

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Aktivität von DUM Neuronen während des Laufens

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Aktivität der thorakalen modulatorischen efferenten DUM Neuronen während des Laufens in einem frei beweglichen intakten Tier zu ermitteln. Durch die gewonnenen Erkenntnisse der Aktivitätsmuster dieser Zellen während des Verhaltens sollten Rückschlüsse auf mögliche modulatorische Effekte von Oktopamin auf die Muskulatur, die beim Laufen aktiv ist, gezogen werden können. Befunde früherer Arbeiten (Hoyle und Dagan, 1978; Orchard et al., 1993) führten zu der Annahme, dass alle DUM Neurone unspezifisch vor einem Verhalten feuern und es somit zu einer 'allgemeinen unspezifischen Erhöhung des Erregungsniveaus' kommt. So sollten alle metathorakalen DUM Neurone einige Male vor einer jeden Beinbewegung feuern (Hoyle und Dagan, 1978) und alle Typen von efferenten DUM Neuronen während des Fluges aktiviert werden (Orchard et al., 1993). Spätere Arbeiten haben gezeigt, dass DUM Neurone in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden können, die spezifisch in unterschiedlichen Verhaltenskontexten rekrutiert werden (Baudoux et al., 1998, Duch et al., 1999, Duch und Pflüger, 1999; Burrows und Pflüger, 1995). Es spricht also einiges dafür, dass Oktopamin in verschiedenen Verhaltenskontexten jeweils zeitlich und räumlich begrenzt durch die spezifische Aktivierung von Gruppen von DUM Neuronen freigesetzt wird. Um dies genauer beurteilen zu können, ist es jedoch zwingend notwendig, die Aktivitätsmuster dieser Zellen im jeweilig ausgeführten motorischen Programm zu kennen. Die Arbeit von Baudoux et al. (1998) zeigte zum ersten Mal die Ankopplung der efferenten DUM Neurone, die die Beinmuskeln innervieren, an eine bestimmte Aktivitätsphase in einem durch Pilocarpin induzierten 'fiktiven' Laufrhythmus. Um zu überprüfen, ob diese Ankopplung dem Aktivitätsmuster der DUM Neurone im freien Verhalten entspricht, wurden extrazelluläre Hakenelektroden entwickelt, die chronisch in die Tiere implantiert wurden. Nach dem Implantieren dieser Elektroden waren die Tiere vollständig intakt und konnten sich frei bewegen. Lediglich der Bewegungsradius war durch die Länge des Elektrodendrahtes limitiert.

Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Methode traten allerdings Probleme auf, die nicht in der Qualität der extrazellulären Elektroden begründet lagen, sondern vielmehr in den Eigenschaften der Signale von DUM Neuronen. Da die Axone von DUM Neuronen sehr dünn sind (0,5 - 1µm), sind ihre Signale in extrazellulären Ableitungen nur sehr schwer zu

detektieren. Daher wurde versucht, die Hakenelektroden weit in der Peripherie zu implantieren, um möglichst wenige motorische oder sensorische Aktivität in der Ableitung zu haben. Hier ergibt sich allerdings die Schwierigkeit die Elektrode zu platzieren, ohne dabei Muskeln oder Tracheen zu zerstören und dadurch das Verhalten des Tieres zu beeinflussen. Die einzige Möglichkeit die Elektroden an peripheren Nerven zu implantieren, ohne anderes Gewebe in Mitleidenschaft zu ziehen, war der Nervabzweig N3A3b, der den Muskel M126 innerviert. Es gelang, erfolgreich von den peripheren Nerven abzuleiten. Die Identifikation der DUM Zell Spikes in diesen Ableitungen war aufgrund der sehr geringen Amplitude der DUM Zellsignale jedoch nicht möglich. Im Vergleich zu den Signalen von Motoneuronen waren die Amplituden der DUM Zell Spikes bis zu 150-fach kleiner und hoben sich trotz der guten Qualität der Hakenelektroden kaum vom Grundrauschen ab. Da die Identifikation der DUM Zell-Signale in diesen Experimenten nicht möglich war, wurden weitere Versuchsansätze entwickelt und durchgeführt, um die Aktivität der DUM Neurone während des Laufens zu ermitteln. Es wurden multiple Ableitungen mit chronisch implantierten Elektroden durchgeführt. Bei diesem Ansatz sollte die Tatsache, dass DUM Neurone die einzigen Zellen sind, die Axone in mehreren Seitennerven führen, ausgenutzt werden. Die Ergebnisse aus der Arbeit von Baudoux et al. (1998) deuten auf eine Kopplung der Aktivität der DUM<sub>3,4,5</sub> Zellen an die Schwing- oder Levatorphase hin. Daher wurde zuerst überprüft, ob sich während der Aktivität von Motoneuronen, die in der Levatorphase aktiv sind, in extrazellulären Ableitungen an Nerven, die nur Depressor-Motoneurone führen, Signale von DUM Neuronen detektieren lassen. Hierzu wurden die Signale der Motoneurone, die während der Levatorphase aktiv waren, als Triggersignale benutzt, um multiple Überläufe aus den synchronen Ableitungen der anderen Hauptnerven anzufertigen. Die multiplen Überläufe aus diesen Ableitungen, die während des Verhaltens gemacht wurden, gaben allerdings keinen Aufschluss über die Aktivität der DUM Neurone.

Antidrome Stimulation über eine der implantierten Elektroden hat gezeigt, dass es grundsätzlich möglich war, die Signale der DUM Neurone mit Hilfe der chronisch implantierten Elektroden abzuleiten. Allerdings waren die Signale der DUM Neurone nur in multiplen Überläufen oder in Averages sichtbar. In Einzelausschnitten der Ableitungen, in denen man das DUM Zell Signal aufgrund des zuvor ermittelten zeitlichen Abstands zum Reizartefakt identifizieren konnte, wurde deutlich, dass sich die Einzelsignale kaum vom Grundrauschen abheben und ihre Form sehr variabel ist.

Im dritten gewählten Ansatz wurden zwei Elektroden chronisch implantiert, und Ableitungen der Nerven aufgezeichnet, während das Tier freibeweglich lief. Im Anschluss wurde das Tier

geöffnet, ohne die implantierten Elektroden zu beeinträchtigen, und die DUM Zelle intrazellulär identifiziert. Mit Hilfe dieser Methode sollte versucht werden, eine Schablone bzw. ein Template von einem DUM Zell Signal aus den Ableitspuren der extrazellulären Ableitspuren zu gewinnen. Diese Schablone sollte dann dazu genutzt werden, die DUM Zellsignale in den Ableitspuren beim Verhalten zu detektieren. Auch hier ließen es die geringen Amplituden der DUM Neurone nicht zu, harte Kriterien für das Spikesorting und das anschließende Templatematching zu formulieren. Die DUM Zell Spikes ließen sich nur in multiplen Überläufen und Averages darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hakenelektroden entwickelt, die zur chronischen Implantation an Nerven hervorragend geeignet sind. Die extrazellulären Ableitungen, die mit Hilfe dieser Elektroden gemacht werden können, sind von hoher Qualität und erlauben es kontinuierliche Ableitungen über mehrere Tage anzufertigen, ohne dass die Qualität dieser Ableitungen abnimmt (siehe unten). Aufgrund des sehr geringen Durchmessers der Axone von DUM Neuronen sind deren Signale sehr klein und heben sich in extrazellulären Ableitungen kaum vom Grundrauschen ab. Ferner werden diese Signale aufgrund ihrer sehr geringen Amplitude leicht durch andere Signale maskiert. Aufgrund der angeführten Gründe war es nicht möglich, die Aktivität von DUM Neuronen während eines Verhaltens zu ermitteln. Mit aufwendigen Spike-Form- Analyse Programmen, wie sie heutzutage beispielsweise für die Auswertung von so genannten 'Multi-Unit' Ableitungen verwendet werden, ist es vielleicht möglich, die Signale der DUM Zellen auch als Einzelsignale in den Verhaltensspuren zu identifizieren. Die 'Spike-Sorting' Genauigkeit solcher Programme geht weit über die des hier verwendeten Programms Spike2 hinaus, da die Spike-Formen mit sehr viel mehr Parametern beschrieben werden. In dieser Arbeit stand derartige Software aber nicht zur Verfügung. Mit den verwendeten technischen Mitteln war die eindeutige Identifikation der DUM Zellsignale nicht möglich.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die Entwicklung chronisch implantierbarer Elektroden einen erheblichen technischen Gewinn für die Untersuchung motorischer Muster im Verhaltenskontext darstellen. Mit Hilfe dieser Elektroden ist es möglich, motorische Muster über lange Zeiträume zu erfassen, was z.B. für motorische Muster, wie sie während der Entwicklung von Insekten auftreten, neue Erkenntnisse liefern kann. Dies ist sowohl für die Entwicklung hemimetaboler Insekten vorstellbar, wie z.B. die neuronalen Rhythmen während der Häutung, als auch für die Entwicklung holometaboler Insekten. Für ein holometaboles Insekt wurde dies im Rahmen dieser Arbeit an *Manduca sexta* durchgeführt, was in einem späteren Kapitel ausführlich diskutiert wird.

Da es nicht gelang die Signale von DUM Neuronen in den Ableitungen der chronisch implantierten Elektroden zu identifizieren, konnte die Frage der Aktivität von DUM Neuronen während des Laufens nicht geklärt werden. Um dennoch einen Aufschluss über die mögliche Aktivität der unterschiedlichen DUM Neurone während eines Verhaltenskontext gewinnen zu können, wurde die Aktivität von DUM Neuronen während eines zentral generierten Musters im Mesothorakalganglion von *Locusta migratoria* untersucht. Im anschließenden Kapitel sollen die Ergebnisse dieser Experimente diskutiert werden.

Bevor detailliert die Aktivität der einzelnen Typen von DUM Neuronen diskutiert wird, soll zuerst auf den motorischen Rhythmus, in dessen Kontext die Untersuchungen an den DUM Zellen durchgeführt wurde, eingegangen werden.

#### 4.2. Die Aktivität von DUM Neuronen unterschiedlichen Typs während eines nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus

In 40% der durchgeführten Experimente (n=90) etablierte sich im Mesothorakalganglion nach dem Durchtrennen der anterioren und posterioren Konnektive ohne die Applikation von Pharmaka ein motorisches Muster. Dieses Präparat bietet im Gegensatz zu anderen so genannten ‚fiktiven‘ motorischen Mustern zwei entscheidende Vorteile. Zum einen muss das motorische Muster nicht mit Hilfe von pharmakologischen Substanzen ausgelöst werden, wie es in vielen früheren Arbeiten, in denen ‚fiktive‘ motorische Muster verwendet wurden, der Fall war (Ryckebusch und Laurent, 1993; 1994; Johnston et al., 1996; Baudoux et al., 1998; Duch and Pflüger, 1999). In dieser Arbeit sollte vor allem die Aktivität von DUM Neuronen beim Laufen untersucht werden. Fiktives Laufen kann durch den muskarinischen Agonisten Pilocarpin ausgelöst werden (Ryckebusch und Laurent, 1993; Baudoux et al., 1998). Pilocarpin hat allerdings einen direkten Einfluss auf das Membranpotential der DUM Neurone (Baudoux et al., 1998), da diese mit muskarinischen Acetylcholinrezeptoren ausgestattet sind (Tuschick 1995, Diplomarbeit). Daher ist bezüglich der Beurteilung der Aktivität der DUM Neurone ein wichtiger Vorteil gegenüber dem Pilocarpin Präparat gegeben. Zum anderen wird das hier verwendete Präparat, im Gegensatz zu den oben zitierten, nicht vollständig deafferentiert, um das motorische Muster auszulösen. Dadurch bleibt die sensorische Rückkopplung zumindest innerhalb des untersuchten Segmentes erhalten. So lässt sich beispielsweise durch die Stimulation des femoralen Chordotonalorgans (fCO) der Rhythmus beeinflussen (Knop et al., 2001).

