

Untersuchungen von physiologischen und molekularen Grundlagen der Mechanosensorik bei Insekten

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Biologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Joscha Arne Alt
aus Gießen

2019

Referent: Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan

Korreferent: Prof. Dr. Ivan Manzini

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	1
II. Abstract	3
1. Anatomie und Physiologie vibrationssensitiver Organe bei Zikaden und Heuschrecken	4
1.1 Einleitung	4
1.2 Material und Methoden	7
1.2.1 Neuroanatomie der Beine von <i>Okanagana rimosa</i>	7
1.2.2 Physiologie der Sensorik des mesothorakalen Beines von <i>Okanagana rimosa</i>	8
1.2.3 Physiologie der abdominalen Chordotonalorgane von <i>Okanagana rimosa</i> und <i>Schistocerca gregaria</i>	9
1.3 Ergebnisse	12
1.3.1 Neuroanatomie der Beine von <i>Okanagana rimosa</i>	12
1.3.2 Neurophysiologie der Beinsensorik von <i>Okanagana rimosa</i>	14
1.3.3 Neurophysiologie der abdominalen Chordotonalorgane von <i>Okanagana rimosa</i> und <i>Schistocerca gregaria</i>	16
1.4 Diskussion	19
1.4.1 Neuroanatomie der Beine und deren sensorischer Organe, sowie Vibrationssensitivität der Mittelbeine der adulten Zikade <i>Okanagana rimosa</i>	19
1.4.2 Vibrationssensitivität der abdominalen Chordotonalorgane von <i>Okanagana rimosa</i> und <i>Schistocerca gregaria</i>	22

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von <i>Drosophila melanogaster</i>	27
2.1 Einleitung	27
2.2 Material und Methoden	30
2.3 Ergebnissen	33
2.4 Diskussion	36
3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion	40
3.1 Einleitung	40
3.1.1 Aufbau von Chordotonalorganen und Scolopidien	40
3.1.2 Mechanotransduktion in neuronale Signale bei scolopidialen Einheiten	42
3.1.3 Das Zelladhäsionsmolekül Fasciclin 2	43
3.1.4 Das extrazelluläre Matrix-Protein Nidogen	44
3.1.5 Zielsetzung bezüglich den molekularen Komponenten von Chordotonalorganen	44
3.2 Material und Methoden	46
3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von Fas2 und NDG	46
3.2.2 Elektrophysiologische Untersuchung der Antenne bei <i>Drosophila melanogaster</i>	49
3.2.3 Tube-climbing Test	50
3.2.4 Verhaltenstest der larvalen Fortbewegung	50
3.3 Ergebnisse	52
3.3.1 Fasciclin 2 in embryonalen und adulten Chordotonalorganen von <i>Schistocerca gregaria</i>	52
3.3.2 Fas2-Lokalisation im Johnston'schen Organ von <i>Drosophila melanogaster</i>	55

3.3.3 Physiologie des Johnston'schen Organs bei reduziertem Fas2-Level	56
3.3.4 Gravitationswahrnehmung adulter <i>Drosophila</i> bei reduziertem Fas2-Levels	58
3.3.5 Physiologische Auswirkungen einer Reduktion des Nidogen-Levels	59
3.3.6 NDG-Lokalisation im Johnston'schen Organ von <i>Drosophila melanogaster</i>	61
3.3.7 Physiologie des Johnston'schen Organs bei reduziertem Nidogen-Level	61
3.4 Diskussion	63
3.4.1 Fasciclin2	63
3.4.2 Nidogen	67
3.4.3 Die Funktion von Nidogen und Fasciclin 2 in Chordotonalorganen	68
3.4.4 Resumé	71
4. Literatur	72
5. Anhang	95
5.1 Erklärung zu vorangehenden Veröffentlichungen	95
5.2 Weitere Veröffentlichungen mit anteiliger Eigenleistung	96
5.3 Rezepte	97
6. Selbstständigkeitserklärung	98

I. Zusammenfassung

In Insekten findet die Wahrnehmung mechanischer Reize (z.B. Schall, Substratvibrationen) besonders mittels scolopidialen Sinneseinheiten statt. Die grundlegenden physiologischen und molekularen Prozesse der Mechanotransduktion können an einzelnen Einheiten, aber auch an komplexen Skolopodialorganen (Chordotonalorgane) untersucht werden. Die hier durchgeführten Studien beschäftigen sich in einem vergleichenden Ansatz mit anatomischen, physiologischen und molekularen Grundlagen dieser Organe bei verschiedenen Insektenarten.

In dem ersten Thesisbereich konnte zum ersten Mal mittels neuronalem Tracing die Neuroanatomie von Chordotonalorganen (COs) im Bein der Zikade *Okanagana rimosa* dargestellt werden. Das femorale Chordotonalorgan (feCO) weist eine Unterteilung in drei verschiedene Zellkluster auf und das Subgenualorgan (SGO) besteht aus nur zwei Zellen. Elektrophysiologisch ermittelte Schwellenkurven zeigen ein breites Frequenz tuning zwischen 200 Hz und 5 kHz als Antwort auf Vibrationsreize.

Auch konnte hier erstmals gezeigt werden, dass abdominale COs sehr empfindlich auf vibratorische Reizung der caudalen Abdominalsternite reagieren. Die Schwellenkurven liegen sowohl bei der Zikade *O. rimosa*, wie auch bei der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* in dem Bereich der Beinsensorik. Das Ergebnis eröffnet neue Konzepte für Untersuchungen der Vibrationswahrnehmung, z.B. in Insekten denen das hochempfindliche Subgenualorgan in den Beinen fehlt.

Im zweiten Thesisbereich wurde das femorale Chordotonalorgan von *Drosophila melanogaster* elektrophysiologisch untersucht. Die Ergebnisse ermöglichen einen Vergleich zu dem bereits vielfach untersuchten Johnston'schen Organ. Mittels Injektion von Acetylcholin-Rezeptor-Antagonisten wurde die Ausprägung motorischer Signale vermindert und so konnte eine primär sensorische Reaktion auf Vibrationsstimulation mit Frequenzen unter 200 Hz gezeigt werden. Die hier verwendete Methode scheint somit für weiterführende Studien der Grundlagen der Mechanotransduktion geeignet.

Im dritten Thesisbereich wurden die Rollen des Zelladhäsionsprotein Fasciclin 2 und des Protein der extrazellulären Matrix, Nidogen, auf ihre Lokalisation und funktionelle Rolle im Bezug zur Mechanotransduktion in Chordotonalorganen untersucht. Beide Proteine sind im Bereich der Scolopalzellen lokalisiert, wie vergleichende Untersuchungen bei *D. melanogaster* und *S. gregaria* zeigen. Verhaltensversuche und elektrophysiologische Untersuchungen bei *D. melanogaster* zeigen

I. Zusammenfassung

eine verminderte Ausprägung mechanosensorisch induzierter Reaktion bei reduziertem Level dieser Proteine. Damit wurde erstmals einem Zelladhäsionsmolekül und einem Molekül der ECM eine funktionelle Rolle bei der Mechanotransduktion nachgewiesen.

II. Abstract

In insects, the perception of mechanical stimuli (e.g., sound, substrate vibrations) is mediated through scolopidial sensory units. The fundamental physiological and molecular processes of the mechanotransduction can be studied on individual scolopidial units as well as on complex scolopidial organs (chordotonal organs). The main purpose of this study is the investigation of the anatomical, physiological and molecular bases of these organs in different species of insects. It is divided into three separate sections.

In the first section, neuronal tracing was used to visualize the neuroanatomy of the various chordotonal organs (COs) in the leg of an adult cicada, *Okanagana rimosa*. The femoral chordotonal organ (feCO) is subdivided into three different cell clusters and the subgenual organ (SGO) consists of only two cells. Electrophysiologically determined threshold curves show a wide frequency tuning between 200 Hz and 5 kHz in response to vibration stimuli.

Apart from sensory system of the leg it is shown for the first time that abdominal COs are very sensitive to vibrational stimulation of the caudal abdominal sternites. The threshold curves are comparable to those of the leg sensory system of the cicada *O. rimosa* and the locust *Schistocerca gregaria*. These results opens up new possibilities for investigations of the perception of vibrations, e.g. in insects lacking the highly sensitive subgenual organ in the legs.

In the second section of the thesis, the femoral chordotonal organ of *Drosophila melanogaster* was examined electrophysiologically. The results allow a comparison to the Johnston's organ, which has already been studied extensively. The occurrence of motor signals was reduced by injection of acetylcholine receptor antagonists, thus demonstrating a primary sensory response to vibratory stimulation at frequencies below 200 Hz. The method used here seems suitable for further studies of the fundamental processes of mechanotransduction mechanism.

In the third section, the roles of the cell adhesion protein fasciclin 2 and the extracellular matrix protein nidogen were investigated for their localization and their functional role related to the mechanotransduction in chordotonal organs. Comparative studies in *D. melanogaster* and *S. gregaria* show that both proteins are located in the area of the scolopal cells. Behavioral tests and electrophysiological studies in *D. melanogaster* reveal a reduced mechanosensory induced neuronal reaction in flies with a lowered level of these proteins. Thus, for the first time, a functional role for a cell adhesion molecule and a molecule of the ECM in the mechanotransduction in chordotonal organs of insects was demonstrated.

1. Anatomie und Physiologie vibrationssensitiver Organe bei Zikaden und Heuschrecken

1.1 Einleitung

Die Wahrnehmung von substrat-vermittelten Vibrationen ist eine evolutionär gesehen relativ alte sensorische Eigenschaft und übernimmt verschiedene verhaltensbezogene Funktionen, wie Partnerfindung und Räuber-Vermeidung (Drosopoulos und Claridge 2006). Generell ist die Kommunikation über Vibrations-Signale wichtig in vielen Spezies der Hemipteren (Schnabelkerfe) (Čokl und Virant-Doberlet 2003). Zwergzikaden (Cicadellidae) weisen eine gut entwickelte Wahrnehmung von Vibrationen auf, besonders in Bezug zur Räuber-Vermeidung (Cocroft 1996, Cocroft et al. 2000). Evolutionär ursprünglichere Zikaden-Arten produzieren zur Kommunikation substrat-getragene Signale, wohingegen weiter entwickeltere Arten eher akustische, durch Luft übertragenen Signale zu Kommunikation verwenden (Claridge et al. 1999). Unklar ist hierbei ob substrat-getragene Vibrationen auch für die Kommunikation in Zikaden-Arten, welche sich auf eine Kommunikation durch akustische Signale spezialisiert haben, eine unterstützende Rolle übernehmen.

Die akustischen intraspezifischen Kommunikations-Signale sind wichtig für das Sexualverhalten und die Reproduktion (Alexander und Moore 1958, Weber et al. 1988, Sanborn und Phillips 1999, Cooley und Marshall 2001, Boulard 2006, Fonseca 2014). Damit einhergehend weisen Zikaden ein gut entwickeltes Hörsystem mit einer hohen Anzahl an, für die Auditorik notwendigen, sensorischen Zellen auf (ca. 1000 Zellen) (Huber et al. 1980, Fonseca 1993, Daws und Hennig 1996, Fonseca et al. 2000, Strauß und Lakes-Harlan 2009). Akustische Signale dienen bei den meisten Zikaden-Arten der Partnerfindung über weite Strecken. Es ist bekannt, dass während der Produktion von akustischen Lockrufen ein Teil der Signal-Energie als Substrat-Vibration abgegeben wird (Hill 1997, Stölting et al. 2002). Die Frequenzspitze liegt hierbei um 9 kHz und entspricht damit der des akustischen Lockrufs. Somit könnten diese Vibrationssignale auf kurzer Distanz die Phonotaxis unterstützen und die Lokalisation des Signalgebers in einer Gruppe von Individuen verbessern. Ähnliches wurde bereits für Arten der Orthopteren gezeigt (Latimer und Schatral 1983, Weidemann und Keuper 1987, Hill 2008). Auch können Vibrations-Signale während der Lockruferzeugung durch verschiedene Bewegungen wie beispielsweise Flügeldrehungen entstehen (Dunning et al.

1979). Abgesehen von der Beteiligung an der innerartlichen Kommunikation ermöglicht oder unterstützt die Wahrnehmung von Vibrationen die Lokalisation möglicher Räuber.

Für die Wahrnehmung von Vibrationen nutzen Insekten vor allem scolopidiale (chordotonale) Sinnesorgane (Reviews: Field und Matheson 1998, Lakes-Harlan und Strauß 2014). Diese Organe kommen in verschiedener Anzahl im Körper und den Körperanhängen von wahrscheinlich allen Insekten vor. Hemipteren besitzen in ihren Beinen jeweils ein femorales Chordotonalorgan (feCO), ein tibiales Subgenualorgan (SGO), ein tibio-tarsales Chordotonalorgan und ein tarsales Chordotonalorgan (Debaisieux 1938, Wiese 1972, Michel et al. 1983). Allerdings ist über die Neuroanatomie der sensorischen Organe in den Beinen von Zikaden noch verhältnismäßig wenig bekannt (Nishino et al. 2016). Die Sensitivität auf Vibrationen der in den Beinen gelegenen Chordotonalorgane wurde in Heteroptera (Wanzen) bisher nur anhand der subgenualen Rezeptorzellen gezeigt (Čokl 1983, Čokl et al., 2014).

Wie bereits erwähnt beschränken sich die mechanosensorischen Chordotonalorgane (COs) in ihrer Lage nicht auf die Beine, sondern sind im gesamten Körper vertreten, wobei normalerweise die in den Beinen vorhandenen Chordotonalorgane mit der Wahrnehmung von Vibrationen in Verbindung gebracht werden (Debaisieux 1938, Wiese 1972, Michel et al. 1983, Lakes-Harlan und Strauß 2014). Viele Insekten berühren die Substratoberfläche während Ruhephasen, aber auch bei der Fortbewegung mit dem Abdomen. Dabei ist bekannt, dass Chordotonalorgane in jedem abdominalen Segment vorhanden sind (Meier und Reichert 1990). Diese sind potentiell in der Lage substratgetragene Vibrationssignale wahrzunehmen. Gerade die Neuroanatomie der Orthopteren wie *Locusta migratoria* und *Schistocerca gregaria* ist in Bezug auf die abdominalen Chordotonalorganen gut dokumentiert (Hustert 1974, Hustert 1975, Meier et al. 1991, Rytlewski 1987).

In dieser Studie soll die Neuroanatomie der vibrationssensitiven Organe in den Beinen der Zikade *Okanagana rimosa*, sowie zum ersten mal die Neurophysiologie dieser Sinnesorgane untersucht werden. Gerade die Neurophysiologie kann dabei Aufschluss über das wahrgenommene Frequenzspektrum geben. Sollte hier eine Anpassung an eine Frequenzen von 9 kHz vorhanden sein (Hauptfrequenz des intraspezifischen Lockrufs), lässt dies Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle der Wahrnehmung von Vibrationen in der innerartlichen Kommunikation zu.

1. Anatomie und Physiologie vibrationssensitiver Organe bei Zikaden und Heuschrecken

Des Weiteren soll überprüft werden, ob im Abdomen von Insekten gelagerte Chordotonalorgane zur Wahrnehmung von Vibrationsreizen beitragen könnten. Hierfür sollen die Physiologie der abdominalen Chordotonalorgane bei der Zikade *Okanagana rimosa*, sowie der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* untersucht werden. Die Reaktionsschwellen bei Stimulation des Abdomens mit Vibrationsreizen können hier Aufschluss über die Funktionalität der Chordotonalorgane in diesem Zusammenhang ermöglichen.

1.2 Material und Methoden

Adulte Weibchen der Zikade *Okanagana rimosa* wurden in offenen Espen-Wäldern um die „Biological Station of the University of Michigan“ (UMBS), Pellston, Michigan, USA im Juli 2013 und im Juni 2017 gefangen. Die Tiere wurden in Käfigen mit frischen Espen- oder Ahorn-Ästen gehalten und wurden innerhalb von zwei bis drei Tagen für die Experimente herangezogen. Adulte Weibchen der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* wurden von dem Internetversandhaus „Born to be eaten“ bezogen und anschließend in der Arbeitsgruppen-internen Tierhaltung weitergezüchtet. Die Tiere wurden bei einem 12/12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus, bei 22°C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 40% gehalten.

1.2.1 Neuroanatomie der Beine von *Okanagana rimosa*

Die Neuroanatomie der Beine und deren sensorische Organe wurde mit Hilfe von retrogradem Tracing (Backfills) des Beinnerven dargestellt. Das zu untersuchende Bein wurde vom Körper getrennt. Die Präparation wurde in mit Silikon ausgekleideten Petrischalen in Locusta-Ringer (pH=7,2; siehe Rezepte) durchgeführt. Der Beinnerv wurde entweder in der Coxa oder im Femur frei präpariert, durchtrennt und das freie Nerven-Ende in mit Neurobiotin (Vector Laboratories, Burlingame, USA) gefüllten Glaskapillaren platziert. Die so vorbereiteten Präparate wurden in Feuchtekammern für zwei bis drei Tage bei 4-7°C aufbewahrt. Danach wurde die Glas-Kapillare entfernt und Femur und Tibia getrennt. Die Präparate wurden in gekühltem Paraformaldehyd (4%) in Phosphatpuffer (siehe Rezepte) für zwei Stunden fixiert. Der Femur wurde dorsal und die Tibia ventral mit einer Rasierklinge geöffnet. Danach wurden die Präparate für drei Tage in Cy3-konjugiertem Streptavidin (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA, 1:200 in PBST (siehe Rezepte) inkubiert und anschließend drei mal für mindestens 2 Stunden in PBST gewaschen. Die Präparate wurden mit Hilfe einer abgestuften Ethanol-Reihe (30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100% Ethanol) (Roth, Karlsruhe, GER) dehydriert, wobei die Präparate in jeder Ethanol-Konzentration für eine Stunde verblieben. Anschließend wurden die Präparate in Methylsalicylat (Merck, Darmstadt, GER) über Nacht aufgeklärt. Die Dokumentation des durchgeführten neuronalen Tracings erfolgte mit Hilfe eines Olympus BH-2 Mikroskops mit einer Leica DFC7000T Kamera unter Verwendung der dazugehörigen Software (Leica Application Suite

(LAS), v4.9, Leica Microsystems, Wetzlar, GER). Von den Präparaten wurden Serienbilder der verschiedenen Fokalebene aufgenommen und mit der Software CombineZP (<http://www.hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk>) oder ImageJ (v1.51, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) mit dem Plugin „Extended depth of field“ (<http://bigwww.epfl.ch/demo/edf/>) zusammengefügt um verschiedene Schärfenebenen gleichzeitig darstellen zu können. Die schematischen Zeichnungen wurden mit Hilfe von Inkscape (v0.91, 118 <https://inkscape.org/>) durchgeführt. Hierfür wurde das Inkscape Fenster vor dem LAS Fenster platziert und mit der Software Glass2k (Chime Software v0.9.2, <http://chime.tv/products/glass2k.shtml>) auf transparent gestellt. Somit konnte das Live-Bild der LAS Software direkt in Inkscape abgezeichnet werden. Größe, Helligkeit, Kontrast und Hintergrund der Bilder wurden in ImageJ angepasst und die Einzelbilder in Inkscape zu Zusammenstellungen arrangiert.

1.2.2 Physiologie der Sensorik des mesothorakalen Beines von *Okanagana rimosa*

Die Reaktion auf die Vibrationsreize der Mittelbeine wurde mit Hilfe einer extrazellulären Ableitung des Beinnerven ermittelt. Hierfür wurden die Tiere mit der Ventralseite nach oben auf einem Halter mit einem Wachs-Kollophonium-Gemisch fixiert. Der distalste Bereich der Mittelbein-Tibia wurde mit Sekundenkleber an eine Aluminiumstange (8 cm Länge), welche mit einem Minishaker (Type 4810, Brüel & Kjær, Odense, DNK) (Abb. 1-1) verbunden war, befestigt. Das Bein wurde so ausgerichtet, dass der Femur-Tibia-Winkel bei ca. 70° lag. Der Stimulus wurde aufgrund von experimentellen Beschränkungen perpendicular zur Körper-Längs-Achse gegeben (Abb. 1-1). Der Minishaker wurde mit Hilfe von Sinus-Signalen, welche mit Hilfe der Software Audacity (v2.0.3, <http://www.audacityteam.org/>) generiert wurde, über einen Verstärker (Type 2706, Brüel & Kjær, Odense, DNK) angesteuert. Die Dauer der Stimuli betrug 100 ms und die Wiederholungsrate lag bei 2 Stimuli/s. Die Stimuli wiesen Frequenzen zwischen 200 und 8000 Hz auf. Jeder Stimulus wurde vier mal wiederholt, bevor die Amplitude um 6 dB angehoben wurde. Die Amplitude wurde in sechs Stufen erhöht und die entsprechende Beschleunigung wurde mit Hilfe eines XL2 Audioanalyse-Gerät (NTI Audio, Schaan, LIE) und einem Beschleunigungssensors (IDS Innomic, Salzwedel, GER, Type KS95B) gemessen. Der Beinnerv wurde auf eine Wolfram-Haken-Elektrode (WPI, Sarasota, USA, Type TM33B05) gelegt und die Referenz-Elektrode wurde in der Hämolymphe des geöffneten Beines platziert. Das Signal der Ableitenden-Elektrode wurde

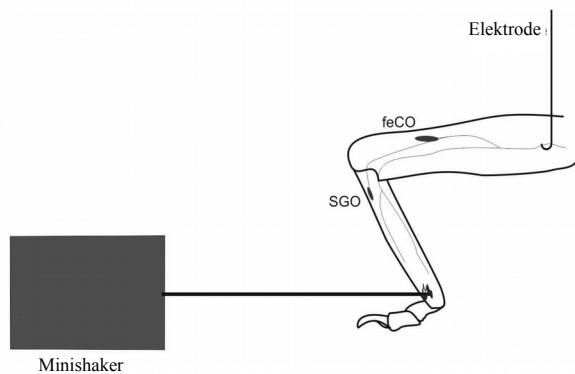


Abb. 1-1 Schematische Darstellung des methodischen Aufbaus zur Untersuchung der Beinphysiologie. Das mesothorakale Bein weiblicher *O. rimosa* wurde mit Hilfe eines Minishakers stimuliert, welcher mittels eines Aluminiumstabes mit dem distalen Bereich der Tibia verbunden wurde. Der Femur-Tibia-Winkel betrug ca. 70°. Mit Hilfe von Hakenelektroden wurden elektrophysiologische Ableitungen des Beinerven durchgeführt, welcher die Axone der zwei wichtigsten Scolopidialorgane: das femorale Chordotonalorgan (feCO) und das Subgenualorgan (SGO) beinhaltet. (Veröffentlicht in: Alt und Lakes-Harlan 2018)

um den Faktor 1000 mit Hilfe eines rauscharmen Verstärkers (ISO-80, WPI, Sarasota, USA) verstärkt und auf einem Oszilloskop dargestellt. Die Aufnahme zur späteren Daten-Analyse erfolgte mit Hilfe der Labtrax Software (WPI, Sarasota, USA) auf einem PC. Der ermittelte Schwellenwert wurde als die niedrigste Beschleunigung definiert, bei der der Nerv auf mindestens vier von fünf Stimuli pro Frequenz reagierte. Des Weiteren wurde die Latenz zwischen Stimulusbeginn und Reaktionsbeginn ermittelt. Spike-sorting wurde mit Hilfe der Spike2 Software (v7.16, Cambridge Electronic Design, Milton, GBR) durchgeführt um verschieden reagierende Einheiten zu bestimmen. Insgesamt wurden die neuronalen Antworten von 13 verschiedenen Individuen analysiert.

1.2.3 Physiologie der abdominalen Chordotonalorgane von *Okanagana rimosa* und *Schistocerca gregaria*

Zur Untersuchung der neuronalen Reaktion der abdominalen Chordotonalorgane auf Vibrationsreize wurden elektrophysiologische Ableitungen bei der Zikade *Okanagana rimosa* und der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* durchgeführt.

Für die Untersuchungen bei *O. rimosa*, wurden die Tiere, wie bei der Untersuchung der Beinsensorik, mit der Ventralseite nach oben mit Hilfe eines erwärmten Kolophonium-Wachs-Gemisches (siehe Rezepte) auf einer Plattform befestigt. Der posteriore Bereich des Thorax wurde ventral geöffnet. Um eine freie Sicht auf das ventrale Nervensystem zu gewährleisten wurden Tracheen und Bindegewebe entfernt. Die Stimulation erfolgte mit Hilfe eines Exciters/Resonators

1. Anatomie und Physiologie vibrationssensitiver Organe bei Zikaden und Heuschrecken

(AR-30, Monacor, Bremen, GER). Dieser wurde mittels eines Aluminiumstabes von 10 cm Länge an der Ventralseite des letzten Abdominalsegment befestigt. Hierfür wurde erneut ein Kolophonium-Wachs-Gemische verwendet. Der Winkel zwischen Körperlängsachse und Aluminiumstab entsprach in etwa 110° . Die in Audacity generierten Signale wurden mittels eines Verstärkers (LP-2020A+, Lepai, Jieyang Bukang Technology Development, Jieyang, CHN) auf den Exciter übertragen. Die Dauer der Stimuli betrug auch hier 100 ms bei einer Wiederholungsrate von 5/s. Es wurden Frequenzen von 80 Hz bis 10 kHz und Beschleunigungen zwischen $0,01$ und 10 m/s^2 getestet. Jede Beschleunigungsstufe wurde dreifach wiederholt und eine Reaktion als positiv vermerkt, wenn bei mindestens 2 der 3 Signale eine reiz-korrelierte Reaktion beobachtet werden konnte. Der Anstieg der Beschleunigung betrug $0,025 \text{ m/s}^2$ ($0,01 \text{ m/s}^2 - 0,1 \text{ m/s}^2$), $0,25 \text{ m/s}^2$ ($0,1 \text{ m/s}^2 - 1 \text{ m/s}^2$) und $2,5 \text{ m/s}^2$ (1 m/s^2 bis 10 m/s^2). Es wurden Ableitungen von 4 Nerven des ventralen Ganglienkomplexes durchgeführt (großer Abdominalnerv (IAN), kleiner Abdominalnerv (sAN), auditorischer Nerv (Tymp) und einem unbenannten Nerv (*N) nach Strauß und Lakes-Harlan 2009) (Abb. 1-2). Insgesamt wurden 11 weibliche und 12 männliche Tiere untersucht. Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in der „Biological Station of the University of Michigan“ durchgeführt.

Die Untersuchungen der abdominalen Chordotonalorgane bei *Schistocerca gregaria* wurden in ähnlicher Weise durchgeführt. Hierbei wurden jedoch die Tiere auf der Ventralseite befestigt und von dorsal präpariert. Muskulatur, Tracheen und Darm wurden entfernt, um einen uneingeschränkten Blick auf das metathorakale Ganglion des ventralen Nervensystems zu gewährleisten. Es wurden Frequenzen zwischen 30 Hz und 10 kHz getestet. Die

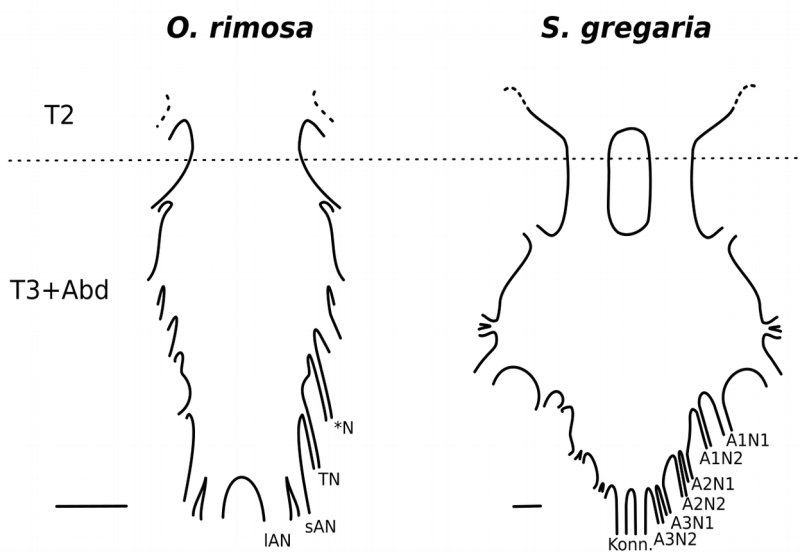


Abb. 1-2 Schematische Darstellung des ventralen Nervensystems von *O. rimosa* und *S. gregaria*. Die beschrifteten Nerven, wurden für die elektrophysiologische Untersuchung der Aktivität bei Vibrationsstimulation des caudalen Abdomens herangezogen. IAN: großer Abdominalnerv, sAN: kleiner Abdominalnerv, TN: Tympanalnerv/auditorischer Nerv, Konn.: Konnektive, _N1: Tergitnerven, _N2: Sternitnerven, A1N1: Tympanalnerv. Maßstab: links $250 \mu\text{m}$; rechts $100 \mu\text{m}$

Beschleunigungsstufen entsprachen denen, welche bei der Untersuchung der abdominalen Chordotonalorgane von *O. rimosus* verwendet wurden. Es wurden Ableitungen der Tergit- und Sternitnerven des ersten, zweiten und dritten Abdominalsegmentes, sowie des Tergitnerven des vierten Abdominalsegmentes durchgeführt (A1N1/Tympanalnerv, A1N2, A2N1, A2N2, A3N1, A3N2, A4N1 nach Campbell 1961) (Abb. 1-2). Insgesamt wurden 15 weibliche Tiere untersucht. Wenn nicht anders erwähnt, entsprachen die verwendete Technik und Materialien denjenigen, welche für die Untersuchung der Beinsensorik in *O. rimosus* verwendet wurde.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Neuroanatomie der Beine von *Okanagana rimosa*

In der Zikade *Okanagana rimosa* verläuft ein Haupt-Beinnerv (MLN) durch die proximalen Bein-Segmente Coxa und Trochanter (Abb. 1-3 A). Von diesem Nerv teilen sich in verschiedene kleinere Seitenäste im Femur ab, darunter auch ein dünner, sensorischer Nerv, welcher das femorale Chordotonalorgan (feCO) innerviert. Innerhalb der Tibia teilt sich der Haupt-Beinnerv in zwei Nerven auf, wobei sich der anteriore der beiden Nerven ein weiteres mal teilt. Dies resultiert in drei größere separate Nerven, welche die distale Tibia durchziehen (Abb. 1-3 B). Der Nerv welcher die wesentlichen Chordotonalorgane innerviert ist wahrscheinlich ein rein sensorischer Nerv. Dieser teilt sich im Femur von dem Haupt-Beinnerven ab, innerviert das feCO und zieht von dort in die Tibia zum Subgenualorgan (SGO) als SGO-Nerv (Abb. 1-3 A, B).

Femur und Tibia sind dicht mit Haar-Sensillen bedeckt. Die meisten diese Haar-Sensillen werden nur von einem einzelnen sensorischen Neuron innerviert, welches eine mechanosensorische Funktion nahelegt (Abb. 1-3 A'). Die Axone der den Haar-Sensillen zugehörigen Neurone formen dünne Nerven, welche sich mit dem Haupt-Beinnerv an mehreren Stellen vereinen. Zusätzlich können campaniforme Sensillen (CS) an verschiedenen Positionen gefunden werden. Beispielsweise befinden sich CS an der proximalen Tibia im Bereich der Ansatzstelle des SGO-Ligaments an der Cuticula. Auch findet man einzelne CS an der Basis der Sporen der ventralen Tibia.

Zwei Scolopodialorgane wurden mit Hilfe des neuronalen Tracers markiert. Das femorale Chordotonalorgan (feCO) ist in allen der Beinpaaren dorsal in der distalen Hälfte des Femurs gelegen (Abb. 1-3 A, A'). Das feCO besteht aus zwei Scoloparien: Einem proximalen und einem distalen. Das proximale Scoloparium beinhaltet 14-16 sensorische Neurone. Eine weitere Aufteilung in zwei Untereinheiten, wie es bei anderen Insekten der Hemipteren zu finden ist (Nishino et al. 2016), kann hier mittels des angewandten neuronalem Tracings in *O. rimosa* nicht ermittelt werden. Das distale Scoloparium (DS) ist longitudinal in zwei Teile gezogen: DS1 mit vier und DS2 mit zwei sensorischen Neuronen. Alle Dendriten sind nach distal gerichtet, da die Scolopidien des feCO mittels Ligament mit dem Tibia-Femur Gelenk verbunden sind.

