

## 1. Einleitung

Adäquates motorisches Verhalten beruht auf der Integration von sensorischer Information mit der Aktivität zentralnervöser Schaltkreise. Neuronale Netzwerke im Zentralnervensystem (ZNS) generieren motorische Muster, die in Form von Aktionspotentialen von Motoneuronen auf die Skelettmuskeln übertragen werden (Pearson, 1995). Die Fähigkeit zur Erzeugung der grundsätzlichen motorischen Muster ist eine inhärente Eigenschaft zentralnervöser Schaltkreise (Central Pattern Generators, CPGs), da isolierte Nervensysteme in der kompletten Abwesenheit von sensorischer Information so genannte fiktive motorische Muster erzeugen können, ohne dass Bewegung auftritt (Neunauge: Grillner, 1985, Grillner und Wallén, 1985; Heuschrecke: Stevenson und Kutsch, 1987, Ryckebusch und Laurent, 1993; STG: Marder und Bucher, 2001; Stabheuschrecke: Bässler und Büschges, 1998; Manduca: Johnston und Levine, 1996.). Daher hängt das grundsätzliche motorische Muster von den intrinsischen elektrischen Eigenschaften und der Konnektivität der Neurone im jeweiligen CPG ab (Marder und Calabrese, 1996). Sensorische Information ist erforderlich, um die zentral generierten motorischen Muster an unterschiedliche Umweltbedingungen anzupassen (Marder, 2001).

Bei dem Ausführen eines bestimmten Verhaltens sollte jedoch nicht nur eine Einflussnahme auf die mustergenerierende Zentrale möglich sein, sondern alle an einem Verhalten beteiligten Komponenten sollten auf die wechselnden Anforderungen im Verhalten zu modifizieren sein. So müssen beispielsweise Muskeln auf die Ausübung bestimmter Verhaltensweisen derart eingestellt werden, dass zum einen die Effektivität der Übertragung des zentral generierten Musters auf den Muskel optimal an das Verhalten angepasst wird, und zum anderen sollten die Kontraktionseigenschaften der Muskeln selbst so modifiziert werden können, dass sie die optimale Leistung für das Verhalten abrufen können. Eine Gruppe chemischer Substanzen, die so genannten Neuromodulatoren, sind in der Lage fast alle dieser Effekte zu vermitteln (Marder, 1991; Kaczmarek und Levitan, 1987; Selverston, 1993; Pflüger, 1999). Die Vielfalt der Wirkungen dieser neuromodulatorischen Substanzen sind in vielen Arbeiten beschrieben worden. So sind neuromodulatorische Substanzen in der Lage die Empfindlichkeit sensorischer Neurone zu ändern (Pasztor und Bush, 1989; Ramirez und Orchard, 1990). Sie können zudem die Membraneigenschaften einzelner Neurone in einem

Netzwerk ändern (Harris-Warrick und Mader, 1991; Ramirez und Pearson, 1991; Hancox und Pitman, 1991) und die Expression von motorischen Mustern initiieren (Chiel et al., 1986; Harris-Warrick et al., 1992; Stevenson und Kutsch 1988). Ihre Effekte auf die Übertragung an der neuromuskulären Synapse ist bei Vertebraten (Orbeli, 1923; Kuba, 1970) und Invertebraten (Evans und O'Shea, 1977) gezeigt worden. Neuromodulatorische Substanzen können darüber hinaus die Kontraktionseigenschaften von Muskeln (Evans und O'Shea, 1978; Clausen und Flatman, 1977; Malamud et al., 1988) und die metabolischen Prozesse in Muskelfasern (Wegener, 1996) modulieren.

Neben den hier aufgelisteten bekannten modulatorischen Effekten sollte auch die Energieversorgung der an einem Verhalten beteiligten Gewebe auf wechselnde Anforderungen reagieren können. Diese sollte nach jeweiligen energetischen Anforderungen derart zu modifizieren sein, dass eine optimale Energieversorgung bei möglichst geringem Verbrauch der körpereigenen Ressourcen gewährleistet ist. Dies beinhaltet nicht nur die Hoch- und Herunterregulierung eines bestimmten Stoffwechselweges, sondern kann auch den Wechsel von einem Stoffwechselweg zu einem anderen bedeuten.

Neuromodulatoren unterscheiden sich von klassischen Transmittern in vielerlei Hinsicht. Ihre Wirkungen sind im Gegensatz zu denen der klassischen „schnellen“ Neurotransmitter nicht auf die postsynaptische Membran beschränkt sind und meist lang anhalten (Selverston, 1993). Neuromodulatoren aktivieren normalerweise „second messenger“ Signalwege innerhalb der Ziel-Zelle, was zu einer Aktivierung von Proteinkinasen führt, die dann mannigfaltige zelluläre Antworten vermitteln. Die Wirkung über „second messenger“ Signalwege ist jedoch kein Kriterium, das der Unterscheidung zwischen Neurotransmitter und Neuromodulator genügen würde. Für die meisten konventionellen Transmitter, mit Ausnahme von Glycin, wurde gezeigt, dass diese auch an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden können, die ihrerseits „second messenger“ Signalwege aktivieren (Bernard et al., 1990).