Inwiefern das hier verwendete motorische Muster tatsächlich Laufen repräsentiert, wurde in dieser Arbeit nicht im Detail untersucht. Im folgenden werden trotzdem kurz einige Gemeinsamkeiten mit der Situation im frei laufenden Tier zusammengefasst. Am auffälligsten ist der Befund, dass trotz der hohen Variabilität in der Dauer der Perioden innerhalb eines Experiments sowie zwischen unterschiedlichen Experimenten die Dauer der Levatorbursts relativ konstant war. Es scheint also auch in diesem Präparat zu gelten, dass die Geschwindigkeit einer Periode über die Änderung der Depressoren-Aktivität bei konstanter Dauer der Levatoren-Aktivität geändert wird, was den Verhältnissen im freilaufenden Tier entspricht (Burns und Usherwood, 1979; Duch und Pflüger, 1995). Wie beim Laufen sind die Levatoren und die Depressoren alternierend aktiv. Darüber hinaus hat Knop in seiner Diplomarbeit (2000) gezeigt, dass es auch zu Kopplungen antagonistischer Muskelpaare in angrenzenden Gelenken kam. In seiner Arbeit stellte er fest, dass es zu einer Koaktivität zwischen den Motoneuronen des Levator des Trochanter und den Flexor-Motoneuronen der Tibia, sowie einer Kopplung der Depressor-Motoneurone des Trochanter und den Extensor-Motoneuronen der Tibia kam. Er beobachtete ferner, dass auch das Umschalten zwischen den jeweils antagonistischen Muskelpaaren annähernd synchron erfolgte. Diese Kopplungen treten auch beim realen Laufen auf (Burns und Usherwood, 1979; Graham, 1985; Duch und Pflüger, 1995; Burrows, 1996). Es sei aber an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass es in den Experimenten von Knop auch zu Koaktivität zwischen Levator-Motoneuronen des Trochanter und Extensor-Motoneuronen der Tibia sowie den Depressor-Motoneuronen des Trochanter und den Flexor-Motoneuronen der Tibia kam. Diese Form der Zwischengelenkskopplung spricht allerdings gegen einen Vergleich mit lauf-ähnlichen Rhythmen anderer Präparate oder dem motorischen Mustern, wie sie in freilaufenden Tieren beobachtet wurden. Trotzdem bleibt festzuhalten, dass das hier verwendete motorische Muster deutliche Gemeinsamkeiten mit dem motorischen Muster im freilaufenden Tier haben. Das verwendete Präparat eignet sich daher gut, um weitere Informationen zur Aktivierung der DUM Neurone während des Laufens zu gewinnen.

Das Mesothorakalganglion von *Locusta migratoria* beinhaltet 19 efferente DUM Neurone (Duch et al., 1999). Diese lassen sich anatomisch in fünf Typen von DUM Neuronen unterteilen. Es beinhaltet 2 DUM1 Neurone (DUM1b, DUMDL), 5 DUM3 Neurone, 6 DUM3,4 Neurone, 4 DUM3,4,5 Neurone und 2 DUM5 Neurone (Duch et al., 1999). Viele, jedoch nicht alle, Zielgewebe der DUM Neurone sind bekannt. Innerhalb des Mesothorakalganglions wurden jedoch nur vier DUM Neurone individuell beschrieben. Dazu

gehören die beiden DUM1 Neurone. Eine der DUM1 Zellen innerviert exklusiv den dorsolongitudinalen Flugmuskel M81 und wird deshalb als DUMDL bezeichnet (Hoyle, 1978). Die zweite DUM1 Zelle projiziert über Nerv 1b (DUM1b) und innerviert ventrale Muskeln, die Muskulatur der Spirakel sowie die Speicheldrüse und bildet neurohämale Terminale auf der Oberfläche von peripheren Nerven aus (Bräunig et al., 1994). Außerdem ist eines der mesothorakalen DUM3,4,5 Neurone von Stevenson und Meuser (1997) beschrieben worden und innerviert über Nerv 4 den pleuroaxillaren Flugsteuermuskel M85. Die peripheren Zielgebiete dieser Zelle über die Nerven 3 und 5 sind allerdings nicht bekannt. Da alle methathorakalen DUM3,4,5 Neurone Beinmuskeln innervieren (Bräunig, 1997), erscheint es wahrscheinlich, dass die mesothorakalen DUM3,4,5 Neurone ebenfalls Beinmuskulatur innervieren. Eine weitere DUM3,4,5 Zelle innerviert den Extensor Tibiae Muskel des Mittelbeins (Duch, 1998, Doktorarbeit) und kann somit als seriell homolog zu DUMETi des Metathorakalganglions angesehen werden. Von den DUM Neuronen, die ausschließlich über Nerv 3 projizieren, sind keine peripheren Zielgebiete bekannt. Wohin die DUM3,4 Neurone über Nerv 3 projizieren, ist ebenfalls nicht geklärt. Von den DUM3,4 Zellen weiß man jedoch, dass sie über Nerv 4 auf die Flugmuskeln M90 (Whim und Evans, 1988) und den Flugmuskel M99 (Kutsch und Schneider, 1987) projizieren. Unveröffentlichte Ergebnisse aus anterograden Färbungen deuten darauf hin, dass alle DUM3 und DUM3,4 Neurone über Nerve 3 Flugmuskeln innervieren (Duch, persönliche Mitteilung). Das stimmt mit physiologischen Arbeiten überein, die gezeigt haben, dass die Gesamtpopulation der pterothorakalen DUM Neurone aufgrund gemeinsamer oder unterschiedlicher synaptischer Eingänge in funktionelle Untergruppen unterteilt werden kann (Baudoux und Burrows, 1998; Duch und Pflüger, 1999; Burrows und Pflüger, 1995; Duch et al., 1999). Zum einen sind alle DUM5 und DUM3,4,5 Neurone als eine Subpopulation definiert worden, da alle diese Zellen gemeinsame synaptische Eingänge erhalten, bei bestimmten motorischen Mustern gemeinsam feuern und alle Beinmuskeln innervieren (Burrows und Pflüger, 1995; Baudoux und Burrows, 1999; Duch et al., 1999). Zu einer zweiten Subpopulation sind alle DUM3 und DUM3,4 Neurone zusammengefasst worden, da diese wahrscheinlich alle Flugmuskeln innervieren, gemeinsame synaptische Eingänge erhalten und niemals gemeinsame synaptische Eingänge mit DUM5 oder DUM3,4,5 Neuronen erhalten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass unterschiedliche Subpopulationen von DUM Neuronen während eines nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus im Mesothorakalganglion verschiedene charakteristische Aktivitätsmuster zeigen. DUM Neurone, die Beinmuskeln innervieren, erhalten rhythmische Depolarisationen, die meist überschwellig sind und diese

Neurone zum Feuern bringen. DUM Neuronen, die Flugmuskeln innervieren, erhalten rhythmische Inhibition, und wieder andere zeigen keine bzw. von dem Rhythmus unabhängige Aktivität. Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern daher die These, dass die Gesamtpopulation der DUM Neurone in funktionelle Subpopulationen unterteilt werden kann. Das belegt weiter, dass neuromodulatorische Neurone eng an bestimmte Verhaltenssituationen gebunden sind und nicht, wie in früheren Arbeiten angenommen, als Gesamtpopulation zur Erhöhung des allgemeinen 'arousal' führen (Hoyle und Dagan, 1978, Orchard et al., 1993).

Die hier vorgestellten Befunde, bezogen auf die Subpopulationen der DUM Neurone, entsprechen in vielen Punkten den Ergebnissen wie sie von Baudoux et al. (1998) für einen Pilocarpin-induzierten Rhythmus im Methathorakalganglion vorgestellt wurden, weichen jedoch in einigen Punkten von diesen Ergebnissen ab. Im Gegensatz zum Pilocarpin-Präparat lässt sich in der in dieser Arbeit verwendeten Präparation nicht für alle DUM Neurone eine Erhöhung der Feuerrate feststellen. Die Erhöhung der Feuerrate aller Typen von DUM Neuronen nach Pilocarpinapplikation, aber vor dem Etablieren des motorischen Musters, lässt sich durch eine direkte Pilocarpin-Wirkung auf das Membranpotential der DUM Neurone erklären, da diese muscarinische Acetylcholinrezeptoren exprimieren. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit keine erhöhte DUM Zell Aktivität vor der Ausbildung des motorischen Musters beobachtet wurde, stützt diese Interpretation weiter. Dieser Befund spricht gegen die Annahme, dass die Aktivität bestimmter DUM Zellen zur Ausbildung des motorischen Musters führt. Sombati und Hoyle (1984) konnten durch iontophoretische Freisetzung von Oktopamin in eng definierten thorakalen Neuropilen Laufen induzieren und Stevenson und Kutsch (1987) Flug. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen gegen die Möglichkeit, dass DUM Neurone durch zentrale Oktopamin-Freisetzung Laufen auslösen.

Die DUM1 Neurone zeigten die größte Variabilität in den auftretenden Aktivitätsmustern. Das Problem bei der Auswertung der Experimente zu DUM1 Zellen bestand darin, dass es nicht gelang, die Zellen als DUMDL oder DUM1b zu identifizieren. Wahrscheinlich ist, dass inhibitorische Eingänge während des Rhythmus von DUMDL abgeleitet wurden, da auch alle anderen DUM Zellen, die Flugmuskeln innervieren, inhibiert werden (siehe unten). Im Gegensatz dazu erhält DUM1b wahrscheinlich depolarisierende Eingänge. Die Beobachtungen von Burrows und Pflüger (1995) würden diese Vermutung stützen. Sie zeigten, dass die DUM1b Zelle während des motorischen Programms des Kicks (Burrows, 1995; Heitler und Burrows, 1977) während der Kokontraktionsphase von Extensor-Motoneuronen und Flexor-Motoneuronen der Tibia mehrfach feuert (Burrows und Pflüger,

1995). Im Gegensatz dazu wurde die zweite DUM1 (DUMDL) während dieser Kokontraktionsphase inhibiert. Eine klare Zuordnung der unterschiedlichen Aktivitätsmuster von DUM1 Neuronen, die während des nicht pharmakologisch induzierten Rhythmus gemessen wurden, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der unzureichenden Färbungen nicht machen.