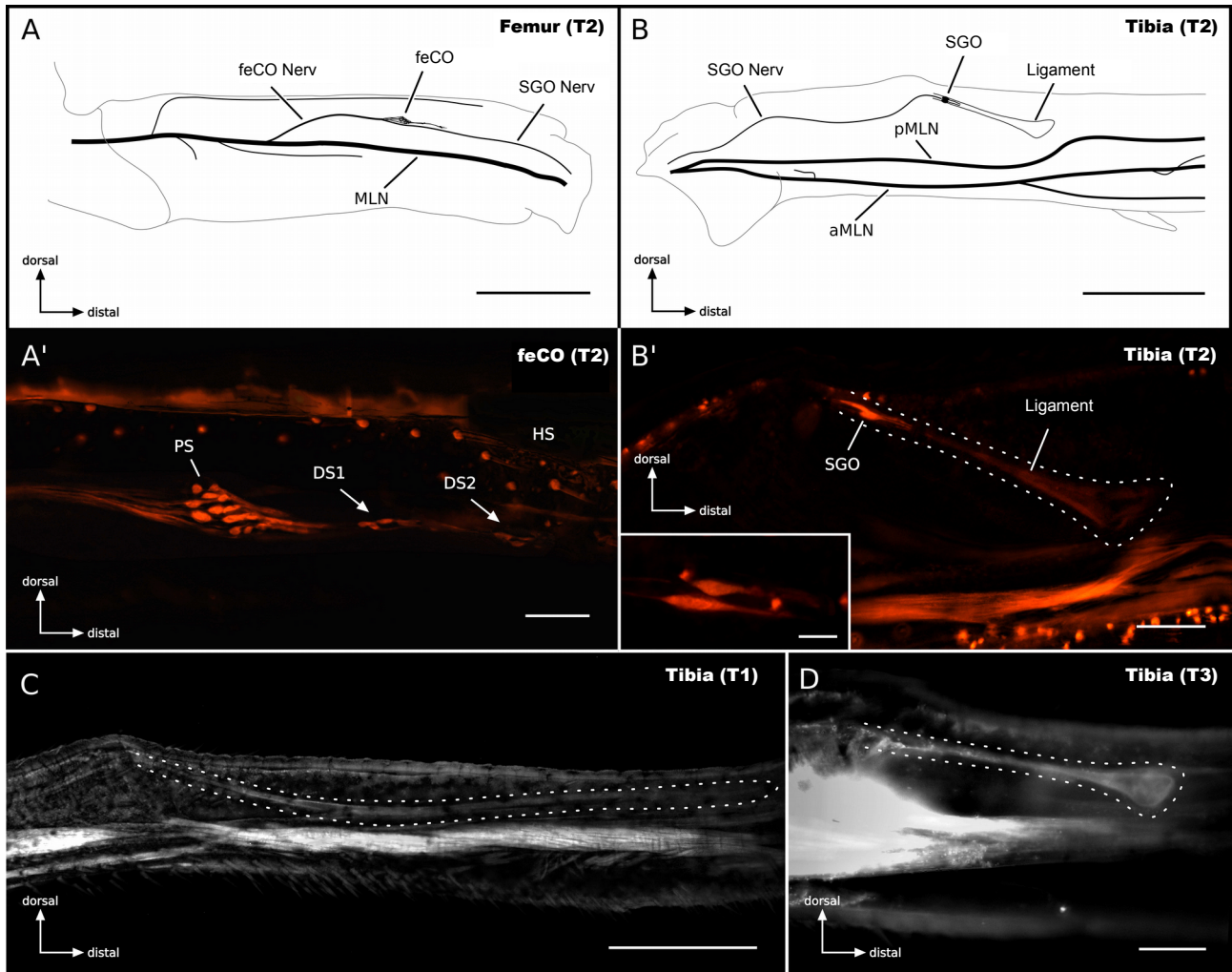


Abb. 1-3 Die mit Hilfe des neuronalen Tracers Neurobiotin dargestellte Neuroanatomie der Bein-Innervation bei *O. rimosa*. **A** Schematische Zeichnung der Nerven des mesothorakalen Femurs. Der Haupt-Beinnerv (MLN, nach Nishino et al. 2016) teilt sich im Verlauf des Femurs in verschiedene kleinere Nerven auf. Die sensorischen Axone des femoralen Chordotonalorgans (feCO) bilden den feCO Nerv, welcher distal des feCOs als Subgenualorgan-Nerv (SGO Nerv) bis in die Tibia zieht. **A'** Abbildung des feCOs und des innervierenden Nervens, sowie markierter Haarsensillen (Neurobiotin-Backfill mit Streptavidin-Cy3 Visualisierung) in der Mitte des Femurs. Das feCO besteht aus verschiedenen Scoloparien: Dem proximalen Scoloparium (PS) mit 14-16 sensorischen Zellen und das distale Scoloparium. Letzteres ist in zwei Bereiche unterteilt (DS1 und DS2), welche vier, beziehungsweise zwei sensorische Neurone beinhalten. Mechanosensorische Neurone innervieren zahlreiche sensorischen Haarsinneszellen (HS). **B** Schematische Darstellung der Hauptbeinnerven der Tibia. Der Beinnerv teilt sich proximal in der Tibia in einen anterioren Ast (aMLN) und einen posterioren Ast (pMLN) auf. Zusätzlich teilen sich kleinere Nerven an verschiedenen Stellen von den Hauptnerven ab und ziehen in die distale Tibia und die Tarsen. Die Axone der beiden sensorischen Zellen des Subgenualorgans (SGO) ziehen mittels des SGO-Nervens in den Femur, in welchem sie sich mit dem feCO Nerv verbinden. **B'** Die Scolopidialeinheiten des SGO sind mittels einem Ligament verbunden, welches sich weiter in die Tibia erstreckt. Der Bildeinschub zeigt die zwei elliptisch geformten sensorischen Zellen des SGO. Die Haarsensillen und die Campaniformen Sensillen (CS) werden von Abzweigungen des Hauptbeinnervens innerviert. **C, D** Die Größe und Form des Ligaments des SGO (hervorgehoben) unterscheidet sich zwischen dem prothorakalen und dem meso- und metathorakalen Bein. Im prothorakalen Bein weist das Ligament eine Länge von ca. 2 mm auf, während das Ligament in den meso- und metathorakalen Beinen nur eine Länge von ca. 500 µm und eine veränderte Form aufweist (**B'**, **D**). Maßstab: A: 1 mm, B: 500 µm, A', B': 100 µm, B`Bildeinschub: 25 µm, C: 500 µm, D: 100 µm. (Veröffentlicht in: Alt und Lakes-Harlan 2018)

Das Subgenualorgan (SGO) wird von einem sehr dünnen Nerv innerviert, welcher nur die beiden Axone der zwei sensorischen Neurone des SGO beinhaltet (Abb. 1-3 B, B'). Das SGO ist in der proximalen Tibia, in der Nähe einer cuticulären Erweiterung an der dorsalen Beinseite zu finden. Die Dendriten der zwei sensorischen Zellen zeigen nach distal und das Scoloparium mündet in einem Ligament. Das Ligament des SGO hat eine größtenteils parallele Orientierung zur longitudinalen Achse der Tibia. Interessanterweise unterscheidet sich die Struktur des SGO-Ligaments zwischen den Beinpaaren. In den Vorderbeinen zieht das Ligament bis zu 2 mm in den distalen Bereich der Tibia, bis zur seiner Befestigung an der dorsalen Cuticula (Abb. 1-3 C). In den mittleren und hinteren Beinpaaren zieht das Ligament nur etwa 500 µm in die Tibia und endet mit einer keulenartigen Form an oder nahe der Cuticula (Abb. 1-3 D).

1.3.2 Neurophysiologie der Beinsensorik von *Okanagana rimosa*

Mittels extrazellulärer Ableitung des Beinnerven lässt sich die Aktivität mehrerer Einheiten darstellen, welche sich ohne Stimulus als Hintergrundaktivität zeigt (Abb. 1-4 A). Hierbei werden große Spike-Amplituden (bis zu 0,6 mV) bei einer Frequenz von 4-8 AP/s erreicht. Im Normalfall vermindert sich die Frequenz während der Aufnahme bis zu einem völligen Aktivitätsstopp dieser Neurone. Bei diesen Einheiten könnte es sich um Motoneurone handeln, auch wenn während der Aktivität dieser Einheiten keine Beinbewegung beobachtet werden konnte. Auch zeigen sich Einheiten mit kleineren Amplituden, welche ein „Burst“-ähnliches Aktivitätsmuster aufweisen.

Um die Sensitivität auf substrat-getragene Vibrationen zu überprüfen, wurden die Beine mit Stimuli unterschiedlicher Frequenzen und Beschleunigungen getestet. Bei einem Vibrations-Stimulus, welcher auf das Bein übertragen wird, kann eine starke neuronale Antwort beobachtet werden (Abb. 1-4 A'). Diese neuronale Reaktion beinhaltet Einheiten mit großen und kleinen Amplituden. Jedoch können mittels Spike-Sorting keine eindeutig getrennten Klassen von aktiven Einheiten ermittelt werden. Auch ist keine Zuordnung der spezifischen Einheiten den einzelnen Scolopodialorganen (feCo und SGO) möglich. Die neuronale Antwort bei einem Reiz mit einer Frequenz von 200 Hz zeichnet sich oft durch phasengekoppelte Aktivität aus. Bei manchen Aufnahmen kann eine Phasenkopplung noch bis zu einer Reizfrequenz von 300 Hz festgestellt werden. Ab einer Reizfrequenz von 500 Hz und höheren Frequenzen sind die neuronalen Reizantworten

1. Anatomie und Physiologie vibrationssensitiver Organe bei Zikaden und Heuschrecken

phasenunabhängig. In den meisten Fällen weist die Reiz-Antwort einen deutlichen phasischen Charakter auf.

Die Reaktionsschwelle bei Stimuli verschiedener Frequenzen liegen im Bereich von 1 ms^2 mit einem Minimum bei 1 kHz (Abb. 1-4 B). Die Analyse der gesamten Schwellenkurve zeigt ein breites Tuning auf Vibrationen von 200 Hz bis zu 5 Hz (Abb. 1-4 B).

Die Latenz der neuronalen Antworten vermindert sich mit höherer Beschleunigung der Stimuli von ca. $13\text{-}17 \text{ ms}$ nahe des Schwellenwertes, bis zu $5\text{-}6 \text{ ms}$ bei größerer Beschleunigung (Abb. 1-4 C), wobei hier eine relativ große Variation zu beobachten ist. Bei einer Reizfrequenz von 200 Hz ist die Latenz bei Schwellenwertniveau länger als bei höheren Frequenzen (1 kHz) (Abb. 1-4 C).

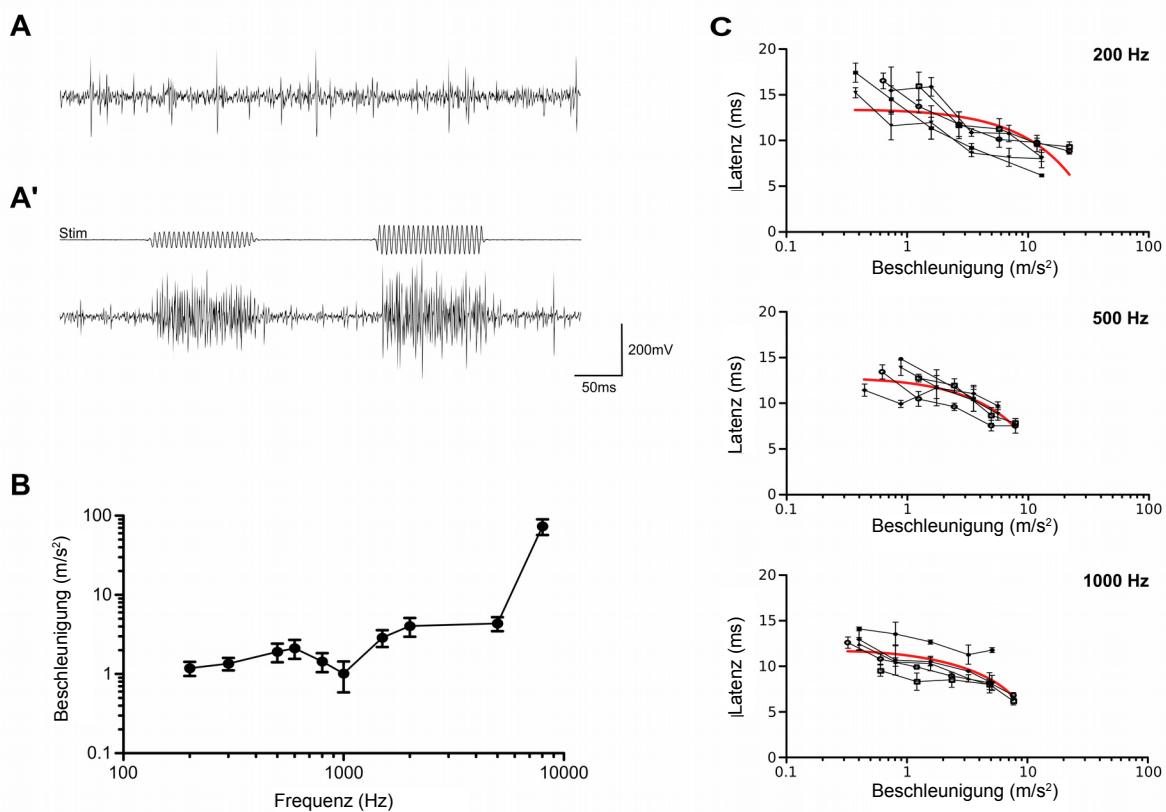


Abb. 1-4 Elektrophysiologische Ableitungen und Schwellenkurve der afferenten Reizantwort auf Vibrationsstimulation im Bein von *O. rimosa*. **A** Stimulus unabhängige Hintergrundaktivität der unterschiedlichen neuronalen Einheiten. **A'** Die Ableitung offenbart verschiedene Einheiten, welche auf Vibrationsstimulation reagieren (200 Hz mit einer Beschleunigung von 6.97 m/s^2 (linker Stimulus) und 12.95 m/s^2 (rechter Stimulus)). **B** Die Schwellenkurve zeigt ein breites Tuning im untersuchten Frequenzbereich, mit einem Minimum bei 1 kHz . Fehlerindikator=SEM (Standardfehler), $n=13$. **C** Latenzen der unterschiedlichen neuronalen Antworten auf die Stimulation mit drei unterschiedlichen Frequenzen (200 Hz , 500 Hz und 1 kHz). Unabhängig der Frequenz vermindert sich die Latenz mit steigender Beschleunigung. Fehlerindikator=SEM, $n=5$, rote Linie: Lineare Regressionskurve). (Veröffentlicht in: Alt und Lakes-Harlan 2018)

1.3.3 Neurophysiologie der abdominalen Chordotonalorgane von *Okanagana rimosa* und *Schistocerca gregaria*

Die elektrophysiologische Untersuchung des auditorischen Nerven und des nach rostral angrenzenden Nerven *N in *O. rimosa* zeigen bei Vibrations-Stimulation des Abdomens eine deutliche neuronale Reaktion bei einem breiten Frequenzspektrum bis 10 kHz. Bei beiden Nerven zeigt sich eine hohe Sensitivität auf Vibrationen mit niedrigen Frequenzen um 100 Hz (Abb. 1-5). Die Reaktionsschwelle beider Nerven erhöht sich mit zunehmender Stimulationsfrequenz. Nur der Tympanalnerv zeigt ein weiteres Reaktionsminimum bei 2 kHz, bei ca. $0,25 \text{ m/s}^2$ Beschleunigung. Bei Vergleich der beiden Nerven, zeigt sich eine deutlich niedrigere Reaktionsschwelle bei dem *N, welcher bei niedrigen Frequenzen unter 600 Hz bereits bei Beschleunigungen unter $0,1 \text{ m/s}^2$ reagiert (Abb. 1-5 B, C). Die Reaktionen beider Nerven unterscheiden sich nicht zwischen männlichen und weiblichen Tieren und zwischen beiden Seiten (2-Way-Anova, ungepaart, Multiple

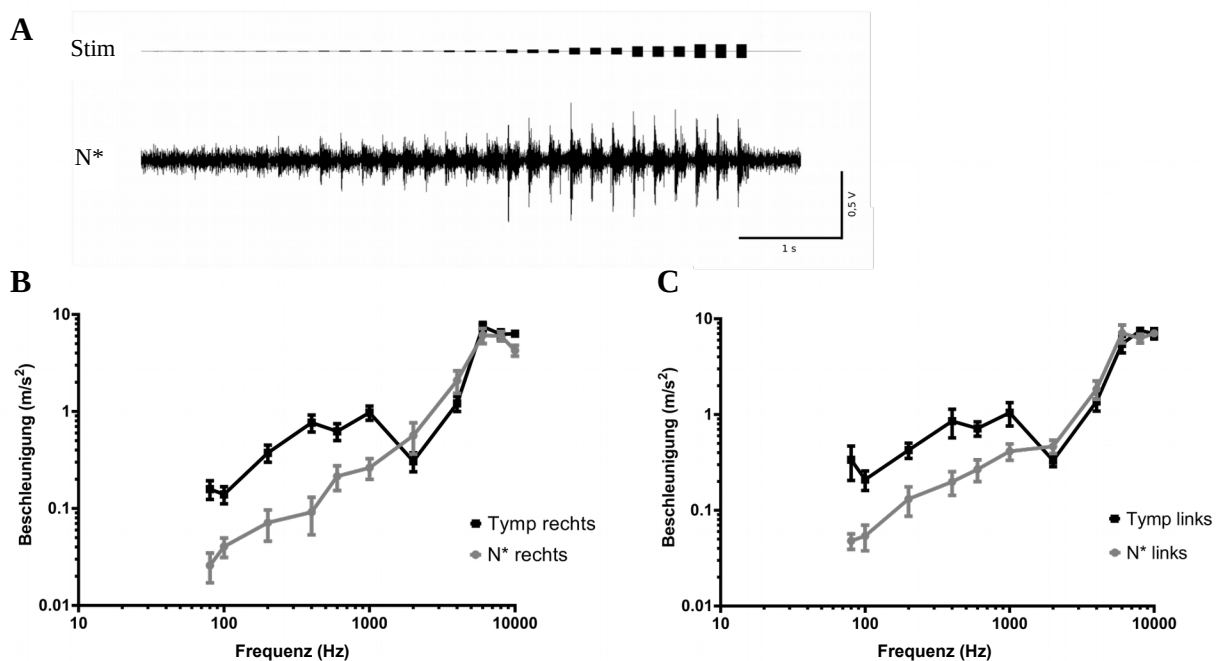


Abb. 1-5 Elektrophysiologische Ableitungen und Schwellenkurve der neuronalen Aktivität nach Vibrationsstimulation des Abdomens bei *O. rimosa* im auditorischen Nerv (Tymp) und dem nach caudal angrenzenden Nerven (*N). **A** Stimulus induzierte neuronale Reaktion bei steigender Beschleunigung (300 Hz) **B,C** Die Schwellenkurven zeigen für beide untersuchten Nerven eine Sensitivität auf Vibrationsreize bei einem breiten Frequenzspektrum. N* zeigt eine Minimum bei niedrigen Frequenzen und weist bei Frequenzen unter 1 kHz eine Höhere Sensitivität auf. Der auditorische Nerv weist ein Minimum bei 80 bis 100 Hz, sowie bei 2 kHz auf. Fehlerindikator=SEM (Standardfehler), $n=23$ ($n(w)=11$, $n(m)=12$). **B** Rechte Seite der Tiere **C** Linke Seite der Tiere

comparison Test mit Sidak-Korrektur, $p(\text{Geschlecht}) = \text{n.s.}$, $p(\text{Seite}) = \text{n.s.}$, für beide genannten Nerven; $p(\text{Frequenz}) < 0,0001$ $p(\text{Interaktion}) = \text{n.s.}$ für alle Kombinationen). Bei Ableitung des kleineren Abdominalnerven (sAN) zeigte sich bei keinem der untersuchten Tiere eine reizgekoppelte neuronale Aktivität bei Vibrationsstimulation. Im großen Abdominalnerv konnten bei einigen Tieren bei starker Beschleunigung Reaktionen beobachtet werden. Jedoch war dies nur bei wenigen Tieren der Fall und die reizgekoppelte Aktivität lag nur knapp über der Hintergrundaktivität. In diesem Fall reichten die Daten nicht aus um eine Schwellenkurve zu bestimmen.

Die untersuchten Tergit- und Sternitnerven des ersten bis vierten Abdominalsegmentes bei *Schistocerca gregaria* zeigen deutliche neuronale Reaktionen bei Stimulation des terminalen Abdomenbereichs mittels Vibrationsreizen bei Frequenzen bis 10 kHz (Abb. 1-6). Die Reaktionsschwelle sind in den Regel zunächst einzelne reaktionsgekoppelte Potentiale charakteristisch, deren Frequenz sich mit steigender Beschleunigung des Reizes erhöht und deren Potentiale sich in etwa entsprechen (Abb. 1-6). Anders als bei den Tergitnerven, zeigen sich bei Ableitung der Skleritnerven bei Frequenzen von unter 400 Hz und starken Beschleunigungen ($> 2,5 \text{ m/s}^2$) oft zusätzliche Einheiten mit deutlich höheren Potentialen (Abb. 1-6 A). Ab 300 Hz sind diese Einheiten nicht mehr zu beobachten und es verbleibt nur die Antwort der Einheiten mit niedriger Amplitude.

Bei den ermittelten Reaktionsschwellen weisen die Tergitnerven, die Sternitnerven und der Tympanalnerv jeweils eigene frequenzspezifische Profile auf (Abb. 1-6). Der Tympanalnerv weist eine geringe Sensitivität bei niedrigen Frequenzen auf. Der sensitive Bereich liegt hier zwischen 800 Hz und 3 kHz, mit einem Minimum bei 2 kHz. Die restlichen Tergitnerven zeigen eine andere Schwellencharakteristik. Diese sind im Vergleich deutlich empfindlicher bei niedrigen Frequenzen unter 100 Hz, weisen jedoch insgesamt ein breites Frequenz tuning, vor allem im Bereich zwischen 100 Hz und 1 kHz auf. Auch die Sternitnerven zeigen ein eigenes und charakteristisches Frequenzprofil. Frequenzen von über 800 Hz rufen nur sehr geringe oder keine Reaktionen hervor. Der sensitive Bereich beschränkt sich hier auf Frequenzen unter 400 Hz. Insgesamt unterscheiden sich die einzelnen Sternitnerven nicht untereinander (2-Way-Anova, ungepaart, Multiple comparison Test mit Sidak-Korrektur, $p(\text{Sternitnerv}) = \text{n.s.}$, $p(\text{Frequenz}) < 0,0001$, $p(\text{Interaktion}) = \text{n.s.}$). Das selbe gilt für die Tergitnerven A2N1, A3N1 und A4N1 auf der rechten Seite (2-Way-Anova, ungepaart, Multiple comparison Test mit Sidak-Korrektur, $p(\text{Tergitnerv_Rechts}) = \text{n.s.}$,

1. Anatomie und Physiologie vibrationssensitiver Organe bei Zikaden und Heuschrecken

$p(\text{Frequenz}) < 0,0001$, $p(\text{Interaktion}) = \text{n.s.}$. Auf der linken Seite zeigen sich jedoch signifikante Unterschiede im Kurvenverlauf der Tergitnerven des zweiten, dritten und vierten Abdominalganglions (2-Way-Anova, ungepaart, Multiple comparison Test mit Sidak-Korrektur, $p(\text{Tergitnerv_Links}) < 0,0001$, $p(\text{Frequenz}) < 0,0001$, $p(\text{Interaktion}) = \text{n.s.}$) (Abb. 1-6 B, C).

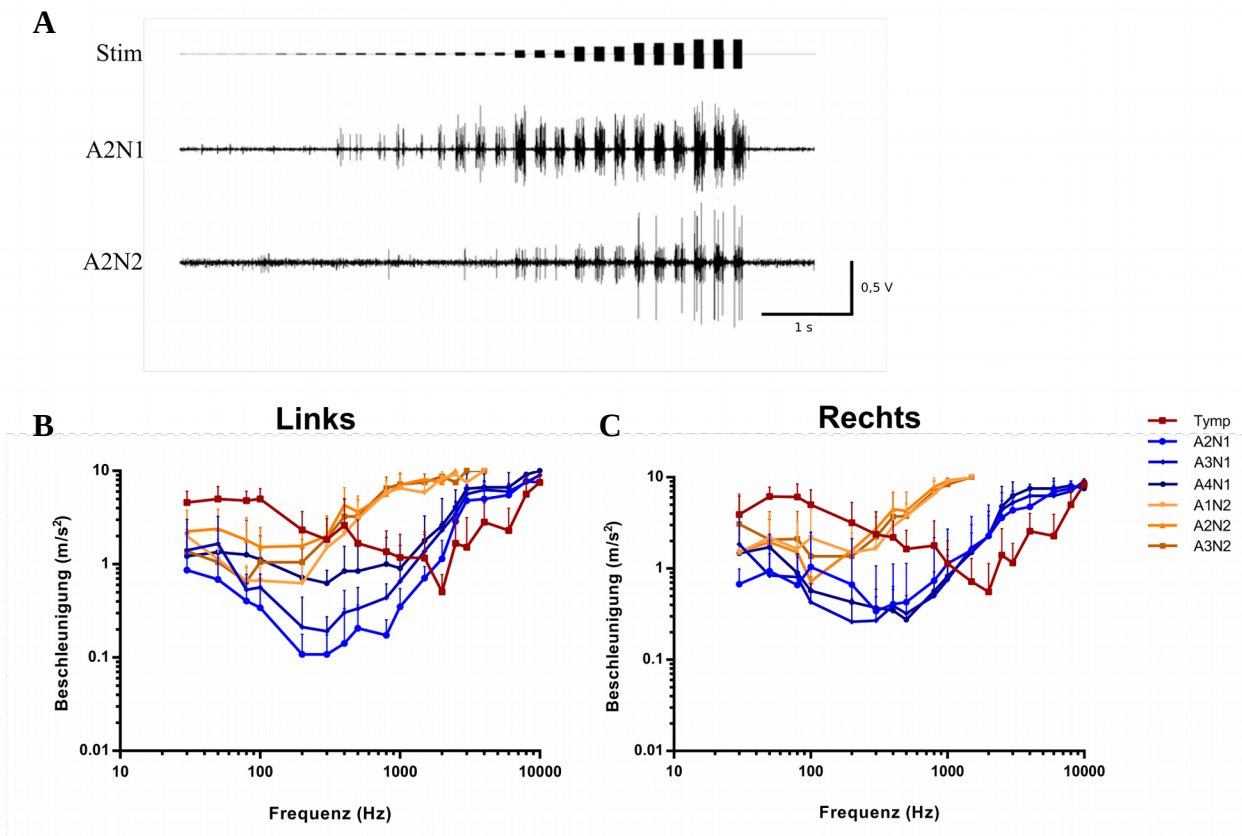


Abb. 1-6 Elektrophysiologische Ableitungen und Schwellenkurve der neuronalen Aktivität nach Vibrationsstimulation des Abdomens bei *Schistocerca gregaria* im auditorischen Nerv (Tymp), den Tergitnerven des 2-4 Abdominalsegmentes (A2-A4) und der Sternalnerven des 1-3 Abdominalsegmentes (A1-A3). **A** Die Stimulus induzierte neuronale Reaktion bei steigender Beschleunigung (300 Hz) exemplarisch für einen pleuralen Nerven (A2N1) und einen sternalen Nerven (A2N2). Während bei steigender Beschleunigung im pleuralen Nerven nur eine Erhöhung der Potentialfrequenz zu erkennen ist, kommt es bei den sternalen Nerven bei hohen Beschleunigungen zu einem Auftauchen von Potentialen höherer Amplitude, welche sich von der vorherigen Antwort deutlich abheben. **B,C** Die Schwellenkurven zeigen einen charakteristischen Verlauf für den auditorischen Nerv, die Tergitnerven und die Sternalnerven. Der auditorische Nerv weist eine Sensitivität in höheren Frequenzbereichen auf, mit einem Minimum bei 2 kHz. Die Tergitnerven haben einen sensitiven Bereich zwischen 100 Hz und 1 kHz und die Sternalnerven bei niedrigen Frequenzen unter 300 Hz. Fehlerindikator=SEM (Standardfehler), $n=15$. **B** Linke Seite der Tiere **C** Rechte Seite der Tiere

1.4 Diskussion

1.4.1 Neuroanatomie der Beine und deren sensorischer Organe, sowie Vibrationssensitivität der Mittelbeine der adulten Zikade *Okanagana rimosa*

Als neuronaler Tracer wurde in dieser Studie Neurobiotin verwendet, welches auch feine Details der Innervationen darstellt. Für die Markierung des Nervensystems in den Körperanhängen von Insekten werden oft Kobalt- oder Nickelsalze verwendet. Diese haben den Vorteil, dass die entsprechenden Präparate (beispielsweise Beine) in den meisten Fällen (je nach Stärke der Pigmentierung) nicht geöffnet werden müssen um eine gute Markierung zu gewährleisten (Bsp.: Strauß und Lakes-Harlan 2013). Vorangehende Experimente mit diesen Schwermetall-Salzen waren jedoch nicht erfolgreich in Zikaden. Daher wurde in dieser Arbeit Neurobiotin als neuronaler Tracer verwendet, welcher mit Hilfe von Cy3-konjugiertem Streptavidin markiert wurde. Diese Methode konnte erfolgreich angewandt werden, jedoch mussten hierfür die Beine entlang der longitudinalen Achse geöffnet werden, um ein ausreichendes Eindringen des Streptavidins zu gewährleisten. Es wurde darauf geachtet nur intaktes Gewebe zur Analyse heranzuziehen. In allen untersuchten Beinen der Zikade trat die selbe sensorische Organisation mit einem femoralen (feCO) und subgenualen (SGO) sensorischen Organ auf. Einzig das Ligament der Scolopidien des Subgenualorgans unterschied sich zwischen dem vorderen Beinpaar und dem mittleren bzw. hinteren Beinpaar (Abb. 1-3 C, D). Zusätzlich zu den Scolopidialorganen wird das sensorische System der Beine in *Okanagana rimosa* von zahlreichen mechanosensorischen Haarsensillen, Haarplatten und Campaniformen Sensillen komplettiert.

Das feCO wird von einem schmalen Nerven (5B1) innerviert, welcher vom Haupt-Beinnerven abzweigt. Das feCO ist in verschiedene Scoloparia geteilt (Abb. 1-3 A'), wie in den meisten anderen Insekten (Field und Matheson 1998). Das feCO weist keine Unterteilung in ein ventrales und ein dorsales Scoloparium auf, wie es bei anderen Zikaden *Lyristes bihamatus* und *Terpnosia nigricosta* (Nishino et al. 2016) beschrieben wurde. Die Zellanzahl des feCOs (ca. 20) ist im selben Bereich wie bei diesen anderen Hemipteren, jedoch geringer als bei vielen anderen Insektenarten; beispielsweise weisen manche Orthopteren einige hundert Scolopien im proximalen Scoloparium und um die 40 im distalen Scoloparium auf (Field und Pflüger 1989, Matheson und Field 1990, Matheson 1992). Bisher ist nicht bekannt was die Anzahl an Zellen determiniert, allerdings scheint

es keine Korrelation zur Körpergröße zu sein, da beispielsweise *Drosophila melanogaster* mit 75 sensorischen Zellen eine höhere Zellzahl im feCO aufweist als *O. rimosus* (Shanbhag et al. 1992).

Der Haupt-Beinnerv verläuft longitudinal durch den Femur und teilt sich innerhalb der Tibia in verschiedene Zweige auf. Ein ähnliches Muster findet man oft bei Insekten (Debaisieux 1938, Mücke 1991). Von allen Nerven innervieren zahlreiche dünne Äste die verschiedenen Bereiche der Epidermis und im Besonderen die Haar-Sensillen. Das SGO besteht aus nur zwei sensorischen Einheiten, so wie es auch für andere Zikaden (Debaisieux 1938, Nishino et al. 2016) und Wanzen (Michel et al. 1983) beschrieben wurde. Die zwei Axone bilden zusammen einen sehr dünnen Nerv, welcher sich im Femur mit dem feCO innervierenden Nerv verbindet und sich letztlich mit dem Haupt-Beinnerv im Femur vereint (Abb. 1-3 A, B). Dem zufolge weisen Hemipteren im Gegensatz zu beispielsweise Orthopteren und Phasmiden kein tibialen sensorischen Organkomplex mit eventuellen verschiedenen Funktionen der einzelnen Scolopodialorgane bei der Wahrnehmung von Vibrationssignalen auf (Nishino und Field 2003, Strauß und Lakes-Harlan 2013, Lakes-Harlan und Strauß 2014). Dies ist in so fern überraschend, da viele Hemipteren eine gut entwickelte Kommunikation mittels Vibrationssignalen aufweisen.

O. rimosus weist bezüglich der Bein-Sensorik eine breite Schwellenkurve zwischen 200 Hz und 5000 Hz mit einer niedrigeren Sensitivität bei höheren Frequenzen auf (Abb. 1-4). Bisher ist für *O. rimosus* keine Kommunikation mittels substrat-getragener Vibration bekannt. Jedoch können Substrat-Vibrationen als Beiprodukt während des Lockrufs auftreten (Stölting et al. 2002) und könnten auch während dem Balzverhalten eine Rolle spielen. Gerade im Hinblick auf den ersten Punkt könnte man ein Spezies-spezifisches Tuning der Vibrations-Reaktionsschwelle des Beines auf den Lockruf (etwa 9 kHz) erwarten. Diese breite Schwelle und das Fehlen einer hohen Sensitivität bei höheren Frequenzen indiziert jedoch kein Tuning zu Spezies-spezifischen Signalen. Allerdings könnte sich das Tuning einzelner Rezeptorzellen von der Schwellenkurve, die durch die Summenableitung ermittelt wurde, deutlich unterscheiden.

Die Wanze *Nezara viridula* weist als niedrigste wahrgenommene Frequenz der zwei SGO Rezeptoren ca. 200 Hz für den einen Rezeptor und 600-1000 Hz für den zweiten Rezeptor auf (Čokl 1983). Diese Rezeptorzellen sind in gleicherweise wie die von *O. rimosus* mit der Cuticula verbunden (Michel et al. 1983). Es könnte also auch bei *O. rimosus* ein spezifisches Tuning jeder

SGO Rezeptorzelle vorhanden sein. Die einem solchen spezifischen Tuning einzelner Scolopidien zugrunde liegende strukturelle Basis ist nicht bekannt. In *N. viridula* liegt der Schwellenwert einer Reaktion auf Vibrationsreize bei etwa $0,01 \text{ m/s}^2$ und ist damit deutlich niedriger als bei *O. rimosa*. Im Allgemeinen zieht jedoch die Bestimmung der Reaktionsschwelle bei Einzelzelleableitungen Methoden-bedingt einen niedrigeren Schwellenwert an, als dies bei Summenableitungen der Fall ist (Kalmring et al. 1996). Das Schwellen-Minimum bei 1 kHz, welches hier bei *O. rimosa* ermittelt wurde, könnte darauf hindeuten, dass hier ein ähnliches Tuning eines SGO-Rezeptors wie bei *N. viridula* vorhanden ist. Auch in Laubheuschrecken (Tettigoniidae) findet man ein solches Minimum bei ca. 800-1000 Hz (Kalmring et al. 1996). In *N. viridula* wurden Reaktionen bis zu einer Frequenz von 5 kHz nachgewiesen (Čokl 1983), ganz ähnlich den Reaktionen auf Stimulation mit hohen Frequenzen bei *O. rimosa*. Weitere Studien mit Einzelzelleableitungen bei *O. rimosa* werden benötigt, um ein eventuelles spezifisches Tuning der verschiedenen einzelnen Rezeptorzellen zu überprüfen. Im Bezug auf das SGO wäre es auch interessant die neuronale Reaktion nach Vibrationsstimulation zwischen den Vorder- und Mittelbeinen zu vergleichen, da sich das Ligament welches die SGO Rezeptorzellen mit der Cuticula verbindet zwischen den Vorderbeinen und Mittel- bzw. Hinterbeinen unterscheidet (Abb. 1-3 C, D und Nishino et al. 2016) und es bislang unklar ist, wie die unterschiedlichen Aufhängungen die Physiologie der sensorischen Einheiten beeinflusst.

Abgesehen vom SGO, welches wahrscheinlich das für substrat-getragene Vibrationen empfindlichste Organ darstellt (Autrum und Schneider 1948, Shaw 1994, Review: Lakes-Harlan und Strauß 2014), können auch andere sensorische Organe im Insektenbein Vibrationen wahrnehmen. Es wurde bereits nachgewiesen, dass bei anderen Spezies Teile des femoralen Chordotonalorgans auf Vibrationsreize reagieren (Field und Pflüger 1989, Matheson 1992, Büschges 1994, Stein und Sauer 1999, Review: Lakes-Harlan und Strauß 2014). Somit könnte auch ein Teil der hier untersuchten neuronalen Vibrationsreaktion bei *O. rimosa* von Scolopidien des feCO ausgehen, besonders in den niedrigeren Frequenzen, wie es bei den Orthopteren der Fall ist. Zusätzlich reagieren auch campaniforme Sensillen (CS) auf mechanische Stimulation. Diese Sensillen weisen eine Phasen-korrelierte Antwort bis hin zu 200 Hz auf (Kühne 1982). Die Phasen-korrelierte Antwort auf Vibrationsreize bei *O. rimosa* könnte also ihren Ursprung in den CS haben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Zikaden eine Reihe von Vibrationsrezeptoren im Bein aufweisen und dass die Summenableitungen des Beinnerven ein breites Tuning dieser

Rezeptoren als Reaktion auf Vibrationsreize offenbart haben. In Zukunft sollen Einzelzelleitungen zeigen ob die einzelnen Rezeptoren unterschiedliche Anpassung an Frequenzen aufweisen und somit an spezifischen Funktionen, wie beispielsweise die Wahrnehmung des substrat-getragenen Anteils des Lockrufs, spezialisiert sind.