Neuromodulatoren werden meist parakrin aus Varikositäten ausgeschüttet. Bei neuromodulatorischen Neuronen findet man diese Varikositäten sowohl an zentralen Verzweigungen als auch an spezialisierten Abschnitten der Axone und an den Terminalen. Das bedeutet, dass die neuromodulatorischen Substanzen entweder lokal im ZNS oder an bestimmten Muskelfasern freigesetzt werden können; sie können aber auch unspezifisch an das Kreislaufsystem abgegeben werden. Je nachdem, wo eine neuromodulatorische Substanz ausgeschüttet wird, vermag sie unterschiedliche Effekte zu vermitteln (Marder, 1991), was

eine klare Trennung zwischen den Begriffen Neurohormon und Neuromodulator oft schwierig macht. Bekannte neuromodulatorische Substanzen sind Peptide wie CCAP, Allatostatin, FMRF-Amid und Proctolin sowie biogene Amine wie Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Oktopamin und Serotonin.

So weitreichend wie die Erkenntnisse über die Wirkung von Neuromodulatoren sind (siehe Kaczmarek und Levitan, 1987; Marder, 1991), so gering ist jedoch die Kenntnis über die Neurone, die neuromodulatorische Substanzen ausschütten. Es ist nur sehr wenig darüber bekannt, in welchem Verhaltenskontext neuromodulatorische Zellen die Modulatorsubstanzen freisetzen, und ob die Freisetzung des Neuromodulators im Rahmen eines bestimmten Verhaltens beliebig erfolgt. Ferner ist auch unklar, ob die Freisetzung des Modulators an bestimmte Phasen eines zentral generierten Musters gekoppelt ist und ob eine solche Kopplung notwendig ist, um den modulatorischen Effekt zu vermitteln.

Um der Vielfalt dieser Fragen gerecht werden zu können, bedarf es eines Systems, in dem sowohl die Aktivitätsmuster von identifizierten modulatorischen Neuronen als auch deren Zielgewebe und die Wirkungen der modulatorischen Substanz auf diese Zielgewebe weitgehend bekannt sind. Das ist bei den oktopaminergen, efferenten, thorakalen DUM (dorsal unpaired median) Neuronen der Wanderheuschrecke, *Locusta migratoria*, der Fall. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine Population von Zellen, deren Somata in der dorsalen Mittellinie der Ganglien lokalisiert sind und die bilateralsymmetrisch projizierende Axone haben. Sie wurden ursprünglich von Plotnikova (1969) beschrieben und erhielten in späteren Arbeiten ihren Namen aufgrund der oben beschriebenen Lokalisation (Hoyle et al., 1974). In der Heuschrecke sind die thorakalen, efferenten DUM Neurone die einzige Population efferenter Neurone, die Oktopamin in der Peripherie ausschütten (Evans und O'Shea, 1977, Evans, 1985; Orchard und Lange, 1985; Stevenson und Spörhase-Eichmann, 1995). Anatomisch lassen sich die DUM Neurone durch ihre unterschiedlichen Projektionen in die verschiedenen thorakalen Seitennerven unterscheiden (Watson, 1984; Campbell et al., 1995). DUM Neurone, die nur durch den Nerv 3 projizieren, werden DUM3 Neurone genannt und dementsprechend werden DUM Neurone, die durch die Seitennerven 3, 4 und 5 projizieren, DUM3,4,5 Neurone genannt. Für die Heuschrecke ist sowohl die Gesamtanzahl der DUM Neurone in den thorakalen Ganglien bekannt, als auch die Häufigkeit der jeweiligen morphologischen Typen (Duch et al., 1999). Das Prothorakalganglion der Heuschrecke enthält 8-10 DUM Neurone und die beiden pterothorakalen Ganglien enthalten jeweils 19 DUM Neurone (Stevenson et al., 1992, Stevenson und Spörhase-Eichmann, 1995, Duch et al.,