In allen Experimenten, in denen eine DUM3 Zelle oder eine DUM3,4 Zelle abgeleitet wurde, zeigten diese lang anhaltende Hyperpolarisationen, die mit den Levatorbursts beider Hemiganglien korrelierten. Diese Hyperpolarisationen waren inhibitorisch, da ihr Umkehrpotential weit unter dem Ruhe-Membranpotential der Zellen liegt, wie durch Strominjektionen gezeigt werden konnte. In den durchgeführten Experimenten zeigten beide Typen von DUM Neuronen selten Spontanaktivität. Baudoux et al. (1998) beschrieben die Aktivität von DUM3 und DUM3,4 Zellen während des durch Pilocarpin induzierten 'fiktiven' Laufens als sehr variabel. Auch sie beobachteten Hyperpolarisationen, die sie allerdings mit keiner Aktivitätsphase der Beinmotoneurone korrelieren konnten. Im Gegensatz dazu korrelieren die hyperpolarisierenden Eingänge in der vorliegenden Arbeit eindeutig mit den Levatorbursts. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich dabei um einen Unterschied zwischen dem von Baudoux et al. (1998) untersuchten Metathorakalganglion und dem in dieser Arbeit untersuchten Mesothorakalganglion handelt, da die Einteilung der DUM Neurone in Subpopulationen zwischen den Thorakalsegmenten erhalten bleibt (Duch et al., 1999). Es könnte sein, dass der Einfluss von Pilocarpin beim 'fiktiven' Laufen inhibitorische Eingänge maskiert. Es ist aber auch möglich, dass die Ankopplung dieser Subpopulation von DUM Neuronen innerhalb des Ganglions durch sensorische Rückkopplung vermittelt wird, die sich nur im semi-intakten Präparat feststellen lässt und sie daher im de-afferentierten Pilocarpin Präparat nicht auftritt. Dafür spricht, dass die gemeinsamen Eingänge, die in DUM3 und DUM3,4 Neuronen im Metathorakalganglion aufgrund von taktiler Stimulation beobachtet wurden, stark von dem Aktivitätszustand des Tieres abhängen (Baudoux und Burrows, 1998). Baudoux und Burrows (1998) zeigten, dass es nur zu starken hyper- und depolarisierenden Eingängen in diesen Zellen kam, wenn das Hinterbein gleichzeitig aktiv bewegt wurde. Dagegen spricht, dass mechanische Reizungen an den Mittelbeinen, ohne dass diese dabei aktiv vom Tier bewegt wurden, nicht zu inhibitorischen Eingängen zu DUM3 oder DUM3,4 Zellen führen (Daten nicht dargestellt; Duch et al., 1999). Die Interpretation der Aktivitätsmuster der DUM3 und DUM3,4 Zellen im Verhaltenskontext bleibt schwierig, da die Zielgebiete dieser Zellen in Bezug auf die Innervationsgebiete über Nerv 3 nicht bekannt



sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen jedoch weiter die Hypothese, dass efferente DUM Neurone, die Flugmuskeln innervieren, beim Laufen inhibiert werden.

Eine auffällige Ausnahme in dieser Subpopulation bilden jedoch die DUM3A/C,4 Neurone. In den beiden Fällen, in denen eine DUM3A/C,4 Zelle abgeleitet wurde, zeigte diese rhythmische depolarisierende Eingänge, die an die Levatorphase gekoppelt waren. Bei diesen Depolarisationen handelte es sich um exzitatorische Eingänge, da sie zum Auftreten von Aktionspotentialen führen konnten. Auch in diesem Fall ist es schwierig, die Aktivitätsmuster dieser Zellen im Verhaltenskontext zu beurteilen, da die Unterschiede der Zielgewebe zwischen DUM3A,4 und DUM3AC,4 Neuronen nicht bekannt sind. Es ist vorstellbar, dass DUM3AC,4 Zellen im Gegensatz zu den anderen DUM3,4 Zellen Beinmuskeln innervieren und daher zu der gleichen Subpopulation wie DUM3,4,5 und DUM5 Zellen gezählt werden müssen.

Es bleibt also festzuhalten, dass die mit dem hier verwendeten Präparat erzielten Ergebnisse bezüglich der DUM3 und DUM3,4 Zellen neue Erkenntnisse liefern. Zum einen wurden an die Levatorphasen gekoppelte inhibitorische Eingänge zu DUM3A,4 und DUM3 Zellen identifiziert. Zum anderen wurden an die Levatorphasen gekoppelte exzitatorische Eingänge zu DUM3AC,4 Zellen beschrieben. Für eine weiterreichende verhaltensrelevante Interpretation dieser Ergebnisse wird eine detaillierte Studie der Zielgewebe dieser Typen von DUM Neuronen sehr wertvoll sein.

Auch die Innervationsgebiete der DUM3,4,5 und der DUM5 Zellen sind für das Mesothorakalganglion größtenteils nicht beschrieben. Da aber alle metathorakalen DUM3,4,5 und DUM5 Neurone Beinmuskulatur innervieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass dies auch auf die mesothorakalen DUM3,4,5 und DUM5 Neurone zutrifft. Diese Gruppe von DUM Neuronen erhielt in allen Experimenten rhythmische Depolarisationen, die oft überschwellig waren und AP's auslösten, und die mit den Bursts der Levator-Motoneurone korrelierten. Da die rhythmischen Depolarisationen während der Bursts der Levator-Motoneurone beider Hemiganglien auftraten, ist es wahrscheinlich, dass diese Gruppe von bilateralsymmetrisch projizierenden DUM Zellen Eingänge von lokalen Netzwerken beider Hemiganglien erhält. Die Aktivität dieser Typen von DUM Neuronen wird also an die rhythmische Aktivität von Beinmotoneuronen gekoppelt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen für durch Pilocarpin induziertes 'fiktives' Laufen im Metathorakalganglion (Baudoux et al., 1998).

#### 4.2.1. Mögliche Funktion einer differenziellen Aktivierung von DUM Neuronen beim Laufen

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten weiter darauf hin, dass während des Laufens nur diejenigen Typen von DUM Neuronen aktiviert werden, die am Laufen beteiligte Muskeln oder Sinnesorgane innervieren, wohingegen andere Typen von DUM Neuronen sogar inhibiert werden. Das deutet darauf hin, dass Oktopamin während des Laufens ganz spezifische und lokal begrenzte Wirkungen hat. Es stellt sich jedoch die Frage, warum die Aktivität der efferenten DUM Neurone an eine bestimmte Aktivitätsphase im Schrittzklus gekoppelt wird. Beim tripoiden Gang, der dem Laufen der meisten Insekten zu Grunde liegt (Buddenbrock 1921, Wilson 1966, Burns 1973, Delcomyn, 1971a), befinden sich die beiden Beine eines Segments in alternierenden Schritphasen, d.h. während ein Bein in der Schwing- oder Levatorphase ist und relativ zum Körper nach vorne bewegt wird, ist das andere Bein desselben Segments in der Stemm- oder Depressorphase, in der das Bein Substratkontakt hat und der Körper relativ zum Substrat nach vorne bewegt wird. Aufgrund ihrer bilateralsymmetrischen Architektur innervieren die DUM Neurone die Beinmuskulatur beider Körperseiten. Eine Ankopplung der bilateralsymmetrischen DUM Neurone an eine Aktivitätsphase wäre nur dann sinnvoll, wenn Oktopamin in beiden Phasen funktionell relevant wäre. Es wäre vorstellbar, dass Oktopamin während der Stemmphase die Amplitude der Muskelkontraktionskraft erhöht, um die Kraft für die Vorwärtsbewegung zu erhöhen (Duch und Pflüger, 1995). Während der Schwingphase hingegen muss tonische Muskelspannung schnell abgebaut werden, um eine schnelle Vorwärtsbewegung der Beine relativ zum Körper zu gewährleisten (Duch und Pflüger, 1995). Efferente DUM Neurone sind in der Lage durch die Ausschüttung von Oktopamin beide Effekte zu ermitteln (Evans und O'Shea, 1978, O'Shea und Evans, 1979). Trotz dieser Tatsache wäre es nicht notwendig, die Aktivität der DUM Neurone eng an eine bestimmte Phase eines motorischen Musters zu koppeln, da die modulatorischen Effekte während beider Schritphasen funktionell wichtig wären. Darüber hinaus sind modulatorische Effekte von Oktopamin sehr langsam und mit Wirkungsdauern im Sekunden- bis Minutenbereich sehr lang anhaltend (Evans und Siegler, 1982). Da sich die Heuschrecke jedoch mit einer Schrittfrequenz bis zu 5Hz fortbewegt (Duch und Pflüger, 1995) scheint es unwahrscheinlich, dass Oktopamin seine modulatorischen Effekte zeitlich begrenzt innerhalb einer Phase des Schrittzklus zu vermitteln vermag. Viel eher scheint es wahrscheinlich, dass die Ankopplung der DUM Neurone an eine bestimmte

Aktivitätsphase eines motorischen Programms evolutiv die einfachste Form der parallelen Aktivierung von modulatorischen und motorischen Neuronen darstellt.

Für Oktopamin sind die verschiedensten modulatorischen Effekte nachgewiesen worden (Zusammenfassung in Bräunig und Pflüger, 2001). Hier sollen jedoch nur die Effekte diskutiert werden, die beim Laufen relevant sein könnten. Im Zentralnervensystem der Heuschrecke zeigte Parker (1996), dass die Erregbarkeit von Beinmotoneuronen durch Badapplikation von Oktopamin steigt. Einen ähnlichen Effekt erreichte er durch die Stimulation von DUM Neuronen allerdings nicht. Durch die Stimulation von DUM Neuronen wurde nur in sechs von 23 Präparationen ein Effekt auf die Beinmotoneurone erzielt. Dieser war zudem sehr variabel und unterschied sich stark von den Effekten die durch Badapplikation erreicht wurden. Darüber hinaus hat die Studie von Parker (1996) auch nur Motoneurone des Extensor und Flexor Tibiae Muskels berücksichtigt, wodurch Effekte auf andere Motoneurone natürlich nicht ausgeschlossen werden können. Elektronenmikroskopische Studien haben darüber hinaus keine klassischen zentralen Ausgangssynapsen in DUM Neuronen gefunden (Pflüger und Watson, 1995). Trotzdem wäre es natürlich prinzipiell vorstellbar, das Oktopamin parakrin von DUM Neuronen ins ZNS abgegeben wird. Andere Arbeiten haben gezeigt, dass sich durch iontophoretische Injektionen von Oktopamin in bestimmte Neuropilgebiete 'laufähnliche' Rhythmen auslösen lassen (Sombati und Hoyle, 1984a). Dass Oktopamin zentral die Membraneigenschaften von Neuronen modulieren kann ist auch für Fluginterneurone und Motoneurone der Atmung gezeigt worden (Ramirez und Pearson, 1991).