1.4.2 Vibrationssensitivität der abdominalen Chordotonalorgane von *Okanagana rimosa* und *Schistocerca gregaria*

Bei Untersuchung der neuronalen Ableitung des auditorischen und des nach caudal angrenzenden Nerven (*N) zeigen beide eine deutliche neuronale Aktivität bei Stimulation des hinteren Abdomens. Die Reaktionsprofile zeigen eine sich unterscheidende, charakteristische Schwellenkurve, welche eine Innervation mechanosensorischer Zellen bestätigt. Bei akustischer Stimulation weist das Tympanalorgan, beziehungsweise der Tympanalnerv ein Schwellen-Minimum zwischen 3 und 5 kHz auf (Hennig et al. 1994, Stölting et al. 2004). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Tympanalnerv auch eine reizgekoppelte Aktivität bei Vibrationsstimulation aufweist, deren sensitive Bereiche jedoch unter 200 Hz, sowie um 2 kHz liegen (Abb. 1-5). Demnach kommt es zu einer deutlichen Verschiebung des sensitiven Bereiches. Durch die sensitive Wahrnehmung hoher Vibrationsfrequenzen scheint es wahrscheinlich, dass das adulte auditorische Chordotonalorgan (Gehörorgan bzw. Tympanalorgan) von *O. rimosa* an der gezeigten neuronalen Aktivität nach Stimulation mittels Vibrationsreizen beteiligt ist. Dieses Gehörorgan befindet sich ventral gelegen im zweiten Abdominalsegment und es wurde in vorangehenden Studien die These aufgestellt, dass dieses Organ eine funktionelle Rolle in der Vibrationswahrnehmung der im Boden lebenden Nymphen von Zikaden einnimmt (Lakes-Harlan und Strauß 2006). Die Überlegung hierbei ist, dass ein relativ großes Organ mit ca. 1000 Scolopidien (Fonseca et al. 2000), welches energieintensiv gebildet und aufrechterhalten wird nicht unbedingt nur für das adulte Hören zuständig sein muss. Auch die postembryonale Entwicklung der Nymphen im Erdreich bis zu 17 Jahre bei periodischen Zikaden dauert (Alexander und Moore 1962) und somit die adulte Phase zeitlich bei weitem übertrifft unterstützt diese These. Somit könnte das Gehörorgan eine sensorische Funktion in der Nymphe übernehmen, bei welcher es wahrscheinlich nicht als Gehörorgan fungiert (Strauß und Lakes-Harlan 2009). Verhaltensexperimente mit Nymphen zeigen, dass diese auf Vibrationsstimulation reagieren (Lakes-Harlan und Holzhauer 2015) und die postulierte Funktion

des „Gehörorgans“ in der Vibrationswahrnehmung von Nymphen könnte noch im adult Stadium vorhanden sein. Bisher wurden keine Untersuchungen bezüglich der Physiologie dieses Organs in einem solchen Zusammenhang durchgeführt und die hier gezeigte neuronale Reaktion des Tympanalnervs bei Stimulation des caudalen Abdomens mittels Vibrationsstimulation gibt einen ersten Hinweis auf eine eventuelle Beteiligung des Tympanalorgans an der Wahrnehmung von Vibrationen.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die gezeigte vibrations-bedingte Aktivität des Tympanalnervs ihren Ursprung in anderen mechanosensorischen Organen hat, da in einigen Zikaden-Arten und auch in *O. rimosa* weitere Chordotonalorgane vom Tympanalnerv innerviert werden (Pringle 1957, Young 1975, Strauß und Lakes-Harlan 2009). Diese Chordotonalorgane weisen eine hohe Zellzahl auf und bisherige Untersuchungen schließen auf eine Funktion bei der Produktion des arteigenen Lockrufs (Pringle 1957, Young 1975). Das tymbale Chordotonalorgan und das Tensor-Chordotonalorgan sind mit der Region des Tensor-Muskels im anterioren Bereich des Tymbals assoziiert, welches für die Produktion des Lockrufs verantwortlich ist. Das Detensor-Chordotonalorgan liegt ventral, nahe der Mittellinie des Tympanums, jedoch ohne direkten Kontakt zu diesem (Young 1975, Strauß und Lakes-Harlan 2009). Die Anzahl an einzelnen Scolopidien reicht von 200 bis zu über 1000, je nach Organ und Zikadenart (Young 1975). Vibrationssignale mit hoher Beschleunigung, welche über die Cuticula, die inneren Gewebe und die Hämolymphe des Abdomen weitergegeben werden, sind wahrscheinlich dazu in der Lage alle genannten Chordotonalorgane überschwellig zu reizen. Somit könnten alle Organe zur aufgenommenen Reaktionsschwelle beitragen.

Unklar ist hingegen, welche sensorischen Strukturen der zwischen auditorischem Nerv und Tymbalnerv gelegene Nerv innerviert. Studien an anderen Zikaden konnten keinen zwischen auditorischem und Tymbalnerv gelegenen Nerv (ausgehend vom ventralen Nervensystem) aufzeigen (Wohlert et al. 1979, Vasvary 1966). Ausgehend von der Lage des Nervs und dem segmentalen Aufbau des Nervensystems sollte der innervierte Bereich auch zwischen den innervierten Bereichen des auditorischen Nervs und des Tymbalnervs liegen, auch wenn dies nicht zwingend notwendig ist. In Anbetracht der sensitiven Reaktion auf Vibrationsreize, der Lage des Nervs und der Tatsache das keine anderen Chordotonalorgane in diesem Körperbereich von Zikaden beschrieben wurden, liegt im Fall von *O. rimosa* am wahrscheinlichsten eine Auftrennung des auditorischen Nervs in zwei Äste vor. Sollte dies der Fall sein, könnte der Ursprung der in diesem Nerv festgestellten vibrationssensitiven Aktivität in einem oder mehreren, der mit der

Lautproduktion assoziierten Chordotonalorgane liegen. Zukünftige Studien sollen die von diesem Nerv innervierten sensorischen Strukturen mittels neuronalem Tracing aufzeigen. Bei den mechanosensorischen Organen, welche in wenigen Tieren bei Ableitung der großen Abdominalnerven eine neuronale Aktivität aufwiesen, könnte es sich um kleinere, segmentale Chordotonalorgane handeln. Bisher liegen keine neuroanatomischen Daten bezüglich solcher mechanosensorischen Einheiten vor, allerdings sind diese bei anderen Insekten wie beispielsweise Orthopteren hinreichend beschrieben (siehe nachfolgender Abschnitt). Auch hier könnten Tracing-Methoden Aufschluss über Vorkommen und Lage geben.

Im Gegensatz zu *O. rimosa* sind Vorkommen und die neuronale Innervation der abdominalen Chordotonalorgane bei Orthopteren wie *Schistocerca gregaria* deutlich besser dokumentiert. In den abdominalen Segmenten sind 2 verschiedene, seriell angelegte Chordotonalorgane zu finden. Zum einen die mit der Pleuralfalte assoziierten pleuralen Chordotonalorgane, welche von den Tergitnerven (N1) innerviert werden und zum anderen die weiter ventral gelegenen sternalen Chordotonalorgane, welche entsprechend von den Sternitnerven innerviert werden (N2) (Hustert 1974, Hustert 1975, Meier et al. 1991, Rytlewski 1987). Die pleuralen Chordotonalorgane weisen bei *Schistocerca* ca. 15 Scolopidien auf, während die sternalen Chordotonalorgane aus ca. 6 Scolopidien bestehen (Meier et al. 1991). Im ersten abdominalen Ganglion ist anstatt eines pleuralen Chordotonalorgans das auditorische Organ (Müller'sche Organ) gelegen, welches eine Zellzahl sensorischer Neurone von 80 bis 100 aufweist (Schwabe 1906, Gray 1960, Michelsen und Larsen 1985, Meier und Reichert 1990, Jacobs et al. 1999, Warren und Matheson 2018). Im Hinblick auf die segmentale Anordnung und die entwicklungspezifischen Gemeinsamkeiten zwischen pleuralen Chordotonalorganen und dem auditorischen Organ, geht man hierbei von seriell homologen Organen aus (Meier und Reichert 1990, Meier et al. 1991). Aufgrund der morphologischen und funktionellen Spezialisierung des Müller'schen Organs auf die Wahrnehmung auditorischer Reize (Jacobs et al. 1999) ist es wenig überraschend, dass die Charakteristik der Schwellenkurve des Tympanalnervs, welcher das Müller'sche Organ innerviert, sich bei Vibrationsstimulation des Abdomens von denen der anderen untersuchten Nerven deutlich unterscheidet. Bemerkenswert ist jedoch, dass trotz allem eine deutliche neuronale Reaktion im auditorischen Nerv feststellbar ist. Bei akustischer Stimulation und extrazellulärer Summenableitung des auditorischen Nervs weist das Müller'sche Organ eine Reaktion bei Frequenzen ab 200 Hz bis hin zum Ultraschallbereich auf (Jacobs et al. 1999, Lakes et al. 1990), mit einem sensitiven Bereich zwischen 2 und 5 kHz. Die hier

ermittelte Reaktionsschwelle bei Vibrationsstimulation zeigte einen sensitiven Bereich zwischen 800 Hz und 3 kHz (Abb. 1-6). Im Vergleich zeigt sich hier also eine deutliche Verschiebung des sensitiven Frequenzbereichs, ähnlich wie dies bei *O. rimosa* der Fall ist. In beiden Fällen könnte hier die Cuticula, innere Gewebe und die Hämolymphe, über welche die Vibrationssignale geleitet werden, mit ihrer jeweiligen Trägheit als Frequenzfilter fungieren.

Den pleuralen und sternalen Chordotonalorganen wird bisher aufgrund ihrer propriozeptiven Eigenschaften eine Rolle bei der Koordination der Atmung/Ventilation zugeschrieben (Hustert 1974, Hustert 1975). Die pleuralen Chordotonalorgane von atympanalen Orthopteren weisen zusätzlich eine deutliche neuronale Aktivität bei akustischer Stimulation auf (Van Staaden und Römer 1998, Van Staaden et al. 2003). Vorherige Studien zeigten, dass auch die pleuralen Chordotonalorgane von *Schistocerca* durch akustische Reize stimuliert werden können (Hustert 1975). Dies konnte während der Durchführung der Experimenten bei Ableitung der pleuralen Nerven der ersten Abdominalsegmente (N1) bestätigt werden (Daten sind nicht gezeigt). Zusammengenommen bietet diese physiologische Reaktion einen weiteren Hinweis auf die serielle Homologie des Tympanalorgans (Müller'sches Organ) zu den pleuralen Chordotonalorganen. Dies erklärt jedoch nicht die Wahrnehmung von über das Abdomen aufgenommenen Vibrationsreizen bei relativ geringen Beschleunigungen (teilweise in Bereichen zwischen um $0,1 \text{ m/s}^2$). Die sternalen Chordotonalorgane zeigen insgesamt eine deutlich geringere Frequenzbreite und Sensitivität bei Stimulation mit Vibrationssignalen, auch wenn Vibrationen mit niedrigen Frequenzen und mäßiger Beschleunigung durchaus zu einer Reaktion führen (Abb. 1-6). Dies spricht im Wesentlichen nicht dafür, dass es sich bei den sternalen Chordotonalorganen um spezialisierte Vibrationssensoren handelt. Die von Hustert 1995 postulierte Funktion bei Propriozeption und Koordination der Muskulatur scheint hier durchaus wahrscheinlicher. Die dokumentierten hohen, gleichförmigen Potentiale, welche bei Ableitung der Skleritnerven und Stimulation mit niedrigen Frequenzen und hohen Beschleunigungen zusätzlich zur Grundantwort auftreten (Abb. 1-6 A2N2), geben einen Hinweis auf gesonderte mechanosensorische Einheiten. Hierbei muss es sich nicht grundsätzlich um ein internes Chordotonalorgan handeln. Auch in der Cuticula gelegene Spaltorgane (Campaniforme Sensillen) könnten bei hohen Beschleunigungen und niedrigen Frequenzen überschwellig gereizt werden (Kühne 1982).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch elektrophysiologischer Untersuchung verschiedener, im Abdomen gelegener Chordotonalorgane eine deutliche Aktivität bei Stimulation des Abdomens

durch Vibrationsreize festzustellen ist. Sowohl die auditorischen Organe, als auch Chordotonalorgane, welche nicht mit einer Tympanalmembran assoziiert sind, werden durch Vibrationen stimuliert. Bei *O. rimosa* liegen die Beschleunigungen der Vibrationsreize, die zur Aktivierung der abdominalen Chordotonalorgane führen in etwa im selben Bereich, wie die für die Aktivierung der Beinsensorik benötigten (vergleiche: Abb. 1-4 und Abb. 1-5). Auch die Beschleunigungen, welche zur Aktivierung der abdominalen Chordotonalorgane von *Schistocerca* durch Vibrationsstimulation benötigt werden, liegen im Vergleich zur Beinsensorik durchaus in einem physiologisch relevanten Bereich (Kühne 1982, Mücke 1989). Ob der hier aufgezeigten Sensitivität auf Vibrationsreize abdominaler Chordotonalorgane sowohl bei *O. rimosa*, als auch bei *Schistocerca gregaria* eine funktionelle Rolle einnimmt, kann anhand der elektrophysiologischen Daten alleine nicht geschlussfolgert werden. Zukünftige Verhaltensuntersuchungen sollen Auskunft über die biologische Bedeutung dieser Sinnesleistung geben.

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von *Drosophila melanogaster*

2.1 Einleitung

Die Umwandlung mechanischer Reize in neuronale Signale stellt eine der Grundlagen der Wahrnehmung dar. Hören, Tastsinn sowie gezielte Fortbewegung gründen sich auf dieser mechanosensorischen Wahrnehmung. Dem zugrunde liegt die Mechanotransduktion in einzelnen Zellen bzw. funktionellen Einheiten, welche diese sensorische Rolle übernehmen. Die fundamentalen Prozesse, welche bei der Mechanotransduktion eine Rolle spielen sind bislang nicht abschließend geklärt. Vor allem das molekulare Verständnis dieser Prozesse liegt weiterhin im Fokus wissenschaftlicher Forschung. Die Mechanotransduktion in Vertebraten und Invertebraten weist viele mechanistische Gemeinsamkeiten auf, wohingegen molekulare Gemeinsamkeiten noch bestimmt werden müssen (Gillespie und Walker 2001, Kavlie und Albert 2013). In Insekten werden mechanosensorische Reize unter anderem mit Hilfe von Scolopidien vermittelt (Reviews: Field und Matheson 1998, Yack 2004, Lakes-Harlan und Strauß 2014). Diese Einheiten bieten vor allem aufgrund des Potentials der genetischer Manipulation von Modellorganismen, wie beispielsweise bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, die Möglichkeit der Untersuchung der molekularen Prozesse der Mechanotransduktion.

Das größte und am besten untersuchte Scolopidialorgan (Chordotonalorgan) in *Drosophila* ist das im zweiten Antennensegment gelegene Johnston'sche Organ. Dieses Organ beinhaltet ca. 480 sensorische Neurone und ist für die Wahrnehmung von akustischen Reizen und Gravitation verantwortlich (Kamikouchi et al. 2006, Eberl und Boekhoff-Falk 2007, Kamikouchi et al. 2009, Lu et al. 2009, Sun et al. 2009). Durch Untersuchungen an diesem Organ wurden zahlreiche Einblicke über die mechanistischen und molekularen Grundlagen der Mechanotransduktion in Scolopidialrezeptoren ermöglicht, teilweise mit deutlichen Parallelen zu entsprechenden Vertebraten-Systemen (Gillespie und Walker 2001, Eatock 2009, Eberl 1999, Eberl et al. 2000, Göpfert und Robert 2002, Kernan 2007, Boekhoff-Falk und Eberl 2014, Albert und Göpfert 2015). Jedoch lässt sich anhand von Ergebnissen einzelner Organe nur bedingt auf ubiquitäre Prozesse schließen. In verschiedenen Studien wurden daher zur vergleichenden Analyse andere mechanosensorische Organe, wie beispielsweise die Haarsensillen (Eberl et al. 2000), oder auch das femorale Chordotonalorgan (feCO) (Lu et al. 2009, Chen et al. 2015, Versteven et al. 2017)

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von *Drosophila melanogaster*

herangezogen. Letzteres ist bei *Drosophila* proximal im Femur aller Beinpaare gelegen und besteht aus drei Gruppen von Scolopidien. Zwei dieser Gruppen sind distal mit der femoralen Muskulatur assoziiert und enthalten etwa 14 bzw. 25-28 unregelmäßig verteilte Scolopidien. Die größte Gruppe beinhaltet etwa 32 geordnete Scolopidien, welche mit der distalen Cuticula des Femurs verbunden sind (Shanbhag et al. 1992). Allgemein sind feCOs vor allem für die Wahrnehmung der Beinstellung (Propriozeption) und Vibrationswahrnehmung verantwortlich (Stabheuschrecken: Bässler 1965, Hofmann et al. 1985, Büschges 1989, Kittmann und Schmitz 1992; Orthopteren: Usherwood et al. 1968, Burns 1974, Field und Pflüger 1989, Burrows 1988; Review: Field und Matheson 1998). Während bei größeren Insekten die elektrophysiologische und damit funktionelle Untersuchung des femoralen Chordotonalorgans jedoch oft problemlos möglich ist, ist diese im feCO von *Drosophila*, anders als beim JSO, bisher nicht etabliert. Bisherige Versuche der funktionalen Untersuchung des feCOs bei *Drosophila* beschränken sich auf transcuticuläres Calcium-Imaging (Kamikouchi et al. 2010). Aufgrund der methodischen Beschränkungen bei der Stimulation und der Voraussetzung der Generierung von Mutationslinien mit genetisch kodierenden Ca^{2+} -Indikatoren, hat diese Methode wenig Verwendung bei der Untersuchung der Mechanotransduktion gefunden.

In einer Studie von Reddy et al. 1997 wurde eine Methode vorgestellt um den Widerstands-Reflex („resistance reflex“), welcher durch passive Auslenkung des tibio-femoralen Gelenkes ausgelöst wird, bei *Drosophila melanogaster* zu untersuchen. Hierfür wurde eine Elektrode im Bein platziert und das Bein mit sinusoidalen Stimuli gereizt. Die so hervorgerufene Aktivität im Beinnerv beinhaltet sowohl die sensorische Komponente der Wahrnehmung der Stimulation, als auch die dadurch hervorgerufenen motorischen Signale, welche durch zentrale Mustergeneratoren im ventralen Nervensystem hervorgerufen werden (Burrows 1987, Bässler 1993, Reddy et al. 1997). Hierbei sind im Wesentlichen muskarinerge und nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren an der Ausbildung der motorischen Aktivität beteiligt (Ryckebusch und Laurent 1993, Rillich et al. 2013, Marder und Bucher 2001).

In dieser Studie soll nun basierend auf der Methode von Reddy et al. 1997 die Möglichkeit einer elektrophysiologischen Untersuchung der neuronalen Aktivität der Beinsensorik und im Besonderen des feCOs überprüft werden. Zur Untersuchung der sensorisch-motorischen Zusammensetzung des neuronalen Signals, wird der durch nikotinerge und muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren vermittelte motorische Output mittels der Acetylcholin-Rezeptor-Antagonisten Scopolamin und

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von *Drosophila melanogaster*

Mecamylamin reduziert. Die verbleibende sensorische Reaktion im Beinnerven bei Vibrationsstimulation soll bezüglich Frequenzsensitivität und -spezifität überprüft werden.

2.2 Material und Methoden

Für die hier vorgestellten Versuche wurden *Drosophila melanogaster* der Linie w¹¹¹⁸ verwendet. Diese Mutationslinie weist eine partielle Deletion im *white* Gen auf (Rabinow und Birchler 1989) und zeichnet sich durch eine weiße Augenfarbe aus. Abgesehen davon sind keinerlei Beeinträchtigungen der Sensorik bekannt (vgl. <http://flybase.org/reports/FBal0018186.html>), daher wird diese Linie hier als Wildtyp-Pendant verwendet.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Fliegen mit CO₂ betäubt und mit der ventralen Seite aufwärts gerichtet auf einen Metallhalter mittels eines Wachs-Kollophonium-Gemisches (siehe Rezepte) befestigt. Nach der Befestigung wurde die Vitalität anhand der Beinbewegung überprüft. Anschließend wurden alle Beine, außer dem linken prothorakalen Bein auf der Platte fixiert. Die Coxa des freien Beines wurde parallel der Körperlängsachse auf dem Preepisternum 2 (nach Demerec 1994) befestigt.

Für Untersuchung der Vibrationssensitivität wurde für die Stimulation ein Minishaker verwendet (Type 4810, Brüel & Kjær, Odense, DNK), welcher mittels eines Aluminium-Stabes (8 cm Länge, 0,5 cm Breite, mit einer 0,5cm langen und 0,1 cm breiten Spitze) an den Tarsalgliedern befestigt wurde. Die Halterung wurde in ihrer Lage angepasst, so dass der Femur-Tibia-Winkel ca. 90° betrug. Die Ableitung erfolgte mittels geschärften Wolfram-Elektroden (TM33B05, WPI, Sarasota, USA). Die ableitende (differente) Elektrode wurde in der Coxa in der Nähe des Beinnerv platziert (Abb. 2-1 schwarze Elektrode). Die Referenz-Elektrode wurde in das Abdomen eingestochen. Die Stimulationssignale wurden mit Audacity (v2.0.3, <http://www.audacityteam.org/>) generiert und mittels eines Verstärkers (Type 2706, Brüel & Kjær, Odense, DNK) auf den Minishaker übertragen. Für die Untersuchung der Auswirkung von Scopolamin und Mecamylamin auf die neuronale Aktivität des Beinnerven bei Vibrationsstimulation wurden einzelne Reize mit einer Länge von 100 ms und einem Intervall von 5/s verwendet. Jeder der Einzelreize hatte eine festgelegten Beschleunigung. Es wurden Beschleunigungen zwischen 0,01 m/s² und 10 m/s² getestet, bei Frequenzen zwischen 10 Hz und 4 kHz. Eine positive Reaktion wurde vermerkt, wenn es zu einer reizgekoppelten neuronalen Reaktion bei mindestens zwei der drei Stimuli einer Beschleunigungsstufe kam.

Für die Untersuchung der Auswirkung von Scopolamin und Mecamylamin auf die Motorik wurden Elektromyogramme der femoralen Muskulatur erstellt. Die Vorbereitung und Fixierung der Tiere

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von *Drosophila melanogaster*

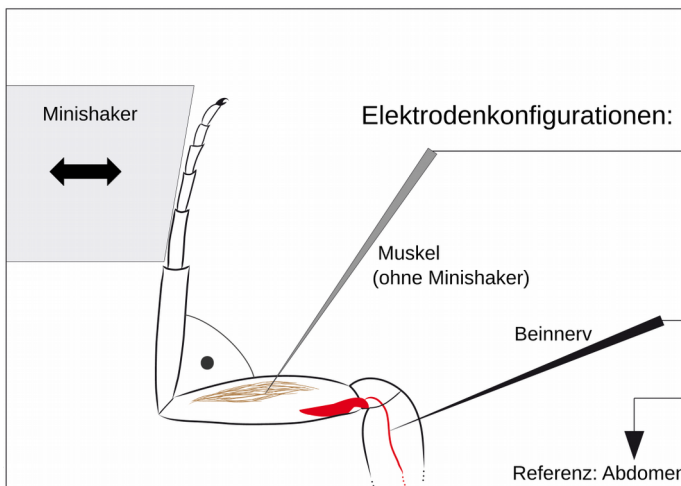


Abb. 2-1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur elektrophysiologischen Untersuchung der femoralen Muskulatur (graue Elektrode) und des Beinerven (schwarze Elektrode). Zur Stimulation der Motorik wurde ein Luftreiz verwendet. Hierbei wurde das Bein nicht am hier dargestellten Minishaker fixiert, sondern konnte sich frei bewegen. Bei der Untersuchung der Beinerv-Aktivität wurden sinusoidale Vibrationsstimulation durch den Minishaker vermittelt.

entsprach dabei dem Ablauf der Untersuchung der neuronalen Aktivität des Beinerven bei Vibrationsstimulation, nur dass hierbei das Bein nicht an einem Minishaker befestigt wurde, sondern sich frei in der Femur-Tibia-Achse bewegen konnte. Die ableitende Elektrode wurde hierbei in der Muskulatur des Femurs platziert. Die Stimulation erfolgte mittels manuellen Luftstößen aus einer Glas-Pasteurpipette (4518, Roth, Karlsruhe, GER) in deren Folge es zu motorischer Aktivität kam. Die Injektion der Pharmazeutika erfolgte mit Hilfe eines pneumatischen Injektors (PV 820, WPI, Sarasota, Florida, USA) und ausgezogener Glaskapillaren (1B100F-4, WPI, Sarasota, Florida, USA und BF150-110-10, Sutter Instruments, Novato, Kalifornien, USA; ausgezogen mittels p97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instruments, Novato, Kalifornien, USA). Die Injektionsmenge wurde vorangehend auf 100 nl bzw. 200 nl festgelegt. Die Acetylcholin-Rezeptor-Antagonisten Scopolamin (N-Methylhyoscinium Bromid, Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, GER) und Mecamylamin (Mecamylamin Hydrochlorid, Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, GER) wurden je nach Injektionsvolumen in Konzentrationen zwischen 10^{-2} und 10^{-4} mol/l in *Drosophila*-Saline gelöst (siehe Rezepte) und injiziert. Die Injektion erfolgte von ventral. Als Kapillar-Eintrittspunkt wurde der Übergang zwischen Thorax und Abdomen gewählt und die Kapillarspitze wurde im Bereich des ventralen Nervensystems platziert, bevor die Injektion erfolgte.

Für die allgemeine Untersuchung der Physiologie der Beinsensorik wurden amplitudenmodulierte Rampen-Reize mit definierter Frequenz und insgesamt 8 s Länge verwendet. Der Aufbau entsprach hierbei dem der Untersuchung der Auswirkung von Scopolamin und Mecamylamin auf die neuronale Aktivität des Beinerven bei Vibrationsstimulation. Die Amplitude der Reize wurde 4 s linear bis zu einem maximalen Beschleunigungswert gesteigert und in den darauf folgenden 4 s linear abgesenkt (Abb. 2-3 A). Der Abstand zum darauf folgenden Reiz betrug 4 s. Auch hier

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von *Drosophila melanogaster*

wurden Frequenzen zwischen 10 Hz und 4 kHz getestet. Für alle einzelnen Frequenzen wurden Beschleunigungskennlinien der Rampen-Reize erstellt, in dem bei drei Amplitudenwerten die Beschleunigung ermittelt und der lineare Verlauf des Beschleunigungsanstiegs vorausgesetzt wurde. Anhand dieser Kennlinien wurden die restlichen amplitudenkorrelierten Beschleunigungen extrapoliert.

Die Analyse der elektrophysiologischen Aufnahmen erfolgte wenn möglich mittels Labtrax-Software. Die Analyse des Reaktionsumfanges erfolgte mit Hilfe der Spike 2 Software (v7.16, Cambridge Electronic Design, Milton, GBR) und dem Plugin „Area above baseline“. Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism (v6.01, GraphPad Software Inc., 2012) durchgeführt.

2.3 Ergebnisse

Bei Stimulation adulter *D. melanogaster* mittels eines Luftreizes kommt es in den meisten Fällen zu einer unmittelbaren und unwillkürlichen motorischen Reaktion in der femoralen Muskulatur (Abb. 2-2 A). Diese stellt durch die hohe Reproduzierbarkeit ein geeignetes Mittel dar, um mittels Elektromyogrammen die motorische Funktion zu quantifizieren. Nach Injektion von *Drosophila*-Saline (Ringer) kommt es zu keiner Beeinträchtigung dieser motorischen Reaktion. Die Injektion der Acetylcholin-Rezeptor-Antagonisten Scopolamin und Mecamylamin führt hingegen zu einer signifikanten Reduktion des motorischen Reaktionsumfanges um ca. 65% bei Scopolamin und 84% bei Mecamylamin (K-W Anova: $p=0,0009$; Dunn's-Test (mit Sidak-Korrektur und angepassten p-Werten): $p(\text{Scop.})=0,048$; $p(\text{Mec.})=0,001$ vs. Ringer-Injektion; $n(\text{Ringer})=12$, $n(\text{Scop.})=7$, $n(\text{Mec})=7$) (Abb. 2-2 C).

Die Stimulation mit Vibrationsreizen des distalen Beinbereichs (Tarsen) führt zu einer reizgekoppelten neuronalen Antwort im Beinnerv (Abb. 2-2 B). Anders als bei der Untersuchung der rein motorischen Aktivität, zeigt sich hierbei jedoch kein Einfluss der Injektion von Scopolamin und Mecamylamin auf die bei Ringer-Injektion ermittelte Reaktionsschwelle (K-W Anova: $p=0,016$; Dunn's-Test (mit Sidak-Korrektur und angepassten p-Werten): $p(\text{Scopolamin})=n.s.$; $p(\text{Mecamylamin})=n.s.$ vs. Ringer-Injektion; $n=7$) (Abb. 2-2 D).

Die Untersuchung der neuronalen Reaktion im Beinnerven bei Vibrationsstimulation mit amplitudenmodulierten Rampen-Reizen, zeigt eine deutliche Reaktion bei einem breiten Frequenzspektrum zwischen 10 Hz und 4 kHz (Abb. 2-3). Es kommt zu einer deutlichen Asymmetrie der Reizantwort bezüglich dem Bereich ansteigender und dem Bereich der abfallenden Beschleunigung. Bei Vergleich der beiden Bereiche des Stimulus sind hier signifikante Unterschiede festzustellen (2-Way Anova, $p<0,001$ für Stimulations-Phase, Beschleunigung und Interaktion), wobei die deutlich höheren Spike-Raten im Bereich der ansteigenden Beschleunigung zu verzeichnen sind (Abb. 2-3 C).

Die durch die amplitudenmodulierten Stimuli ermittelte Schwellenkurve weist einen sensitive Bereich Frequenzen unter 100 Hz auf. Bei Vergleich mit der Schwellenkurve, welche durch kurze Einzel-Stimuli mit einer Länge von 100 ms und einer festgelegter Amplitude ermittelt wurde, zeigt sich ein ähnlicher Kurvenverlauf. Beide Schwellenkurven weisen das selbe Reaktionsspektrum auf. Zwar ist der Kurvenverlauf auch bei Frequenzen oberhalb von 100 Hz ähnlich, jedoch

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von *Drosophila melanogaster*

unterscheiden sich die Schwellenkurven dennoch signifikant (2-Way Anova, $p(\text{Stimulations- Art})=0,0001$, $p(\text{Frequenz})=0,0001$, $p(\text{Interaktion})=n.s.$) (Abb. 2-3 D). Eine anschließende Multiple-comparison Analyse zeigt hier einzig einen signifikanten Unterschied für eine Frequenz von 4 kHz (Sidak-Test, $p(4 \text{ kHz})=0,003$).

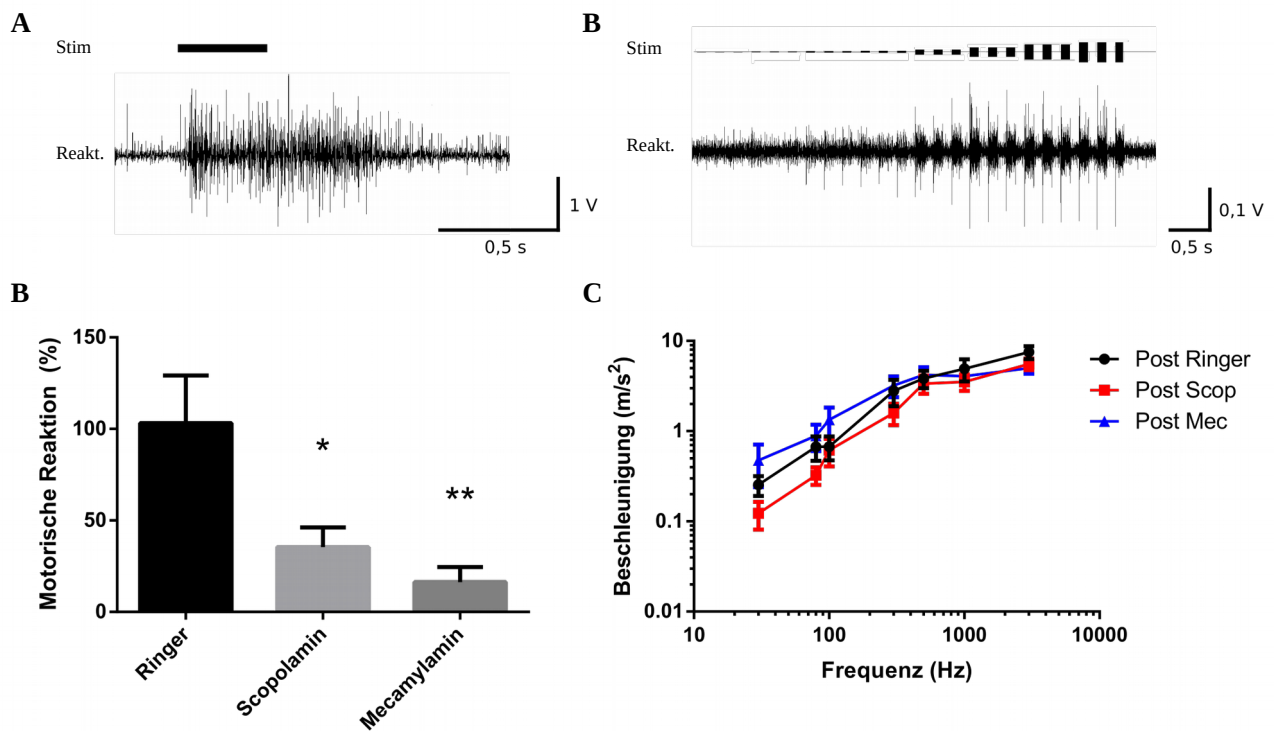


Abb. 2-2 Elektrophysiologische Untersuchung der motorischen und neuronalen Aktivität im Bein von *Drosophila melanogaster*. **A** Bei Stimulation mittels eines Luftreizes erfolgt als Reaktion eine motorische Aktivität in der femoralen Muskulatur. **C** Durch Injektion der Acetylcholin-Rezeptor-Antagonisten Scopolamin und Mecamylamin erfolgt eine Reduktion dieses motorischen Signals (K-W Anova, $p(\text{Scop.})=0,048$; $p(\text{Mec.})=0,001$). **B** Bei Vibrationsstimulation des Beines kommt es zu einer Reiz-gekoppelten Reaktion im Beinnerven auf Höhe der Coxa. **D** Die Reaktions-Schwelle dieses Signals bleibt bei Injektion von Scopolamin und Mecamylamin unverändert (K-W Anova, $p(\text{Scop.})=n.s.$; $p(\text{Mec.})=n.s.$). Fehlerindikator: SEM (Standardfehler). Teile der Originaldaten: Heinen 2018.