1999). Die unterschiedlichen morphologischen Typen sind für das Metathorakalganglion von Campbell (1995) und für das Pro- und Mesothorakalganglion von Duch et al. (1999) beschrieben worden. In den pterothorakalen Ganglien kennt man fünf unterschiedliche Typen von DUM Neuronen. Man unterscheidet hier zwischen DUM1, DUM3, DUM3,4; DUM3,4,5 und DUM5 Neuronen. Auch im Prothorakalganglion gibt es 5 unterschiedliche morphologische Typen; allerdings findet man dort keine DUM3 Zellen, sondern eine DUM Zelle, die ins Unterschlundganglion projiziert (DUM-SOG Zelle). DUM Zellen besitzen wahrscheinlich keine zentralen Ausgangssynapsen (Watson, 1984), haben jedoch an einigen zentralen Neuriten präsynaptische Strukturen (Pflüger und Watson, 1995). Diese sind allerdings weder mit postsynaptischen Strukturen anderer Zellen assoziiert, noch zeigten elektronenmikroskopische Studien Vesikel in diesen präsynaptischen Strukturen (Pflüger und Watson, 1995). Diese zentralen präsynaptischen Strukturen können jedoch als ein Indiz für eine mögliche parakrine Freisetzung von Oktopamin im ZNS gewertet werden, zumal DUM Neurone auch in der Peripherie Oktopamin nicht aus konventionellen Synapsen sondern aus Varikositäten freisetzen. Allerdings ist bisher in keinem Insekt eindeutig gezeigt worden, dass DUM Neurone in der Lage sind, zentrale modulatorische Effekte zu vermitteln. Es finden sich nur wenige Hinweise auf eine zentrale modulatorische Wirkung durch DUM Neurone. Parker zeigte 1996, dass die Stimulation von DUM Neuronen verschiedene Effekte auf Beinmotoneurone vermittelt. Die von Parker (1996) beschriebenen Effekte waren allerdings sehr variabel und eine Relevanz für einen Verhaltenskontext wurde nicht gezeigt. Einen weiteren Hinweis liefert die Arbeit von Kalogianni und Theophilidis (1993), die zeigten, dass DUM Neurone zentral die Erregbarkeit von Ovidukt-Motoneuronen erhöhen. Die Tatsache, dass diese Zellen morphologisch katalogisiert sind und die Tatsache, dass es die einzigen thorakalen efferenten Neurone sind, die Oktopamin in der Peripherie ausschütten, machen sie zu höchst geeigneten Kandidaten, um die modulatorischen Effekte dieser Zellen in einem Verhaltenskontext zu untersuchen.

Die Effekte, die Oktopamin in der Peripherie zu vermitteln vermag, waren Gegenstand zahlreicher Arbeiten (siehe Bräunig und Pflüger, 2001; Roeder, 1999). Seit seiner Entdeckung 1951 (Erspamer und Boretti) in den Speicheldrüsen von *Octopus*, ist das biogene Amin Oktopamin (p-Hydroxyethanolamin) für die meisten untersuchten Invertebraten nachgewiesen worden. Aufgrund seiner ähnlichen chemischen Struktur und Wirkungsweise von Oktopamin mit Noradrenalin wird das oktopaminerge System der Invertebraten oft als funktionell homolog zu dem noradrenergen System der Vertebraten angesehen. In den meisten

Invertebraten wird Oktopamin in einem zweistufigen Syntheseprozess aus Tyrosin synthetisiert (Tyrosin  $\rightarrow$  Tyramin  $\rightarrow$  Oktopamin). In *Locusta migratoria* ist noch ein alternativer Syntheseweg gezeigt worden. Die Applikation von L-DOPA führte in kultivierten Ganglien von *Locusta* zu einem erhöhten Oktopaminspiegel (Walker und Kerkut, 1978). So wird teilweise davon ausgegangen, dass der Syntheseweg von Oktopamin in Heuschrecken über L-DOPA läuft (Tyrosin  $\rightarrow$  DOPA  $\rightarrow$  Dopamin  $\rightarrow$  Tyramin  $\rightarrow$  Oktopamin, Walker und Kerkut, 1978). Die Rolle von Oktopamin als Neurotransmitter, Neurohormon und Neuromodulator ist seitdem in vielen Invertebratensystemen beschrieben worden (Axelrod und Saavedra, 1977; Orchard, 1982; Evans, 1985; Roeder, 1999). Die modulatorischen Effekte von Oktopamin im ZNS und in der Peripherie sind besonders bei Insekten gut untersucht. Im ZNS können durch die iontophoretische Injektion von Oktopamin in bestimmte Neuropilgebiete motorische Verhaltensweisen wie Laufen (Sombati und Hoyle, 1984) und Flug (Sombati und Hoyle, 1984; Stevenson und Kutsch, 1988) ausgelöst werden. Dies ist von Weisel-Eichler und Libersat (1996) auch für die Schabe *Periplaneta americana* gezeigt worden, bei der die Applikation von Oktopamin die Initiation von Flug moduliert. Des Weiteren wirkt Oktopamin auf die Membraneigenschaften von Interneuronen und Motoneuronen des Flug- und Ventilationssystems bei Heuschrecken (Ramirez und Pearson, 1991a,b) und moduliert die Erregbarkeit von Beinmotoneuronen (Parker, 1996). In zwei Systemen ist darüber hinaus gezeigt worden, dass die Stimulation von identifizierten oktopaminergen Zellen zu modulatorischen Effekten im ZNS führt. Bei der Honigbiene reicht die Stimulation einer identifizierten oktopaminergen Zelle aus, um den unconditionierten Stimulus (US) während der klassischen Konditionierung auf Düfte zu ersetzen (Hammer, 1993). In der Heuschrecke führt die Stimulation einer identifizierten oktopaminergen Zelle zur Dishabituation eines descendierenden, optischen Interneurons (Bacon et al., 1995). Diese beiden Beispiele sind jedoch die Einzigen, in denen zentrale modulatorische Effekte von Oktopamin durch Stimulation einer oktopaminergen Zelle nachgeahmt werden konnte.

