*, 296–321.
- Willey, R. B. (1961). The morphology of the stomodeal nervous system in *Periplaneta americana* (L.) and other Blattaria. *Journal of Morphology*, *108*, 219–261.
- Wilson, D. M. (1961). The central nervous control of locust flight. *The Journal of Experimental Biology*, *38*, 471–490.
- Wilson, D. M. (1966). Central nervous mechanisms for the generation of rhythmic behaviour in arthropods. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, *20*, 199–228.
- Wilson, D. M. & Wyman, R. J. (1965). Motor output patterns during random and rhythmic stimulation of locust thoracic ganglia. *Biophysical Journal*, *5*, 121–143.
- Wilson, R. I., Turner, G. C., & G., L. (2004). Transformation of olfactory representations in the *Drosophila* antennal lobe. *Science*, *303*, 366–370.
- Zilberstein, Y. & Ayali, A. (2002). The role of the frontal ganglion in locust feeding and moulting related behaviours. *The Journal of Experimental Biology*, *205*, 2833–2841.
- Zilberstein, Y., Ewer, J., & Ayali, A. (2006). Neuromodulation of the locust frontal ganglion during the moult: a novel role for insect ecdysis peptides. *The Journal of Experimental Biology*, *209*, 2911–2919.
- Zilberstein, Y., Fuchs, E., Hershtik, L., & Ayali, A. (2004). Neuromodulation for behavior in the locust frontal ganglion. *Journal of Comparative Physiology A*, *190*, 301–309.
- Zinke, I., Kirchner, C., Chao, L. C., Tetzlaff, M. T., & Pankratz, M. J. (1999). Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of *pumpless*, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development*, *126*, 5275–5284.
- Zinke, I., Schütz, C., Katzenberger, J., Bauer, M., & Pankratz, M. J. (2002). Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar dependent response. *The EMBO Journal*, *21*, 6162–6173.