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von *Drosophila melanogaster*

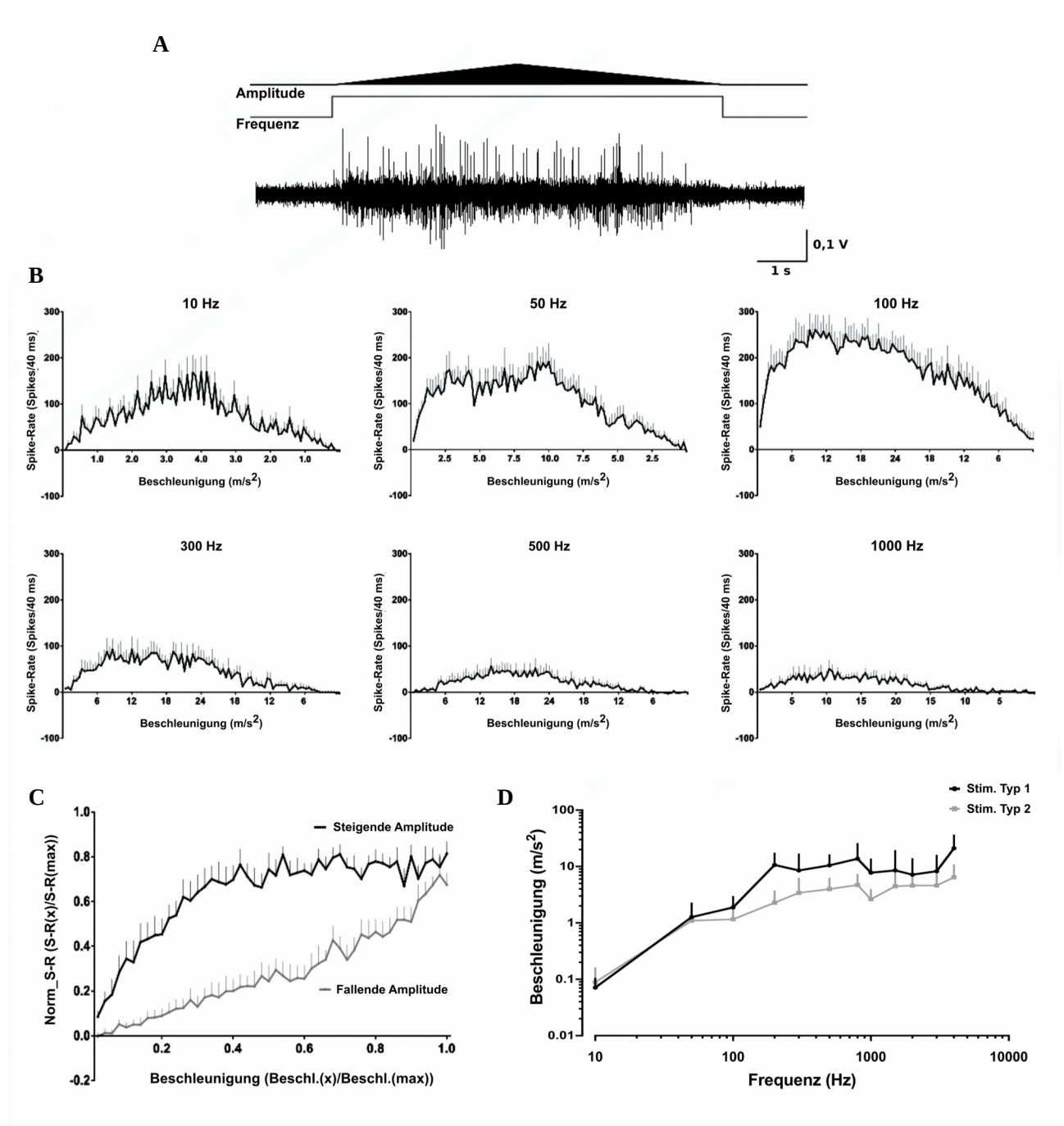


Abb. 2-3 Elektrophysiologische Untersuchung der neuronalen Aktivität im Bein von *Drosophila melanogaster*
A,B Bei Stimulation der distalen Bereiche des prothorakalen Beines mittels Amplituden-modulierten Reizen kommt es zu einer reizgekoppelten neuronalen Antwort in einem weiten Frequenzbereich **C** Diese neuronale Antwort weist eine Asymmetrie zwischen Bereichen steigender Amplitude und abfallender Amplitude auf (2-Way Anova, $p < 0,001$). **D** Die Reaktions-Schwelle zeigt eine Sensitivität bei Frequenzen unter 100 Hz. Bei Vergleich der Stimulation mittels Amplituden-modulierten Reizen (Typ 1) und Stimulation mit einzelnen, kurzen Pulsen (100 ms) und konstanter Amplitude (Typ 2), zeigt sich ein ähnlicher Verlauf der Reaktions-Schwellen. Dennoch zeigen sich signifikante Unterschiede (2-Way Anova, $p(\text{Stimulations-Art}) = 0,0001$, $p(\text{Frequenz}) = 0,0001$, $p(\text{Interaktion}) = \text{n.s.}$) bei hohen Frequenzen (Sidak-Test, $p(4 \text{ kHz}) = 0,003$). Fehlerindikator: SEM (Standardfehler). S-R=Spike-Rate. Teile der Originaldaten: Schlüter 2015, Heinen 2018

2.4 Diskussion

Die bisherigen Untersuchungen im Johnston'schen Organ von *Drosophila melanogaster* bilden mit die Basis des derzeitigen Verständnisses der Mechanotransduktion und der damit zusammenhängenden molekularen und mechanistischen fundamentalen Prozesse (Eberl 1999, Yack 2004, Eatock 2009, Kamikouchi et al. 2009, Boekhoff-Falk und Eberl 2014, Albert und Göpfert 2015). Bislang waren vergleichende Studien zu anderen Chordotonalorganen in *Drosophila* schwierig. Diese Studie beschäftigt sich mit der Frage ob und mit welcher reliablen Methodik eine funktionelle Untersuchung des in den Beinen gelegenen femoralen Chordotonalorgans möglich ist. Von *Drosophila* und anderen Insekten ist bekannt, dass muskarinerge und nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren an der Ausbildung der motorischen Aktivität in den zentralen Mustergeneratoren beteiligt sind (Gorczyca et al. 1991, Buhl et al. 2008). Dies gilt auch für die Mustergeneratoren, welche die Beinbewegung steuern (Ryckebusch und Laurent 1993, Rillich et al. 2013, Marder und Bucher 2001). Scopolamin als Antagonist des muskarinergen (Pinnok et al. 1988, Bai et al. 1991) und Mecamylamin als Antagonisten des nikotinergen (Trimmer und Weeks 1993) Acetylcholin-Rezeptors wurden bereits in früheren Studien zur Blockierung entsprechender motorischer Aktivität genutzt (Gorczyca et al. 1991). Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine Injektion von Scopolamin und Mecamylamin zu einer deutlichen Reduktion der motorischen Aktivität im Femur adulter *Drosophila* führt (Abb. 2-2 C). Jedoch kommt es nach Injektion dieser beiden Pharmazeutika zu keiner Veränderung der neuronalen Reaktions-Schwelle bei elektrophysiologischer Ableitung des Beinnerven auf Höhe der Coxa und gleichzeitiger Stimulation des Beines mit Vibrationsreizen (Abb. 2-2 D). Frühere Studien konnten belegen, dass sich auch der Reaktionsumfang dieser neuronalen Antwort nach Injektion von Mecamylamin und Scopolamin nicht signifikant verändert (Alt 2013). Zusammengenommen belegen diese Ergebnisse, dass der wesentliche Anteil der Beinnerv-Aktivität bei Vibrationsstimulation primär sensorischen Ursprungs ist. In der Arbeit von Reddy et al. 1997 wird eine vergleichbare Methode genutzt um den Widerstands-Reflex („resistance reflex“), welcher durch passive Auslenkung des tibio-femorale Gelenkes ausgelöst wird, bei *Drosophila* zu untersuchen. Dieser Widerstands-Reflex ist auch bei anderen Insekten untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass eine passive Veränderung des Femur-Tibia-Winkels das feCO aktiviert und dies in Reaktion darauf zwei Motoneurone anregt, welche Teile der Beinmotorik steuern (Bässler 1993, Burrows 1987). Hier konnten wir zeigen, dass die Aktivität dieser beiden und anderer Motoneurone nur einen geringen Anteil an der neuronalen

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von *Drosophila melanogaster*

Aktivität im Beinnerv innehaben. Der sensorische Ursprung der Vibrationsreiz-gekoppelten neuronalen Aktivität kann anhand dieser Methode jedoch nicht genau bestimmt werden, da außer dem feCO auch andere mechanosensorische Einheiten potentiell in der Lage sind auf ein solches Vibrations-Signal zu reagieren. Dazu gehören das tibiale Chordotonalorgan, taktile Haarsensillen und campaniforme Sensillen (Demerec 1994, Nayak und Singh 1983, Awasaki und Kimura 1997, Smith und Shepherd 1998, Zill et al. 2004, Mendes et al. 2013, Tuthill und Wilson 2016). Bezüglich *Drosophila* ist wenig über die Sensitivität und Reizspezifität dieser Sinnesorgane bekannt. Studien an anderen Insekten zeigen jedoch, dass alle dieser drei Sinnesorgane auf sinusoidale Stimulationen des Beines reagieren (Schnorbus 1971, Newland 1990, Eberhard et al. 2010, Lakes-Harlan und Strauß 2014). Das tibiale Chordotonalorgan spricht jedoch auf Bewegung des tibio-tarsalen Gelenkes an (Young 1970), welche in den hier dargestellten Versuchen nahezu unverändert blieb. Auch weist es nur geringe Zellzahlen im Vergleich zum feCO auf und ist beispielsweise in Stabheuschrecken oder in Mantophasmatodea nur für einen geringen Anteil der neuronalen Reaktion bei Vibrationsstimulation der Beines verantwortlich (Strauß und Lakes-Harlan 2017, Eberhard et al 2010). Für mechanosensorische Haarsensillen zählt eine richtungsspezifische Flexion als adäquater Reiz (Newland 1990, Tuthill und Wilson 2016). Ob der in dieser Arbeit angewandte Stimulus ausreicht um Haarsensillen überschwellig zu reizen ist jedoch fraglich und ähnliches gilt für die auf langsame Druckänderung reagierenden campaniformen Sensillen, welche eher für niedrige Frequenzen um 50 Hz sensitiv sind (Schnorbus 1971, Kühne 1982, Zill et al. 2004). Es kann also bedingt durch die im Vergleich hohe Zellzahl und durch die Verwendung eines adäquaten Stimulus davon ausgegangen werden, dass zumindest ein nicht unwesentlicher Teil der neuronalen Antwort bei Vibrations-Stimulation einen Ursprung im feCO aufweist.

Die bisherigen Untersuchungen im Bezug zum feCO in *Drosophila* beschränken sich im Wesentlichen auf die anatomischen und strukturellen Eigenschaften. Hypothesen über funktionale Aspekte wurden bisher aufgrund der durch die Größe des Organismus bedingten methodischer Beschränkungen nur aus den anatomischen Daten geschlossen. Deutlich mehr ist über das femorale Chordotonalorgan bei größeren Insekten wie Stabheuschrecken, Heuschrecken und Grillen bekannt. Während diese Insekten im feCO eine deutlich höhere Anzahl an Sinneszellen aufweisen, sind deutliche Parallelen bezüglich der Organisation innerhalb des feCOS zu erkennen: sowohl in *Drosophila*, als auch in den hier genannten größeren Insekten ist eine Unterteilung des feCOs in verschiedene Cluster (Scoloparia) zu erkennen (Füller und Ernst 1973, Burns 1974, Shanbhag et al.

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von *Drosophila melanogaster*

1992, Field und Pflüger 1989, Matheson 1990, Matheson und Field 1990, Nishino und Sakai 1997). Dabei stellen die Cluster funktionelle Skolopidien-Gruppen da, welche für spezifische mechanische Reize sensitiv sind. Der ventrale Cluster ist hierbei für eine Wahrnehmung des Femur-Tibia-Winkels verantwortlich und am Widerstands-Reflex beteiligt, während für den dorsalen Cluster eine Vibrationssensitivität diskutiert wird (Field und Pflüger 1989, Kittmann und Schmitz 1992). Eine ähnliche funktionale Aufteilung könnte auch im feCO von *Drosophila* vorliegen. Sollte dies der Fall sein, würde dies eine weitere Eingrenzung des Ursprungs der hier gezeigten Vibrationssensitivität im Beinnerv von *Drosophila* ermöglichen.

Bei Verwendung eines Amplituden-modulierten Reizes kommt es bei Stimulation des Beines von adulten *Drosophila* zu einer asymmetrischen neuronalen Reaktion zwischen Bereichen steigender und abfallender Beschleunigung (Abb. 2-3 C). Dieser Effekt ist unabhängig der verwendeten Frequenzen. Ursächlich hierfür könnte ein phasisch-tonischer Charakter der reagierenden Einheiten sein. In dieser Studie wurden zwei unterschiedliche Stimulationsarten zur Ermittlung der Reaktionsschwelle verwendet: Zum einen 100 ms lange Pulse mit festgelegter Beschleunigung und zum anderen Amplituden-modulierte Reize von 8 s Länge mit linear steigender und abfallender Beschleunigung. Bisherige Untersuchungen der Vibrationswahrnehmung von Chordotonalorganen beschränkten sich fast ausschließlich auf die Verwendung kurzer Stimulationssignale mit festgelegter Amplitude (Dambach 1972, Kühne 1982, Čokl 1983, Kalmring et al. 1994, Kalmring et al. 1996, Devetak und Amon 1997, Stein und Sauer 1999, Strauß und Lakes-Harlan 2017). Die Verwendung von Reizen mit Amplituden-moduliertem Charakter wurden in einigen wenigen Studien zwar verwendet (Eberhard et al. 2010, Dieudonné et al. 2014), jedoch wurden die beiden Methoden bisher nicht vergleichend untersucht. Die hier vorgestellte Studie belegt, dass beide Stimulations-Arten einen vergleichbaren Schwellen-Verlauf mit einem sensitiven Bereich bei Frequenzen unter 100 Hz und erkennbaren, aber schwächeren Reaktionen für höhere Frequenzen zeigen (Abb. 2-3 D). Die Verwendung von einzelnen kurzen Stimulations-Pulsen scheint gerade bei höheren Frequenzen eine sensiblere Analyse zu ermöglichen. Dennoch sind beide Stimulations-Arten für die Ermittlung der Schwellen-Kurven bezüglich der Wahrnehmung von Vibrationssignalen adäquat. Eine Anpassung der maximalen Beschleunigung bei den verwendeten amplitudenmodulierten Reizen könnte hier eine genauere Bestimmung der Reizschwelle ermöglichen und bieten das Potential, die Reizschwelle bei einzelnen Frequenzen in kürzerer Zeit zu bestimmen.

2. Physiologie des femoralen Chordotonalorgans von *Drosophila melanogaster*

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse eine Methode zur elektrophysiologischen Untersuchung der Bein-Sensorik von *Drosophila melanogaster*. Der Ursprung der gezeigten Vibrations-Sensitivität kann nicht abschließend geklärt werden, jedoch ist eine Beteiligung des femorale Chordotonalorgan sehr wahrscheinlich.

Zukünftig sollen weitere Studien an Mutations-Linien mit bereits beschriebener Auswirkung auf die Physiologie des Johnston'schen Organs Aufschluss darüber geben, ob es sich bei der hier vorgestellten Methode um eine Möglichkeit handelt, die molekularen Grundlagen der Mechanotransduktion in Chordotonalorganen zu verifizieren.

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

3.1 Einleitung

Die Wahrnehmung mechanischer Reize stellt eine der Grundlagen des komplexen Lebens dar. Beispielsweise ist koordinierte Fortbewegung nur mit einem gewissen Maß an Wahrnehmung der eigenen Bewegung und der Lage des Körpers im Raum möglich (Propriozeption). Auch andere Sinne beruhen auf der Wahrnehmung mechanischer Reize, wie das Hören oder der Tastsinn. Bei Insekten übernehmen neben äußeren sensorischen Einheiten wie campaniforme Sensillen (Pringle et al. 1938 A, Spinola und Chapman 1975, Gnatzy et al. 1987), Haarsensillen (Pringle et al. 1938 B, Pflüger 1980) auch interne Rezeptoren wie multipolare Sensillen (Kuster und French 1983) oder Scolopidialsensoren (Scolopidien) (Field und Matheson 1998) diese Aufgabe (Review: Tuthill und Wilson 2016, Lakes-Harlan und Strauß 2014). Vor allem Scolopidien übernehmen vielfältige Rollen. Sowohl die Propriozeption, die Wahrnehmung akustischer Reize und Vibrationen, sowie die Gravitationswahrnehmung werden primär von Scolopidien vermittelt (Field und Matheson 1998, Yack 2004, Eatock 2009, Kamikouchi et al. 2009). Scolopidien können als einzelne Einheiten, in kleineren Gruppen, aber auch als komplexe Organe mit hunderten Einzelrezeptoren vorliegen, die funktionsbedingt mit beweglichen Teilen des Exoskelettes, wie beispielsweise Gelenke oder Tracheen verbunden sind. Gruppen von Skolopidien die eine funktionelle Einheit bilden werden als Chordotonalorgane bezeichnet (Reviews: Field und Matheson 1998, Lakes-Harlan und Strauß 2014).

3.1.1 Aufbau von Chordotonalorganen und Scolopidien

Neben der Fülle an Ausprägungen, welche Chordotonalorgane bezüglich Größe, Anzahl an Einzelrezeptoren, Lage, adäquate Reize und Anpassung an Frequenzspektren im Insektenreich aufweisen, ist der Aufbau der einzelnen Scolopidien relativ konserviert. Bezogen auf die Entwicklung bilden vier Zellen die Grundeinheit des Scolopidiums (Field und Matheson 1998). Jedes Scolopidium besteht aus drei unterstützenden Zellen: einer Kappenzelle, einer Scolopodialzelle und einer Ligamentzelle, sowie einem (monodynamal) bis vier (heterodynamal)

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

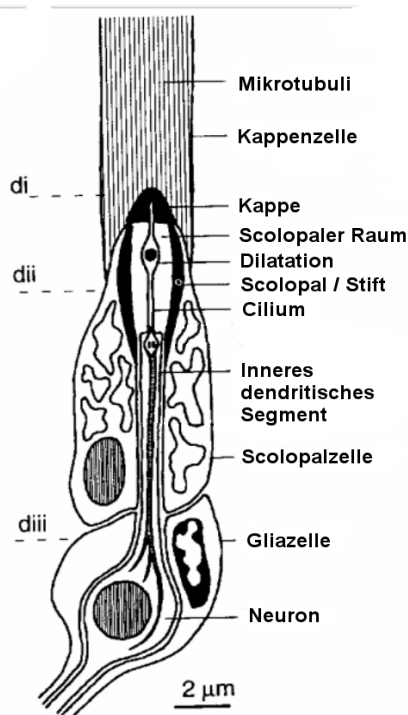


Abb. 3-1 Schematischer Aufbau eines Typ1 Scolopidiums mit monodynamem (einzelnes Neuron) und bipolarem Aufbau. Im Bereich des Dendriten wird das sensorische Neuron von der Scolopalzelle umschlossen und endet an der Kappe, welche von der Kappenzelle gebildet wird. Verändert nach Field & Matheson 1998.

sensorischen Neuronen. Namensgebend für die Scolopidien ist das Scolopal (oder Stift) (Graber 1882). Diese elektronendichte Struktur wird von der Scolopalzelle (Stiftzelle) gebildet und umhüllt ein oder mehrere Dendriten. Sie münden distal in eine sogenannte Kappe, welche von der Kappenzelle oder Verbindungszelle („Attachment Cell“) gebildet wird. Diese dendritische Kappe schließt den terminalen Bereich des Dendriten ab und stellt die Verbindung zu den extrazellulären Strukturen dar, welche die mechanischen Reize übertragen. Die Scolopalzelle umhüllt den Dendriten des sensorischen Neurons und stellt die Verbindung zu anderen Scolopidien dar (Field und Matheson 1998) (Abb. 3-1).

Scolopidien können anhand verschiedener Merkmale klassifiziert werden, je nach Anzahl der sensorischen Neurone (monodynam/heterodynam), nach Morphologie des Dendriten/Ciliums und der Kappe (Typ1/Typ2) oder nach Art der Verbindung der Zellen im Gewebe (Verbindung mit der Hypodermis/Cuticula oder

Verbindung mit Muskeln oder Sehnen) (Moulines 1976, Field und Matheson 1998, Yack 2004). Die sensorischen Neurone sind bipolar und monodendritisch. Das heißt sie weisen ein proximales Axon und einen distalen Dendriten auf. Der Dendrit wird in ein inneres und ein äußeres Segment eingeteilt. Das innere Segment wird eng von der Scolopalzelle umhüllt, während das äußere Segment im Bereich der Scolopale ein Scolopalen-Raum zwischen Scolopalzelle und Dendriten aufweist. Dieser Scolopale-Raum enthält Endolymphe mit einer hohen Konzentration von K^+ -Ionen und einer niedrigen Konzentration von Ca^{2+} -Ionen (Grünert und Gnatzy 1987). Des Weiteren weist der Dendrit innerhalb des äußeren Segmentes eine sogenannte Schwellung auf, welche charakteristisch für das scolopidiale Neuron ist und er enthält ein $9 \times 2 + 0$ Mikrotubuli-Gerüst, welches ihn als Cilium definiert (Field und Matheson 1998).

3.1.2 Mechanotransduktion in scolopidialen Einheiten

Die grundlegende Umwandlung eines mechanischen Reizes in ein neuronales Signal ist ein dreistufiger Prozess (French 1992). Zunächst muss eine mechanische Kopplung eines adäquaten Stimulus mit der Rezeptorzelle erfolgen. In einem zweiten Schritt wird dieser Reiz in der Rezeptorzelle in eine Potentialänderung umgewandelt, welche im letzten Schritt Aktionspotentiale hervorruft (French 1992). Der genaue Einfluss des Aufbaus, der Lage und der Verbindung auf diese Umsetzung des mechanischen Reizes haben ist bislang nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass bei Typ1 Scolopidien eine axiale Dehnung und bei Typ2 eine laterale Stauchung einen adäquaten Reiz darstellen (Field und Matheson 1998). Die eigentliche Umwandlung des mechanischen Stimulus in eine Depolarisation erfolgt im äußeren, vom Scolopal umschlossenen Segment des Dendriten. Es gibt zahlreiche bekannte Proteine, welche die Mechanotransduktion in Scolopidien beeinflussen (Senthilan et al. 2012). Der primäre Ionenkanal, welcher die Umsetzung des mechanischen Signals in eine Depolarisation verantwortet ist jedoch weiterhin umstritten. Die bisherigen Untersuchungen deuten auf zwei Ionenkanäle aus der TRP(transient receptor potential)-Superfamilie hin: NompC („no receptor potential C“ oder TRPN1), und Nan/Iav (Nanchung/Inactive) (Gong et al. 2004, Göpfert et al. 2006, Effertz et al. 2011, Liang et al. 2011, Zhang et al. 2013, Warren und Matheson 2018).

NompC ist nachweislich an der Propriozeption während der Fortbewegung von *Drosophila*-Larven und Adulten (Cheng et al. 2010) sowie an der Wahrnehmung von akustischen Signalen über die Antenne von *Drosophila* beteiligt. So zeigen NompC Mutanten beispielsweise keine Feedback-Verstärkung, eine verminderte Amplitude des neuronalen Signals und eine verminderte Sensitivität (Göpfert et al. 2006, Effertz et al. 2011). Ähnliches gilt für den heteromultimeren TRPV(„transient receptor potential vanilloid receptor“-Ionenkanal, welcher von den Kanalproteinen Nanchung (Nan) und Inactive (Iav) gebildet werden. Eine Null-Mutation des Iav-Proteins führt zu einer vollständigen Reduktion von messbaren Potentialen im Antennalnerv, bei Stimulation der Antenne und damit des Johnston'schen Organs (JSO) (Göpfert et al. 2006). Neuere Studien bestätigen diese Auswirkung eines Knockouts von Nan/Iav: Bei Blockierung mit einem spezifischen Agonisten (Pymetrozin) kommt es zu einem Verlust von Schall-Induzierter Aktivität im Müller'schen Organ von *Schistocerca gregaria* (Warren und Matheson 2018). Dennoch kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass Nan/Iav nur als Verstärker für eine eventuellen NompC getragene Depolarisation fungieren (Warren und Matheson 2018). Sowohl NompC als auch Nan/Iav sind im

Bereich der Cilie des sensorischen Neurons der Scolopidien lokalisiert, welches ihre Rolle bei der Mechanotransduktion weiter untermauert (Gong et al. 2004, Liang et al. 2011).

3.1.3 Das Zelladhäsionsmolekül Fasciclin 2

Unabhängig der genannten Ionenkanäle welche an der Mechanotransduktion beteiligt sind, liegt es Nahe, dass noch zahlreiche andere Faktoren und Proteine bei der Funktion von Scolopidien eine Rolle spielen. Ein neuer Ansatz findet sich durch den Nachweis des Zelladhäsionsmoleküls Fasciclin 2 (Fas2) im Müller'schen Organ (MüO) und dem femoralen Chordotonalorgan (feCO) adulter *Schistocerca gregaria* (Jacobs und Lakes-Harlan 1999). Fas2 ist ein Zelladhäsionsmolekül und wird zur Immunglobulin(Ig)-Superfamilie gezählt (Harrelson and Goodman 1988). Es stellt das strukturelle und funktionale Ortholog des NCAM („neural cell adhesion molecule“) in Vertebraten dar (Kristiansen und Hortsch 2010). Die zuerst beschriebene Funktion in Insekten liegt in der Orientierung der Wachstumskegel bei der axonalen Wegfindung im auswachsenden Nervensystem, während der neuronalen Entwicklung bei *Drosophila* (Bastiani et al. 1987, Grenningloh et al. 1991). Durch nachfolgende Forschung wurden verschiedene andere Funktionen des Proteins nachgewiesen, sowohl während der Ontogenese, als auch im adulten Organismus. Beteiligt ist Fas2 unter anderem an der Formierung neuromuskulärer Synapsen (Schuster et al. 1995, Baines et al. 2002, Hebbar und Fernandez 2005, Beck et al. 2012), an der Ausbildung der Pilzkörper (Kurusu et al., 2002) und fungiert sowohl als Inhibitor des EGFR (epidermal growth factor receptor)–Signalwegs (Mao und Freeman 2009), als auch als Kontrollfaktor bei der Expression von proneuralen Genen (García-Alonso et al. 1995). Im adulten Organismus wurden unter anderem Funktionen bei der Gedächtnisbildung nachgewiesen (Cheng et al. 2001). Doch keine der bislang bekannten Funktionen begründet die Lokalisation von Fas2 in adulten Chordotonalorganen von *Schistocerca gregaria*. Weitere Untersuchungen ergaben Hinweise auf ein Vorkommen von Fas2 in verschiedenen Chordotonalorganen larvaler und adulter *Drosophila melanogaster* (Lefèvre 2010). In einer vorangehenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Reduktion des Fas2-Levels die Funktionalität der larvalen Chordotonalorgane und des feCOs bei adulten *Drosophila melanogaster* einschränkt (Alt 2013). Sollte sich sowohl die Lokalisation in Chordotonalorganen, als auch eine funktionelle Rolle bei der Mechanotransduktion bestätigen, scheint es wahrscheinlich, dass Fas2 ein grundlegender Bestandteil des molekularen Apparates aller oder bestimmter Chordotonalorgane der Insekten darstellt.

3.1.4 Das extrazelluläre Matrix-Protein Nidogen

Die extrazelluläre Matrix (EZM) umhüllt in vielen Fällen Cilien sensorischer Zellen. Auch Scolopidien fallen in diese Kategorie und es wird davon ausgegangen, dass die extrazelluläre Matrix direkt an der Mechanotransduktion beteiligt ist, indem die externen mechanischen Kräfte auf die Cilienoberfläche geleitet werden (Gerdes et al. 2009, Andrés et al. 2014). Im Wesentlichen besteht die EZM aus Laminin, TypIV Collagen, Perlecan und Nidogen/Entactin (NDG), wobei NDG als Verbindung zwischen den anderen Komponenten dient (Wolfstetter et al. 2019, Barber et al. 2014). Nidogen selbst ist im Tierreich stark konserviert. Homologe Proteine finden sich beispielsweise bei Vertebraten (Entactin 1&2) (Dong et al. 2002, Murshed et al. 2000, Schymeinsky et al. 2002), aber auch bei *Caenorhabditis elegans* (nid-1) (Ackley et al. 2003, Hobert und Bülow 2003, Kang und Kramer 2000, Kim und Wadsworth 2000, Kramer 2005).

Eine Charakterisierung von NDG in *Drosophila melanogaster* zeigt bei immunhistochemischer Markierung eine deutliche Lokalisation von NDG in den lateralen Chordotonalorganen von Embryonen. Nidogen mRNA findet sich hier hauptsächlich in den chordotonalen Kappenzellen, während das Protein Scolopalzelle und Neuron umlagert. Des Weiteren zeigen vor allem die Null-Mutanten ein auffälliges Fortbewegungsmuster, welches einen Hinweis auf eine gestörte propriozeptive Wahrnehmung darstellt (Wolfstetter et al. 2019). Über eine mögliche Lokalisation in adulten Chordotonalorganen ist bislang nichts bekannt.

3.1.5 Zielsetzung bezüglich der molekularen Komponenten von Chordotonalorganen

Das Ziel dieser Arbeit ist es die Lokalisation von Fas2 und NDG in Chordotonalorganen von Insekten zu dokumentieren und mittels elektrophysiologischer Ableitung einen Einfluss der Proteine auf die Mechanotransduktion zu überprüfen. Der immunhistochemische Nachweis erfolgt mittels Antikörpermarkierung und im Fall von *Drosophila*-Fas2 mit Hilfe von GFP getaggten Fas2-Stämmen, da diese einen Isoform-spezifischen Nachweis ermöglichen.

Zunächst soll die Lokalisation von Fas2 in Chordotonalorganen von adulten *Schistocerca gregaria* erneut überprüft werden, da bisher die genaue Lokalisation noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Mittels Markierung von Fas2 in Embryonen von *S. gregaria* soll der entwicklungspezifische Zeitpunkt des Auftretens im Müller'schen Organ nachgewiesen werden.

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

Bei *Drosophila* fokussieren sich die immunhistochemischen Nachweise von Fas2 und NDG auf das Johnston'sche Organ in der Antenne, da dieses leicht zugänglich ist und in vielen bisherigen Studien die Grundlage der Forschung über die Mechanotransduktion in Chordotonalorganen darstellt.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen zum Einfluss von NDG und Fas2 sollen mit Hilfe von extrazellulären Summenableitungen des Antennalnerven durchgeführt werden. Hierfür werden *Drosophila*-Stämme mit vermindertem Fas2- bzw. NDG-Proteinlevel ($w; Fas2^{e76}$, $Ndg^{\Delta 0.4}$, $Ndg^{\Delta 1.4}$) verwendet. Der Vergleich mit einem *Drosophila*-Stamm mit der Wildtyp-entsprechenden Verteilung von Fas2 und NDG soll hier Rückschlüsse auf einen Einfluss der Proteine auf die Mechanotransduktion im Johnston'schen Organ und in Chordotonalorganen im Allgemeinen ermöglichen (Sun et al. 2009, Eberl et al. 2000, Todi et al. 2008).

In verschiedenen Verhaltens-Assays soll überprüft werden, ob eine eventuelle Veränderung der physiologischen Eigenschaften von Chordotonalorganen nach Verminderung von Fas2 bzw NDG auch Auswirkungen auf die Verhaltensebene hat. In vorangehenden Studien konnte bestätigt werden, dass eine Reduktion von Fas2 das Fortbewegungsverhalten und die Wahrnehmung von Vibrationsreizen bei *Drosophila* Larven negativ beeinflusst (Alt 2013). Ein ähnliche Untersuchung des Verhaltens soll hier bei den NDG-Mutanten durchgeführt werden. Zusätzlich soll die Auswirkung einer Reduktion von Fas2 auf die Gravitationswahrnehmung von adulten Fruchtfliegen mit Hilfe des sogenannten Tube-climbing-Test untersucht werden (Nichols 2012, Gargano et al. 2005, Sun et al. 2009).

3.2 Material und Methoden

Adulte Weibchen der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* wurden von „Born to be eaten“ (B.t.b.e. Insektenzucht GmbH, Bad Wörishofen, GER) bezogen und anschließend in der Arbeitsgruppen-internen Tierhaltung fortführend gezüchtet. Die Tiere wurden mit jungen Weizentrieben, sowie Fischfutter versorgt. Die *Drosophila melanogaster* Linien w^{1118} , $Ndg^{\Delta 0.4}$ und $NDG^{\Delta 1.4}$ wurden vom Institut für allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bereitgestellt. Der Stamm $w;fas2^{e76}$ wurde von Prof. Dr. Vivian Budnik und Dr. James A. Ashley vom Department of Neurobiology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA bezogen. Die *Drosophila*-Linien wurden in Anzuchttröhrchen (Durchmesser: 2,5 cm, Höhe 9 cm) auf einem Standard-Nährbrei gehalten und fortlaufend gezüchtet (Rezept: siehe Anhang).

Bei der *Drosophila*-Linie $w;fas2^{e76}$ verursacht eine Mutation im Allel $e76$ eine Reduktion des Fasciclin2 (Fas2)-Levels auf unter 10% (Grenningloh et al. 1991). Die *Drosophila*-Stämme mit den Fas2-GFP-Tags wurden von Kenneth A. Halberg bereit gestellt ($Fas2^{GFP778}$, $Fas2^{GFP396}$, $Fas2^{GFPCBO3613}$ (Halberg et al. 2016), wobei der Stamm $Fas2^{GFPCBO3613}$ ursprünglich aus der Arbeitsgruppe von Allan C. Spradling (Buszczak et al. 2007) stammt. Bei den Linien $Ndg^{\Delta 0.4}$ und $Ndg^{\Delta 1.4}$ weisen unterschiedlich starke Reduktionen des EZM Proteins Nidogen (NDG) auf, wobei sich $NDG^{\Delta 0.4}$ durch ein deutlich vermindertes NDG-Level auszeichnet, während die Deletion im NDG-Allel bei $NDG^{\Delta 1.4}$ zu einem kompletten Verlust von NDG-Protein führt (Wolfstetter et al. 2018). Beide Stämme wurden von Frau Dr. Anne Holz (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn der Justus-Liebig-Universität Gießen) bereit gestellt.

Alle Tiere wurden bei einem 12/12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus bei 22°C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 40% gehalten.

3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von Fas2 und NDG

Für den immunhistochemischen Nachweis des entwicklungsbezogenen Auftreten von Fas2 in *Schistocerca* wurden Embryone zwischen 50% und 100% Entwicklungsfortschritt aus den Eihüllen in Locusta-Saline (Rezept: siehe Anhang) herauspräpariert. Bei den so gewonnenen Embryonen wurden das Alter nach den von Bentley et al. 1979 bzw. Schäffer 1999 aufgestellten Kriterien in 5% Schritten eingeteilt. Anschließend wurden die Extremitäten entfernt, die Embryos dorsal geöffnet

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

und verbliebener Dotter entfernt. Die Präparate wurden mit der Innenseite nach oben mit Hilfe von Minutiennadeln in einer mit Silikon ausgekleideter Petrischale aufgespannt und für 30 min in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PB (Rezept: siehe Anhang) fixiert. Im Anschluss wurden die Minutiennadeln entfernt und die Präparate in 2 ml Eppendorftubes überführt. Überschüssiges PFA wurde entfernt. Danach wurden die Präparate 3*10 min in PBST (Rezept: siehe Anhang) gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über 48 h. Die Präparate wurden erneut 3*10 min in PBST gewaschen und für 24 h mit den sekundären Antikörper inkubiert (Tab. 3-1). Nach erneutem Waschen (3*10 min. in PBST) wurden die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und in Methylsalicylat aufgeklärt. Alle Waschschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte. Die Inkubationen mit den Antikörpern erfolgten bei 4°C. Für den immunhistochemischen Nachweis von Fas2 im femoralen Chordotonalorgan (feCO) und dem Müller'schen Organ (MüO) der adulten Tiere, wurden die entsprechenden Organe herauspräpariert und unabhängig vom restlichen Gewebe untersucht. Zur Präparation des femoralen Chordotonalorgans wurde die Cuticula des Femurs der Vorder- bzw. Mittelbeinen seitlich entfernt. Das femorale Chordotonalorgan wurde anhand der zum femo-tibialen Gelenk führenden Sehne identifiziert und proximal im Femur lokalisiert. Umgebendes Gewebe wurde entfernt, der Nerv und die Sehne durchtrennt und das losgelöste Organ in ein Blockschälchen mit Locusta-Saline überführt. Für die Präparation des Müller'schen Organs wurde das im ersten Abdominalsegment gelegene Tympanum

Tab. 3-1 Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Markierung. DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA; Sigma: Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, GER; Abcam: Abcam, Cambridge, UK; JIR: Jackson Immuno Research Europe, Cambridgeshire, UK; I: Dr. Anne Holz, Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen, GER; TFS: Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.