In der Peripherie sind im Gegensatz zum ZNS weitaus mehr oktopamin-vermittelte Effekte beschrieben worden. In Muskeln ist Oktopamin in der Lage die Grundspannung zu reduzieren, myogene Rhythmen zu hemmen, sowie die Kontraktionskraft und die Relaxationsgeschwindigkeit von Visceral- und Skelettmuskeln zu erhöhen (Evans und O'Shea, 1978; Evans und Siegler, 1982; Orchard und Lange, 1985; Malamud et al., 1988; Whim und Evans, 1988; Kalogianni und Pflüger, 1992). Ferner hat Oktopamin modulatorische Effekte auf Sinnesorgane. So wurde für die Stabheuschrecke und

Wanderheuschrecke gezeigt, dass es zur Sensibilisierung von Propriozeptoren der Flügel und Beine beiträgt (Ramirez und Orchard, 1990; Ramirez et al., 1993; Matheson, 1994,1997; Bräunig und Eder, 1998). Auch im Zusammenhang mit metabolischen Prozessen in den Flugmuskeln von Heuschrecken wird die modulatorische Rolle von Oktopamin diskutiert. In den Flugmuskeln von Heuschrecken führt Oktopamin zu der Erhöhung von Fructose 2,6-Bisphosphat (F2,6BP), einem potenten Aktivator der Glykolyse (Blau et al., 1994,; Blau und Wegener, 1994), was bedeutet, dass Oktopamin in den Flugmuskeln von Heuschrecken zu einer Erhöhung der Glykolyse-Rate führen könnte (Becker et al., 1996; Wegener, 1996). Als Neurohormon wird Oktopamin adipokinetische Aktivität bei der Aktivierung der Hormone AKH1 und AKH2 zur Freisetzung von Lipiden aus dem Fettkörper der Heuschrecke und dem Transport dieser Lipide zu den Flugmuskeln zugesprochen (Agricola et al., 1988; Orchard et al., 1993).

Die zentralen und peripheren modulatorischen Effekte von Oktopamin und die Tatsache, dass die gut beschriebenen efferenten, thorakalen DUM Neurone die einzige periphere Quelle von Oktopamin sind, haben zu unterschiedlichen Modellen über die Rolle von DUM Neuronen und damit die Effekte von Oktopamin im Verhaltenskontext geführt. Ein Modellsystem postuliert für die Rolle der DUM Neurone eine „allgemeine unspezifische Erhöhung des Erregungsniveaus“, was wieder dem Vergleich mit dem noradrenergen System der Vertebraten entsprechen würde. Gestützt wird dieses Modell durch zahlreiche frühe Arbeiten. So zeigten Hoyle und Dagan (1978) in ihrer Arbeit, dass alle metathorakalen DUM Neurone vor einer jeden Beinbewegung feuern sollen. Es wurde auch gezeigt, dass alle DUM Neurone während des Fluges aktiviert werden sollen (Orchard et al., 1993), und dass einige prothorakale DUM Neurone während der ersten Schritte beim Laufen der Grille aktiviert werden (Gras et al., 1990). Unterstützt wird dieses Modell durch die anatomischen Befunde, denn zum einen versorgen DUM Neurone Muskeln auf beiden Körperseiten und rufen dort die oben beschriebenen Effekte hervor, und zum anderen zeigen einige DUM Neurone neurohämale Strukturen außerhalb von Muskeln. DUM1b Neurone formen ein Netzwerk von Varikositäten auf symphatischen Nerven (Bräunig et al., 1994) und verschiedene andere Typen von DUM Neuronen besitzen neurohämale Strukturen an der Oberfläche von peripheren Nerven (Bräunig, 1997).

Neuere Arbeiten haben im Gegensatz dazu allerdings eindeutig gezeigt, dass DUM Neurone spezifisch für bestimmte motorische Programme aktiviert werden und im Rahmen