In der Peripherie reduziert Oktopamin den myogenen Rhythmus eines bestimmten Muskelabschnitts des Extensor Tibiae Muskels und erhöht die Übertragung an der neuromuskulären Synapse (Evans und O'Shea, 1978; Evans und Myers, 1986). Außerdem vermag Oktopamin die Amplitude der Muskelkontraktionen im Extensor Tibiae Muskel zu erhöhen und die Relaxationszeit herabzusetzen (Evans und O'Shea, 1978, Evans und Siegler, 1982).

Die dritte Möglichkeit, in der Oktopamin modulatorische Effekte vermittelt, sind Effekte auf Sinnesorgane. Es wurde gezeigt, dass Oktopamin Sinnesorgane in Crustaceen und Insekten modulieren kann (Pasztor und Busch, 1989; Ramirez und Orchard, 1990, Ramirez et al., 1993; Matheson, 1997; Bräunig und Eder, 1998). Bei der Stabheuschrecke werden so zum Beispiel die Sinneszellen des femoralen Chordotonalorgans durch Oktopamin sensitisiert, die für die Position kodieren (Ramirez et al., 1993). Des weiteren werden im Hinterbein der

Heuschrecke identifizierte Sinneszellen (engl.: 'strandrezeptor') durch die Freisetzung von Oktopamin von einer DUM<sub>3,4,5</sub> Zelle sensitisiert (Bräunig und Eder, 1998).

Da der modulatorische Einfluss von Oktopamin auf die einzelnen Komponenten, die am Laufen beteiligt sind, während der Durchführung eines motorischen Programms bis jetzt nicht untersucht wurde, lässt sich die alternative Hypothese einer streng phasengekoppelten, schnellen Modulation jedoch nicht ausschließen. Für eine solche Annahme müsste man allerdings fordern, dass die bilateralsymmetrischen DUM Neurone ihre APs wahlweise auf das rechte oder linke Axon beschränken können. Dies wäre prinzipiell möglich, da DUM Neurone distal ihrer T-Kreuzung verschiedene voneinander unabhängige AP-Generierende Zonen besitzen (Heitler und Goodman, 1978). Allerdings haben Burrows und Pflüger (1995) gezeigt, dass während des Kickprogramms DUM Neurone das gleiche Aktivitätsmuster zeigen, unabhängig ob nur ein Bein oder beide Hinterbeine gleichzeitig kicken.

Das fehlende Glied zur Untersuchung der Effekte auf motorische Programme durch die Aktivität efferenter modulatorische DUM Neurone bleibt die genaue Kenntnis der Aktivität dieser Zellen in einer intakten Präparation. Nur mit einer genauen Analyse der Aktivitätsmuster dieser Zellen in einem Verhaltenskontext lassen sich Aussagen über mögliche modulatorische Effekte dieser Zellen auf einzelne Komponenten des Netzwerkes, die an der Ausführung des Verhalten beteiligt sind, machen. Mit der genauen Kenntnis der Aktivitätsmuster der DUM Neurone während eines Verhaltens ließen sich in Zukunft Experimente durchführen, in denen man die Aktivität von DUM Neuronen simulieren könnte. Dadurch wären die Effekte auf Sinnesorgane, Muskeln und andere Komponenten, die am Laufen beteiligt sind, zu analysieren. Darüber hinaus ließe sich feststellen, ob die Ausschüttung von Oktopamin durch die DUM Zellen nur dann modulatorische Effekte vermittelt, wenn die Ausschüttung des Modulators rhythmisch erfolgt, was für die rhythmische Aktivierung dieser Neurone durch ein motorisches Programm spräche, oder ob lediglich die Ausschüttung des Modulators selbst genügt, um den Effekt zu vermitteln. Dies spräche dafür, dass es sich bei der rhythmischen Aktivierung um die evolutiv einfachste Lösung handelt. Auch wenn die vorliegende Arbeit dies nicht zu leisten vermag, stützt sie die Befunde vorheriger Arbeiten (Baudoux et al., 1998, Duch et al., 1999), dass DUM Neurone differentiell an ein zentrales Netzwerk gekoppelt sind und dass diese Kopplung an eine bestimmte Phase eines rhythmischen motorischen Programms erfolgt. Die differentielle Aktivierung der DUM Neurone wurde in dieser Arbeit das erste Mal für ein Präparat nachgewiesen, dessen motorischer Rhythmus nicht durch die Badapplikation von Pharmaka ausgelöst wurde und in dem zumindest im untersuchten Segment die Sensorik intakt war.

Ferner wurde in dieser Arbeit klar gezeigt, dass auch DUM3A,4 und DUM3 inhibitorische Eingänge erhalten, die an die Levatorphase gekoppelt sind, und dass es innerhalb dieser Subpopulation eine Ausnahme gibt. Diese Ausnahme ist die DUM3A/C,4 Zelle, die im Gegensatz zu den anderen Zellen dieser Gruppe rhythmische exzitatorische Eingänge bekommt, die an die Levatorphase gekoppelt sind.

#### 4.3. Stimulationsexperimente zur Untersuchung der Wirkung von DUM Neuronen aus den Energiestoffwechsel des Muskels

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass DUM Neurone in Subpopulationen unterteilt werden können, die bei verschiedenen motorischen Verhalten unterschiedlich aktiviert werden. Mögliche modulatorische Konsequenzen der Aktivität der DUM Neurone während des Laufens wurden für die Kontraktionseigenschaften von Muskeln, für die Eigenschaften von Sinnesorganen und für zentrale Netzwerke diskutiert. Darüber hinaus sind in früheren Arbeiten mögliche Effekte der Aktivität von DUM Neuronen auf den Energiestoffwechsel von Muskeln diskutiert worden (Orchard et al., 1982, Orchard und Lange, 1984, Duch und Pflüger, 1999). Da der Flug von Insekten sehr Energie-intensiv ist (Wegener et al., 1990; Wegener, 1996 Candy et al., 1997), wurde eine mögliche Stoffwechselwirkung von DUM Neuron Aktivität, vor allem während des Fluges, untersucht. Frühere Arbeiten postulierten, dass alle Typen von DUM Neuronen während des Fluges erregt werden (Ramirez und Orchard, 1990). Auf diesen Ergebnissen basierend formulierten spätere Arbeiten (Orchard et al., 1993), dass die Aktivität aller DUM Neurone während des Fluges zu einer Erhöhung des allgemeinen Erregungsniveaus des Tieres führt. Eine spezifische Rekrutierung einzelner Subpopulationen während des Fluges wurde ausgeschlossen, vielmehr sollen Oktopamin-Konzentrationen in verschiedenen Geweben dadurch ansteigen, dass DUM Neurone kurz vor jedem motorischen Verhalten unspezifisch aktiviert werden (Orchard et al., 1993). Spätere Arbeiten und die vorliegende Arbeit (siehe oben) haben gezeigt, dass die modulatorischen efferenten DUM Neurone aufgrund ihrer unterschiedlichen synaptischen Eingänge (Baudoux und Burrows, 1998; Duch et al.; 1999), so wie ihrer spezifischen Aktivierung während verschiedener motorischer Programme (Baudoux et al., 1999, Burrows und Pflüger, 1995; Duch und Pflüger, 1999) in Subpopulationen unterteilt werden können. Die beiden Hauptgruppen die sich dabei unterscheiden lassen, sind

zum einen diejenigen DUM Neurone, die die Beinmuskulatur innervieren und zum anderen die DUM Neurone, die die Flugmuskulatur innervieren. Duch und Pflüger (1999) haben gezeigt, dass sowohl in semiintakten Präparationen während kurzer Flugsequenzen, als auch in denervierten Präparaten, in denen flug-ähnlicher 'fiktiver Flug' durch Chlordimeform ausgelöst wurde, alle DUM Neurone, die Flugmuskeln innervieren, inhibiert werden, wohingegen alle anderen DUM Neurone aktiviert werden. Darüber hinaus zeigten sie, dass die beiden Subpopulationen unterschiedliche sensorische Eingänge erhalten.

Es stellt sich die Frage, welche Funktion eine Gruppe von modulatorischen Neuronen hat, die sowohl in einem Verhaltenskontext inhibiert wird an dem die Laufmaschinerie beteiligt ist, als auch in einem Verhaltenskontext in dem die Flugmaschinerie beteiligt ist. Duch und Pflüger formulierten 1999 erstmals die Hypothese, dass die efferenten DUM Neurone, die die Flugmuskulatur innervieren, Einfluss auf den Energiestoffwechsel der Flugmuskeln nehmen. Während des Ruhezustandes von semi-intakten Präparationen feuern die DUM Neurone, die Flugmuskeln innervieren, mit einer Rate von 0,1-1 Hz (Duch und Pflüger, 1999). Es kommt somit zu einer kontinuierlichen Ausschüttung von Oktopamin in den Flugmuskeln während das Tier in Ruhe ist. Sobald das Tier zu fliegen beginnt, werden alle DUM Neurone zu Flugmuskeln inhibiert. Damit wird die Oktopamin-Ausschüttung auf Flugmuskeln beendet. Flugmuskeln erhalten außer DUM Neuronen keine andere direkte oktopaminerge Innervation (Kutsch und Schneider, 1987). Mit zunehmender Flugdauer sollte die Oktopamin-Konzentration im Flugmuskel also fallen. Tatsächlich nimmt nach 10 Minuten Flug nimmt der Gehalt an Oktopamin im dorso-ventralen Flugmuskel um bis zu 40 % ab (Goosey und Candy, 1982). Ein Abfall der Oktopamin-Konzentration führt in der Flugmuskulatur zu einer Verringerung der Konzentration von F<sub>2,6</sub>BP (Blau et al., 1994; Blau und Wegener, 1994; Wegener 1996). F<sub>2,6</sub>BP ist bereits nach 3 Minuten um 50% und nach 10 Minuten tatsächlich um 80% reduziert (Wegener, 1996). F<sub>2,6</sub>BP nimmt eine Schlüsselstellung in der Regulation der Glykolyse ein (Wegener et al., 1986,1987, Abb.36). Wird F<sub>2,6</sub>BP im Flugmuskel erhöht, führt dies zu einer erhöhten Glykolyserate; wird es verringert, wird die Glykolyserate gesenkt, bis es schließlich zu einem Umschalten auf den Fettstoffwechsel kommt (Blau et al., 1994; Blau und Wegener, 1994; Wegener 1996). Im Umkehrschluss sollte dies bedeuten, dass es durch die Erhöhung des Oktopaminspiegels im Flugmuskel zu einer Erhöhung des F<sub>2,6</sub>BP-Spiegels und damit zu einer Erhöhung der Glykolyserate kommt.