	Host-Spezies	Markierung	Antigen-Spezies	Bezug	Verdünnung	Referenz
Primär Antikörper						
mAb anti-Fas2 8C6	Maus	Fasciclin 2	Heuschrecke	DSHB	1:10	Bastiani et al. 1987
pAb anti-HRP P7899	Kaninchen	Neurone	-	Sigma	1:700	Jan und Jan 1982
pAb anti-GFP ab290	Kaninchen	GFP	-	Abcam	1:700	Le et al. 2006
mAb anti-Futsch 22C10	Maus	Neurone	Drosophila	DSHB	1:10	Zipursky et al. 1984
pAb anti-Nid	Kaninchen	Nidogen	Drosophila	I.	1:700	Wolfstetter et al. 2009
Sekundäre Antikörper						
Cy3 konj. Anti Maus	Ziege	IgG (H+L)	Maus	JIR	1:300	
FITC konj. Anti Maus	Ziege	IgG (H+L)	Maus	JIR	1:300	
Cy3 konj. anti Kaninchen	Ziege	IgG (H+L)	Kaninchen	JIR	1:300	
Alexa 488 konj. anti Kaninchen	Ziege	IgG (H+L)	Kaninchen	JIR	1:300	
Andere						
Alexa 350 konj. Phalloidin	--	F-Aktin	-	TFS	1:1000	

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

am Rande mit Hilfe einer Pinzette perforiert und umgeklappt. Das nun sichtbare Müller'sche Organ wurde an den Resten des Tympanums in ein Blockschälchen mit Locusta-Saline überführt, nachdem der entsprechende Nerv durchtrennt wurde. Danach wurde das restliche umgebende Gewebe entfernt. Die eigentliche immunhistochemische Markierung erfolgte entsprechend dem Markierungs-Protokoll der Embryonen.

Die Dokumentation der immunhistochemischen Markierungen erfolgte mit Hilfe eines Multiphotonen-Mikroskops (A1R MP, Nikon, Düsseldorf, GER) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Ivan Manzini der Justus-Liebig-Universität Gießen (GER). Größe, Helligkeit, Kontrast und Hintergrund der Bilder wurden in ImageJ angepasst und die Einzelbilder in Inkscape zu Zusammenstellungen arrangiert.

Für die immunhistochemische Markierung von Fas2 und NDG in der Antenne von *D. melanogaster* wurden zunächst Cryotom-Schnitte der Antenne angefertigt. Vorbereitung und Ablauf erfolgten im Wesentlichen nach Mishra 2015. Die Fliegen wurden zunächst mit CO₂ anästhesiert und der Kopf und die Proboscis wurden entfernt. Die so vorbereiteten Köpfe wurden in ein Eppendorf-Gefäß (2 ml) überführt und eine Stunde in Steffanini's Fixativ fixiert (Rezept: siehe Anhang). Anschließend wurde das Fixativ entfernt und die Köpfe 3*20 min in PBST gewaschen. Dann inkubierten die Präparate eine Stunde in einer 10% Succrose-Lösung und danach über Nacht in 25% Succrose-Lösung (jeweils in PBS gelöst, Rezept: siehe Anhang). Anschließend wurden die Köpfe in Einbett-Formen (rund, Durchmesser: 8 mm, Höhe: 4 mm) überführt und die Succrose-Lösung so weit wie möglich entfernt und durch ein Einbettmedium für Cryostatschnitte (O.C.T.TM Compound, Tissue-Tek, Sakura, Alphen aan den Rijn, NED) ersetzt. Die Köpfe wurden so arrangiert, dass die Augen nach oben zeigten. Danach wurden die Förmchen auf Trockeneis gelegt, damit die Präparate mit dem Einbettmedium durchfrieren konnten. Die so angefertigten Proben wurden bei -80°C bis zur Verwendung gelagert (höchstens 3 Monate). Die Gefrierschnitte wurden bei -17°C an einem Cryotom (2800 Frigo-Cut, Reichert & Jung/Leica Microsystems, Wetzlar, GER) mit einer Schnittdicke von 10 µm durchgeführt und auf Adhäsionsobjektträger (Superfrost-PlusTM, Thermo Fischer ScientificTM, Waltham, Massachusetts, USA) überführt. Die Objektträger wurden für 20 min bei 40°C auf eine Heizplatte gelegt und anschließend mit PBST gewaschen. Der Ablauf der Markierung erfolgte wie bereits für die Präparate von *Schistocerca* beschrieben, jedoch mit deutlich kürzeren Inkubationszeiten (Waschschritte je 5 min., Erst-Antikörper über Nacht, Zweit-Antikörper 2 h).

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

Die Dokumentation der immunhistochemischen Markierungen erfolgte mit Hilfe eines Olympus BH-2 Mikroskops mit einer Leica DFC7000T Kamera unter Verwendung der dazugehörigen Software (Leica Application Suite (LAS), v4.9, Leica Microsystems, Wetzlar, GER). Größe, Helligkeit, Kontrast und Hintergrund der Bilder wurden in ImageJ angepasst und die Einzelbilder in Inkscape zu Zusammenstellungen arrangiert.

3.2.2 Elektrophysiologische Untersuchung der Antenne bei *Drosophila melanogaster*

Um Veränderungen der Funktionalität von Chordotonalorganen bei Reduktion oder Verlust der Proteine Fas2 und NDG zu überprüfen wurden elektrophysiologische Ableitungen der Antenne und im Wesentlichen des Johnston'schen Organs durchgeführt. Hierfür wurden die Fliegen mit CO₂ betäubt und in eine Universal-Pipettenspitze (100-1000 µl, Carl Roth, Karlsruhe, GER) überführt, so dass der Kopf aus der Pipettenspitze heraus ragte, der restliche Körper jedoch fixiert wurde (Abb. 3-2). Die ableitende Elektrode wurde im ersten Antennensegment platziert, so dass die Elektrodenspitze in der Nähe des Antennal-Nerven zum liegen kam. Die Referenzelektrode wurde im Prothorax, hinter der Kopfkapsel platziert. Die akustische Stimuli wurden mit Audacity (v2.0.3, <http://www.audacityteam.org/>) erstellt. Zum einen wurde ein dem Balzgesang („Courtship song“) ähnlicher Stimulus verwendet (57 Chirps, Gesamtdauer: 2 s, Trägerfrequenz: 160 Hz) und zum anderen Stimuli mit Frequenzen zwischen 25 Hz und 10 kHz bei einer Dauer von 100 ms und einem Intervall von 500 ms. Die akustische Stimulation erfolgte mit Hilfe eines in-ear Kopfhörers (CX 300 II, Sennheiser, Wedemark, GER). Das Signal des Kopfhörers wurde mit Hilfe eines flexiblen Schlauches (Länge 40 cm, Innendurchmesser 4,5 mm) und einer Universal-Pipettenspitze (100-1000 µl, Carl Roth, Karlsruhe, GER) direkt auf die Antenne gerichtet (Abstand zwischen

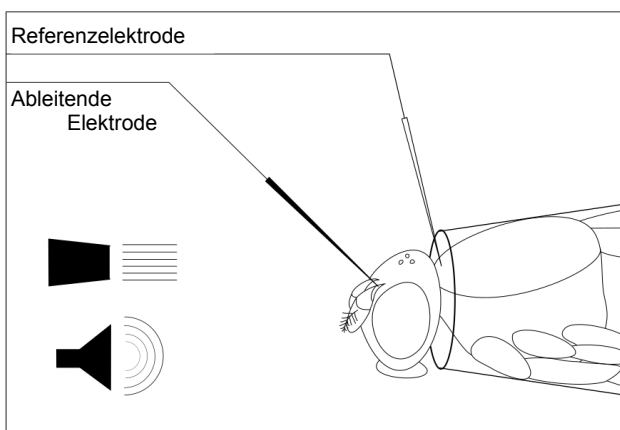


Abb. 3-2 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung zur elektrophysiologischen Untersuchung des Johnston'schen Organs. Die Fliege wurde mittels einer Pipettenspitze fixiert. Die verwendeten Stimuli wurden aus festgelegten Distanzen (Akustik: 5 mm, Wind: 5 cm) auf die Antenne gerichtet. Die Ableitung erfolgte mittels Wolfram-Elektroden. Die ableitende Elektrode wurde im zweiten Antennensegment nahe des Antennalnerven positioniert, die Referenzelektrode im Prothorax, hinter der Kopfkapsel.

Antenne und Pipettenspitze: 5 mm). Die Ausgabelautstärke über den Kopfhörer wurde so gewählt, dass bei einem abgespielten Courtship-Song eine deutliche elektrophysiologische Reaktion zu beobachten war. Die so eingestellte Ausgabelautstärke wurde während allen Versuchen beibehalten. Der angewandte Windstimulus erfolgte mit einer Länge von 500 ms und einem Intervall von 2 s. Dieser Luftstoß wurde mit Hilfe eines pneumatischen Injektors generiert (PV 820, WPI, Sarasota, Florida, USA) und in gleicher Weise wie der akustische Stimulus auf die Antenne gelenkt. Der Abstand zwischen Antenne und Pipettenspitze betrug hier 5 cm bei einem angelegten Druck von 5 psi.

Alle Stimulationen wurden während einer Aufnahme mehrfach wiederholt. Für die Analyse wurden für jedes Tier jeweils drei Reaktionen pro Stimulus-Konfiguration gemittelt. Die Analyse des Reaktionsumfanges erfolgte mit Hilfe der Spike 2 Software und dem Plugin „Area above baseline“.

3.2.3 Tube-climbing Test

Um zu überprüfen ob ein verändertes Fas2-Level auch eine veränderte Gravitationswahrnehmung bedingt, wurden Tube-climbing-Tests durchgeführt. Hierfür wurden weibliche *Drosophila* 3 Tage nach dem Schlupf zur Untersuchung herangezogen. 10 Fliegen wurden für jede Durchführung in einen Glaszylinder (Gesamthöhe: 17,5 cm, Innendurchmesser: 2 cm) gesetzt. Nach 5 min. wurden die Fliegen auf den Boden des Zylinders geklopft und nach 10 s wurde die Anzahl der Fliegen ermittelt, welche sich mehr als 8 cm oberhalb des Zylinderbodens befanden. Jede Gruppe von Fliegen wurde bei Lichteinfall von oben, sowie bei Dunkelheit getestet, um den Einfluss der Phototaxis zu bestimmen (vgl. Sun et al. 2009).

3.2.4 Verhaltenstest der larvalen Fortbewegung

Die Analyse der larvalen Fortbewegung orientiert sich an der von Eschbach et al. 2011 beschriebenen Methode. Für jeden Durchgang wurden 4 Larven des dritten Larvenstadiums („Crawling Phase“) auf eine mit einer 1% Agaroseschicht (in destilliertem Wasser) bedeckten Petrischale (Durchmesser: 6 cm) gesetzt. Die Petrischale wurde mit Hilfe einer Rotlicht Lampe (Pf712em, 15 W, 7 lm, Philips, Eindhoven, NED) beleuchtet und in einer mit akustisch dämmenden Schaumstoff ausgekleideten Holzbox plaziert ((57*57*47cm [B*L*T]). Vibrationsstimuli wurden

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

mit Hilfe eines Breitbandlautsprechers (BPSL 100/7, Impedanz: 8 Ohm, 60-20.000 Hz, 7 W, Isophon/Gauder Akustik, Rehningen, GER), auf welchen die Petrischale mit Knetmasse fixiert wurde, erzeugt. Die Stimulations-Signale mit einer Frequenz von 100 Hz und einer Dauer von 1 s wurden mit Hilfe der Audacity Software generiert. Bei jedem Durchgang wurden drei Stimuli mit einer Beschleunigung von 12 m/s^2 auf die Petrischale übertragen (Interpuls-Intervall: 9 s). Die mittlere Geschwindigkeit wurde anhand von 5 s durchgängigem Fortbewegungsmuster und die Bewegungsfrequenz anhand von 5 aufeinanderfolgenden Bewegungsabläufen für jede Larve bestimmt. Das Verhalten der Larven wurde während der Durchgänge mit einer Infrarot-CMOS Kamera (CCD-651, Conrad Electronics, Hirschau, GER) dokumentiert. Das analoge Videosignal konnte mittels eines analog/digital Videokonverters (700-USB, Pinnacle Systems, Mountain View, USA) auf einem PC für die weitere Analyse aufgenommen werden (25 fps). Die Analyse der Videos wurde mit der Software Cabrillo Tracker (v4.91, Douglas Brown, Open Source Physics, 2015, <https://physlets.org/tracker/>) durchgeführt. Es wurde die Körperlänge, Fortbewegungsgeschwindigkeit und die Bewegungsfrequenz ermittelt.

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism (v6.01, GraphPad Software Inc., 2012) durchgeführt.

3.3 Ergebnisse

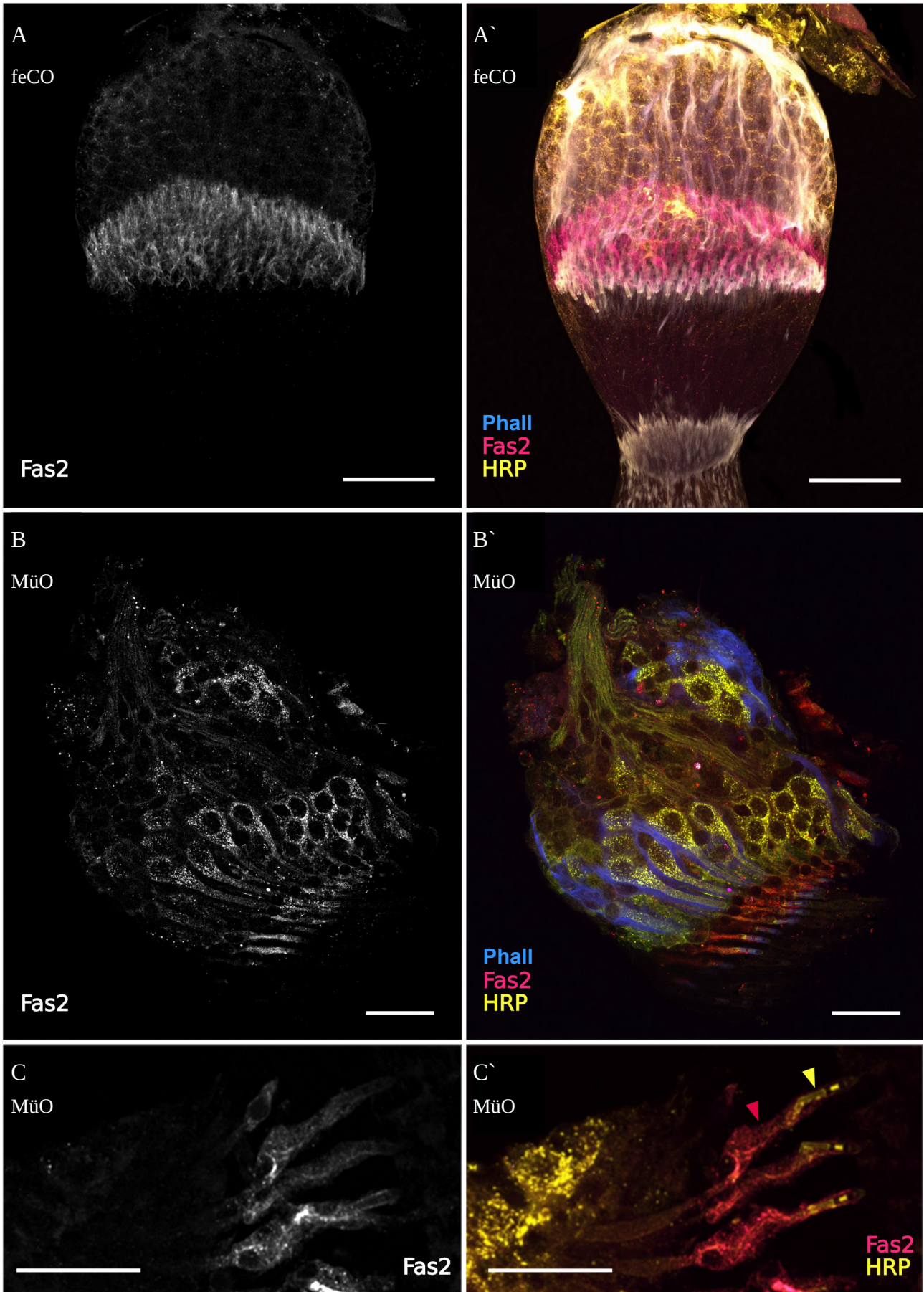
3.3.1 Lokalisation von Fasciclin2 in embryonalen und adulten Chordotonalorganen von *Schistocerca gregaria*

Die genaue Lokalisation, sowie das zeitliche Auftreten von Fasciclin 2 in Chordotonalorganen ist trotz der vorangehenden Arbeiten in diesem Bereich (Jacobs 1997, Jacobs & Lakes-Harlan 1999, Unverzagt 2015) noch nicht abschließend geklärt. Durch immunhistochemische Markierung von Fasciclin 2 mit dem monoklonalen Antikörper 8C6 erkennt man im proximalen Scoloparium des femoralen Chordotonalorgans bei *Schistocerca gregaria* eine Markierung im Bereich um die Sinneszellen. Sowohl der Bereich der proximalen, als auch der distalen Attachment/Ligament-Zellen weist keine Fas2-Markierung auf. Somit ist Fas2 nur in einem klar abgegrenzten Bereich mittig des feCOs vorzufinden. Antikörper gegen HRP markieren hingegen alle neuronalen Zellen des feCOs und Fluorophor-gekoppeltes Phalloidin markiert die Aktin-reichen Bereiche des Scolops und Bereiche der Attachment-Zellen (Abb. 3-3 A, A').

Eine ähnliches Muster der Fas2-Markierung ist im Müller'schen Organ vorzufinden. Auch hier beschränkt sich die Fas2-Markierung im Wesentlichen auf einen Bereich um die sensorischen Neurone und die Scolopalzellen. Im Gegensatz zu der Markierung im feCO erkennt man zusätzlich eine deutlichere Markierung bestimmter Zellkörper (Abb. 3-3 B, B'). Erst bei starker Vergrößerung erkennt man, dass sich die Fas2-Markierung im Wesentlichen auf die Scolopal-Zellen beschränkt, welche die Dendriten der sensorischen Neurone umhüllen. Besonders der Übergang zwischen Dendrit und Scolopal-Zelle weist eine starke Fas2-Markierung auf. Es kommt zu keiner erkennbaren Markierung des Dendriten selbst oder der scolopalen Kappe. Lediglich eine Fas2-Markierung im Lumen des Scolops kann nicht ausgeschlossen werden (Abb. 3-3 C, C').

Während der embryonalen Entwicklung kommt es bis zu einem Entwicklungsstand von 75% zu keiner positiven Fas2-Markierung, während die neuronalen Zellen inklusive der sensorischen Neurone schon deutlich früher mit anti-HRP markiert werden können. Erst ab 80% Entwicklungsstadium zeigt sich die typische Fas2-Markierung im Bereich der sensorischen Neurone beziehungsweise Scolopalzellen. Während der fortschreitenden Entwicklung bleibt die Fas2-Markierung stabil bis hin in das adulte Stadium (Abb. 3-4).

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion



3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

Abb. 3-3 Lokalisation von Fas2 im femoralen Chordotonalorgan (feCO, A, A') und im Müllerschen Organ (MüO; B, B', C, C') von *Schistocerca gregaria*. **A, A'** Im femoralen Chordotonalorgan konzentriert sich die Lokalisation von Fas2 auf einen klar definierten Bereich um die sensorischen Neurone und deren Dendriten. In anderen Bereichen des feCOs kann keine Fas2-positive Markierung festgestellt werden. **B, B'** Die Markierung von Fas2 im für die auditorische Wahrnehmung verantwortlichen Müller'schen Organ, entspricht der Markierung im feCO im Wesentlichen. Auch hier konzentriert sich der Fas2 positive Bereich um die sensorischen Dendriten. Unklar ist, ob die proximal liegenden Zellkörper auch eine Fas2 positive Markierung aufweisen (*). Bei höherer Vergrößerung des Bereiches um den sensorischen Dendriten wird deutlich, dass sich die Fas2-Markierung auf die den Dendriten umlagernden Scolopalzelle beschränkt (**C, C'**). Am Übergang zwischen Dendrit und Scolopalzelle ist ein vermehrtes Fas2-Vorkommen zu beobachten (weißer Pfeil), jedoch weißt weder der Bereich der Kappe oder Kappenzelle, noch der Scolopale Raum eine Fas2-positive Markierung auf. Roter Pfeilkopf: Scolopalzelle, gelber Pfeilkopf: mit anti-HRP markiertes inneres dendritisches Segment und dendritisches Cilium. Phall: Phalloidin-Markierung von F-Aktin. Maßstab: 50 µm.

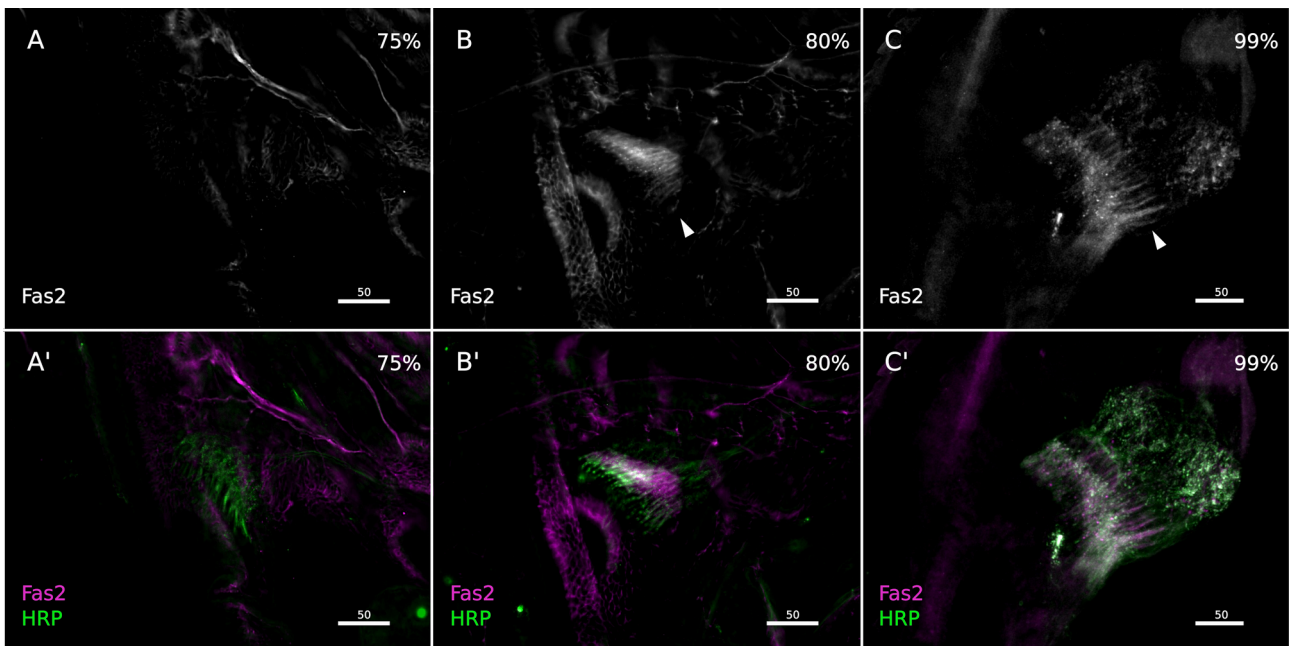


Abb. 3-4 Entwicklungsspezifische Markierung von Fas2 bei unterschiedlichen Embryonalstadien von *Schistocerca gregaria*. Bei einem Entwicklungsstadium von 75 % kommt es zu keiner Fas2-positiven Markierung im sich entwickelnden Müllerschen Organ (**A, A'**). Erst ab 80 % kann eine Fas2-positive Markierung nachgewiesen werden (**B, B'**). Diese wird anschließend bis in das Adultstadium aufrecht erhalten (**C, C'**). Weißer Pfeil: Bereich des Müller'schen Organs, welcher durch die anti-HRP Markierung verdeutlicht wird. Weißer Pfeilkopf: Bereich der Fas2-Markierung ab einer Entwicklung von 80 %. Maßstab: 50 µm.

3.3.2 Fas2-Lokalisation im Johnston'schen Organ von *Drosophila melanogaster*

In *Drosophila melanogaster* sind mehrere Isoformen bzw. Spleißvarianten des Zelladhäsionsmoleküls Fasciclin 2 bekannt. Durch isoformspezifische Einbringung einer GFP-kodierenden DNA-Sequenz mittels des Exon-Trapping Verfahrens in die Fas2-Sequenz, ist es möglich die Lokalisation der unterschiedlichen Fas2-Isoformen separat zu untersuchen, wobei die Isoformen Fas2-RA,-RB und -RC die verbreitetsten sind und daher hier weiterführend untersucht wurden (Halberg et al. 2016).

Im Johnston'schen Organ in der Antenne von *D. melanogaster* zeigt sich eine Isoform-spezifische Verteilung des Fas2-Proteins (Abb. 3-5). Eine GFP-Markierung aller drei Isoformen (778^{GFP}, Abb.

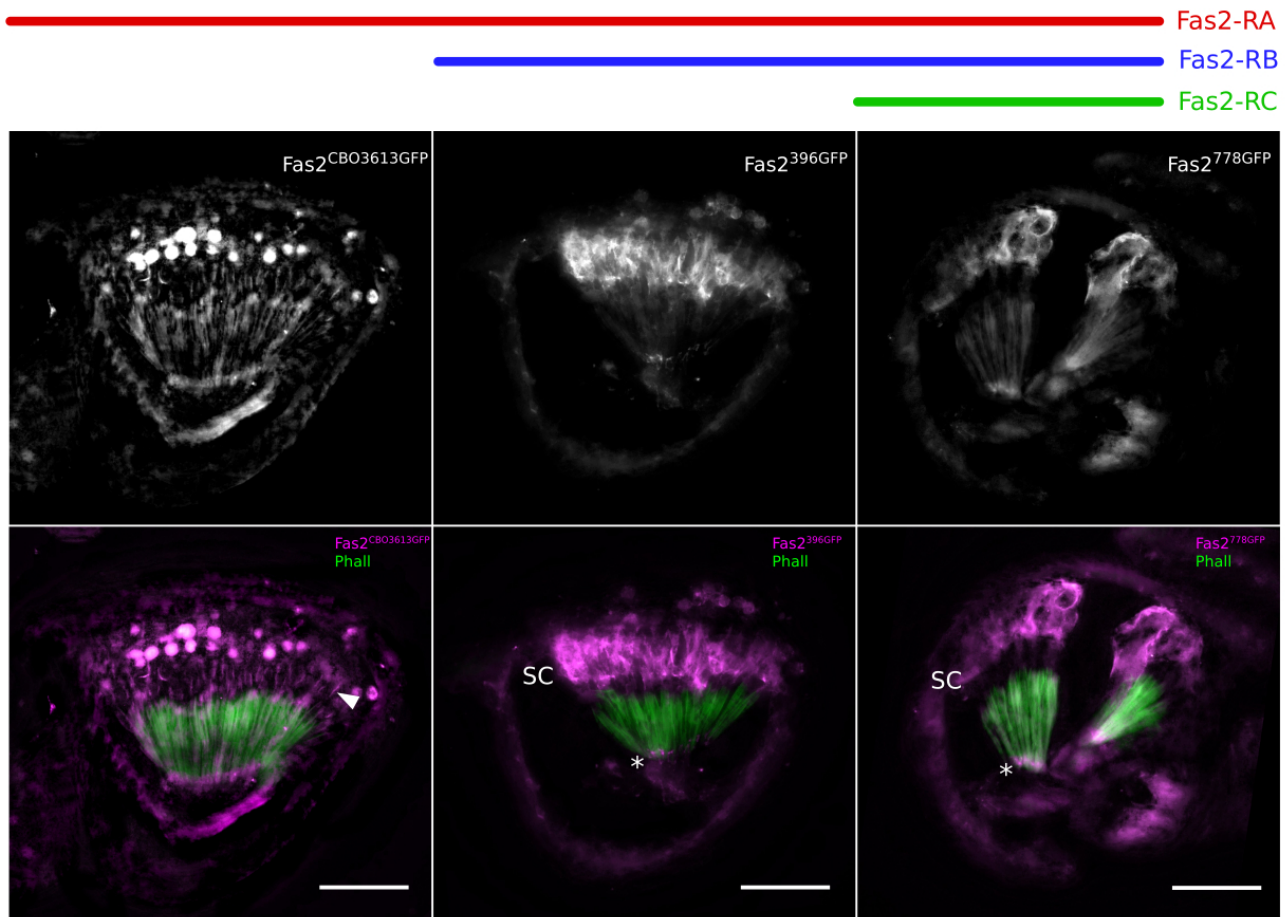


Abb. 3-5 Isoformspezifische Lokalisation von Fas2 im Johnston'schen Organ von *Drosophila melanogaster*. Die Markierung der Isoform RA mittels des Fas2-GFP Stammes CBO3613^{GFP}, zeigt eine Lokalisation von Fas2 im sensorischen Dendriten (A, A'; weißer Pfeilkopf). Die Isoformen RB und RC, welche durch die Stämme 396^{GFP} und 778^{GFP} nachgewiesen werden, zeigen ein übereinstimmendes Muster. Hier kommt es zu einer positiven Markierung im Bereich der Scolopalzellen (SC) (B, B', C, C'). Auch zeigt sich eine Fas2-positive Markierung im Bereich der Verankerung der Kappenzellen (*), welche hier durch die Phalloidin-Markierung hervorgehoben werden. Phall: Phalloidin-Markierung von F-Aktin. Maßstab: 10 µm.

3-5 C, C') zeigt die Lokalisation von Fas2 in den Scolopalzellen und dem Bereich der Verankerung der Kappenzellen. Bei Betrachtung der Fas2-Lokalisation der Isoformen RA und RB ergibt sich das gleiche Bild. Auch hier zeigt sich eine klare Markierung der Scolopalzellen und Markierungen am terminalen Bereich der Kappenzellen (396^{GFP}, Abb. 3-5 B, B'). Bei alleiniger Markierung der Fas2-Spleißvariante RA lässt sich jedoch keine Markierung der Scolopalzellen erkennen. Die Markierung ist im Vergleich zu den beiden anderen Varianten geringer, welches eine deutliche Erhöhung der Belichtungszeit bedingt. Deutlich sind im Bereich der Scolopalzellen und der sensorischen Neurone Zellkerne markiert, wobei unklar ist welchem Zelltyp diese zuzuordnen sind. Davon abgesehen kommt es zu einer Markierung der Dendrite sensorischer Neurone (CBO3613^{GFP}, Abb. 3-5 A, A'). Dies bestätigt die Ergebnisse vorangehender Experimente, bei denen der Fas2-Isoform RA spezifische monoklonale Antikörper 1D4 verwendet wurde.

3.3.3 Physiologie des Johnston'schen Organs bei reduziertem Fas2-Level

Die Summenableitung des Antennalnerven während der Stimulation der Antenne ermöglicht eine Überprüfung der physiologischen Reaktion des Johnston'schen Organs. Bei Stimulation mit einem an den „Coursthip song“ angelehnten, primär akustischen Reiz kommt es bei 57 Einzelpulsen in 2 s zu einer Reaktion auf jeden einzelnen Puls (Abb. 3-6 A). Ein 500 ms andauernder Windreiz verursacht hingegen einen durchgängige neuronale Reaktion (Abb. 3-6 B). Beim Vergleich der Reaktion eines *Drosophila*-Stammes mit einem reduzierten Fas2-Level (*w*;Fas2^{e76}) zu einem unveränderten Kontrollstamm (*w*¹¹¹⁸) wird deutlich, dass der Reaktionsumfang durch das verminderte Fas2-Level deutlich abnimmt. Es kommt zwar bei beiden verwendeten Stämmen zu einer erkennbaren Reaktion auf die Stimulation der Antenne, jedoch weisen *Drosophila* der Linie *w*;Fas2^{e76} sowohl bei der Stimulation mit akustischen Reizen (*w*¹¹¹⁸: 342,1 ± 39,8 mv*ms; *w*;Fas2^{e76}: 237,4 ± 25,7 mv*ms; T-Test: p=0,0282; n=16), als auch bei Wind-Reizen (*w*¹¹¹⁸: 679,5 ± 176,1 mv*ms; *w*;Fas2^{e76}: 505,6 ± 123,5 mv*ms; T-Test: p=0,0179; n=16) über die gesamte Dauer der Stimulation einen signifikant niedrigeren Reaktionsumfang auf (Abb. 3-6 C-F). Vorversuche zeigten hier keinen Einfluss auf die Latenz, als auch auf die Reaktionsschwelle (Daten nicht gezeigt). Bei Stimulation mit reinen Tönen/Frequenzen zeigt sich ein ähnliches Bild. Bei reduziertem Fas2-Level sind die Reaktionen über das gesamte getestete Frequenzspektrum signifikant niedriger als die des *w*¹¹¹⁸-Kontrollstammes. Dieser Unterschied im Reaktionsumfang ist frequenzunabhängig (Two-way ANOVA, *Drosophila*-Linie: p<0,0001, Frequenz: p<0,0001, Interaktion: n.s., n=16) (Abb. 3-7).