dieser Verhaltenskontexte definierte modulatorische Effekte hervorrufen. Es konnte für abdominale DUM Neurone, die das Ovidukt innervieren, gezeigt werden, dass ihre Aktivität eng an die Aktivität von zyklisch feuernenden Motoneuronen während neurogener Kontraktionen des Ovidukts gekoppelt ist (Kalogianni und Theophilidis, 1993). Kalogianni und Pflüger (1992) zeigten darüber hinaus, dass die orthodromische Stimulation dieser DUM Neurone sowohl zu einer Modulation der myogenen Kontraktionen des Oviduktes führen, als auch zu einer Modulation der neurogenen rhythmischen Kontraktionen (Kalogianni und Theophilidis, 1993). Burrows und Pflüger (1995) haben gezeigt, dass während des motorischen Programms, das dem „Kick“ zugrunde liegt, unterschiedliche Typen von DUM Neuronen differentiell aktiviert werden. Während dieses motorischen Programms erhalten nur diejenigen DUM Neurone erregende Eingänge, die Beinmuskeln innervieren. Die DUM Neurone, die andere Zielgebiete haben, zeigen entweder keine Änderung in ihrer Aktivität oder erhalten inhibitorische Eingänge. Dies ist auch für das motorische Programm des Fluges gezeigt worden (Duch und Pflüger, 1999). Auch hier werden die DUM Neurone, die Beinmuskeln innervieren, meist überschwellig erregt, und die DUM Neurone, die Flugmuskeln innervieren, erhalten inhibitorische Eingänge. Baudoux et al. (1999) haben gezeigt, dass in einem isolierten Metathorakalganglion, in dem durch die Applikation von Pilocarpin ein „laufähnlicher“ motorischer Rhythmus ausgelöst wurde (Ryckebusch und Laurent, 1993), die Typen von DUM Neuronen, die die Beinmuskeln innervieren, an eine bestimmte Phase des motorischen Rhythmus ankoppeln. Auch in diesem Präparat zeigten die DUM Neurone, die keine Beinmuskeln innervieren, keine Änderung ihrer Aktivität, oder zeigten rhythmische hyperpolarisierende Eingänge, die allerdings mit keiner Phase des Rhythmus korrelierten. Es ist auch gezeigt worden, dass die unterschiedlichen Subpopulationen von DUM Neuronen von unterschiedlichen präsynaptischen Netzwerken versorgt werden (Baudoux und Burrows, 1998; Duch et al., 1999). So erhalten alle DUM5 und DUM3,4,5 Neurone einerseits und alle DUM3 und DUM3,4 andererseits zu einem Großteil gemeinsame Eingänge innerhalb eines Ganglions (Baudoux und Burrows, 1998). DUM5 und DUM3,4,5 Neurone erhalten auch intersegmental zu einem Großteil gemeinsame Eingänge, was für DUM3 und DUM3,4 Neurone nicht zutrifft (Duch et al., 1999).

Alle Arbeiten, die sich mit den modulatorischen Effekten von Oktopamin im ZNS oder in der Peripherie beschäftigt haben, sind entweder an semi-intakten Präparationen oder an isolierten Ganglien durchgeführt worden. Bis auf wenige Ausnahmen wurde Oktopamin in diesen Arbeiten von extern appliziert. Es ist also nicht in allen Fällen bekannt, ob z.B.

Sinnesorgane, die durch Oktopamin sensitisiert werden, überhaupt durch oktopaminerge Zellen innerviert werden, und ob der beobachtete Effekt für ein Verhalten relevant ist oder nicht. In anderen Arbeiten, in denen die Aktivität von DUM Neuronen in einem „fiktiven“ Verhaltenskontext untersucht wurde, wurden diese „fiktiven“ motorischen Muster teilweise durch die Applikation von Pharmaka induziert. Eine Wechselwirkung der untersuchten DUM Neurone mit den Pharmaka wurde allerdings nicht berücksichtigt.

Was allen bisherigen Arbeiten fehlt, die sich mit der Aktivität der DUM Neurone und der damit verbundenen Modulation in der Peripherie durch die Ausschüttung von Oktopamin befassen, ist die genaue Kenntnis der Aktivitätsmuster der DUM Neurone in einem intakten Tier, das ein spezifisches Verhalten ausführt. Darüber hinaus ist eine mögliche funktionelle Rolle der Aktivität von DUM Neuronen für den Stoffwechsel ihrer Zielgewebe bislang nicht untersucht worden, obwohl bekannt ist, dass Oktopamin den Stoffwechsel von Flugmuskeln der Wanderheuschrecke beeinflusst, und dass diese Flugmuskeln von DUM Neuronen innerviert werden.

Frühere Arbeiten haben sich mit der neuronalen Aktivität, die dem Laufen zu Grunde liegt, in verschiedenen Ansätzen genähert. Ryckebusch und Laurent (1993) haben ein isoliertes Präparat vorgestellt, in dem sich durch die Applikation von Pilocarpin rhythmische Aktivität in den Motoneuronen der Beinmuskulatur auslösen ließ, die aufgrund ihrer Ähnlichkeiten zum motorischen Rhythmus, wie er bei frei laufenden Heuschrecken beobachtet wurde, als „fiktiver-lauffählicher“ Rhythmus beschrieben wurde. Dieses Präparat wurde von Baudoux et al. (1999) benutzt, um die Aktivität der thorakalen efferenten DUM Neurone während dieses „fiktiven“ Laufmusters zu untersuchen. Ihre Ergebnisse zeigten eine differentielle Aktivierung der DUM Neurone während dieses Rhythmus. Alle DUM Neurone, die die Beinmuskulatur innervieren, erhielten während dieses Rhythmus erregende Eingänge während der Levatorphase des motorischen Programms. Alle anderen DUM Neurone hingegen zeigten entweder inhibitorische Eingänge, die nur teilweise an die Levatorphase gekoppelt waren, oder keine Änderung in ihrer Aktivität. Um zu überprüfen, ob diese differentielle Aktivierung bestimmter Typen von DUM Neuronen auch im frei laufenden Tier stattfindet, soll im Rahmen dieser Doktorarbeit extrazelluläre Elektroden entwickelt werden, die chronisch in das Tier implantiert werden können, ohne das Tier nachhaltig in seinem Verhalten zu beeinflussen. Mit Hilfe der implantierten Elektroden soll die neuronale Aktivität während des Verhaltens aufgezeichnet werden. Durch computergestützte Analyseverfahren

sollen die Signale von DUM Neuronen in den Verhaltensspuren identifiziert werden und ihre Aktivitätsmuster während des Laufens ermittelt und dargestellt werden.