Grundsätzlich erfordert anhaltende Flugaktivität zwei metabolische Anpassungen. Zum einen müssen Lipide zur Verfügung gestellt werden. Das geschieht durch steigende Hämolympf-Konzentrationen von adipokinetischen Hormonen (AKHs, van der Horst, 1990, van der Horst

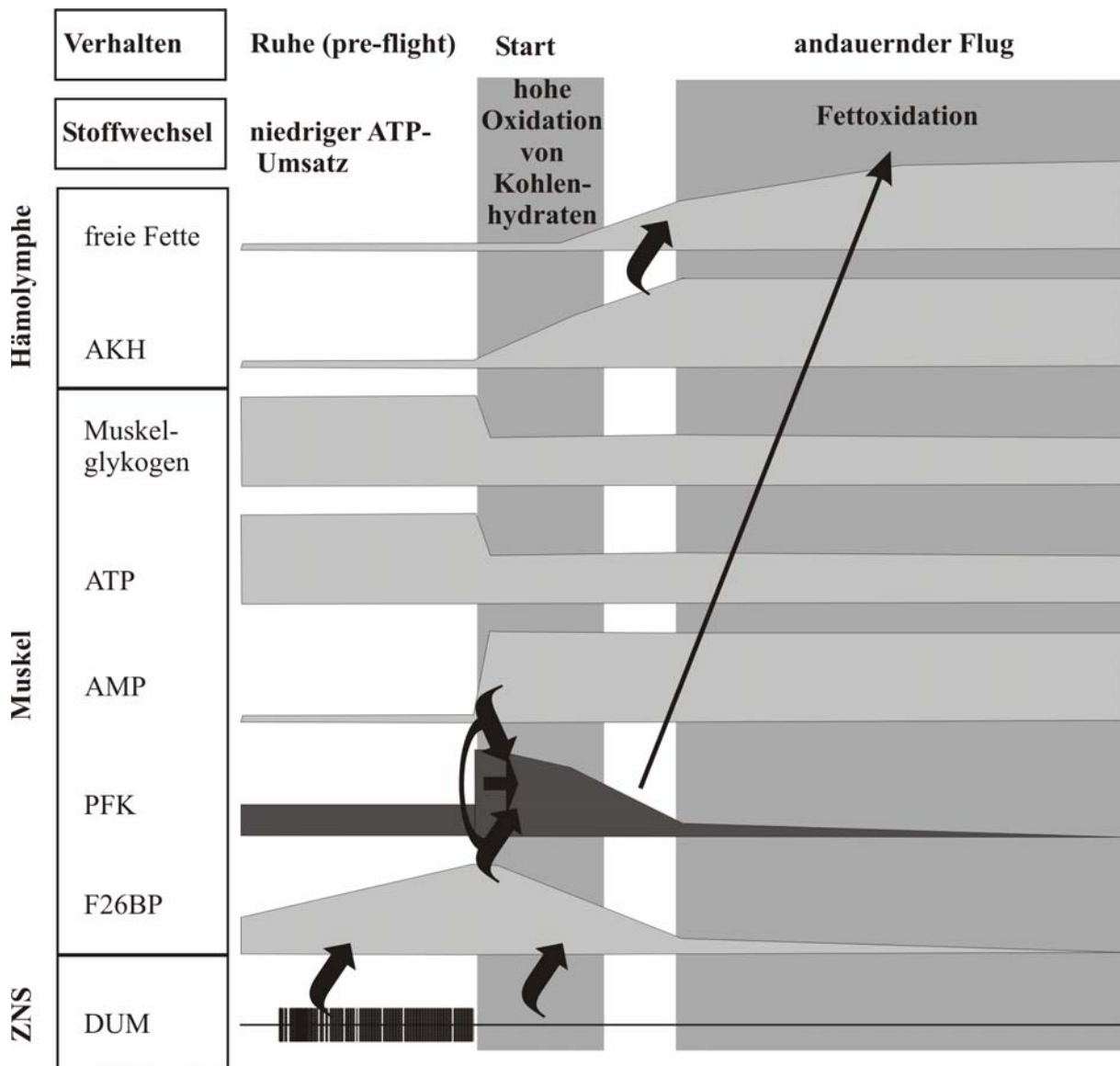
et al., 2001). Zum Zweiten muss der Stoffwechsel im Flugmuskel von der Verbrennung von Kohlenhydraten auf die Verbrennung von Fetten wechseln (Wegener, 1996). Das erfordert einen bislang ungeklärten, aber spezifischen Mechanismus, da Heuschrecken selbst nach 30 Minuten Flug noch erhebliche Kohlenhydrat-Reserven besitzen, obwohl die Glykolyse-Rate, im Vergleich zum Beginn des Fluges, um mehr als 90 % gesenkt worden ist. (Jutsum and Goldsworthy, 1976). Die Glykolyse-Rate wird durch die Aktivität der Phosphofruktokinase (PFK) kontrolliert. PFK wird durch physiologische Konzentrationen von ATP inhibiert und durch ADP und AMP de-inhibiert (Wegener et al., 1987). <sup>31</sup>P NMR Spektroskopie hat gezeigt, dass sich die Konzentrationen von ATP, ADP und AMP nur während der ersten 10 Sekunden eines Fluges ändern, danach aber konstant bleiben (Wegener et al., 1991). Daher können diese die Aktivität der PFK während anhaltender Flugaktivität nicht beeinflussen. Nur von einem einzigen Aktivator der PFK ist bekannt, dass seine Konzentration während der ersten 10 Minuten des Fluges im Flugmuskel um 80% gesenkt wird. Dabei handelt es sich um Fructose 2,6-Bisphosphat (F2,6BP; Wegener et al., 1986). F2,6BP aktiviert die PFK synergistisch zusammen mit AMP (Abb.36). F2,6BP ist kein Zwischenprodukt einer Stoffwechselkaskade, sondern ein intrazellulärer Signalstoff, dessen Konzentration auf extrazelluläre Signale hin verändert wird. Wie F2,6BP im Muskel reguliert wird, ist weder bei Vertebraten, noch bei Invertebraten bekannt (Wegener, 1996; Krause and Wegener, 1996; Wegener and Krause, 2002).

Im isolierten Flugmuskel kann F2,6BP durch Badapplikation von Oktopamin erhöht werden (Blau et al., 1994). Die Injektionen von unphysiologisch hohen Oktopamin-Konzentrationen in die Hämolymphe neutralisieren die Flug-induzierte Verringerung der F2,6BP Konzentration im Flugmuskel (Blau and Wegener, 1994). Zusammengefasst bedeutet das: Die Konzentrationen von F2,6BP und Oktopamin fallen bei anhaltender Flugaktivität im Flugmuskel. Der Abfall von F2,6BP ist eine der Ursachen, die für die verringerte Glykolyse-Rate in Frage kommt. Die Inhibition der DUM Neuronen kann mit dem Abfall von Oktopamin und somit auch von F2,6BP korreliert werden (Duch und Pflüger, 1999).

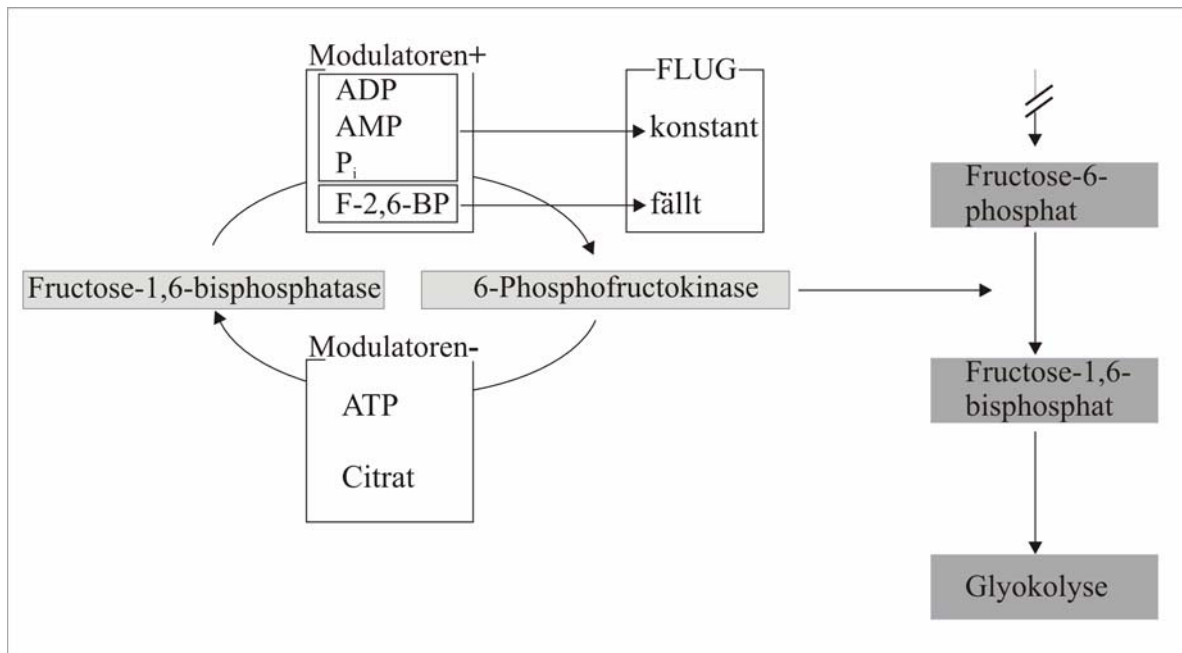
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Ausschüttung von Oktopamin durch die Aktivität der DUM Neurone hinreichend ist, um die Konzentration von F2,6BP im Flugmuskel zu erhöhen. Die Stimulation der DUM Neurone für 20 Minuten mit einer Frequenz von 1Hz, wie sie in semi-intakten Präparaten in Ruhe auftritt (Duch und Pflüger, 1999) führt im Mittel zu einer signifikanten Erhöhung von F2,6BP im Flugmuskel. Die große Variabilität zwischen den Einzelexperimenten kann aus zwei Ursachen resultieren. Zum einen

ist es möglich, dass die Stimulation nicht in allen Experimenten optimal war. So kann es durchaus passiert sein, dass nicht alle DUM Neurone, die M119 innervieren, stimuliert wurden. Für einen solchen Umstand spricht die Tatsache, dass bei verschiedenen Experimenten der Gehalt an F2,6BP in den denervierten Kontrollmuskeln annähernd gleich gering ist, der Mehrgehalt an F2,6BP in den stimulierten Muskeln jedoch variiert. Eine weitere Ursache für die Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten könnte auch in unterschiedlichen physiologischen Ausgangssituationen der Tiere liegen. Die Tiere wurden 4 Stunden vor jedem Experiment der Zucht entnommen. Die modulatorische Historie der Tiere war nicht bekannt. Trotz dieser Unbekannten war der Effekt von DUM Zellstimulation auf den F2,6BP Gehalt im Flugmuskel hoch-signifikant ( $P < 0.01$ ). Es ist nicht davon auszugehen, dass die normale Ruhe-Aktivität der DUM Neurone über erhöhte F2,6BP Konzentrationen zu erhöhten Glykolyse-Raten führt, da erhöhte F2,6BP Konzentrationen alleine keinen Effekt auf die Aktivität der PFK haben. F2,6BP wirkt synergistisch mit AMP auf die Aktivität der PFK. D.h., erhöhte F2,6BP Konzentrationen wirken nur bei erhöhter ATP-Umsatzrate auf die Aktivität der PFK. Erhöhte ATP Umsatzraten treten aber erst während des Fluges auf. Das bedeutet, dass die Ausschüttung von Oktopamin durch die Aktivität von DUM Neuronen vor dem Flug zu einer Erhöhung der F2,6P<sub>2</sub> Konzentration im Flugmuskel führt, die dann beim Start zusammen mit der stark erhöhten ATP-Umsatzrate (Wegener, 1996) während der ersten 10 Sekunden des Fluges zu einer hohen initialen Glykolyse-Rate führt. Zum besseren Verständnis ist in Abbildung 35 ein mögliches Ablaufschema dargestellt.