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

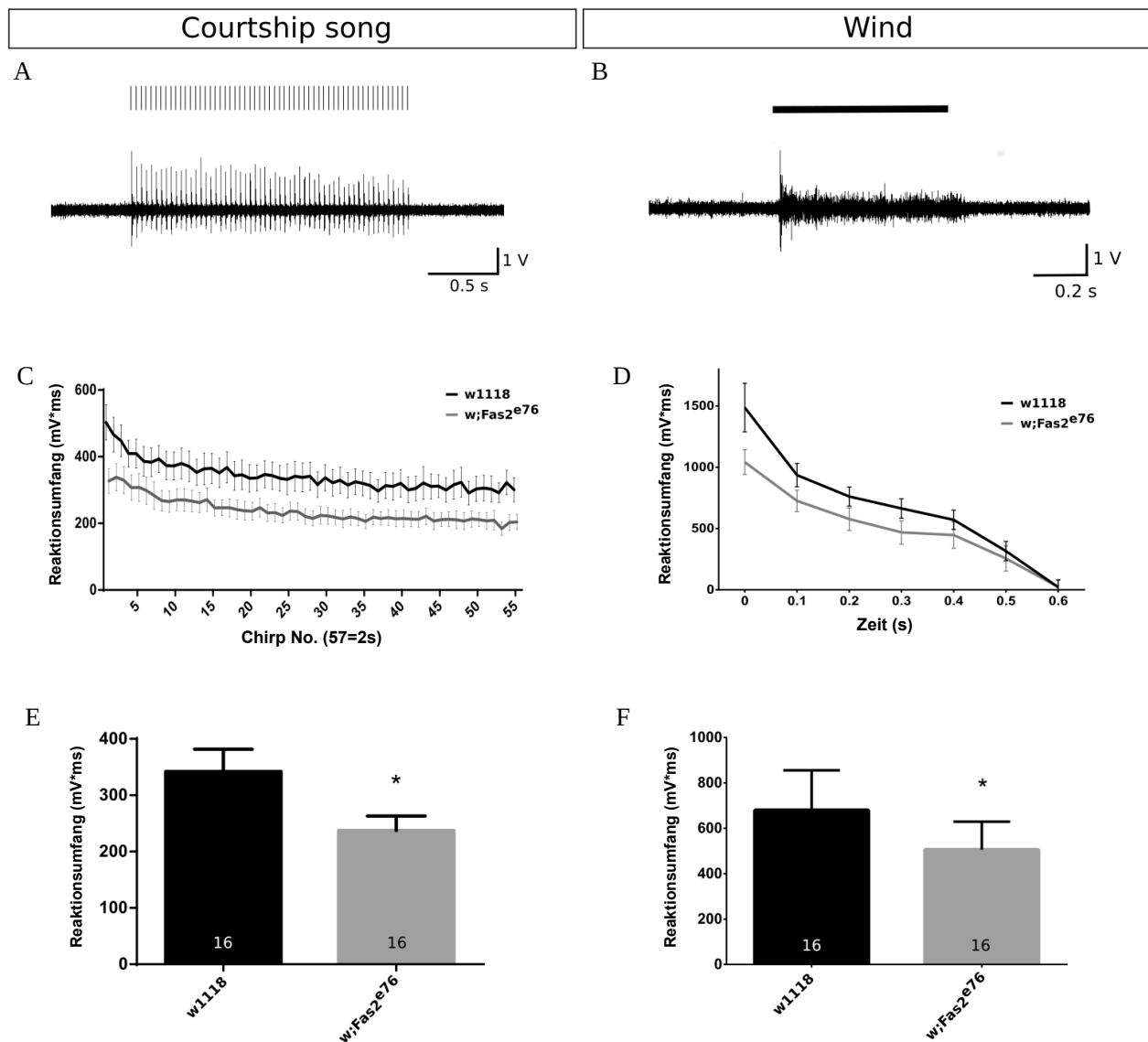


Abb. 3-6 Elektrophysiologische Untersuchung des Johnston'schen Organs bei Reduktion des Fas2-Levels. In Folge der Stimulation der Antenne mit akustischen Signalen und Wind-Reizung kommt es zu einer reizgekoppelten neuronalen Reaktion (A,B). Sowohl bei Stimulation mittels des Courtship Songs (linke Spalte), als auch bei Wind-Stimulation (rechte Spalte) zeigt sich bei dem *Drosophila*-Stamm mit reduziertem Fas2-Level (*w;fas2^{e76}*) eine verminderte neuronale Antwort als Reaktion auf den Reiz. Der Verlauf der Reaktion entspricht derjenigen des Kontrollstammes (*w¹¹¹⁸*), jedoch ist die Reaktion im Umfang vermindert (C,D). Beim Vergleich des mittleren Reaktionsumfanges, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zum Kontrollstamm (MWU-Test, * $p < 0,05$). Fehlerindikator: Standardfehler (SEM)

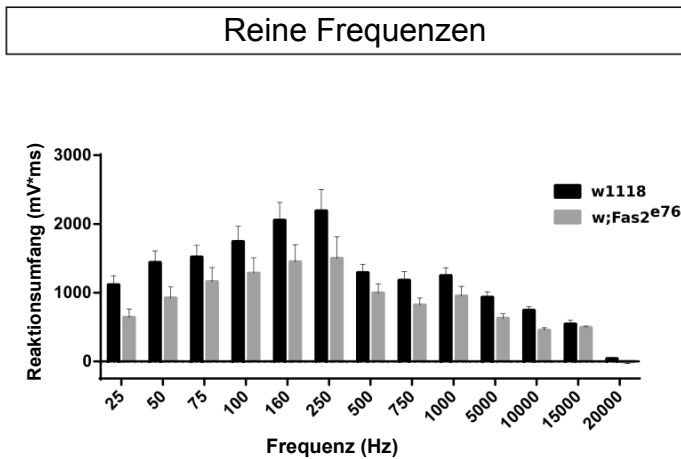


Abb. 3-7 Neuronale Reaktionen von *Drosophila* mit reduziertem Fas2-Level bei akustischer Reizung mit einzelnen Frequenzen. Die akustische Stimulation führt in einem Frequenzbereich zwischen 25 Hz und 15 kHz zu messbaren Reaktionen. Der sensitive Bereich liegt hierbei zwischen 50 und 250 Hz. *Drosophila* mit einem verminderten Fas2-Level zeigen eine dem Kontrollstamm ähnliche Frequenzsensitivität. Jedoch ist auch hier der Reaktionsumfang frequenzunabhängig vermindert (2-Way-Anova, *** $p < 0,001$, $n = 16$).

3.3.4 Gravitationswahrnehmung adulter *Drosophila* bei reduziertem Fas2-Level

Adulte *Drosophila* zeigen normalerweise eine ausgeprägte positive Phototaxis und negative Gravitaxis (Abb. 3-8). Die Gravitationswahrnehmung erfolgt über die Antenne bzw. dem darin liegenden Johnston'schen Organ. *Drosophila* mit einem verminderten Fas2-Level ($w;Fas2^{e76}$) weisen während Licht-Einfall das selbe Kletterverhalten wie die Kontroll-Linie (w^{1118}) auf. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust an Fas2 keinen Einfluss auf die allgemeine Fortbewegung der Fliegen hat und die gezeigte Phototaxis nicht beeinträchtigt ist. Ohne Lichtquelle und nur auf die negative Gravitaxis beschränkt, zeigen die Fliegen mit vermindertem Fas2-Level jedoch ein um ca. 24% signifikant verringertes Kletterverhalten (Climbing Score, w^{1118} : $0,717 \pm 0,0375$; $w;Fas2^{e76}$: $0,5148 \pm 0,0495$; MWU-Test, $p = 0,0278$; $n(w^{1118}) = 570$ in 42 Trials; $n(w;Fas2^{e76}) = 405$ in 27 Trials) (Abb. 3-8 B). Noch deutlicher wird dieses veränderte Verhalten bei Vergleich des Verhältnisses zwischen Dunkel- und Licht-Bedingungen. Hierbei liegt der Unterschied bei ca. 28 % (D/L Verhältnis, w^{1118} : $0,717 \pm 0,0375$; $w;Fas2^{e76}$: $0,5148 \pm 0,0495$; MWU-Test, $p = 0,0014$) (Abb. 3-8 C).

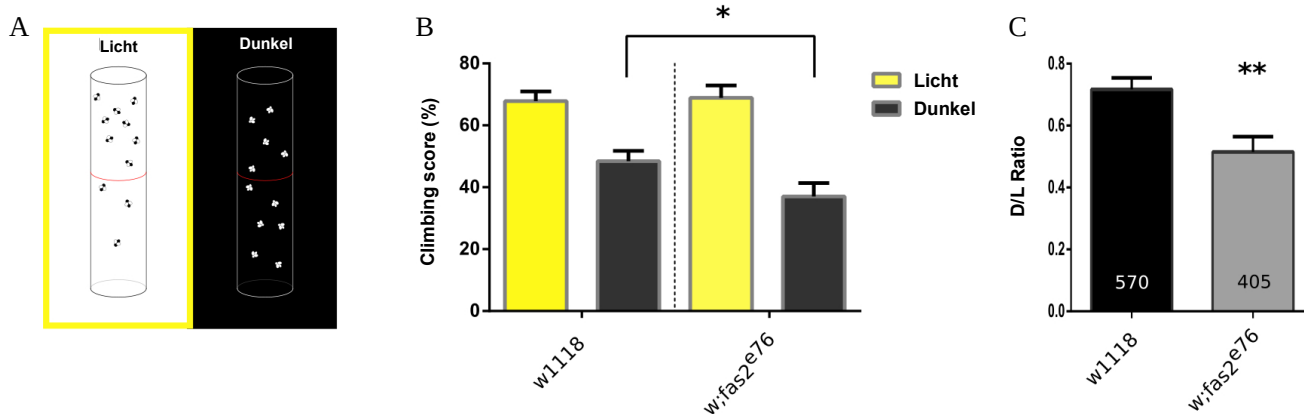


Abb. 3-8 Tube-climbing-Test zur Quantifizierung der Gravitationswahrnehmung bei adulten *Drosophila*. **A** Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Zu Beginn werden die Fliegen in einem Glaszylinder auf den Boden geklopft und nach einem Zeitintervall von 10 s werden die Fliegen, welche eine Markierung bei 8 cm Höhe passiert haben ausgezählt. Jede Gruppe wird sowohl bei Licht- als auch bei Dunkelbedingung getestet. **B,C** Bei Lichtbedingungen unterscheiden sich die Fas2-reduzierten Fliegen (w;*fas2*^{e76}) nicht vom Kontrollstamm (w¹¹¹⁸). Nach Wegfall des optischen Orientierungspunktes (Dunkelbedingungen) zeigen *Drosophila* mit reduziertem Fas2-Level ein deutlich vermindertes Kletterverhalten. B: MWU-Test, * p<0,05; C: MWU-Test, ** p<0,01. Fehlerindikator: SEM (Standardfehler)

3.3.5 Physiologische Auswirkungen einer Reduktion des NDG-Levels

Ein Verlust von NDG-Protein führt zu einem veränderten Fortbewegungsverhalten, vergleicht man die mittlere Fortbewegungsgeschwindigkeit und die „Schritt“-Frequenz zwischen NDG-Mutanten mit vermindertem NDG-Level mit der w¹¹¹⁸-Kontrollgruppe. Die mittlere Fortbewegungsgeschwindigkeit der Ndg^{Δ0.4}-Larven ist leicht, wenn auch nicht signifikant reduziert, wohingegen Ndg^{Δ1.4}-Larven mit kompletten NDG Verlust, eine signifikant reduzierte Fortbewegungsgeschwindigkeit aufweisen (w¹¹¹⁸: 1,265 ± 0,052 mm/s; Ndg^{Δ0.4}: 1,070 ± 0,049; Ndg^{Δ1.4}: 0,896 ± 0,052; K-W Anova, p < 0,0001; Dunn's-test mit angepasstem p-Wert, Ndg^{Δ0.4}: n.s. p = 0,0597, Ndg^{Δ1.4}: *** p < 0,0001 versus w¹¹¹⁸; n(w¹¹¹⁸) = 26, n(Ndg^{Δ0.4}) = 25, n(Ndg^{Δ1.4}) = 27; Abb. 3-9 A). Bei der Frequenz der Bewegungen zeigt sich ein ähnliches Bild. Sowohl die Linie Ndg^{Δ0.4}, als auch Ndg^{Δ1.4} zeigen hier eine signifikant Reduzierte Bewegungsfrequenz, wobei Ndg^{Δ1.4} auch hier den Phänotyp mit der deutlicheren Auswirkung darstellt (w¹¹¹⁸: 73,32 ± 2,48 Bew./min; Ndg^{Δ0.4}: 62,25 ± 2,29; Ndg^{Δ1.4}: 47,75 ± 2,55; K-W Anova, p < 0,0001; Dunn's-test mit angepasstem p-Wert, Ndg^{Δ0.4}: * p = 0,0207, Ndg^{Δ1.4}: *** p < 0,0001 versus w¹¹¹⁸; n(w¹¹¹⁸) = 26, n(Ndg^{Δ0.4}) = 25, n(Ndg^{Δ1.4}) = 23; Abb. 3-9 B). Diese Veränderungen in der Fortbewegung deuten auf eine veränderte

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

Propriozeption hin, welche durch die lateralen Chordotonalorgane vermittelt wird. Um diese Möglichkeit weiter zu prüfen, wurde zusätzlich die Wahrnehmung von Vibrationsreizen untersucht. Das Ausmaß an Körperlängen-Reduktion, welche als Reaktion auf einen Vibrationsreiz erfolgt, wurde zwischen w^{1118} und den $Ndg^{\Delta 0.4}$ bzw. $Ndg^{\Delta 1.4}$ -Larven des dritten Larvenstadiums verglichen (Abb. 3-9 C, D). Bei den Larven der Kontrollgruppe (w^{1118}) beträgt die durchschnittliche Reduktion der Körperlänge bei einem Vibrationsreiz ca. 14 %. Larven mit reduzierten NDG-Level hingegen weisen auch hier signifikant reduzierte Reaktionen auf, bei denen $Ndg^{\Delta 1.4}$ erneut den stärker beeinträchtigteren Phänotyp darstellt. (w^{1118} : $14,16 \pm 1,52$ Bew./min; $Ndg^{\Delta 0.4}$: $7,05 \pm 0,92$; $Ndg^{\Delta 1.4}$: $3,98 \pm 1,71$; K-W Anova, $p < 0,0001$; Dunn's-test mit angepasstem p-Wert, $Ndg^{\Delta 0.4}$: ** $p = 0,0061$, $Ndg^{\Delta 1.4}$: *** $p < 0,0001$ versus w^{1118} ; $n = 24$) (Abb. 3-9 D).

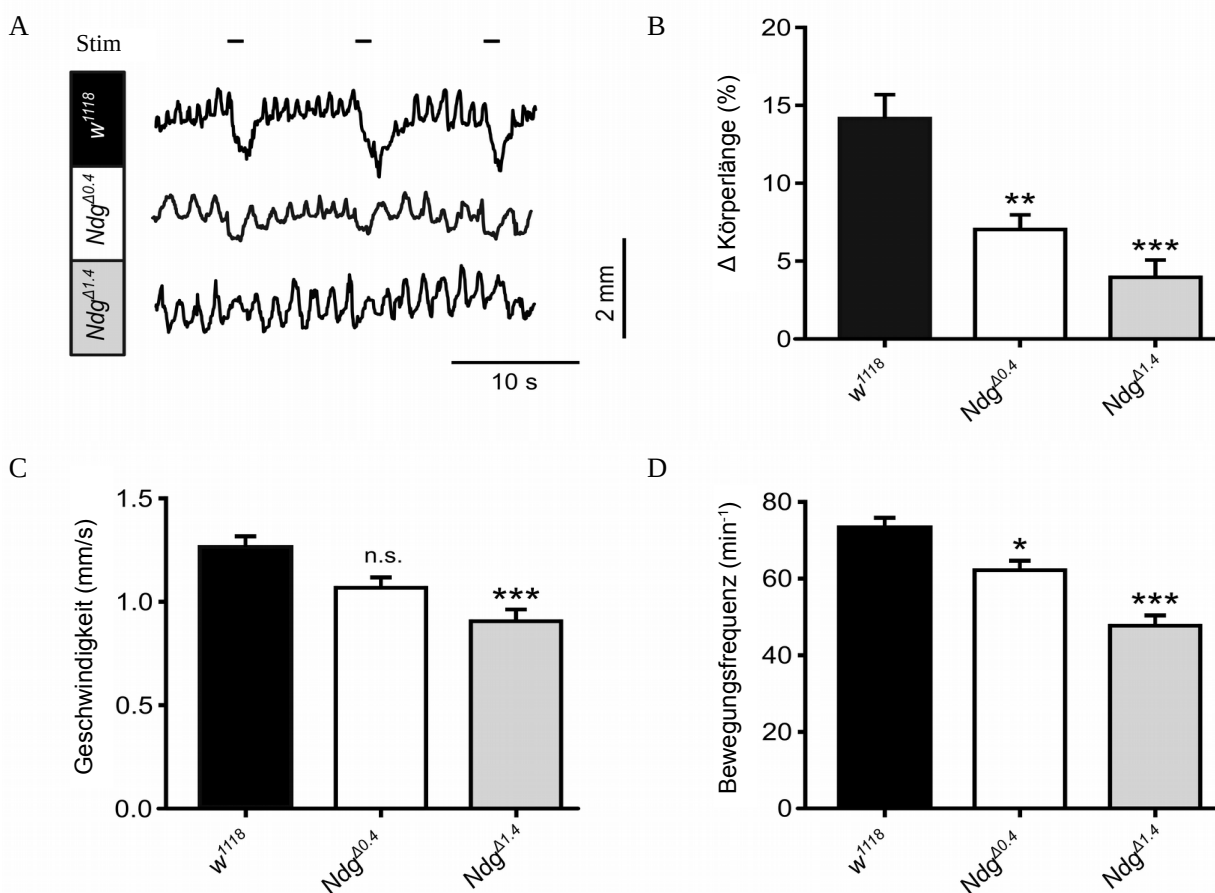


Abb. 3-9 Veränderte Verhaltensaspekte von *Drosophila*-Larven mit Mutation des NDG Proteins. **A,B** Nach Stimulation mittels Vibrationsreiz, reagieren *Drosophila*-Larven (w^{1118}) mit einer Reduktion der Gesamtkörperlänge. *Drosophila*-Larven mit reduziertem NDG-Level weisen hierbei eine verminderte Reaktion auf Vibrationsstimulation auf ($Ndg^{\Delta 0.4}$ $p=0.0061$, $Ndg^{\Delta 1.4}$ $p<0.001$ vs. w^{1118} . **B,C** Sowohl die Fortbewegungsgeschwindigkeit, als auch die Bewegungsfrequenz werden durch ein niedriges NDG-Level negativ beeinflusst (C: $Ndg^{\Delta 0.4}=0.0597$, $Ndg^{\Delta 1.4}$ *** $p < 0.0001$ vs. w^{1118} ; D: $Ndg^{\Delta 0.4}$ * $p=0.0207$, $Ndg^{\Delta 1.4}$ *** $p < 0.0001$ vs. w^{1118}). Fehlerindikator: SEM (Standardfehler). Veröffentlicht in Wolfstetter et al. 2019.

3.3.6 NDG-Lokalisation im Johnston'schen Organ bei *Drosophila melanogaster*

Um zu überprüfen ob NDG auch in Chordotonalorganen adulter Fruchtfliegen eine funktionale Rolle übernimmt, wurden Antikörpermarkierungen gegen NDG an Cryotom-Schnitten der Antenne durchgeführt. Auch hier kommt es zu einer deutlichen Markierung im Bereich des Johnston'schen Organs. Anders als Fas2 findet sich NDG nicht im Bereich der Zell-Somata, sondern umlagert hier, ähnlich wie bei den larvalen Chordotonalorganen, die Dendriten der Neurone, sowie der Scolopalzellen (Abb. 3-10). Es kommt zu einer schwachen Markierung der Kappenzellen und dem Bereich der Verankerung der Kappenzellen. Neben den direkten, Chordotonalorgan-assoziierten Markierungen weisen auch andere Bereiche NDG-positive Markierungen auf. Darunter die Basalmembran, welche den Raum um das Johnston'sche Organ auskleidet, sowie eine EZM-Schicht um den Antennalnerven, welcher ins dritte Antennensegment führt. Auch die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs) sind von einer NDG positiven EZM-Schicht umgeben (Abb. 3-10 B).

3.3.7 Physiologie des Johnston'schen Organs bei reduziertem NDG-Level

Um den Einfluss von NDG auf die Funktion von Chordotonalorganen zu untersuchen, wurden entsprechend den Versuchen zur Funktionalität von Fasciclin 2 elektrophysiologische Ableitungen des Antennalnerven durchgeführt (Abb. 3-11). Auch hier wurden als Stimuli akustische Signale (Courtship song), sowie Luftstöße (Wind) verwendet.

Hierbei zeigt sich der Einfluss einer Reduktion des NDG-Levels auf die Funktion des Johnston'schen Organs. Sowohl bei Stimulation mit akustischen Signalen (w^{1118} : $484,4 \pm 79,8$ mV*ms; $Ndg^{\Delta 0.4}$: $387,6 \pm 58,4$ mV*ms; $Ndg^{\Delta 1.4}$: $203,3 \pm 33,9$ mV*ms; $n(w^{1118}) = 10$, $n(Ndg^{\Delta 0.4}) = 7$, $n(Ndg^{\Delta 1.4}) = 10$) (Abb. 3-11 A), als auch bei Wind-Stimulation (w^{1118} : $11,62 \pm 2,35$ mV*ms; $Ndg^{\Delta 0.4}$: $10,01 \pm 0,99$ mV*ms; $Ndg^{\Delta 1.4}$: $5,98 \pm 0,75$ mV*ms; $n(w^{1118}) = 10$, $n(Ndg^{\Delta 0.4}) = 7$, $n(Ndg^{\Delta 1.4}) = 9$) (Abb. 3-11 B) ist die neuronale Reaktion der Fliegen mit reduziertem NDG-Level geringer als die der w^{1118} -Linie, jedoch ist der Unterschied nur bei der Linie $Ndg^{\Delta 1.4}$ signifikant unterschiedlich (Courtship song: K-W Anova, $p = 0,0076$; Dunn's-test mit angepasstem p-Wert, $Ndg^{\Delta 0.4}$: n.s., $Ndg^{\Delta 1.4}$: * $p = 0,0109$ versus w^{1118} ; Wind: K-W Anova, $p = 0,0128$; Dunn's-test mit angepasstem p-Wert, $Ndg^{\Delta 0.4}$: n.s., $Ndg^{\Delta 1.4}$: * $p = 0,0414$ versus w^{1118}) (Abb. 3-11 C, D).

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

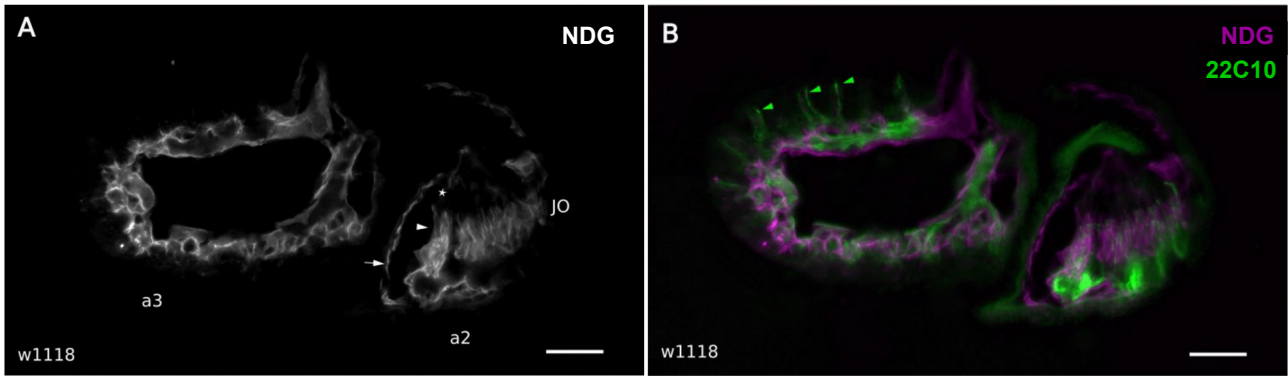


Abb. 3-10 NDG Lokalisation in der Antenne adulter *Drosophila*. **A,B** Die Immunhistochemische Markierung zeigen eine NDG-positive Markierung um die Scolopalzellen und Dendriten der sensorischen Neurone (weißer Pfeilkopf). Sowohl die Kappenzellen, als auch deren distaler Verankerungsbereich zeigt eine schwächere Markierung (*). Abgesehen von den dem JSO zugehörigen Strukturen ist eine deutliche Markierung der den JSO-Raum auskleidenden Basalmembran (weißer Pfeil), der den Antennalnerv im 3. Antennensegment (a3) umhüllenden EZM und der Bereich um die Zell-Somata der olfaktorischen Rezeptor Neurone (ORNs; grüne Pfeilköpfe). 22C10: Neuronenmarker (α -Futsch), Maßstab 10 μ m.

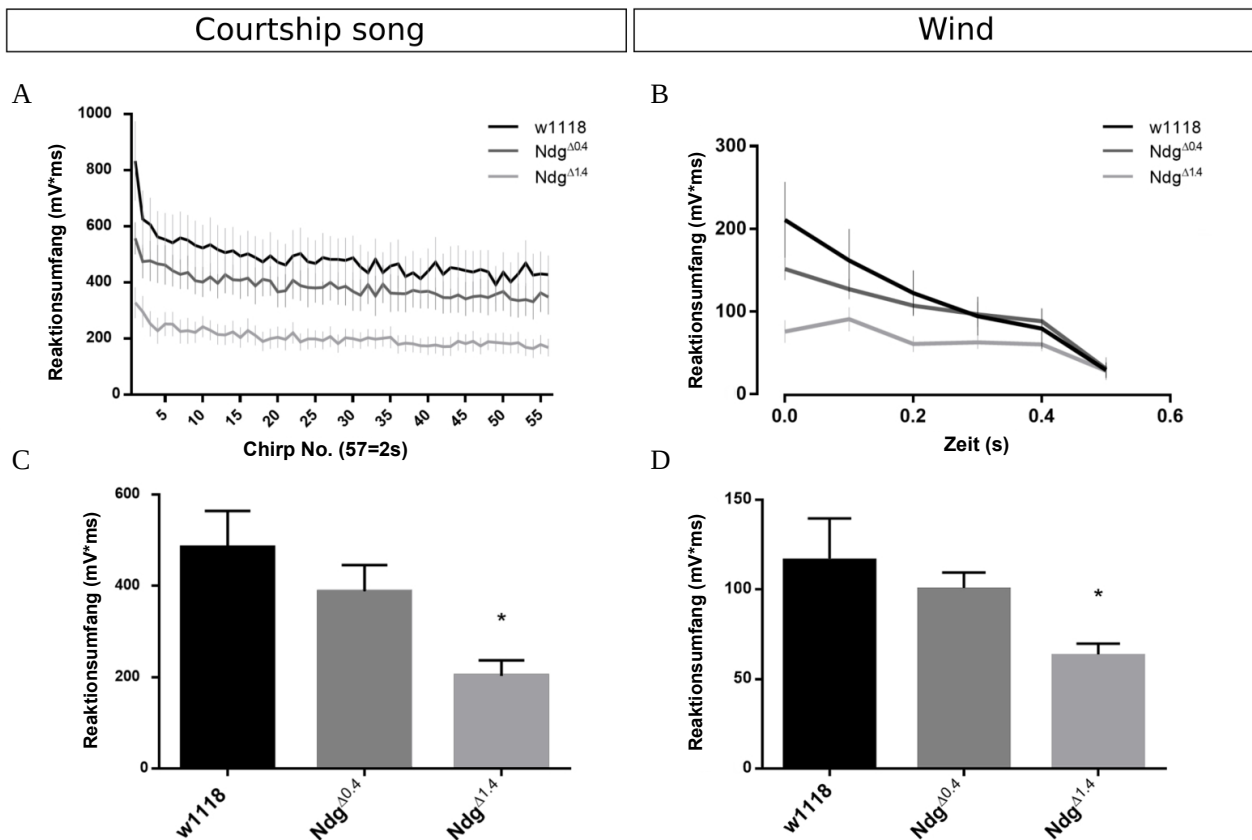


Abb. 3-11 Elektrophysiologische Untersuchung des Johnstonschen Organs bei Reduktion des NDG-Niveaus. **A** Adulte *Drosophila* mit reduziertem NDG-Level (Ndg ^{Δ 0.4}) und komplettem Knockout (Ndg ^{Δ 1.4}) weisen bei Stimulation mit akustischen und Wind-Stimuli einen ähnlichen Verlauf der neuronalen Antwort auf, jedoch bei reduziertem Reaktionsumfang (**A**, **B**). Dabei zeigt nur der durch den kompletten Knockout bedingte, stärkere Phänotyp (Ndg ^{Δ 1.4}) signifikante Unterschiede zum Kontrollstamm (w¹¹¹⁸) bezüglich des mittleren Reaktionsumfangs auf (w¹¹¹⁸ vs. Ndg ^{Δ 1.4}, **C**: p(*) = 0,0076, **D**: p(*) = 0,0109). Fehlerindikator: SEM (Standardfehler).

3.4 Diskussion

In früheren Arbeiten wurde das Vorkommen des Zelladhäsionsmoleküls Fasciclin 2 und des EZM-Proteins Nidogen in Chordotonalorganen von Insekten nachgewiesen. Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der Lokalisation der Proteine in Chordotonalorganen und mit deren Einfluss auf die mechanosensorische Kopplung der Mechanotransduktion in diesen Organen.

3.4.1 Fasciclin2

Die immunhistochemischen Markierungen zeigen ein deutliches Vorkommen von Fas2 in Chordotonalorganen von *Schistocerca gregaria*. Durch Verwendung eines Multiphotonen-Mikroskops kann in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Fas2 primär in den die Dendriten umhüllenden Scolopalzellen lokalisiert ist (Abb. 3-3). Die Fas2-Lokalisation in feCO und MüO entsprechen sich im Wesentlichen, daher ist anzunehmen, dass es sich hierbei um ein konsistentes Muster handelt, welches sich bei anderen Fas2-positiven Chordotonalorganen bestätigen sollte. Besonders interessant ist hierbei das vermehrte Vorkommen von Fas2 am Übergang von Scolopalzelle zum Dendriten. Dies lässt den Rückschluss zu, dass auch die Funktion von Fas2 in Scolopidien Dendrit-bezogen ist und sich somit direkt auf die primär im Dendriten erfolgende Mechanotransduktion bezieht. Welche Auswirkungen ein Wegfall oder eine Reduktion von Fas2 in Chordotonalorganen von *Schistocerca* mit sich bringen würde ist nicht bekannt. Hierfür fehlen entsprechende Mutationslinien, da *Schistocerca* nicht derart im wissenschaftlichen Fokus wie beispielsweise *Drosophila* liegt und genetische Manipulationen aufwändiger sind. Nichts desto trotz könnte in zukünftigen Versuchen siRNA („short interfering RNA“) oder shRNA („short hairpin RNA“) dazu verwendet werden, einen RNAi („RNA interference“) basierten Fas2-knockdown lokal oder systemisch zu erreichen (Boerjan et al. 2011, Dong und Friedrich 2005, Marchal et al. 2012. Überblick: Leung und Whittaker 2005, Rao et al. 2010). Entsprechende elektrophysiologische Untersuchungen des feCOs und des MüOs wurden bereits beschrieben, sowohl bezüglich extrazellulären Summenableitungen (Burns 1974, Bässler 1977, Matheson 1992, Jackobs et al. 1999, Ausborn et al. 2005), als auch Einzelzelluntersuchungen mittels der patch-clamp Technik (Warren und Matheson 2018). In Kombination mit dem RNAi basierten knockdown von Fas2, sollten diese Techniken einen Einblick in den Einfluss von Fas2 bezüglich der Funktionalität der Chordotonalorgane von *S. gregaria* ermöglichen. Entsprechende Untersuchungen sind in Planung.

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

Anders als das Protein Fasciclin 1, welches in der frühen Entwicklung der Chordotonalorgane eine Rolle einnimmt (Meier und Reichert 1990), liegt der entwicklungsbezogene Beginn der Fas2-Lokalisation im MüO bei etwa 80% der Embryonalentwicklung (Abb. 3-4). Dies entspricht auch dem Zeitpunkt des Auftretens von Fas2 im feCO (Jacobs und Lakes-Harlan 1999, Unverzagt 2015). Dies lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei um einen ubiquitären Zeitpunkt für den Beginn des Fas2-Vorkommens in Fas2-positiven Chordotonalorganen in *S. gregaria* handelt. Interessanterweise liegt der Zeitpunkt des ersten Nachweises von Fas2 mit 80% Embryonalentwicklung kurz nach dem Beginn der motorischen Aktivität der Beine (70%, Schäffer 1999), also nahe dem ersten Zeitpunkt bei welchem eine Aktivität und propriozeptive Wahrnehmung von Nutzen wäre. Dies legt eine Verbindung von Fas2 und der Funktion der Chordotonalorgane in *Schistocerca* nahe.

Um der Frage nachzugehen, ob Fas2 auch in den Chordotonalorganen anderer Insekten vorkommt, wurde anhand von GFP-getaggen *Drosophila melanogaster* Stämmen die isoformspezifische Verteilung von Fas2 im Johnston'schen Organ überprüft. Im Fokus dieser Arbeit lagen dabei die Isoformen RA, RB und RC, welche in *Drosophila* am verbreitetsten sind (Halberg et al. 2016). Die Markierungsmuster der Linie Fas2^{GFP778}, welche alle drei Isoformen markieren sollte, entspricht dem der auf die Isoformen RA und RB beschränkten Linie Fas2^{GFP396} (Abb. 3-5 Isoformen B/C). Somit ist unklar ob die Isoform RC überhaupt mit dem Johnston'schen Organ assoziiert ist. Beide Isoformen könnten sich entsprechende Verteilungsmuster aufweisen. Vorläufige Ergebnisse, welche auf RT-PCR („Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion“) unter Einsatz isoformspezifischer Primer beruhen, konnten jedoch keine mRNA der Isoform RC aufzeigen, wohingegen mRNA der Isoformen RA und RB positiv markiert wurde. Somit scheint die Isoform RC keine wesentliche Rolle im Johnston'schen Organ von *D. melanogaster* zu spielen. Die Isoform RB zeigt eine vergleichbare Lokalisation, wie die Fas2 Markierung in den Chordotonalorganen von *S. gregaria*. In beiden Fällen wurden die Scolopalzellen um die sensorischen Neurone deutlich markiert. Auch hier scheint sich also ein konsistentes Muster der Fas2-Lokalisation in Chordotonalorganen abzuzeichnen. Am überraschendsten ist jedoch die Markierung der Isoform RA. Im Vergleich zu den anderen Isoformen ist die Markierung von RA nur sehr schwach. Dies macht eine höhere Belichtungszeit bei der Dokumentation notwendig, in deren Folge die hervorgehobenen Artefakte eine klare Lokalisation von Fas2-RA erschweren. Deutlich erkennbar ist jedoch eine Markierung im Bereich des Dendriten der sensorischen Neurone, in welchem die eigentliche Umsetzung des mechanischen in ein neuronales Signal erfolgt. In *Schistocerca* konnte

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

keine Markierung im Bereich des Dendriten mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 8C6 festgestellt werden.

Allgemein wird angenommen, dass der Antikörper 8C6 jegliche Formen von Fas2 markiert, allerdings ist über eventuelle Isoformen in *Schistocerca* nichts bekannt (Snow et al. 1988). Somit sind zwei Möglichkeiten gegeben: 1. In Orthopteren könnte es keine alternativen Spleißformen von Fas2 geben bzw. alle werden durch den Antikörper 8C6 markiert. Dies würde bedeuten, dass die Lokalisation der Isoform Fas2-RA sich auf *Drosophila* oder womöglich auf Dipteren beschränkt. Oder 2. Auch *Schistocerca* weist verschiedene Spleiß-Varianten von Fas2 auf und der Antikörper 8C6 ist auf eine oder einige beschränkt. Derzeitig sind keine umfassenden DNA-Sequenzen oder andere Isoformen von Fas2 bei *Schistocerca* bekannt. *Drosophila*-Fas2 wird, wie bereits erwähnt, in mehreren Isoformen exprimiert. Diese Isoformen teilen sich auf in eine transmembrane (TM) Form (RA) und andere, wie RB und RC, welche mittels eines GPI-Ankers an der äußeren Zellmembran anheften (Snow et al. 1988, Grenningloh et al. 1991, Lin und Goodman 1994, Beck et al. 2012; siehe auch: 3.4.3 Die Funktion von Nidogen und Fasciclin2 in Chordotonalorganen). Vergleichbare Isoformen wurden auch für das nahe verwandte Vertebraten-Protein NCAM gefunden. Auch hier teilen sich die Isoformen in eine TM- und in GPI-verankerte Formen auf (Cunningham et al. 1987, Pollerberg et al. 1985, Pollerberg et al. 1986, Persohn et al. 1989, Winter et al. 2008). Das selbe Muster von TM- und GPI-verankerten Isoformen (TM-MFas2 und GPI-MFas2) zeigt sich auch bei Blick auf Fas2 in *Manduca sexta*, dem Tabakschwärmer (Wright et al. 1999, Wright und Copenhaver 2000, Wright und Copenhaver 2001, Kuehn und Duch 2008). Es scheint demnach unwahrscheinlich das *Schistocerca* nur eine einzige Spleißvariante aufweist. Schaut man sich jedoch die Aminosäuresequenz von Fas2 in *Schistocerca* an, bei deren Erstellung der Antikörper 8C6 Verwendung fand (Snow et al. 1988), weist diese eine TM-Region ähnlich der von *Drosophila* (RA) und *Manduca* (TM-MFas2) auf (Wright et al. 1999). Da die Verteilung der Isoform RA von *Drosophila* sich deutlich von der Markierung von Fas2 in *Schistocerca* in Chordotonalorganen unterscheidet, könnte dies bedeuten, dass es sich hierbei tatsächlich um eine veränderte Proteinverteilung handelt. Nichts desto trotz ist die Frage nach alternativen Spleißvarianten von Fas2 in *Schistocerca* an dieser Stelle nicht abschließend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Auch wäre eine mögliche Lokalisation der genannten Fas2-Isoformen in Chordotonalorganen von *Manduca sexta* (TM-MFas2 und GPI-MFas2) von Interesse. Es wurden bereits spezifische Antikörper sowohl für TM-MFas2, als auch für GPI-MFas2 in anderen Studien vorgestellt (Wright und Copenhaver 2000, Kuehn und Duch 2008), welche hier Verwendung finden könnten. Eine

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

mögliche isoformspezifische Lokalisation wie sie hier im Johnston'schen Organ von *Drosophila* nachgewiesen werden konnte, würde Rückschlüsse auf die Verbreitung dieser Lokalisations- und eventuelle Funktionsunterschiede der Fas2-Isoformen in Bezug auf Chordotonalorgane erlauben.