Darüber hinaus wird die Aktivierung der efferenten DUM Neurone während eines zentral generierten Musters im Mesothorakalganglion untersucht. Diese Präparation wurde 2001 von Knop et al. vorgestellt und zeigt, dass das Durchtrennen der anterioren und posterioren Konnektive des Mesothorakalganglions zu der Etablierung eines Rhythmus in diesem Ganglion führt. In der Arbeit von Knop wurde der sensorische Einfluss von sensorischer Rückkopplung auf diesen zentral generierten Rhythmus gezeigt. Da dieses Präparat Ähnlichkeiten mit dem von Ryckebusch und Laurent (1993) vorgestellten Präparat zeigt, wird es im Rahmen dieser Arbeit dazu genutzt werden, um die Aktivität der DUM Neurone während dieses nicht pharmakologisch induzierten zentralen Rhythmus zu untersuchen. Dieses Präparat bietet zu dem den Vorteil, dass die sensorische Rückkopplung innerhalb des untersuchten Segments erhalten bleibt, und dass der Einfluss von applizierten Pharmaka sowohl auf den Rhythmus, als auch auf die Aktivität der DUM Neurone ausgeschlossen werden kann.

Ein weiteres Verhalten, bei dem die differentielle Aktivierung von DUM Neuronen beobachtet wurde, ist der Flug der Heuschrecke (Duch und Pflüger, 1999). In dieser Arbeit soll untersucht werden, welche funktionelle Bedeutung die differentielle Aktivität verschiedener Typen von DUM Neuronen für den Stoffwechsel der Flugmuskeln hat. Wie oben bereits erwähnt, wird die Rolle von Oktopamin als multifunktionaler Neuromodulator und Neurohormon im Flugsystem diskutiert. Duch und Pflüger entwickelten ein Modell (1999), das den bisherigen Kenntnisstand über die Aktivität der DUM Neurone während des Fluges in die vorhandenen Daten zu den metabolischen Effekten von Oktopamin zu integrieren versucht. Auf den ersten Blick scheint die Hemmung der DUM Neurone, die die Flugmuskeln innervieren, in einem nicht vereinbaren Gegensatz zu den Ergebnissen früherer Arbeiten zu stehen. Von Oktopamin ist bekannt, dass es zentrale Wirkungen auf das zentrale Netzwerk hat, das den Flug generiert (Stevenson und Kutsch, 1988; Ramirez und Pearson, 1991). Neben diesen Effekten ist es in der Lage, die Kontraktionseigenschaften von Flugmuskeln zu modulieren (Malamud et al., 1988; Whim und Evans, 1988; Stevenson und Meuser, 1997), außerdem spielt es bei der Sensibilisierung des Flügelstreckrezeptors eine Rolle (Ramirez und Orchard, 1990). Es stellt sich also die Frage, warum dann die DUM Neurone, die Flugmuskeln innervieren, während des Fluges gehemmt werden. Dieser Gegensatz wurde sowohl durch Arbeiten verstärkt, in denen gezeigt wurde, dass Oktopamin adipokinetische

Aktivität auf den Fettkörper von *Locusta* hat (Orchard et al., 1982; Van Heusden et al., 1984, Wang et al., 1990), als auch durch die Tatsache, dass die Konzentration von Oktopamin in der Hämolymphe während der ersten 5-10 Minuten des Fluges drastisch ansteigt (Goosey und Candy 1989, 1982; Orchard, 1987). In Ihrem Modell lösen Duch und Pflüger (1999) diesen Widerspruch zumindest theoretisch auf. Hier führt die Inhibition der DUM Neurone, die die Flugmuskeln innervieren, zu einem Abfall des Oktopaminspiegels in den Flugmuskeln in den ersten 5 Minuten. Dass dies der Fall ist, wurde in früheren Arbeiten schon gezeigt (Goosey und Candy, 1982; Wegener et al., 1986). Die Abnahme von Oktopamin im Flugmuskel führt in dem Modell von Duch und Pflüger (1999) zu einer Abnahme von Fructose 2,6-Bisphosphat (F2,6BP), welches ein starker Aktivator der Glykolyse ist. Diese Reduzierung von F2,6BP führt dann zu einem Umschalten von Zuckerstoffwechsel auf Fettstoffwechsel im Flugmuskel. Dass dies sinnvoll wäre, ergibt sich aus der Tatsache, dass die ATP-Umsatzrate in Flugmuskeln während des Fluges um mehr als ein hundertfaches erhöht wird (Kammer und Heinrich, 1978, Beenackers et al., 1984; Wegener, 1990). Ohne eine schnelle Neusynthetisierung von Adenosintriphosphat (ATP) wären die Speicher für ATP und Argininphosphat schätzungsweise innerhalb einer Sekunde leer (Wegener 1990). Um den hohen Bedarf an Energie auf Dauer decken zu können, scheint es notwendig von dem „teuren“ Zuckerstoffwechsel auf den „preiswerteren“ Fettstoffwechsel umzuschalten. In dieser Arbeit soll das von Duch und Pflüger entwickelte Modell überprüft werden. Durch Stimulation von DUM Neuronen soll eine gezielte Ausschüttung von Oktopamin auf einen Flugmuskel erreicht werden. Mit anschließenden biochemischen Essays soll dann der Effekt, den das von den DUM Neuronen ausgeschüttete Oktopamin in Bezug auf den Stoffwechsel im Muskel hervorruft, überprüft werden.