**Abb.35:** Dargestellt ist ein Schema für den Übergang vom Zuckerstoffwechsel zum Fettstoffwechsel im Flugmuskel der Heuschrecke. Ist das Tier in Ruhe wird nur wenig ATP im Muskel umgesetzt. Durch die Ausschüttung von Oktopamin durch DUM Zellaktivität wird der Gehalt an F2,6BP im Muskel hoch gehalten. Mit Beginn des Fluges steigt die Umsatzrate von ATP zu AMP stark an. F2,6BP und AMP stimulieren das Enzym Phosphofruktokinase (PFK), was die Glykolyse zur Bereitstellung von Kohlenhydraten zu Beginn des Fluges unterstützt. Mit Beginn des Fluges werden die DUM Neurone, die die Flugmuskel innervieren, gehemmt und eine Ausschüttung von Oktopamin auf den Muskel bleibt aus. Dies führt zu einer Reduzierung von F2,6BP, was wiederum zu einer Reduzierung der PFK führt. In dieser Phase fällt der ATP-Spiegel und der Muskelglykogen-Spiegel anfänglich ab, wird aber nicht vollständig verbraucht, sondern bleibt auf einem konstanten Niveau. Der Gehalt von adipokinetischen Enzymen (AKH) in der Hämolymphe steigt jedoch zu Beginn des Fluges an, was zu einer Mobilisierung von freien Fetten aus dem Fettkörper führt.



**Abb.36:** In der Abbildung ist der Regelkreis für eines der Schlüsselenzyme der Glykolyse dargestellt. Während der Glykolyse wird Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat phosphoryliert. Dieser Schritt wird durch das Enzym 6-Phosphofruktokinase katalysiert. 6-Phosphofruktokinase wird in Anwesenheit der Modulatoren ADP, AMP Pi und F2,6BP aus Fructose-1,6-bisphosphatase gewonnen. In Anwesenheit von ATP und Citrat liegt nur wenig aktive 6-Phosphofruktokinase vor und die Glykolyse wird reduziert.

Als Konsequenz ergibt sich daraus, dass der Flugmuskel durch die Aktivität der DUM Neurone in Ruhephasen des Tieres in die Bereitschaft versetzt wird, bei plötzlichem hohem ATP Umsatz eine hohe glykolytische Aktivität zu verrichten, wie es für die Startphase des Flugs unabdingbar ist. Mit dem Beginn des Fluges steigt die Umsatzrate von ATP um das 70 bis 100fache an (Beenackers et al., 1984; Wegener, 1990), was zu einer augenblicklichen Erhöhung des AMP Spiegels im aktiven Muskel führt (Wegener et al., 1991). In Wechselwirkungen mit den hohen F2,6BP Spiegeln gewährleistet die drastische Erhöhung von AMP hohe Glykolyseaktivität. Im Gegensatz dazu führt die Inhibition der DUM Neurone während des Fluges (Duch und Pflüger, 1999) zu einem Abfall der Oktopamin-Konzentration im Flugmuskel, da die Innervation der Flugmuskeln durch die DUM Neurone die einzige oktopaminerge Innervation der Flugmuskeln ist. Dass es zu einem Abfall des Oktopaminspiegels in den Flugmuskeln während des Fluges kommt, ist von Goosey und Candy (1982) für den dorso-ventralen Flugmuskel gezeigt worden. Ein Abfall des Oktopaminspiegels in den Flugmuskeln sollte zu einem Abfall des F2,6BP Spiegels in den Flugmuskeln führen. Dies

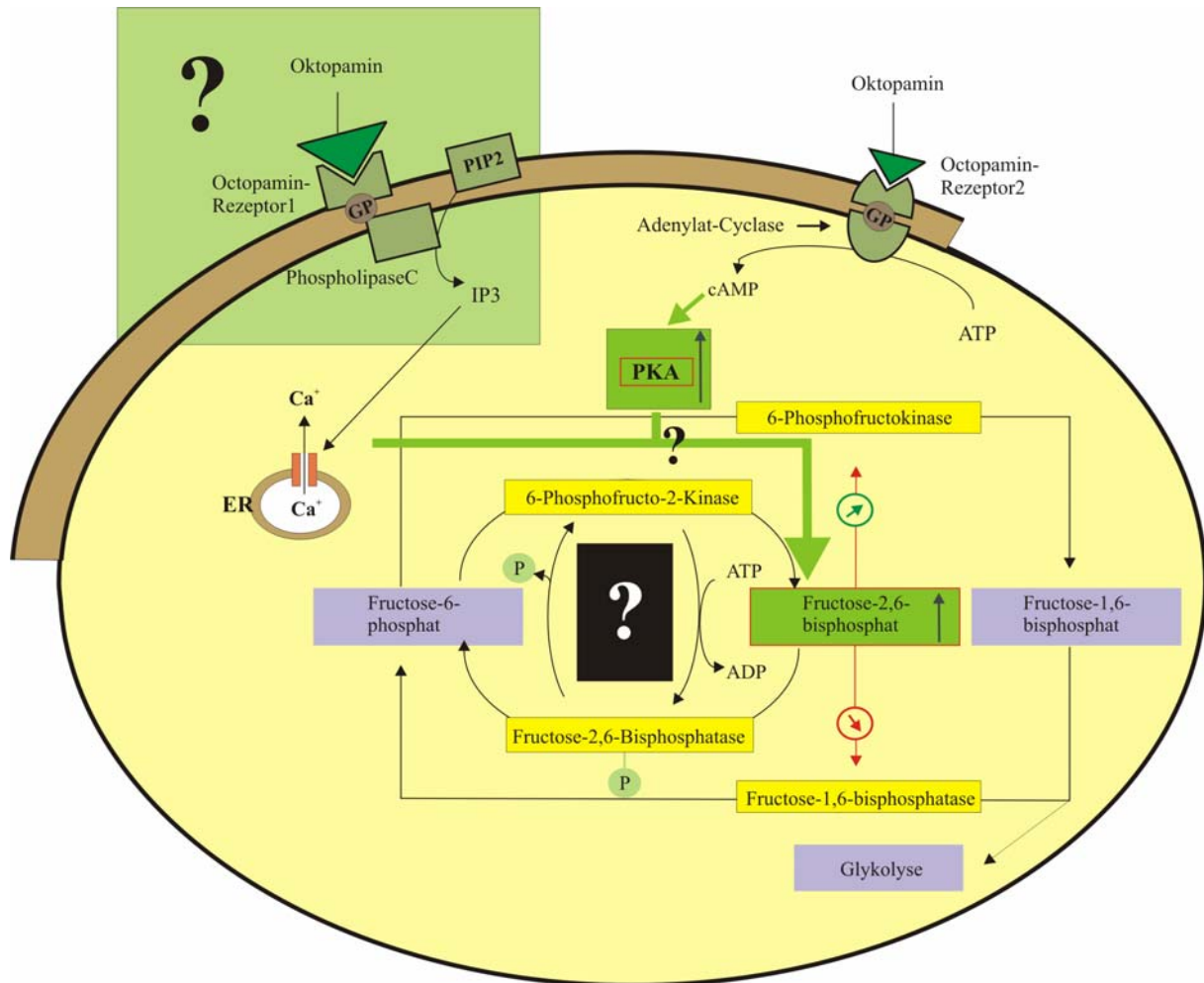
haben Wegener et al. (1986) nachgewiesen. Sie zeigten, dass nach 10 Minuten Flug der Gehalt an F<sub>2,6</sub>BP in den Flugmuskeln um 80% herabgesetzt ist. Bleiben alle anderen Effektoren der Phosphofruktokinase unbeeinträchtigt, wie es durch Magnet-Resonanz-Tomografie (MRT) gezeigt wurde (Wegener et al., 1991), führt die Herabsetzung von F<sub>2,6</sub>BP zu reduzierter Glykolyseaktivität (Candy et al., 1997). Die Aktivität von DUM Neuronen während des Fluges würde dem entgegenwirken. Tatsächlich wurde von Blau et al. (1994) gezeigt, dass die Applikation von Oktopamin der Herabsetzung des F<sub>2,6</sub>BP Gehalts in stimulierten, isolierten Flugmuskeln entgegenwirkt.

Dass ein solcher Mechanismus durch die efferenten modulatorischen DUM Neurone getragen werden könnte, widerspricht auch nicht die bis zu fünffach erhöhte Konzentration von Oktopamin in der Hämolymphe der Heuschrecke nach zehn Minuten Flug (Goosey und Candy, 1980, 1982; Orchard et al., 1993). In dem von Duch und Pflüger (1999) vorgestellten Modell fügt sich diese Erhöhung der Oktopamin-Konzentration in der Hämolymphe sogar unterstützend ein. Die Terminalen von DUM Neuronen verlaufen mit den Terminalen der Motoneurone in der gleichen Glia-scheide bis auf den Muskel (Rheuben, 1995), was zum einen eine präzise Freisetzung von Oktopamin auf die Flugmuskeln zulässt, und zum anderen eine effektive Trennung zwischen Muskel-Oktopamin und dem Oktopamin der Hämolymphe sicherstellt. Die erhöhte Oktopamin-Konzentration in der Hämolymphe führt wahrscheinlich zu einer Freisetzung der adipokinetischen Hormone AKH I und AKH II (Cheeseman und Goldsworthy, 1979; Goosey und Candy, 1980; Orchard, 1982, Orchard und Lange, 1983, 1985). Diese Hormone bewirken eine Freisetzung von Lipiden aus dem Fettkörper (Orchard und Lange, 1984). Zusätzlich induzieren die adipokinetischen Hormone die Kopplung der freigesetzten Lipide an Lipophorin (Van der Horst, 1990). Das Lipophorin-System stellt einen wichtigen Transportmechanismus dar, der während des Fluges die Lipide zu den Flugmuskeln transportiert (Beenackers et al., 1985; Shapiro et al., 1988). Die erhöhte Oktopamin-Konzentration in der Hämolymphe führt somit sowohl zur Mobilisierung von Fetten, als auch zu deren Transport zu den Flugmuskeln. Die Erhöhung der Oktopamin-Konzentration in der Hämolymphe könnte durch die efferenten DUM Neurone unterstützend reguliert werden. Duch und Pflüger (1999) haben gezeigt, dass diejenigen DUM Neurone, die die Beinmuskulatur innervieren, während des Fluges mit jedem Flügelabschlag Salven von AP's feuern. Die Ausschüttung von Oktopamin auf Beinmuskulatur während des Fluges scheint wenig sinnvoll, doch hat Bräunig (1997) gezeigt, dass die DUM<sub>3,4,5</sub> Neurone des Metathorakalganglions neurohämale Varikositäten an der Oberfläche von peripheren Nerven