Sowohl die Verhaltens-, als auch die elektrophysiologischen Untersuchungen einer *Drosophila*-Linie mit vermindertem Fas2-Level zeigen ein eindeutiges Ergebnis. Unabhängig des verwendeten Stimulationsreizes (ob akustische Stimulation oder Stimulation mittels eines Luftstoßes) sind die neuronalen Antworten bei Ableitung des Antennalnervs im Vergleich zur Kontroll-Linie (w^{1118}) signifikant verringert, ohne dass es zu einer deutlichen Veränderung des Kurvenverlaufes selbst kommt (Abb. 3-6 und 3-7). Bei den Ergebnissen des Tube-climbing-Test wird deutlich, dass auch die Gravitationswahrnehmung beeinträchtigt wird. Die motorischen Möglichkeiten der negativen Gravitaxis zu folgen sind trotz Reduktion von Fas2 gegeben, da die Fas2 reduzierten Fliegen das gleiche Maß an Phototaxis wie die Kontroll-Linie (w^{1118}) bei Lichtbedingungen an den Tag legen. Trotzdem folgen weniger Fliegen der Fas2 reduzierten Linie ($w;fas2^{e76}$) der negativen Gravitaxis, wenn das Licht als Orientierungspunkt wegfällt (Abb. 3-8). Dies weist auf eine Funktionsbeeinträchtigung der durch das Johnston'sche Organ vermittelten Gravitationswahrnehmung bei *Drosophila* mit reduziertem Fas2-Level hin.

Sowohl die Wahrnehmung von akustischen Signalen, die Wahrnehmung von Luft/Wind-Reizen, als auch die Wahrnehmung der Gravitation wird von unterschiedlichen Neuronengruppen im Johnston'schen Organ wahrgenommen (Eberl et al. 2000, Sun et al. 2009, Yorozu et al. 2009, Kamikouchi et al. 2009; Review: Albert und Göpfert 2015). Die Ergebnisse zeigen damit, dass alle Scolopidien des Johnston'schen Organs gleichermaßen von einer Fas2-Reduktion betroffen sind. Dies entspricht auch den Ergebnissen des immunhistochemischen Nachweises von Fas2 im Johnston'schen Organ. Auch hier wurden keine Scolopidiengruppen im einzelnen markiert, sondern alle Scolopidien des Johnson'schen Organs gleichermaßen (Abb. 3-5). Auch zeigen die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung und des Verhaltensassays, dass es zu keinem kompletten Verlust der Sensitivität des JSOs auf die verschiedenen Stimuli kommt, sondern die physiologischen Reaktionen in reduziertem Maße vorhanden sind. Vorangehende Studien, welche die Auswirkungen einer Reduktion von Fas2 auf die Fortbewegung und Vibrationswahrnehmung von *Drosophila*-Larven untersuchten, zeigten auch hier eine Reduktion der Vibrationssensitivität und eine veränderte Propriozeption (Alt 2013). Somit sind die Auswirkungen einer Reduktion von Fas2 zwischen verschiedenen Chordotonalorgane kohärent.

3.4.2 Nidogen

In der Studie von Wolfstetter et al. 2019 wurde nachgewiesen, dass das extrazelluläre Matrixprotein Nidogen (NDG) in älteren *Drosophila*-Embryonen (neben anderen Bereichen) auch stark im Bereich der lateralen Chordotonalorgane exprimiert wird. NDG mRNA findet sich hauptsächlich in den chordotonalen Kappenzellen, während das Protein Skolopalzelle und Neuron umlagert (Wolfstetter et al. 2019). Für diese Studie sollte die Funktion von NDG bei Vibrationswahrnehmung und Propriozeption während der larvalen Fortbewegung untersucht werden.

Nach einer Unterbrechung des normalen Fortbewegungsmuster mittels Vibrationsstimulation, zeigen wildtypische *Drosophila* eine komplexe Sequenz an Verhaltensmustern. Die Larven unterbrechen ihre Fortbewegung und ziehen ihren Kopf zurück („hunch“). Danach folgt eine Phase in der laterale Kopfbewegungen vermehrt auftreten („kink“) (Bharadwaj et al. 2013, Ohya et al. 2013, Wu et al. 2011). Diese Verhaltenssequenz wird durch die sensorische Wahrnehmung der mechanischen Stimuli initiiert und von den segmental angeordneten lateralen Chordotonalorganen der Larven vermittelt. Im Anschluss werden die Stimuli im ventralen Nervensystem verarbeitet und führen über die neuromuskuläre Verschaltung zur entsprechenden motorischen Reaktion. Hier konnte gezeigt werden, dass *Drosophila*-Larven mit einem reduzierten NDG-Level (Ndg^{Δ0.4}, Ndg^{Δ1.4}) eine verminderte Reaktion auf solche Vibrationsreize aufweisen (Abb. 3-9). Neben der Wahrnehmung von äußeren mechanischen Reizen sind die lateralen Chordotonalorgane auch für die benötigte propriozeptive Wahrnehmung während der Fortbewegung verantwortlich (Caldwell et al. 2003, Cheng et al. 2010, Prahlad et al. 2017). *Drosophila*-Larven mit vermindertem NDG-Level zeigen in diesem Zusammenhang eine reduzierte Frequenz des Bewegungsmusters und Fortbewegungsgeschwindigkeit (Abb. 3-9). Unklar ist wo der genaue Ursprung dieser veränderten Verhaltensweisen bei *Drosophila*-Larven mit vermindertem NDG-Level liegt. Beispielweise zeigen vorangehende Studien eine geschwächte strukturelle Entwicklung der neuromuskulären Verbindung und Defekte in der synaptischen Struktur in *Platynereis dumerilii* mit vermindertem NDG-Level (Ackley et al. 2003). Ähnliche Effekte könnten auch bei *Drosophila*-Larven zum tragen kommen. Allerdings zeigen sich bei einem vollständigen Knockout von NDG strukturelle Defekte in den Chordotonalorganen, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit Auswirkung auf die Funktionalität dieser Organe haben (Wolfstetter et al. 2019). Zusammengenommen mit der Lokalisation von NDG in den segmentalen Chordotonalorganen, deuten die Ergebnisse somit eher auf eine Verbindung zur Mechanosensorik hin.

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

Auch im JSO von adulten *Drosophila* konnte hier ein vermehrtes Vorkommen von NDG nachgewiesen werden. Die Markierung von NDG in den larvalen Chordotonalorganen und dem JSO zeigen eine ähnliche Verteilung des Proteins im Bezug auf die Scolopidien an. NDG umlagert die Scolopalzelle und findet sich vermehrt in dem Bereich zwischen Skolopalzelle und Dendrit (Abb. 3-10). Auch hier zeigt sich also ein konsistentes Muster der NDG-Lokalisation zwischen verschiedenen Chordotonalorganen. Eine Reduktion von NDG führt bei elektrophysiologischer Ableitung des Antennalnervs und gleichzeitiger Stimulation mit akustischen Reizen und Windreizen zu einer verminderten neuronalen Antwort, ähnlich wie dies bei Reduktion des Proteins Fas2 der Fall ist (s.o.). Während die *Drosophila*-Linie mit nur moderat vermindertem NDG-Level ($Ndg^{A0.4}$) sich nicht signifikant von der Kontroll-Linie (w^{1118}) unterscheidet, führt ein kompletter Knockout von NDG zu einem deutlich stärkeren Phänotyp ($Ndg^{A1.4}$). Auch hier scheint der eigentliche Verlauf der Antwort unbeeinflusst zu sein, abgesehen von der insgesamt herabgesenkten neuronalen Reaktion. Im Gegensatz zu den Verhaltensversuchen bei *Drosophila*-Larven, ist hier die Wahrscheinlichkeit, dass die verminderte neuronale Reaktion sich nicht auf den Wegfall von NDG im JSO begründet, sehr gering. Die hier verwendeten Reize sind für die Stimulation des JSO adäquat und die elektrophysiologische Ableitung des Antennalnervs erfolgte nahe des JSO am Übergang zwischen dem ersten Antennalsegment und der Kopfkapsel.

3.4.3 Die Funktion von Nidogen und Fasciclin 2 in Chordotonalorganen

Nach dem Nachweis der Lokalisation und der physiologischen Auswirkung der Reduktion beider untersuchten Proteine Fas2 und NDG in Chordotonalorganen, bleibt die Frage nach der eigentlichen Funktion innerhalb des molekularen Apparates, welcher die Grundlage der mechanosensorischen Transduktion in Scolopidien darstellt. In welcher Weise beide Proteine Auswirkung auf die Funktionalität der Scolopidien ausüben, lässt sich durch die hier durchgeführten Untersuchungen nur schwer ableiten. Die Markierung beider Proteine in Chordotonalorganen und die Auswirkungen auf die Sensitivität der Mechanotransduktion nach Reduktion der Proteine legt in jedem Fall eine funktionelle Rolle nahe. Worin diese besteht lässt sich an dieser Stelle nur mutmaßen.

Wie bereits erwähnt gehört Fasciclin 2 zu der Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle. Diese Gruppe von Molekülen ist im Wesentlichen dafür zuständig Zell-Zell-Kontakte oder Zell-EZM-Kontakte herzustellen. Fasciclin 2 gehört hierbei zu der ersten Gruppe und stellt über homophile Verbindungen Zell-Zell-Kontakte her (Lin et al. 1994, Review: Horstkorte und Fuss 2012). Dies gilt

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

sowohl für die GPI-verankerten Isoformen, als auch für Isoformen, welche eine TM-Domäne aufweisen. Jedoch werden vor allem für die Fas2-Isoformen mit TM-Domänen verschiedene andere Aufgaben postuliert, welche über die reine Aufrechterhaltung einer Zell-Zell-Verbindung hinaus geht. Beispielsweise sind sie an der Kontrolle von proneuraler Gen-Expression (García-Alonso et al., 1995; Whitlock, 1993), der Aufrechterhaltung synaptischer Verbindungen und der aktivitätsabhängigen Plastizität beteiligt (Davis et al. 1997, Schuster et al. 1995, Schuster et al. 1996, Review: Goodman 1996). Auch weist die transmembrane Isoform ein PDZ-Motiv aus, welches Interaktionen mit in der Membran verankerten Guanylat-Kinasen und sogar mit einem spannungsabhängigen Kalium-Kanal („Shaker“) vermittelt (Thomas et al., 1997; Zito et al., 1997). Dies ist insofern interessant, da die hier vorgestellten Ergebnisse eine deutliche isoformspezifische Lokalisation von Fas2 zeigen. Die GPI-verankerte Isoform RB ohne TM-Domäne, wurde vor allem in und an den Scolopalellen nachgewiesen (Abb. 3-5 B). Bei *Schistocerca* zeigte sich auch eine höhere Abundanz von Fas2 am Übergang zwischen Scolopalzelle und Neuron (Abb. 3-3). Eine mögliche Funktion läge also in der Aufrechterhaltung des Zell-Zell-Kontaktes zwischen diesen beiden Zelltypen. Dies könnte einer Stabilisierung des Zellkomplexes und einer exakten Ausrichtung der kritische Juxtaposition in Richtung des ankommenden mechanischen Reizes dienen, welche eine sensitive Umsetzung in neuronale Signale gewährleistet (Jacobs und Lakes-Harlan 1999). Die Fas2-Isoform RA, welche eine Transmembrandomäne aufweist, ist hingegen direkt am Dendriten lokalisiert. Da der Dendrit als Ort der eigentlichen mechano-sensorischen Umwandlung gilt, ist eine direkte Beteiligung der Fas2-Isoform RA an diesem Prozess möglich. Da Verbindungen zwischen der TM-Isoform und Kanalproteinen an anderer Stelle dokumentiert wurden (Thomas et al., 1997; Zito et al., 1997), ist eine ähnliche Verbindung mit einem an der Mechanotransduktion beteiligten Kanalprotein vorstellbar. Ob es sich dabei um eines der primär beteiligten Protein (NompC, Nan/Iav) handelt ist unklar. Jedoch könnte man bei Reduktion von Fas2-RA eine deutlichere Auswirkung auf die physiologischen Eigenschaften von Chordotonalorganen erwarten, sollte eine Verbindung zu diesen Proteinen bestehen. Eine andere mögliche Aufgabe könnte eine Beteiligung an der Regulierung des Ca^{2+} -Stromes an der dendritischen Membran darstellen, da ähnliche Mechanismen für Fas2 in Bezug zu Synapsen diskutiert wurden (Murase und Schuman 1999). Bisher kann über die genaue Funktion von Fas2 in Chordotonalorganen nur gemutmaßt werden. Eine genauere Lokalisation der einzelnen Isoformen ist für einen tieferen Einblick in die Funktionen von Fas2 unerlässlich. In zukünftigen Studien könnten beispielsweise die Transmissionselektronenmikroskopie in Verbindung mit Immunogold-

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

Markierungen, aufgrund der hohen Spezifität einen tieferen Einblick in Lokalisation und Funktionsweise ermöglichen.

Die Funktion von Nidogen in Chordotonalorganen kann in gleicher Weise nur gemutmaßt werden. Die extrazelluläre Matrix umgibt alle ciliären mechanosensorischen Organe und darunter fallen dem entsprechend auch Chordotonalorgane. Dies wird auch anhand der immunhistochemischen Markierung von NDG deutlich, welche eine Lokalisation von NDG um das sensorische Neuron und die Scolopalzelle, sowie eine Markierung um die Kappenzelle zeigt (Abb. 3-10). In der Studie von Wolfstetter et al. 2019 konnte aufgezeigt werden, dass ein kompletter Verlust von NDG zu einer Desorganisation der Scolopidien in den segmentalen Chordotonalorganen führt. Demnach ist das veränderte Verhalten bezüglich Fortbewegung und Vibrationswahrnehmung von *Drosophila*-Larven wenig verwunderlich. Eine ähnliche Ursache könnte dem entsprechend auch für die verminderte neuronale Antwort des JSO auf Stimulation verantwortlich sein, obwohl hier in Vorversuchen keine derart eindeutige strukturelle Beeinträchtigung der Scolopidienanordnung erkennbar war. Eine intensivere Analyse der Anordnung der Scolopidien im JSO ist derzeit noch ausstehend und bietet Raum für zukünftige Untersuchungen. Deutlich wird, dass NDG nicht auf mechanosensorische Organe beschränkt ist. Bei Markierung von NDG in der Antenne kann sowohl ein Vorkommen von NDG um den in das dritte Antennensegment führenden Nerv zu erkennen, als auch um die chemosensorischen olfaktorischen Rezeptorneurone (ORNs). Diese gehören genau wie die Neurone der Scolopidien zu den Cilien aufweisenden Typ 1 sensorischen Neuronen (Shanbhag et al. 2000, Jana et al. 2011, Martin et al. 2013). Insgesamt werden bezüglich NDG einige Parallelen zu anderen Proteinen der EZM deutlich. So ist das EZM Protein Artichoke für die normale Morphogenese und Funktion von ciliären Sensillen (darunter auch Chordotonalorgane) unerlässlich. Ein Wegfall dieses Proteins führt ähnlich wie bei NDG zu einer Disorganisation der einzelnen Scolopidien in lateralen Chordotonalorganen von *Drosophila*-Larven und zu einem veränderten Fortbewegungsverhalten (Andrés et al. 2014). Somit scheint es sich bei NDG nur um eines von verschiedenen Proteinen zu handeln, welches für eine stabile Generierung der EZM in und um Chordotonalorgane verantwortlich ist und die EZM für einen organisierten Aufbau der Chordotonalorgane unerlässlich ist.

3.4.4 Résumé

In dieser Studie konnte sowohl die Lokalisation, als auch die funktionelle Rolle des Zelladhäsionsmoleküls Fasciclin 2 und der Proteins der extrazellulären Matrix Nidogen in Chordotonalorganen nachgewiesen werden. Eine Verminderung der Proteinabundanz durch Mutation des entsprechenden Allels führt zu einer reduzierten neuronalen Antwort im JSO von *Drosophila*, bei Stimulation mit akustischen oder Wind-Reizen. Auch andere Verhaltensmuster, welche auf Wahrnehmung mechanischer Reize beruhen, sind durch Reduktion der Proteine beeinträchtigt. Darunter fallen die Fortbewegungsmuster und die Wahrnehmung von Vibrationsreizen bei *Drosophila*-Larven, sowie die negative Gravitaxis adulter *Drosophila*.

Für NDG und Fas2 können verschiedene Funktionen postuliert werden:

1. NDG ist ein essentieller Bestandteil der EZM, welche Chordotonalorgane umlagert und für die organisierte Struktur der Organe unerlässlich ist.
2. Die GPI-verankerte Fas2 Isoform RB könnte für den Zell-Zell-Kontakt zwischen Scolopalzellen und den sensorischen Neuronen verantwortlich sein und den Dendriten in Stimulationsrichtung stabilisieren.
3. Die Fas2 Isoform RA, welche eine Transmembrandomäne aufweist, ist am Dendriten selbst lokalisiert und könnte direkt an der mechanosensorischen Umsetzung im Dendriten beteiligt sein.

Zur Untersuchung dieser Thesen sind weiterführende Studien notwendig. Der erste Schritt, vor allem im Bezug zur isoformspezifischen Funktion von Fas2, wäre hier die genaue Lokalisation der Isoformen weiterführend zu analysieren.

4. Literatur

- Ackley, B. D., Kang, S. H., Crew, J. R., Suh, C., Jin, Y., & Kramer, J. M. (2003).** The basement membrane components nidogen and type XVIII collagen regulate organization of neuromuscular junctions in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience*, 23(9), 3577–3587
- Albert, J. T., & Göpfert, M. C. (2015).** Hearing in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, 34, 79–85.
- Alexander, R. D., & Moore, T. E. (1958).** Studies on the acoustical behavior of seventeen-year cicadas. *The Ohio Journal of Science*, 58(2), 107–127.
- Alexander, R. D., & Moore, T. E. (1962).** The evolutionary relationships of 17-year and 13-year cicadas, and three new species. *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan*, 121, 1–59.
- Alt, J. A. (2013).** Fasciclin2 als ein funktioneller Bestandteil der mechanosensorischen Transduktion in Chordotonalorganen von *Drosophila melanogaster*. Thesis zur Erlangung des akademischen Grades „Master of Science“. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Alt, J. A., & Lakes-Harlan, R. (2018).** Sensing of substrate vibrations in the adult cicada *Okanagana rimosa* (Hemiptera: Cicadidae). *Journal of Insect Science (Online)*, 18(3).
- Andrés, M., Turiégano, E., Göpfert, M. C., Canal, I., & Torroja, L. (2014).** The extracellular matrix protein artichoke is required for integrity of ciliated mechanosensory and chemosensory organs in *Drosophila* embryos. *Genetics*, 196(4), 1091–1102.
- Ausborn, J., Wolf, H., Mader, W., & Kayser, H. (2005).** The insecticide pymetrozine selectively affects chordotonal mechanoreceptors. *Journal of Experimental Biology*, 208(23), 4451–4466.
- Autrum, H., & Schneider, W. (1948).** Vergleichende Untersuchungen über den Erschütterungssinn der Insekten. *Zeitschrift Für Vergleichende Physiologie*, 31(1), 77–88.
- Awasaki, T., & Kimura, K. I. (1997).** Pox-neuro is required for development of chemosensory bristles in *Drosophila*. *Journal of Neurobiology*, 32(7), 707–721.

4. Literatur

- Bai, D., Lummis, S. C. R., Leicht, W., Breer, H., & Sattelle, D. B. (1991).** Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone. *Pesticide Science*, 33(2), 197–204.
- Baines, R. A., Seugnet, L., Thompson, A., Salvaterra, P. M., & Bate, M. (2002).** Regulation of synaptic connectivity: levels of Fasciclin II influence synaptic growth in the *Drosophila* CNS. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6587–6595.
- Barber, T., Esteban-Pretel, G., Marín, M. P., & Timoneda, J. (2014).** Vitamin A deficiency and alterations in the extracellular matrix. *Nutrients*, 6(11), 4984–5017.
- Bässler, U. (1977).** Sense organs in the femur of the stick insect and their relevance to the control of position of the femur-tibia-joint. *Journal of Comparative Physiology A*, 121(1), 99–113.
- Bässler, U. (1965).** Propriozeptoren am Subcoxal- und Femur-Tibia-Gelenk der Stabheuschrecke *Carausius morosus* und ihre Rolle bei der Wahrnehmung der Schwerkraftrichtung. *Kybernetik*, 2, 168–193.
- Bässler, U. (1993).** The femur-tibia control system of stick insects - a model system for the study of the neural basis of joint control. *Brain Research Reviews*, 18(2), 207–226.
- Bastiani, M. J., Harrelson, A. L., Snow, P. M., & Goodman, C. S. (1987).** Expression of fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper. *Cell*, 48(5), 745–755.
- Beck, E. S., Gasque, G., Imlach, W. L., Jiao, W., Jiwon Choi, B., Wu, P.-S., ... McCabe, B. D. (2012).** Regulation of Fasciclin II and synaptic terminal development by the splicing factor beag. *The Journal of Neuroscience*, 32(20), 7058–7073.
- Bentley, D., Keshishian, H., Shankland, M., & Toroian-Raymond, A. (1979).** Quantitative staging of embryonic development of the grasshopper, *Schistocerca nitens*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 54(1), 47–74.

- Bharadwaj, R., Roy, M., Ohyama, T., Sivan-Loukianova, E., Delannoy, M., Lloyd, T. E., ... Kolodkin, A. L. (2013).** Cbl-associated protein regulates assembly and function of two tension-sensing structures in *Drosophila*. *Development*, 140(3), 627–638.
- Boerjan, B., Tobback, J., De Loof, A., Schoofs, L., & Huybrechts, R. (2011).** Fruitless RNAi knockdown in males interferes with copulation success in *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(5), 340–347.
- Boekhoff-Falk, G., & Eberl, D. F. (2014).** The *Drosophila* auditory system. *Developmental Biology*, 3(2), 179–191
- Boulard, M. (2006).** Acoustic signals, diversity and behaviour of cicadas (Cicadidae, Hemiptera). In S. Drosopoulus & M. F. Claridge (Eds.), *Insect Sounds and Communication* (pp. 331–349). Boca Raton: CRC Press.
- Buhl, E., Schildberger, K., & Stevenson, P. A. (2008).** A muscarinic cholinergic mechanism underlies activation of the central pattern generator for locust flight. *Journal of Experimental Biology*, 211(14), 2346–2357.
- Burns, M. D. (1974).** Structure and physiology of the locust femoral chordotonal organ. *Journal of Insect Physiology*, 20(7), 1319–1339.
- Burrows, M. (1987).** Parallel processing of proprioceptive signals by spiking local interneurons and motor neurons in the locust. *The Journal of Neuroscience*, 7(4), 1064–1080.
- Burrows, M. (1988).** Responses of spiking local interneurons in the locust to proprioceptive signals from the femoral chordotonal organ. *Journal of Comparative Physiology A*, 164(2), 207–217.
- Büschges, A. (1994).** The physiology of sensory cells in the ventral scoloparium of the stick insect femoral chordotonal organ. *The Journal of Experimental Biology*, 189, 285–292.
- Büschges, A. (1989).** Processing of sensory Input from the femoral chordotonal organ by spiking interneurons of stick insects. *Journal of Experimental Biology*, 144(1), 81–111.

- Buszczak, M., Paterno, S., Lighthouse, D., Bachman, J., Planck, J., Owen, S., ... Spradling, A. C. (2007).** The carnegie protein trap library: a versatile tool for *Drosophila* developmental studies. *Genetics*, 175(3), 1505–1531.
- Caldwell, J. C., Wing, S., Miller, M. M., Soll, D. R., & Eberl, D. F. (2003).** Dynamic analysis of larval locomotion in *Drosophila* chordotonal organ mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 16053–16058.
- Chen, J. V., Kao, L. R., Jana, S. C., Sivan-Loukianova, E., Mendonça, S., Cabrera, O. A., ... Megraw, T. L. (2015).** Rootletin organizes the ciliary rootlet to achieve neuron sensory function in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*, 211(2), 435–453.
- Cheng, L. E., Song, W., Looger, L. L., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2010).** The role of the TRP channel NompC in *Drosophila* larval and adult locomotion. *Neuron*, 67(3), 373–380.
- Cheng, Y., Endo, K., Wu, K., Rodan, A. R., Heberlein, U., & Davis, R. L. (2001).** *Drosophila* fasciclinII is required for the formation of odor memories and for normal sensitivity to alcohol. *Cell*, 105(6), 757–768.
- Chuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D., & Goodman, C. S. (1996).** Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity. *Neuron*, 17(4), 655–667.
- Claridge, M. F., Morgan, J. C., & Moulds, M. S. (1999).** Substrate-transmitted acoustic signals of the primitive cicada, *Tettigarcta crinita* Distant (Hemiptera Cicadoidea, Tettigarctidae). *Journal of Natural History*, 33(12), 1831–1834.
- Clements, A. N., & May, T. E. (1974).** Studies on locust neuromuscular physiology in relation to glutamic acid. *The Journal of Experimental Biology*, 60(3), 673–705.
- Cocroft, R. B. (1996).** Insect vibrational defence signals. *Nature*, 382(6593), 679–680.
- Cocroft, R. B., Tieu, T. D., Hoy, R. R., & Miles, R. N. (2000).** Directionality in the mechanical response to substrate vibration in a treehopper (Hemiptera: Membracidae: *Umbonia crassicornis*). *Journal of Comparative Physiology A*, 186(7–8), 695–705.

4. Literatur

- Čokl, A. (1983).** Functional properties of vibroreceptors in the legs of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera, Pentatomidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 150(2), 261–269.
- Čokl, A., & Virant-Doberlet, M. (2003).** Communication with substrate-borne signals in small plant-dwelling insects. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 29–50.
- Čokl, A., Zorović, M., Kosi, A. Ž., Stritih, N., & Virant-Doberlet, M. (2014).** Communication through plants in a narrow frequency window. In R. B. Cocroft, M. Gogala, P. S. M. Hill, & A. Wessel (Eds.), *Studying Vibrational Communication* (pp. 171–195). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Cooley, J. R., & Marshall, D. C. (2001).** Sexual signaling in periodical cicadas, *Magicicada spp.* (Hemiptera: Cicadidae). *Behaviour*, 138, 827–855.
- Cunningham, B., Hemperly, J., Murray, B., Prediger, E., Brackenbury, R., & Edelman, G. (1987).** Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*, 236(4803), 799–806.
- Dambach, M. (1972).** Der Vibrationssinn der Grillen. *Journal of Comparative Physiology*, 79, 281–304.
- Davis, G. W., Schuster, C. M., & Goodman, C. S. (1997).** Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: Target-derived Fasciclin II regulates the pattern of synapse formation. *Neuron*, 19(3), 561–573.
- Daws, A. G., & Hennig, R. M. (1996).** Tuning of the peripheral auditory system of the cicada, *Cyclochila australasiae*. *Zoology-Analysis of Complex Systems*, 99(3), 175–188.
- Debaisieux, P. (1938).** Organes scolopidiaux des pattes d’insectes. *La Cellule*, 47, 77–202.
- Demerec, M. (1994).** *Biology of Drosophila*. Facsimile Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (Original: 1950, New York: Wiley & Sons).
- Devetak, D., & Amon, T. (1997).** Substrate vibration sensitivity of the leg scolopidial organs in the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. *Journal of Insect Physiology*, 43(5), 433–437.

4. Literatur

- Dieudonné, A., Daniel, T. L., & Sane, S. P. (2014).** Encoding properties of the mechanosensory neurons in the Johnston's organ of the hawk moth, *Manduca sexta*. *Journal of Experimental Biology*, 217(17), 3045–3056.
- Dong, L., Chen, Y., Lewis, M., Hsieh, J.-C., Reing, J., Chaillet, J. R., ... Chung, A. E. (2002).** Neurologic defects and selective disruption of basement membranes in mice lacking Entactin-1/Nidogen-1. *Laboratory Investigation*, 82, 1617-1630.
- Dong, Y., & Friedrich, M. (2005).** Nymphal RNAi: Systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnology*, 5, 1–7.
- Dow, J. A. T., Maddrell, S. H. P., Görtz, A., Skaer, N. J. V, Brogan, S., & Kaiser, K. (1994).** The malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*: a novel phenotype for studies of fluid secretion and its control. *Journal of Experimental Biology*, 197, 421–428.
- Drosopoulos, S., & Claridge, M. F. (2006).** *Insect Sound and Communication*. Boca Raton: CRC Press.
- Dunning, D. C., Byers, J. A., & Zanger, C. D. (1979).** Courtship in two species of periodical cicadas, *Magicicada septendecim* and *Magicicada cassini*. *Animal Behaviour*, 27, 1073–1090.
- Eatock, R. A. (2009).** Neuroscience: Up, down, flying around. *Nature*, 458(7235), 156–157.
- Eberhard, M. J. B., Lang, D., Metscher, B., Pass, G., Picker, M. D., & Wolf, H. (2010).** Structure and sensory physiology of the leg scolopidial organs in Mantophasmatodea and their role in vibrational communication. *Arthropod Structure and Development*, 39(4), 230–241.
- Eberl, D. F. (1999).** Feeling the vibes: chordotonal mechanisms in insect hearing. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(4), 389–393.
- Eberl, D. F., Hardy, R. W., & Kernan, M. J. (2000).** Genetically similar transduction mechanisms for touch and hearing in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 20(16), 5981–5988.
- Eberl, D. F., & Boekhoff-Falk, G. (2007).** Development of Johnston's organ in *Drosophila*. *International Journal of Developmental Biology*, 51(6–7), 679–687.

4. Literatur

- Effertz, T., Wiek, R., & Göpfert, M. C. (2011).** NompC TRP channel is essential for *Drosophila* sound receptor function. *Current Biology*, 21(7), 592–597.
- Eschbach, C., Cano, C., Haberkern, H., Schraut, K., Guan, C., Triphan, T., & Gerber, B. (2011).** Associative learning between odorants and mechanosensory punishment in larval *Drosophila*. *The Journal of Experimental Biology*, 214(23), 3897–3905.
- Eve Marder, & Dirk Bucher. (2001).** Central pattern generators and the control of rhythmic movements. *Current Biology*, 11(23), 986–996.
- Field, L. H., & Pflüger, H. J. (1989).** The femoral chordotonal organ: A bifunctional orthopteran (*Locusta migratoria*) sense organ? *Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology*, 93(4), 729–743.
- Field, L. H., & Matheson, T. (1998).** Chordotonal organs of insects. *Advances in Insect Physiology*, 27, 1–228.
- Fonseca, P. J. (2014).** Cicada acoustic communication. In B. Hedwig (Ed.), *Insect hearing and acoustic communication* (pp. 101–122). Heidelberg, New York: Springer.
- Fonseca, P. J. (1993).** Directional hearing of a cicada: biophysical aspects. *Journal of Comparative Physiology A*, 172(6), 767–774.
- Fonseca, P. J., Munch, D., & Hennig, R. M. (2000).** How cicadas interpret acoustic signals. *Nature*, 405(6784), 297–298.
- French, A. S. (1992).** Mechanotransduction. *Annual Review of Physiology*, 54(1), 135–152.
- Füller, H., & Ernst, A. (1973).** Die Ultrastruktur der femoralen Chordotonalorgane von *Carausius morosus*. *Br Zoologische Jahrbücher Anatomie*, 91, 574–601.
- García-Alonso, L., VanBerkum, M. F., Grenningloh, G., Schuster, C., & Goodman, C. S. (1995).** Fasciclin II controls proneural gene expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), 10501–10505.

4. Literatur

- Gargano, J. W., Martin, I., Bhandari, P., & Grotewiel, M. S. (2005).** Rapid iterative negative geotaxis (RING): A new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 40(5), 386–395.
- Gerdes, J. M., Davis, E. E., & Katsanis, N. (2009).** The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell*, 137(1), 32–45.
- Gillespie, P. G., & Walker, R. G. (2001).** Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature*, 413(6852), 194–202.
- Gnatzy, W., Grünert, U., & Bender, M. (1987).** Campaniform sensilla of *Calliphora vicina* (Insecta, Diptera). *Zoomorphology*, 106, 312–319.
- Gong, Z., Son, W., Chung, Y. D., Kim, J., Shin, D. W., McClung, C. A., ... Kim, C. (2004).** Two interdependent TRPV channel subunits, inactive and Nanchung, mediate hearing in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 24(41), 9059–9066.
- Goodman, C. S. (1996).** Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annual Review of Neuroscience*, 19(1), 341–377.
- Göpfert, M. C., Albert, J. T., Nadrowski, B., & Kamikouchi, A. (2006).** Specification of auditory sensitivity by *Drosophila* TRP channels. *Nature Neuroscience*, 9(8), 999–1000.
- Göpfert, M. C., & Robert, D. (2002).** The mechanical basis of *Drosophila* audition. *The Journal of Experimental Biology*, 205(Pt 9), 1199–1208.
- Gorczyca, M. G., Budnik, V., White, K., & Wu, C. F. (1991).** Dual muscarinic and nicotinic action on a motor program in *Drosophila*. *Journal of Neurobiology*, 22(4), 391–404.
- Graber, V. (1882).** Die chordotonalen Sinnesorgane und das Gehör der Insekten. *Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik*, 20, 506–640.
- Gray, E. G. (1960).** The fine structure of the insect ear. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 243, 75–94.