In dieser Arbeit werden weitere Ergebnisse präsentiert, die zeigen, dass DUM Neurone nicht kollektiv sondern differentiell aktiviert werden. Darüber hinaus wird gezeigt werden, dass die Aktivität von DUM Neuronen und damit die Ausschüttung von Oktopamin im Flugmuskel den Gehalt von F2,6BP im Flugmuskel erhöht, was das Modell von Duch und Pflüger (1999) bestätigt, und damit einen möglichen Mechanismus aufzeigt, der den Wechsel zwischen verschiedenen Stoffwechselwegen im Flugmuskel der Heuschrecke durch zentrale modulatorische Neurone erlaubt. Ferner wird eine neu entwickelte Methode der dauerhaften Ableitung neuronaler Aktivität durch chronisch implantierte Elektroden vorgestellt, die es möglich macht, neuronale Aktivität über lange Zeiträume zu beobachten. Die Qualität und die Möglichkeiten, die diese Methode bietet, wird im folgenden Abschnitt in einer Kooperation mit der AG Duch am System von *Manduca sexta* vorgestellt werden.

Wie oben erwähnt ist eines der Hauptziele dieser Arbeit die Entwicklung von chronisch implantierbaren Hakenelektroden, mit denen aus intakten Tieren während des Verhaltens die Aktivität von DUM Neuronen aus peripheren Nerven extrazellulär abgeleitet werden soll. Während der experimentellen Phase dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass die hier entwickelten Elektroden sich hervorragend eignen, um aus intakten Tieren während des Verhaltens über längere Zeit hinweg motorische Aktivität abzuleiten. Das ist in früheren Arbeiten immer mit Hilfe von extrazellulären Muskelableitungen durchgeführt worden (Burns und Usherwood, 1979; Duch und Pflüger, 1995). Solche Muskelableitungen sind allerdings nicht in allen Insekten Systemen möglich. Während der Metamorphose holometaboler Insekten sind solche Muskelableitungen nicht möglich, da die meisten Muskeln während der späten Larvalstadien degenerieren (Weeks und Truman, 1986; Consoulas et al., 2000; Tissot und Stocker, 2000). Nun ist aber das Wissen über die Aktivität der Motoneurone gerade während dieser Entwicklungsstadien in holometabolen Insekten besonders wichtig, da nur so die Rolle von motorischer Aktivität für die strukturelle Veränderungen der neuromuskulären Systeme, wie sie während der Metamorphose stattfinden, erforscht werden kann. Genau zu diesem Zweck sind die in dieser Arbeit entwickelten chronischen Elektroden-Implantate in einer Kooperation mit Dr. Carsten Duch beim Tabakschwärmer, *Manduca sexta*, eingesetzt worden. Im Folgenden soll kurz der wissenschaftliche Hintergrund dieser Experimente dargestellt werden:

Während der Metamorphose holometaboler Insekten finden dramatische Verhaltensänderungen statt. Larvale motorische Verhalten (Kriechen, Fressen) stellen vollkommen andere Anforderungen an das neuromuskuläre System, als adulte (Flug, Laufen, Fortpflanzung). Dementsprechend kommt es während der Metamorphose zu drastischen strukturellen Veränderungen im ZNS und im Muskelsystem (Consoulas et al., 2000; Tissot und Stocker, 2000). Da die Metamorphose von Insekten durch das Steroidhormon Ecdyson kontrolliert wird, dienen holometabole Insekten wie *Manduca sexta* und *Drosophila melanogaster* als vorzügliche Modellsysteme, um die Rolle von Steroidhormonen für postembryonale Veränderungen des neuromuskulären Systems zu untersuchen (Weeks und Truman, 1986; Truman, 1990; 1996; Levine et al., 1995; Levine und Weeks, 1996).

Darüber hinaus steht auch das motorische Verhalten während jeder Häutung bei holometabolen Insekten unter hormoneller Kontrolle; es wird durch Kaskaden von Peptidhormonen kontrolliert, die ihrerseits wiederum durch Änderungen der Blut-Ecdyson-Konzentrationen hervorgerufen werden (Gammie und Truman, 1997; Zitnan et al., 1999, Mesce und Fahrbach, 2002).