aufweisen. Das spricht dafür, dass diese Zellen Oktopamin auch direkt in die Hämolymphe ausschütten, was den oben beschriebenen Mechanismus unterstützen würde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten mal, dass zentrale modulatorische Neurone in der Lage sind, den Energiestoffwechsel eines Flugmuskels dahingehend zu beeinflussen, dass entsprechend der Anforderungen, die an den Muskel gestellt werden, es zu einer Änderung des Stoffwechselweges kommt, der die erforderliche Energie für den entsprechenden Verhaltenskontext bereitstellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, dass der Effekt von Oktopamin auf den Energiestoffwechsel des Muskels teilweise über den PKA Signalweg vermittelt wird. Durch die Stimulation der DUM Neurone kommt es zu einer erhöhten PKA Aktivität, die zu einer Erhöhung des F2,6BP Gehalts führt. Die Applikation eines cAMP Donors ist in der Lage, den Effekt der erhöhten PKA Aktivität, wie sie durch DUM Zellstimulation hervorgerufen wird, zu imitieren. Die Applikation des cAMP Donors führt jedoch nicht zu einer Erhöhung des F2,6BP-Gehalts im Muskel. Der PKA Signalweg ist also notwendig, um eine Signaltransduktion von Oktopamin zu einem erhöhten Gehalt an F2,6BP zu erreichen. Die Experimente zeigen aber auch, dass mindestens ein weiterer Signalweg nötig ist, um die Signaltransduktion zu gewährleisten, da eine Erhöhung der PKA Aktivität durch einen cAMP Donor nicht zu einem erhöhten F2,6BP Spiegel führt. Abbildung 37 fasst die Ergebnisse dieser Arbeit in einem Schema zusammen.



**Abb.37:** Dargestellt ist ein theoretisches Modell, das die mögliche Signalkaskade zeigt, die durch die Ausschüttung von Oktopamin auf den Flugmuskel aktiviert wird. Oktopamin bindet an einen spezifischen Oktopamin-Rezeptor, wodurch der Gehalt an cAMP im Muskel steigt und PKA aktiviert wird. Der erhöhte PKA-Spiegel führt zu einem erhöhten F2,6BP-Spiegel und katalysiert somit die Glykolyse im Flugmuskel. Dieser Signalweg ist jedoch nicht ausreichend, um den Gehalt an F2,6BP im Muskel zu erhöhen. Für Oktopamin ist ein weiterer Rezeptortyp nachgewiesen, der den IP3 Signalweg aktiviert, ob dieser jedoch im Flugmuskel aktiviert wird, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden und bleibt spekulativ.

Es ist durchaus vorstellbar, dass Oktopamin über verschiedene Rezeptoren wirkt. Es sind unterschiedliche Rezeptortypen für Oktopamin beschrieben worden (Roeder, 1999). Im Allgemeinen werden vier Typen von Oktopamin-Rezeptoren (OA) unterschieden. Allen gemein ist, dass sie an G-Proteine gekoppelt sind und über intrazelluläre Signalkaskaden wirken (Nathanson und Greengard, 1973; Roeder 1999; Bräunig und Pflüger, 2001). OA<sub>1</sub>

haben inhibitorische Effekte auf den myogenen Rhythmus eines Muskelfaserbündels im Hinterbein der Heuschrecke (Evans, 1981). Dieser Rezeptor vermittelt den Effekt über intrazelluläre Änderungen der Kalzium Konzentration. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass dieser Effekt über den IP<sub>3</sub> Signalweg vermittelt wird. Der Oktopamin-Rezeptor OA<sub>2</sub> wird in die beiden Untergruppen OA<sub>2A</sub> und OA<sub>2B</sub> unterteilt (Evans, 1981; Evans, 1993). Beide Rezeptortypen vermitteln den modulatorischen Effekt von Oktopamin über die Aktivierung der Adenylatzyklase (Evans, 1984a, b). Über den vierten Oktopamin-Rezeptor OA<sub>3</sub> wird in der gegenwärtigen Literatur noch diskutiert. Aufgrund seines unterschiedlichen pharmakologischen Profils wurde er als weiterer Rezeptortyp klassifiziert, der nur im Zentralnervensystem lokalisiert ist (Roeder und Gewecke, 1990; Roeder, 1992,1995; Roeder und Nathanson, 1993). Eine andere Position vertritt die Auffassung, dass dieser Rezeptor nur als eine weitere Untergruppe von OA<sub>2</sub> und als OA<sub>2C</sub> eingestuft werden sollte (Evans und Robb, 1993; Howell und Evans, 1998). In den Haemozyten der Schabe wurden überdies Oktopamin-Rezeptoren beschrieben, die sowohl über den IP<sub>3</sub> Signalweg wirken, als auch über die Aktivierung der Adenylatzyklase (Baines und Downer, 1994).

In der Abbildung 37 ist der Mechanismus, der zu der Synthese von F2,6BP aus Fructose-6-Phosphat führt, als so genannte 'black box' dargestellt. F2,6BP wird durch das Enzym 6-Phosphofrukt-2-Kinase (PFK-2) aus Fructose-6-Phosphat (F6P) synthetisiert und durch das Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase-2) zu F6P reduziert (Abb.36). Beide enzymatischen Aktivitäten sind auf einem Protein lokalisiert (Wegener und Krause, 2002). Bei dem PFK-2/FBPase-2 Komplex handelt es sich somit um ein bifunktionales Enzym. Eine Aufreinigung dieses Komplexes brachte zwei Isoformen hervor (Wegener und Krause, 2002). Man unterscheidet eine Leber-Typ (L) Isoform und eine Muskel-Typ (M) Isoform (Wegener und Krause, 2002). Interessanterweise ließ sich die M-Isoform weder durch Proteinkinase A (PKA) noch durch Proteinkinase C (PKC) oder durch eine Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase phosphorylieren. Dies trifft allerdings nicht auf die L-Isoform zu (Wegener und Krause, 2002). Sie beschrieben außerdem für den Froschmuskel, dass der Gehalt an F2,6BP, während der Frosch in Ruhe ist, niedrig ist und mit zunehmender Arbeit, die der Muskel leistet, ansteigt (Wegener und Krause, 2002). Dieser Mechanismus kann so im Flugmuskel der Heuschrecke allerdings nicht greifen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen klar, dass es sich im Flugmuskel der Heuschrecke genau umgekehrt verhält. Ist das Tier in Ruhe, wird Oktopamin stetig auf den Flugmuskel ausgeschüttet und führt zu einem erhöhtem Gehalt an F2,6BP. Mit dem Beginn des Fluges werden die DUM Neurone, und damit die einzige Oktopamin-Quelle in der Peripherie, inhibiert und es kommt zu einem Abfall von F2,6BP im

Flugmuskel. Das heißt, dass ein aktiver Muskel einen niedrigen Gehalt an F<sub>2,6</sub>BP und ein Ruhemuskel einen hohen Gehalt an F<sub>2,6</sub>BP hat. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit klar, dass dieser Effekt, im Gegensatz zu der M-Isoform des Froschmuskels teilweise über den PKA Signalweg vermittelt wird. Dass dieser Mechanismus den gegenteiligen Effekt hat, den er im Froschmuskel zu haben scheint (Wegener und Krause, 2002), ist funktionell sinnvoll, da der Froschmuskel die benötigte Energie aus der anoeroben Phosphorylierung von Glykogen gewinnt. Da die Kohlehydratspeicher der Heuschrecke sehr begrenzt sind und der Stoffwechsel von Insekten ausschließlich aerob ist (Candy et al., 1997), wäre die Energiegewinnung aus Zucker nur von kurzer Dauer und macht das Umschalten auf Fettstoffwechsel bei längeren Flügen unabdingbar.

#### 4.4. Stimulationsexperimente zur Ermittlung des Einflusses neuronaler Aktivität auf das Auswachsen persistierender Motoneurone während der Larvalentwicklung von *Manduca sexta*

Im Zuge dieser Arbeit wurden chronisch implantierte, bipolare extrazelluläre Elektroden entwickelt, um von vollständig intakten Tieren während des Verhaltens abzuleiten. Wie in Kapitel 3.1. und 4.1. dargestellt war es leider nicht möglich, von den extrem dünnen Axonen der DUM Neurone der Heuschrecke während des Laufens abzuleiten. Die Elektroden eignen sich allerdings hervorragend, die Aktivität von Motoneuronen extrazellulär abzuleiten. Das bringt methodisch für die Analyse motorischer Programme bei hemimetabolen Insekten keine wesentlichen Vorteile, da dort die Aktivität von Motoneuronen durch Myogramme hervorragend bestimmt werden kann (Duch und Pflüger, 1995). Das ist aber nicht bei allen Insekten der Fall. In den Larvalstadien von holometabolen Insekten kann man von den langsam kontrahierenden Muskeln der Körperwände nur sehr bedingt durch Myogramme die Aktivität der entsprechenden Motoneurone messen. In späten Larvalstadien ist es vollkommen unmöglich, Myogramme durchzuführen, da die meisten larvalen Muskeln zu dieser Zeit degenerieren (Consoulas et al., 2000; Tissot und Stocker, 2000). Die Kenntnis der motorischen Aktivität ist aber gerade während dieser Stadien besonders interessant, da das gesamte neuromuskuläre System genau dann drastischen, entwicklungsbedingten, strukturellen Änderungen unterworfen ist. Parallel dazu ändert sich das motorische Verhalten bei holometabolen Insekten während der späten Larvalstadien in einer stereotypen Art und Weise (Dominick und Truman, 1984a; b; Zitnan et al., 1999). Um zu testen, ob

entwicklungsbedingte Änderungen der motorischen Programme während der späten Larvalstadien von holometabolen Insekten eine funktionelle Bedeutung für die parallel auftretenden strukturellen Änderungen besitzen, muss die Aktivität identifizierter Motoneurone in intakten Tieren während der Entwicklung gemessen und manipuliert werden. Genau das kann mit den in dieser Arbeit entwickelten, chronisch implantierten Elektroden durchgeführt werden. Daher wurde im Rahmen der Arbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Carsten Duch der Einfluss der Aktivität von identifizierten Motoneuronen auf deren axonales Wachstum während der späten Larvalentwicklung (Wanderstadien, siehe Einleitung) des Tabakswärmers *Manduca sexta* untersucht.