4. Literatur

- Grenningloh, G., Rehm, E. J., & Goodman, C. S. (1991).** Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. *Cell*, 67(1), 45–57.
- Grünert, U., & Gnatzy, W. (1987).** K⁺ and Ca⁺⁺ in the receptor lymph of arthropod cuticular mechanoreceptors. *Journal of Comparative Physiology A*, 161(2), 329–333.
- Halberg, K. A., Rainey, S. M., Veland, I. R., Neuert, H., Dornan, A. J., Klämbt, C., ... Dow, J. A. T. (2016).** The cell adhesion molecule Fasciclin2 regulates brush border length and organization in *Drosophila* renal tubules. *Nature Communications*, 7, 11266.
- Harrelson, A. L., & Goodman, C. S. (1988).** Growth cone guidance in insects: fasciclin II is a member of the immunoglobulin superfamily. *Science*, 242(4879), 700–708.
- Hebbar, S., & Fernandes, J. J. (2005).** A role for Fas II in the stabilization of motor neuron branches during pruning in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 285(1), 185–199.
- Heinen, S. (2018).** Elektrophysiologische und pharmakologische Untersuchung der Reaktion auf einen Vibrationsstimulus im Bein von *Drosophila melanogaster*. Thesis zur Erlangung des akademischen Grades „Bachelor of Science“, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Hennig, R. M., Weber, T., Huber, F., Kleindienst, H. U., Moore, T. E., & Popov, A. V. (1994).** Auditory threshold change in singing cicadas. *The Journal of Experimental Biology*, 187(1), 45–55.
- Hill, P. S. M., & Shadley, J. R. (1997).** Substrate vibration as a component of a calling song. *Naturwissenschaften*, 84(10), 460–463.
- Hill, P. S. M. (2008).** *Vibrational Communication in Animals*. Cambridge, London: Harvard University Press.
- Hobert, O., & Bülow, H. (2003).** Development and maintenance of neuronal architecture at the ventral midline of *C. elegans*. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(1), 70–78.
- Hofmann, T., Koch, U. T., & Bässler, U. (1985).** Physiology of the femoral chordotonal organ in the stick insect, *Cuniculina Impigra*. *Journal of Experimental Biology*, 114(1), 207–223.

4. Literatur

- Horstkorte, R., & Fuss, B. (2012).** Cell adhesion molecules. *Basic Neurochemistry*, 165–179.
- Huber, F., Wohlers, D. W., & Moore, T. E. (1980).** Auditory nerve and interneurone responses to natural sounds in several species of cicadas. *Physiological Entomology*, 5(1), 25–45.
- Hustert, R. (1974).** Morphologie und Atmungsbewegungen des 5. Abdominalsegments von *Locusta migratoria migratorioides*. *Zoologische Jahrbücher - Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere*, 78, 157–174.
- Hustert, R. (1975).** Neuromuscular coordination and proprioceptive control of rhythmical abdominal ventilation in intact *Locusta migratoria migratorioides*. *Journal of Comparative Physiology A*, 97(2), 159–179.
- Jacobs, K. (1997).** Axonale Degeneration und Regeneration tympanaler Sinneszellen von *Schistocerca gregaria*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Georg-August-Universität Göttingen.
- Jacobs, K., & Lakes-Harlan, R. (1999).** Fasciclin II immunoreactivity in sensory organs: A new role for FasII? In Proceedings of the 1st Göttinger conference of the german neuroscience society, Vol.2, 27th Göttinger neurobiology conference. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Jacobs, K., Otte, B., & Lakes-Harlan, R. (1999).** Tympanal receptor cells of *Schistocerca gregaria*: Correlation of soma positions and dendrite attachment sites, central projections and physiologies. *Journal of Experimental Zoology*, 283(3), 270–285.
- Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1982).** Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(8), 2700–2704.
- Jana, S. C., Girotra, M., & Ray, K. (2011).** Heterotrimeric kinesin-II is necessary and sufficient to promote different stepwise assembly of morphologically distinct bipartite cilia in *Drosophila* antenna. *Molecular Biology of the Cell*, 22(6), 769–781.
- Kalmring, K., Hoffmann, E., Jatho, M., Sickmann, T., & Grossbach, M. (1996).** The auditory-vibratory sensory system of the bushcricket *Polysarcus denticauda* (Phaneropterinae, Tettigoniidae) II. Physiology of receptor cells. *The Journal of Experimental Zoology*, 276(5), 315–329.

4. Literatur

- Kalmring, K., Rössler, W., & Unrast, C. (1994).** Complex tibial organs in the forelegs, midlegs, and hindlegs of the bushcricket *Gampsocleis gratiosa* (tettigoniidae): Comparison of the physiology of the organs. *Journal of Experimental Zoology*, 270(2), 155–161.
- Kamikouchi, A., Inagaki, H. K., Effertz, T., Hendrich, O., Fiala, A., Göpfert, M. C., & Ito, K. (2009).** The neural basis of *Drosophila* gravity-sensing and hearing. *Nature*, 458(7235), 165–171.
- Kamikouchi, A., Shimada, T., & Ito, K. (2006).** Comprehensive classification of the auditory sensory projections in the brain of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology*, 499(3), 317–356.
- Kamikouchi, A., Wiek, R., Effertz, T., Göpfert, M. C., & Fiala, A. (2010).** Transcuticular optical imaging of stimulus-evoked neural activities in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Nature Protocols*, 5(7), 1229–1235.
- Kang, S. H., & Kramer, J. M. (2000).** Nidogen is nonessential and not required for normal type IV collagen localization in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*, 11(11), 3911–3923.
- Kavlie, R. G., & Albert, J. T. (2013).** Chordotonal organs. *Current Biology*, 23(9), 334–335.
- Kernan, M. J. (2007).** Mechanotransduction and auditory transduction in *Drosophila*. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 454(5), 703-720
- Kim, S., & Wadsworth, W. G. (2000).** Positioning of longitudinal nerves in *C. elegans* by Nidogen. *Science*, 288(5463), 150-154.
- Kittmann, R., & Schmitz, J. (1992).** Functional specialization of the scoloparia of the femoral chordotonal organ in stick insects. *The Journal of Experimental Biology*, 173(1), 91-108.
- Kramer, J. M. (2005).** Basement membranes. In *Worm Book* (pp. 1–15).
- Kristiansen, L. V., & Hortsch, M. (2010).** Fasciclin II: The NCAM ortholog in *Drosophila melanogaster*. In V. Berezin (Ed.), *Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM* (pp. 387–401). New York: Springer.

4. Literatur

- Kuehn, C., & Duch, C. (2008).** Expression of two different isoforms of fasciclin II during postembryonic central nervous system remodeling in *Manduca sexta*. *Cell and Tissue Research*, 334(3), 477–498.
- Kühne, R. (1982).** Neurophysiology of the vibration sense in locusts and bushcrickets: Response characteristics of single receptor units. *Journal of Insect Physiology*, 28(2), 155-157.
- Kurusu, M., Awasaki, T., Masuda-Nakagawa, L. M., Kawauchi, H., Ito, K., & Furukubo-Tokunaga, K. (2002).** Embryonic and larval development of the *Drosophila* mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of fasciclin II. *Development*, 129(2), 409–419.
- Kuster, J. E., & French, A. S. (1983).** Sensory transduction in a locust multipolar joint receptor: The dynamic behaviour under a variety of stimulus conditions. *Journal of Comparative Physiology*, 150(2), 207–215.
- Lakes-Harlan, R., & Holzhauer, F. (2015).** Behaviour and vibration sensitivity of nymphs of the cicada *Okanagana rimosa*. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie*, 20, 329–332.
- Lakes-Harlan, R., & Strauß, J. (2014).** Functional morphology and evolutionary diversity of vibration receptors in insects. In R. B. Cocroft, M. Gogala, P. S. M. Hill, & A. Wessel (Eds.), *Studying Vibrational Communication* (pp. 277–302). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Lakes-Harlan, R., & Strauß, J. (2006).** Developmental constraint of insect audition. *Frontiers in Zoology*, 3(20).
- Lakes, R., Kalmring, K., & Engelhard, K. H. (1990).** Changes in the auditory system of locusts (*Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*) after deafferentation. *Journal of Comparative Physiology A*, 166(4), 553–563.
- Latimer, W., & Schatral, A. (1983).** The acoustic behaviour of the bushcricket *Tettigonia cantans* I. Behavioural responses to sound and vibration. *Behavioural Processes*, 8(2), 113–124.
- Le, T., Liang, Z., Patel, H., Yu, M. H., Sivasubramaniam, G., Slovitt, M., ... Beitel, G. J. (2006).** A new family of *Drosophila* balancer chromosomes with a w- dfd-GMR yellow fluorescent protein marker. *Genetics*, 174(4), 2255-2257.

4. Literatur

- Lefèvre, M. T. (2010).** Mechanisms of the mechanosensory transduction in chordotonal organs in *Drosophila melanogaster*. Thesis zur Erlangung des akademischen Grades „Master of Science“, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Leung, R. K. M., & Whittaker, P. A. (2005).** RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*, 107(2), 222–239.
- Liang, X., Madrid, J., Saleh, H. S., & Howard, J. (2011).** NOMPC, a member of the TRP channel family, localizes to the tubular body and distal cilium of *Drosophila* campaniform and chordotonal receptor cells. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 68(1), 1–7.
- Lin, D. M., Fetter, R. D., Kopczynski, C., Grenningloh, G., & Goodman, C. S. (1994).** Genetic analysis of Fasciclin II in *Drosophila*: Defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation. *Neuron*, 13(5), 1055–1069.
- Lin, D. M., & Goodman, C. S. (1994).** Ectopic and increased expression of fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron*, 13(3), 507–523.
- Lu, Q., Senthilan, P. R., Effertz, T., Nadrowski, B., & Göpfert, M. C. (2009).** Using *Drosophila* for studying fundamental processes in hearing. *Integrative and Comparative Biology*, 49(6), 674–680.
- Mao, Y., & Freeman, M. (2009).** Fasciclin 2, the *Drosophila* orthologue of neural cell-adhesion molecule, inhibits EGF receptor signalling. *Development*, 136(3), 473–481.
- Marchal, E., Verlinden, H., Badisco, L., Van Wielendaele, P., & Vanden Broeck, J. (2012).** RNAi-mediated knockdown of Shade negatively affects ecdysone-20-hydroxylation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 58(7), 890–896.
- Martin, F., Boto, T., Gomez-Diaz, C., & Alcorta, E. (2013).** Elements of olfactory reception in adult *Drosophila melanogaster*. *Anatomical Record*, 296(9), 1477–1488.
- Matheson, T. (1990).** Responses and locations of neurones in the locust metathoracic femoral chordotonal organ. *Journal of Comparative Physiology A*, 166(6), 915–927.

4. Literatur

- Matheson, T. (1992).** Range fractionation in the locust metathoracic femoral chordotonal organ. *Journal of Comparative Physiology A*, 170(4), 509–520.
- Matheson, T., & Field, L. H. (1990).** Innervation of the metathoracic femoral chordotonal organ of *Locusta migratoria*. *Cell and Tissue Research*, 259(3), 551–560.
- Meier, T., Chabaud, F., & Reichert, H. (1991).** Homologous patterns in the embryonic development of the peripheral nervous system in the grasshopper *Schistocerca gregaria* and the fly *Drosophila melanogaster*. *Development*, 112(1), 241–253.
- Meier, T., & Reichert, H. (1990).** Embryonic development and evolutionary origin of the orthopteran auditory organs. *Journal of Neurobiology*, 21(4), 592–610.
- Mendes, C. S., Bartos, I., Akay, T., Márka, S., & Mann, R. S. (2013).** Quantification of gait parameters in freely walking wild type and sensory deprived *Drosophila melanogaster*. *ELife*, 2013(2), 1–24.
- Michel, K., Amon, T., & Cokl, A. (1983).** The morphology of the leg scolopidial organs in *Nezara viridula* (L.)(Heteroptera, Pentatomidae). *Revue Canadienne de Biologie Expérimentale*, 42(2), 139–150.
- Michelsen, A., & Larsen, O. N. (1985).** Hearing and sound. In G. A. Kerkut & L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive insect physiology, bio-chemistry and pharmacology*, Vol. 6 (pp. 495–556). New York: Pergamon Press.
- Mishra, M. (2015).** A quick method to investigate the *Drosophila* Johnston's organ by confocal microscopy. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 3(1), 1–7.
- Moulins, M. (1976).** Ultrastructure of chordotonal organs. In P. J. Mill (Ed.), *Structure and Function of Proprioceptors in the Invertebrates* (pp. 387–426). London: Chapman & Hall.
- Mücke, A. (1989).** Das periphere Nervensystem und die Zentralprojektion der Rezeptoren intakter und regenerierter Beine von *Schistocerca gregaria* und *Locusta migratoria*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Philipps-Universität Marburg.
- Mücke, A. (1991).** Innervation pattern and sensory supply of the midleg of *Schistocerca gregaria* (Insecta, Orthopteroidea). *Zoomorphology*, 110, 175–187.

4. Literatur

- Murase, S., & Schuman, E. M. (1999).** The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(5), 549–553.
- Murshed, M., Smyth, N., Miosge, N., Karolat, J., Krieg, T., Paulsson, M., & Nischt, R. (2000).** The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), 7007–7012.
- Nayak, S. V., & Singh, R. N. (1983).** Sensilla on the tarsal segments and mouthparts of adult *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera : Drosophilidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 12(5), 273–291.
- Newland, P. L. (1990).** Morphology of a population of mechanosensory ascending interneurons in the metathoracic ganglion of the locust. *Journal of Comparative Neurology*, 299(2), 242–260.
- Nichols, C. D., Becnel, J., & Pandey, U. B. (2012).** Methods to assay *Drosophila* behavior. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (61).
- Nishino, H., & Sakai, M. (1997).** Three neural groups in the femoral chordotonal organ of the cricket *Gryllus bimaculatus*: central projections and soma arrangement and displacement during joint flexion. *J Exp Biol*, 200(Pt 20), 2583–2595.
- Nishino, H., & Field, L. H. (2003).** Somatotopic mapping of chordotonal organ neurons in a primitive ensiferan, the New Zealand tree weta *Hemideina femorata*: II. Complex tibial organ. *Journal of Comparative Neurology*, 464(3), 327–342.
- Nishino, H., Mukai, H., & Takanashi, T. (2016).** Chordotonal organs in hemipteran insects: unique peripheral structures but conserved central organization revealed by comparative neuroanatomy. *Cell and Tissue Research*, 366(3), 549–572.
- Ohyama, T., Jovanic, T., Denisov, G., Dang, T. C., Hoffmann, D., Kerr, R. A., & Zlatic, M. (2013).** High-throughput analysis of stimulus-evoked behaviors in *Drosophila* larva reveals multiple modality-specific escape strategies. *PLoS ONE*, 8(8).

4. Literatur

- Persohn, E., Pollerberg, G. E., & Schachner, M. (1989).** Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes. *Journal of Comparative Neurology*, 288(1), 92–100.
- Pflüger, H.-J. (1980).** The Function of hair sensilla on the locusts Leg: The role of tibial hairs. *The Journal of Experimental Biology*, 87, 163–176.
- Pinnock, R. D., Lummis, S. C. R., Chiappinelli, V. A., & Sattelle, D. B. (1988).** κ -Bungarotoxin blocks an α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptor in the insect central nervous system. *Brain Research*, 458(1), 45–52.
- Pollerberg, E. G., Sadoul, R., Goridis, C., & Schachner, M. (1985).** Selective expression of the 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development. *The Journal of Cell Biology*, 101(5), 1921-1929.
- Pollerberg, G. E., Schachner, M., & Davoust, J. (1986).** Differentiation state-dependent surface mobilities of two forms of the neural cell adhesion molecule. *Nature*, 324(6096), 462–465.
- Prahlad, A., Spalthoff, C., Kong, D., Großhans, J., Göpfert, M. C., & Schmidt, C. F. (2017).** Mechanical properties of a *Drosophila* larval chordotonal organ. *Biophysical Journal*, 113(12), 2796–2804.
- Pringle, J. W. S. (1957).** The structure and evolution of the organs of sound production in cicadas. *Proceedings of the Linnean Society of London*, 167(2), 144–159.
- Pringle, J. W. S. (1938 A).** Proprioception in insects II: The action of the campaniform sensilla on the legs. *Journal of Experimental Biology*, 15, 114–131.
- Pringle, J. W. S. (1938 B).** Proprioception in insects III. The function of the hair sensilla at the joints. *Journal of Experimental Biology*, 15, 467–473.
- Rabinow, L., & Birchler, J. A. (2018).** A dosage-sensitive modifier of retrotransposon-induced alleles of the *Drosophila* white locus. *The EMBO Journal*, 8(3), 879–889.

- Rao, D. D., Maples, P. B., Senzer, N., Kumar, P., Wang, Z., Pappen, B. O., ... Nemunaitis, J. (2010).** Enhanced target gene knockdown by a bifunctional shRNA: A novel approach of RNA interference. *Cancer Gene Therapy*, 17(11), 780–791.
- Reddy, S., Jin, P., Trimarchi, J., Caruccio, P., Phillis, R., & Murphey, R. K. (1997).** Mutant molecular motors disrupt neural circuits in *Drosophila*. *Journal of Neurobiology*, 33(6), 711–723.
- Rillich, J., Stevenson, P. A., & Pflueger, H. J. (2013).** Flight and walking in locusts-cholinergic co-activation, temporal coupling and its modulation by biogenic amines. *PLoS ONE*, 8(5).
- Ryckebusch, S., & Laurent, G. (1993).** Rhythmic patterns evoked in locust leg motor neurons by the muscarinic agonist pilocarpine. *Journal of Neurophysiology*, 69(5), 1583–1595.
- Rytlewski, D. (1987).** Histologische Untersuchungen zur peripheren Innervation in den ersten Abdominalsegmenten von Feldheuschrecken. Thesis zur Erlangung des Diploms im Bereich „Biologie“, Philipps-Universität Marburg
- Sanborn, A. F., & Phillips, P. K. (1999).** Analysis of acoustic signals produced by the cicada *Platypedia putnami* variety *lutea* (Homoptera: Tibicinidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 92(3), 451–455.
- Schäffer, S. (1999).** Embryonalentwicklung der axonalen Projektion tympanaler Sinneszellen von *Schistocerca gregaria*. Thesis zur Erlangung des Diploms im Bereich „Biologie“, Georg-August-Universität Göttingen.
- Schlüter, B. C. (2015).** Physiologische Untersuchungen zur Mechanosensitivität bei *Drosophila melanogaster*. Thesis zur Erlangung des akademischen Grades „Bachelor of Science“, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Schnorbus, H. (1971).** Die subgenualen Sinnesorgane von *Periplaneta americana*: Histologie und Vibrationsschwellen. *Zeitschrift Für Vergleichende Physiologie*, 71, 14–48.
- Schuster, C. M., Lin, D. M., & Goodman, C. S. (1995).** Genetic dissection of structural changes at the *Drosophila* neuromuscular junction: a role for Fasciclin II. In Fifth European Meeting on the Neurogenetics of *Drosophila*, *Journal of Neurogenetics*, 10(1), 49-50.

- Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D., & Goodman, C. S. (1996).** Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity. *Neuron*, 17(4), 655–667.
- Schwabe, J. (1906).** Beiträge zur Morphologie und Histologie der tympanalen Sinnesapparate der Orthopteren. *Zoologica (Stuttgart)*, 20(50), 1–154.
- Schymeinsky, J., Nedbal, S., Miosge, N., Po, E., Rao, C., Beier, D. R., ... Bader, B. L. (2002).** Gene structure and functional analysis of the mouse Nidogen-2 gene: Nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 22(19), 6820–6830.
- Senthilan, P. R., Piepenbrock, D., Ovezmyradov, G., Nadrowski, B., Bechstedt, S., Pauls, S., ... Göpfert, M. C. (2012).** *Drosophila* auditory organ genes and genetic hearing defects. *Cell*, 150(5), 1042–1054.
- Shanbhag, S. R., Müller, B., & Steinbrecht, R. A. (2000).** Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster*. 2. Internal organization and cellular architecture of olfactory sensilla. *Arthropod Structure and Development*, 29(3), 211–229.
- Shanbhag, S. R., Singh, K., & Naresh Singh, R. (1992).** Ultrastructure of the femoral chordotonal organs and their novel synaptic organization in the legs of *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 21(4), 311–322.
- Shaw, S. R. (1994).** Re-evaluation of the absolute threshold and response mode of the most sensitive known “vibration” detector, the cockroach’s subgenual organ: A cochlea-like displacement threshold and a direct response to sound. *Journal of Neurobiology*, 25(9), 1167–1185.
- Smith, S. A., & Shepherd, D. (1996).** Central afferent projections of proprioceptive sensory neurons in *Drosophila* revealed with the enhancer-trap technique. *Journal of Comparative Neurology*, 364(2), 311–323.
- Snow, P., Zinn, K., Harrelson, A., McAllister, L., Schilling, J., Bastiani, M., ... Goodman, C. (1988).** Characterization and cloning of fasciclin I and fasciclin II glycoproteins in the grasshopper. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(14), 5291–5295.

- Spinola, S. M., & Chapman, K. M. (1975).** Proprioceptive indentation of the campaniform sensilla of cockroach legs. *The Journal of Comparative Physiology*, 96, 257–272.
- Stefanini, M., Martino, C. D. E., & Zamboni, L. (1967).** Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216(5111), 173–174.
- Stein, W., & Sauer, A. E. (1999).** Physiology of vibration-sensitive afferents in the femoral chordotonal organ of the stick insect. *Journal of Comparative Physiology A*, 184(3), 253–263.
- Stölting, H., Moore, T. E., & Lakes-Harlan, R. (2004).** Acoustic communication in *Okanagana rimosa* (Say) (Homoptera: Cicadidae). *Zoology*, 107(3), 243–257.
- Stölting, H., Moore, T. E., & Lakes-Harlan, R. (2002).** Substrate vibrations during acoustic signalling in the cicada *Okanagana rimosa*. *Journal of Insect Science*, 2(2), 1–7.
- Strauß, J., & Lakes-Harlan, R. (2017).** Vibrational sensitivity of the subgenual organ complex in female *Sipyloidea sipyilus* stick insects in different experimental paradigms of stimulus direction, leg attachment, and ablation of a connective tibial sense organ. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 203, 100–108.
- Strauß, J., & Lakes-Harlan, R. (2013).** Sensory neuroanatomy of stick insects highlights the evolutionary diversity of the orthopteroid subgenual organ complex. *The Journal of Comparative Neurology*, 521(16), 3791–3803.
- Strauß, J., & Lakes-Harlan, R. (2009).** Postembryonic development of the auditory system of the cicada *Okanagana rimosa* (Say) (Homoptera: Auchenorrhyncha: Cicadidae). *Zoology*, 112(4), 305–315.
- Sun, Y., Liu, L., Ben-Shahar, Y., Jacobs, J. S., Eberl, D. F., & Welsh, M. J. (2009).** TRPA channels distinguish gravity sensing from hearing in Johnston’s organ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13606–13611.
- Thomas, U., Kim, E., Kuhlendahl, S., Koh, Y. H., Gundelfinger, E. D., Sheng, M., ... Budnik, V. (1997).** Synaptic clustering of the cell adhesion molecule Fasciclin II by discs-large and its role in the regulation of presynaptic structure. *Neuron*, 19(4), 787–799.

4. Literatur

- Todi, S. V., Sharma, Y., & Eberl, D. F. (2004).** Anatomical and molecular design of the *Drosophila* antenna as a flagellar auditory organ. *Microscopy Research and Technique*, 63(6), 388–399.
- Todi, S. V., Sivan-Loukianova, E., Jacobs, J. S., Kiehart, D. P., & Eberl, D. F. (2008).** Myosin VIIA, important for human auditory function, is necessary for drosophila auditory organ development. *PLoS ONE*, 3(5), 1–9.
- Trimmer, B. A., & Weeks, J. C. (2017).** Muscarinic acetylcholine receptors modulate the excitability of an identified insect motoneuron. *Journal of Neurophysiology*, 69(6), 1821–1836.
- Tuthill, J. C., & Wilson, R. I. (2016).** Mechanosensation and adaptive motor control in insects. *Current Biology*, 26(20), R1022–R1038.
- Unit, M. B., & Road, H. B. (1983).** Sensilla on the tarsal segments and mouthparts of adult *Drosophila melanogaster* Meigen. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 12(5), 273–291.
- Unverzagt, P. (2015).** Fasciclin 2 in Skolopidialorganen der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*. Thesis zur Erlangung des akademischen Grades „Master of Science“. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Usherwood, P. N. R., Runion, H. ., & Campbell, J. . (1968).** Structure and physiology of a chordotonal organ in the locust leg. *Journal of Experimental Biology*, 48, 305–323.
- Van Staden, M. J., Rieser, M., Ott, S. R., Pabst, M. A., & Römer, H. (2003).** Serial hearing organs in the atympanate grasshopper *Bullacris membracioides* (Orthoptera, Pneumoridae). *Journal of Comparative Neurology*, 465(4), 579–592.
- Van Staden, M. J., & Römer, H. (1998).** Evolutionary transition from stretch to hearing organs in ancient grasshoppers. *Nature*, 394(6695), 773–776.
- Vasvary, L. M. (1966).** Musculature and nervous system of the thorax, of the sound mechanism, and of a typical pregenital abdominal segment of the male of the annual cicada, *Tibicen chloromera* (Walker) (Homoptera: Cicadidae). *Journal of the New York Entomological Society*, 74(1), 2–55.

- Versteven, M., Vanden Broeck, L., Geurten, B., Zwarts, L., Decraecker, L., Beelen, M., ... Callaerts, P. (2017).** Hearing regulates *Drosophila* aggression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(8), 1958 LP-1963.
- Warren, B., & Matheson, T. (2018).** The role of the mechanotransduction ion channel candidate Nanchung-Inactive in auditory transduction in an insect ear. *The Journal of Neuroscience*, 38(15), 3741–3752.
- Weber, T., Moore, T. E., Huber, F., & Klein, U. (1988).** Sound production in periodical cicadas (Homoptera: Cicadidae: *Magicicada septendecim*, *M. cassini*). In C. Vidano & A. Arzone (Eds.), *Proceedings 6th Auchenorrhyncha Meeting* (pp. 329–336). Turin: University Turin.
- Weidemann, S., & Keuper, A. (1987).** Influence of vibratory signals on the phonotaxis of the gryllid *Gryllus bimaculatus* DeGeer (Ensifera: Gryllidae). *Oecologia*, 74(2), 316–318.
- Whitlock, K. E. (1993).** Development of *Drosophila* wing sensory neurons in mutants with missing or modified cell surface molecules. *Development*, 117(4), 1251–1260.
- Wiese, K. (1972).** Das mechanorezeptorische Beuteortungssystem von Notonecta. I. Die Funktion des tarsalen Scolopodialorgans. *Journal of Comparative Physiology*, 78, 83–102.
- Winkler, M., Piepenbrock, D., Senthilan, P. R., Howard, J., Ovezmyradov, G., Bechstedt, S., ... Möbius, W. (2012).** *Drosophila* auditory organ genes and genetic hearing defects. *Cell*, 150(5), 1042–1054.
- Winter, C., Pawel, B., Seiser, E., Zhao, H., Raabe, E., Wang, Q., ... Maris, J. M. (2008).** Neural cell adhesion molecule (NCAM) isoform expression is associated with neuroblastoma differentiation status. *Pediatric Blood & Cancer*, 51(1), 10–16.
- Wohlers, D. W., Williams, J. L. D., Huber, F., & Moore, T. E. (1979).** Central projections of fibers in the auditory and tensor nerves of cicadas (Homoptera: Cicadidae). *Cell and Tissue Research*, 203(1), 35–51.
- Wolfstetter, G., Dahlitz, I., Pfeifer, K., Töpfer, U., Alt, J. A., Pfeifer, D. C., ... Holz, A. (2019).** Characterization of *Drosophila* Nidogen/entactin reveals roles in basement membrane stability, barrier function and nervous system patterning. *Development*, 146, dev.168948.

- Wolfstetter, G., Shirinian, M., Stute, C., Grabbe, C., Hummel, T., Baumgartner, S., ... Holz, A. (2009).** Fusion of circular and longitudinal muscles in *Drosophila* is independent of the endoderm but further visceral muscle differentiation requires a close contact between mesoderm and endoderm. *Mechanisms of Development*, 126(8–9), 721–736.
- Wright, J. W., & Copenhaver, P. F. (2001).** Cell type-specific expression of fasciclin II isoforms reveals neuronal-glia interactions during peripheral nerve growth. *Developmental Biology*, 234(1), 24–41.
- Wright, J. W., Snyder, M. A., Schwinof, K. M., Combes, S., & Copenhaver, P. F. (1999).** A role for fasciclin II in the guidance of neuronal migration. *Development (Cambridge, England)*, 126(14), 3217–3228.
- Wright, J. W., & Copenhaver, P. F. (2000).** Different isoforms of fasciclin II play distinct roles in the guidance of neuronal migration during insect embryogenesis. *Developmental Biology*, 225(1), 59–78.
- Wu, Z., Sweeney, L. B., Ayoob, J. C., Chak, K., Andreone, B. J., Ohyama, T., ... Kolodkin, A. L. (2011).** A combinatorial semaphorin code instructs the initial steps of sensory circuit assembly in the *Drosophila* CNS. *Neuron*, 70(2), 281–298.
- Yack, J. E. (2004).** The structure and function of auditory chordotonal organs in insects. *Microscopy Research and Technique*, 63(6), 315–337.
- Yorozu, S., Wong, A., Fischer, B. J., Dankert, H., Kernan, M. J., Kamikouchi, A., ... Anderson, D. J. (2009).** Distinct sensory representations of wind and near-field sound in the *Drosophila* brain. *Nature*, 458(7235), 201–205.
- Young, D. (1975).** Chordotonal organs associated with the sound producing apparatus of cicadas (Insecta, Homoptera). *Zeitschrift Für Morphologie Der Tiere*, 81(2), 111–135.
- Young, D. (1970).** The structure and function of a connective chordotonal organ in the cockroach leg. In *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences (Vol. 256, pp. 401–426)*.

4. Literatur

- Zhang, W., Yan, Z., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2013).** Sound response mediated by the TRP channels NompC, Nanchung, and Inactive in chordotonal organs of *Drosophila* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), 13612–13617.
- Zill, S., Schmitz, J., & Büschges, A. (2004).** Load sensing and control of posture and locomotion. *Arthropod Structure and Development*, 33(3), 273–286.
- Zipursky, S. L., Venkatesh, T. R., Teplow, D. B., & Benzer, S. (1984).** Neuronal development in the *Drosophila* retina: Monoclonal antibodies as molecular probes. *Cell*, 36(1), 15–26.
- Zito, K., Fetter, R. D., Goodman, C. S., & Isacoff, E. Y. (1997).** Synaptic clustering of Fasciclin II and Shaker: Essential targeting sequences and role of Dlg. *Neuron*, 19(5), 1007–1016.

5. Anhang

5.1 Erklärung zu vorangehenden Veröffentlichungen

Teile der hier vorgestellten Daten wurden im Vorfeld veröffentlicht. Dies betrifft bestimmte Abbildungen und Teile der entsprechenden Textstellen. Letztere werden in dieser Arbeit sinngemäß wiedergegeben.

I. Die folgenden Abbildungen und die entsprechenden Daten stellen den eigenen Anteil an diesen Veröffentlichungen dar.

1. Anatomie und Physiologie vibrationssensitiver Organe

Abb. 1-1, Abb. 1-3, Abb. 1-4: aus Alt und Lakes-Harlan 2018

3. Fasciclin 2 und Nidogen als molekulare Bestandteile der Mechanotransduktion

Abb. 3-9: aus Wolfstetter et al. 2019

II. Die folgenden Abbildungen und die entsprechenden Daten wurden in Kooperation und mit Betreuung der entsprechenden Autoren im Zuge deren Erstellung der Thesis zur Erlangung des akademischen Bachelor-Grades erstellt. Aufarbeitung und Interpretation der Daten erfolgten in Eigenleistung.

2. Physiologie der Beinsensorik von *Drosophila melanogaster*

Abb. 2-2: aus Heinen 2018

Abb. 2-3: aus Schlüter 2015 und Heinen 2018

5.2 Weitere Veröffentlichungen mit anteiliger Eigenleistung

Stolz K, Strauß J, Alt J A, Lakes-Harlan R (2018) Independent suboesophageal neuronal innervation of the defense gland and longitudinal muscles in the stick insect (*Peruphasma schultei*) prothorax. *Arthropod Structure & Development*, 47(2) 162-172

Strauß J, Alt J A, Ekschmitt K, Schul J, Lakes-Harlan R (2017) Evolutionary diversification of the auditory organ sensilla in *Neoconocephalus* katydids (Orthoptera: Tettigoniidae) correlates with acoustic signal diversification over phylogenetic relatedness and life history. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(6) 1094-1109

5.3 Rezepte

PB: Na_2HPO_4 40,5 mM/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 9,5 mM/l (Merck, Darmstadt, GER) in Aqua dest.;
pH=7,4

PBS: NaCl 136,9 mM/l, KCl 2,7 mM/l, Na_2HPO_4 10,1 mM/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM/l
(Merck, Darmstadt, GER) in Aqua dest.; pH=7.2

PBST: PBS + 0,1% Triton X-100 (Roth, Karlsruhe, GER); pH=7.4

***Drosophila* Saline:** NaCl 117,4 mM/l, KCl 20 mM/l, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM/l, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mM/l,
HEPES 8,6 mM/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 4,5 mM/l, NaHCO_3 10,2 mM/l (Merck, Darmstadt,
GER) in Aqua dest.; pH=7.2 (nach Dow 1994)

Locusta Saline: NaCl 8,2 mM/l, KCl 10,1 mM/l, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM/l, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mM/l,
 Na_2HPO_4 6 mM/l (Merck, Darmstadt, GER) in Aqua dest.; pH=6,9 (nach Clements und
May 1974)

Stefanini's Fixativ: 4 % Formaldehyd (Roth, Karlsruhe, GER), 15 % gesättigte Picrin-Säure (Fluka
(Honeywell), Morristown, New Jersey, USA), PIPES 75 mM/l (Merck, Darmstadt, GER) in
Aqua dest.; pH=7,4 (nach Stefanini und Zamboni 1967)

***Drosophila* Standard-Nährbrei:**

8g Agar-Agar (*), 500ml Aqua dest. (kochen)

66g Maismehl, 17g Trockenhefe, 47g Zucker, in 500ml Aqua dest. verrühren

1 TL Rübensirup, 1 g Nipagin (*), 3,5 ml Propionsäure (*)

Vor Gebrauch mit Trockenhefe bestreuen; (*) = (Roth, Karlsruhe, GER)

Kolophonium-Wachs-Gemisch:

2 Gewichtsanteile Kolophonium (*)

1 Gewichtsanteil Bienenwachs (*); (*) = (Roth, Karlsruhe, GER)

6. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(Ort, Datum)

(Unterschrift: Joscha A. Alt)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich in den letzten Jahren während der Arbeit an der hier vorliegenden Dissertation in vielerlei Hinsicht unterstützt haben.

Zunächst Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan für die Übernahme der Betreuung dieser Dissertation, für die Vergabe der vielen spannenden und fordernden Themenbereiche, für die Unterstützung mit Rat und Tat und letztendlich für die letzten Jahre.

Dann Dr. Johannes Strauß für die Bereicherung des Alltags, für gelegentliche Abschweifungen und auch hier für Rat und Tat die mir reichhaltig zuteil wurden.

Natürlich danke ich auch Mirjam Buss und Anja Schnecko für Ihre Arbeit in Keller und Labor.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Ivan Manzini danken. Zum einen für die Übernahme der Zweitkorrektur und zum anderen für die freundliche Art, die unterstützenden Worte und die so selbstverständlich wirkende Bereitstellung von Geräten und Materialien.

Auch die restliche AG Manzini soll hier nicht unerwähnt bleiben: Danke für die Unterstützung im moralischen aber auch handwerklichen Bereich.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die großartige Unterstützung während der letzten Jahre und auch schon davor und auch schon davor. Ohne euch wäre dies hier nicht möglich gewesen. Und einen letzten und besonders großen Dank an meinen Sohn Benjamin Hauke Alt, der es immer mit Leichtigkeit geschafft hat meine Gedanken auch mal von der Arbeit zu lösen.