Man weiß allerdings nur sehr wenig über mögliche funktionelle Wechselwirkungen zwischen Hormon-Effekten und anderen Mechanismen, wie z. B. aktivitätsabhängigen Mechanismen für die Entwicklung neuromuskulärer Systeme. Aktivitätsabhängiger Kalzium-Einstrom ist kürzlich als ein möglicher solcher Mechanismus für strukturelle Veränderungen von *Manduca* Motoneuronen während der postembryonalen Entwicklung vorgeschlagen worden (Duch and Levine, 2000; 2002). Darüber hinaus konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass Denervierungen zu vermehrtem axonalen Sprouting von Motoneuronen führen können (Keshishian et al., 1993), und dass in hyper-erregbaren Mutanten die Anzahl axonaler Verzweigungen erhöht sein kann (Budnik et al., 1990). Genau an dieser Frage soll diese Arbeit mit Hilfe des Einsatzes chronisch implantierter Elektroden ansetzen. In *Manduca sexta* soll die Aktivität identifizierter Motoneurone während der normalen Entwicklung in intakten Tieren gemessen und manipuliert werden, um herauszufinden, ob aktivitätsabhängige Mechanismen für die bekannten strukturellen Veränderungen dieser Neurone von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich um die Motoneurone des dorsalen longitudinalen Flugmuskels (DLM) der adulten Motte.

Der DLM von *Manduca sexta* entwickelt sich während der Metamorphose aus einem "Template" von partiell degenerierten larvalen Muskelfasern und extrinsischen Myoblasten (Duch et al., 2000). Jeder der 5 adulten Muskelfaserbündel wird von einem einzelnen Motoneuron innerviert, MN1-5. MN1-5 sind so genannte persistierende larvale Motoneurone, d.h. sie besitzen im Larvalstadium eine Funktion, überleben die Degeneration ihrer larvalen Zielmuskeln während der Metamorphose, und innervieren im Adultstadium einen neu gebildeten Muskel. In der Larve innervieren MN1-5 langsam kontrahierende Kriechmuskeln der dorsalen Körperwand (Duch et al., 2000). Während der späten Larvalstadien werden die Axon-Terminalen dieser Motoneurone von den degenerierenden larvalen Zielmuskeln zurückgezogen (Duch et al., 2000). Die zurückgezogenen Terminalen bilden verdickte Strukturen aus kondensierter Membran, so genannte „Tufts“, die als attraktive Signale für akkumulierende Myoblasten dienen (Bayline et al., 2001). Während der Puppenstadien wachsen die Axon-Terminalen auf den sich entwickelnden DLM aus (Duch et al., 2000). Während dieses Umgestaltungsprozesses werden auch die dendritische Architektur und die Membraneigenschaften der Motoneurone MN1-5 verändert (Duch und Levine, 2000; 2002, Libersat und Duch, 2002).

Während der späten Larvalstadien korrelieren wichtige strukturelle Änderungen (Retraktion von Axon-Terminalen, Retraktion von Dendriten, Myoblasten-Akkumulation)

zeitlich mit ganz bestimmten motorischen Verhalten. Die späte Larve durchläuft zu dieser Zeit die so genannten „Wanderphasen“. Fünf Tage vor der Puppenhäutung, am Tag Wanderer 0 (W0), endet die Nahrungsaufnahme der Larve. Darauf folgen 3 distinkte Verhaltensweisen während der folgenden 4 Tage (Stadien W1-W4). Die Tage W1 und W2 sind durch erhöhte Lokomotion, Kriechen und Graben gekennzeichnet. Die Larve gräbt sich in der Erde ein. Darauf folgt an den Tagen W3 und W4 eine Reduktion der Lokomotion bis schließlich am Tag W4 keine motorische Aktivität mehr stattfindet. Die Larve wartet unter der Erde auf die Verpuppung (Reinecke et al., 1980; Dominick und Truman, 1984a). Die Puppenhäutung findet am Tag W4 statt und kann in „pre-ecdysis“ und „ecdysis“ Muster unterteilt werden. „Pre-ecdysis“ ist durch rhythmische dorso-ventrale Flexionen der anterioren Körperhälfte gekennzeichnet (Miles and Weeks, 1991). Darauf folgt die eigentliche Häutung („ecdysis“), während derer die larvale Kutikula abgestreift wird (Reinecke et al., 1980; Truman et al., 1980).

Die Retraktion der axonalen Prozesse von MN1-5 korreliert zeitlich mit der Abnahme motorischer Aktivität während der Stadien W2 bis W4, wohingegen der Beginn des erneuten Auswachsens der Axone mit der erhöhten motorischen Aktivität während der Puppenhäutung korreliert.

In dieser Arbeit wurde die Aktivität der Motoneurone MN1-5 mit Hilfe von chronisch implantierten Elektroden in intakten Larven abgeleitet, während diese sich von Stadium W2 bis zur Puppenhäutung entwickelten. Auf die Bestimmung der Aktivität von MN1-5 während der Stadien W2 bis W4 folgten Manipulationsexperimente. Durch elektrische Stimulation wurde die normale Aktivität von MN1-5 während der Entwicklung verändert, um zu testen, welche Auswirkungen Aktivität auf die Retraktion und das Auswachsen der Axone von MN1-5 hat.