#### 4.4.1. Neuronale Aktivität und Verhalten

Insekten, die eine Metamorphose durchlaufen (holometabole Insekten), sind mit dramatischen Änderungen in der Entwicklung und im Verhalten konfrontiert. Das typische larvale Verhalten ist geprägt von Kriechen, Fressen, Feindabwehr und Häutung. Das Verhaltensrepertoire im Adultstadium unterscheidet sich meist völlig und ist durch Verhaltensformen wie Laufen, Fliegen und Fortpflanzung gekennzeichnet. Um diesen neuen Anforderungen gerecht werden zu können, werden während der Metamorphose von holometabolen Insekten die meisten larvalen Muskeln und sensorische Neurone durch neue adulte Elemente ersetzt. Die meisten Motoneurone hingegen persistieren und werden den neuen Anforderungen, die im adulten Organismus an sie gestellt werden, angepasst und umgebaut (Consoulas et al., 2000; Tissot und Stocker, 2000). Die Kontrolle der meisten dieser strukturellen Änderungen wird der Wirkung von Hormonen zugeschrieben, da die Metamorphose unter hormoneller Kontrolle von Steroidhormonen steht (Weeks und Truman, 1986; Truman und Riddiford, 2002; Truman et al., 1994). Die Frage, ob es jedoch auch aktivitätsabhängige Mechanismen gibt, die in Wechselwirkung mit hormoneller Aktivität an diesen strukturellen Reorganisationen beteiligt sind, ist bislang weitgehend ungeklärt. Um eine solche Hypothese zu untersuchen ist eine genaue Kenntnis der neuronalen Aktivität während definierter Entwicklungsphasen eine Grundvoraussetzung. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die motorische Aktivität von identifizierten Motoneuronen mit Hilfe chronisch implantierter Hakenelektroden für spezifische Entwicklungsstadien dokumentiert. Dies gelang, ohne dass die Tiere in ihrer Entwicklung gestört wurden.

Im Wanderstadium von *Manduca* Larven unterscheidet sich die motorische Aktivität signifikant zwischen den einzelnen Stadien bezüglich der Gesamtanzahl der Spikes, der Dauer



der Salven von Aktionspotentialen der Motoneurone, sowie deren Form und deren Periode. Des Weiteren werden unterschiedliche Motoneurone zu unterschiedlichen Zeitpunkten rekrutiert. Dabei scheint es so, als dass die auftretenden motorischen Muster mit bestimmten stereotypen Verhaltensweisen, wie sie in den unterschiedlichen Phasen des Wanderstadiums vorkommen, korrelieren. Die hohe Anzahl von Bursts, wie sie im Wanderstadium zwei auftreten, korreliert mit dem für dieses Entwicklungsstadium typischen Umherkriechen und dem Eingraben der Tiere (Dominick und Truman, 1984). Der signifikante Abfall der motorischen Aktivität, der in dieser Arbeit während des Übergangs von W2 zu W3 beobachtet wurde, findet genau zu dem Zeitpunkt statt, in dem das Tier in seine stationäre Phase übergeht nachdem es sich eingegraben hat. Die chronischen Ableitungen, die in dieser Arbeit über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden durchgeführt wurden, zeigen, dass motorische Aktivität in Form von Salven von Aktionspotentialen über alle Entwicklungsstadien hinweg auftreten. Diese stammen von Motoneuronen, die die ventrale Muskulatur innervieren. Die zukünftigen DLM Motoneurone hingegen zeigen vom Wanderstadium 3 bis zur Puppenhäutung keine Aktivität. Auch dieser Befund korreliert mit zuvor beschriebenen Entwicklungsschritten in *Manduca*. Die Dauer der Salven und die Frequenz von Aktionspotentialen innerhalb dieser Salven der kleineren motorischen Einheiten zwischen dem Wanderstadium W2 und W4 nehmen ebenfalls ab. Die Reduzierung der motorischen Aktivität vor der Puppenhäutung scheint ein generelles Prinzip bei Arthropoden zu sein. Ähnlich wie *Manduca*, die nur noch eine sehr reduzierte Lokomotion während der späten Lavalentwicklung zeigen (Dominick und Truman, 1984), reduzieren Hummer ihre Muskelaktivität indem sie wiederholte Schwimmmuster, wie sie dem Fluchtverhalten zu Grund liegen, reduzieren (Cromarty et al., 1991). *Drosophila* Larven unterbrechen ihre Lokomotion durch zunehmend längere Ruhephasen (Wang et al., 1997). Man geht davon aus, dass diese Ruhephasen vor einer Häutung dazu dienen, die sich entwickelnde Puppe, deren Struktur sehr fragil ist, vor mechanischer Beschädigung zu schützen (Ruffner et al., 1999). Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, scheint das vorübergehende Aussetzen von motorischer Aktivität darüber hinaus auch für strukturelle Veränderungen während der neuromuskulären Entwicklung nötig zu sein.

#### 4.4.2. Verminderte motorische Aktivität ist für die strukturellen Veränderungen von Motor-Terminalen von funktioneller Bedeutung

Während der Metamorphose von Amphibien (Alley und Omerzy, 1998) und holometabolen Insekten (Fernandes und VijayRaghavan, 1993; Consoulas et al., 2000) ist das „Recycling“ von Motoneuronen für neue adulte Funktionen durch das Zurückziehen axonaler Fortsätze und terminaler Varikositäten vom degenerierenden Muskel sowie dem erneuten Auswachsen der Terminalen dieser Neurone auf sich neu bildende adulte Muskeln gekennzeichnet. Es ist nur sehr wenig über den Mechanismus bekannt, der das Zurückziehen und das erneute Auswachsen der Terminalen steuert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Zurückziehen axonaler Terminalen zeitlich mit einem drastischen Abfall motorischer Aktivität während der normalen Entwicklung korreliert. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob das Zurückziehen der Terminalen der Motoneurone durch den Abfall der Aktivität induziert wird, oder ob es durch Signale des degenerierenden Muskels vermittelt wird. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die bereits stark zurückgezogenen Terminalen dieser Motoneurone durch elektrische Stimulation erneut auswachsen. Eine morphometrische Analyse hat ergeben, dass dieses erneute Auswachsen der Terminalen statistisch signifikant war. Darüber hinaus konnte mit verschiedenen Stimulationsprotokollen gezeigt werden, dass längere und höher frequente Stimulationen zu einem stärkeren Auswachsen als kürzere Stimulationen führen. Es gibt also eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Stärke der motorischen Aktivität und dem Grad des axonalen Wachstums.

Stimulationsmuster, die die motorische Aktivität simulierten, wie sie während der Puppenhäutung auftrat, waren hinreichend, um signifikantes Axon-Wachstum zu induzieren. In sich normal entwickelnden Tieren ist der höchste Grad der Terminalenregression während des Stadiums W4 und dem frühen Puppenstadium P0 erreicht (Duch et al., 2000). Das erneute Auswachsen setzt während der frühen Puppenstadien ein (Duch et al., 2000). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die natürlich vorkommenden motorischen Muster während der Häutung eines der Signale sind, die zu einem erneuten Auswachsen der Terminalen führen. Diese Vermutung wird dadurch verstärkt, dass Stimulationen, die zwar die gleiche Anzahl an Spikes aufwiesen, wie das imitierte Häutungsmuster, jedoch tonisch appliziert wurden, nicht zu einem signifikanten Auswachsen der Terminalen führten.

Die beobachteten Veränderungen in der motorischen Aktivität korrelieren mit entwicklungspezifischen Verhaltensänderungen der Tiere, in ihrer normalen Umgebung. In den durchgeführten Experimenten wurden die äußeren Bedingungen über den gesamten

Zeitraum der Versuche für die Tiere konstant gehalten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass entwicklungsbedingte Änderungen der motorischen Aktivität auf endogene Faktoren zurückzuführen sind. Der Beginn des Wanderstadiums korreliert zeitlich mit einem Ansteigen der Steroidhormontiter während des so genannten „pre-pupal peak“ zum Zeitpunkt W0 bis W2 (Bollenbacher et al., 1981). Es wäre also vorstellbar, dass die ausgeprägte Aktivität der Motoneurone, wie sie im Wanderstadium 2 beobachtet wurde, auf einen erhöhten Hormonspiegel zurückzuführen ist. Dominick und Truman (1984b) haben gezeigt, dass sich durch die Applikation von 20-Hydroxyecdysen (20 HE) in der Abwesenheit von Juvenilhormon Verhaltensweisen, die für das Wanderstadium typisch sind, auslösen lassen. Dabei bleibt jedoch ungeklärt, ob Steroidhormone direkt auf motorische Schaltkreise wirken und ob diese Effekte genetisch bedingt sind oder nicht. Der Mechanismus, der dem stadienspezifischen Abfall der motorischen Aktivität oder der selektiven Rekrutierung kleinerer Motoreinheiten zugrunde liegt, ist ebenfalls nicht bekannt. Es wäre allerdings möglich, dass sinkende Spiegel von Ecdysteroiden (Bollenbacher et al., 1981) die motorischen Muster nach dem Wanderstadium W2 beeinflussen. So wurde z.B. gezeigt, dass der Abfall von 20HE spezifische Antworten in individuellen Motoneuronen hervorrufen kann (Zee und Weeks, 2001). In Ratten ist das neuronale Netzwerk, das dem Fortpflanzungsverhalten zu Grunde liegt, abhängig von der Wechselwirkung von Östrogen und Progesteron in Neuronen des Hypothalamus (Pfaff et al., 2002). Es wäre also vorstellbar, dass wechselnde Titer von Ecdysteroiden eine Kaskade von Peptidhormonfreisetzung auslösen, welche ihrerseits spezifische motorische Aktivität während der einzelnen Stadien auslöst. Dies ist für die Häutung von *Manduca* beschrieben worden (Gammie und Truman, 1997; Zitnan et al., 1999). Dass modulatorische Substanzen oder Hormone bei der Regulierung motorischer Programme eine Rolle spielen können, wurde in einer Vielzahl von Systemen gezeigt (Insektenflug, Sombati und Hoyle, 1984; Laufen der Katze, Grillner und Zangger, 1979; Aggressionsverhalten von Hummern, Kravitz, 1988). Darüber hinaus können Neuromodulatoren die intrinsischen Eigenschaften (Flamm und Harris Warrick, 1986) und die synaptischen Eigenschaften (Johnsson et al., 1993) von Neuronen innerhalb eines Netzwerks ändern. Die motorische Aktivität während des späten Wanderstadiums 4 zeigt einige Ähnlichkeiten mit motorischen Häutungsmustern. So ähneln sich z.B. die Dauer und die Frequenz der Aktionspotential Salven. Es ist möglich, dass die motorische Aktivität während der Wanderstadien wenn nicht durch die gleichen, so doch durch überlappende Kaskaden von Neuropeptiden, wie sie der Häutung zu Grunde liegen, gesteuert wird.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe chronisch implantierter Elektroden erstmals gezeigt wurde, dass die Änderungen der Aktivität identifizierter Motoneurone, wie sie während der normalen „wildtyp-Entwicklung“ auftreten, Auswirkungen auf das axonale Wachstums dieser Neurone haben. Es erscheint wahrscheinlich, dass die Änderungen der motorischen Aktivitätsmuster ihrerseits unter hormoneller Kontrolle stehen.