

# **Mechanoelektrische Transduktion in Sinneszellen des Chordotonalorgans**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln



vorgelegt von  
Judith Förster  
aus Herford

Berichterstatter:  
Prof. Dr. Ansgar Büschges  
Prof. Dr. Peter Kloppenburg

Tag der mündlichen Prüfung:  
27.05.2014

„Und wenn ein Sturm dich in die Knie zwingt,  
halt dein Gesicht einfach gegen den Wind.  
Egal, wie dunkel die Wolken über dir sind,  
sie werden irgendwann vorüberziehn.“

Die Toten Hosen – Steh auf wenn du am Boden bist



# Literaturverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Pymetrozine.....	<b>10</b>
1.2 Femorales Chordotonalorgan (fCO).....	<b>11</b>
1.3 Detaillierter Aufbau eines Chordotonalorgans.....	<b>15</b>
1.4 Mechanoelektrische Transduktion im Chordotonalorgan.....	<b>18</b>
1.5 Ziel der Arbeit.....	<b>20</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1 Versuchstiere .....	<b>21</b>
2.2 Insektizide .....	<b>22</b>
2.3 Injektionsversuche an <i>Carausius morosus</i> .....	<b>22</b>
2.4 Elektrophysiologische Methoden.....	<b>23</b>
2.5 Konzentrationsreihen der Insektizide an <i>Carausius morosus</i> .....	<b>26</b>
2.6 Berechnung der Frequenzdifferenz von verschiedenen Phasen eines Stimulus.....	<b>29</b>
2.7 Reaktion in Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumkonzentration bei <i>Carausius morosus</i> .....	<b>30</b>
2.8 Beinbewegungen von <i>Drosophila melanogaster</i> unter Einfluss von Pymetrozin.....	<b>31</b>
2.9 Negative Gravitaxis bei <i>Drosophila melanogaster</i> unter Einfluss von Pymetrozin.....	<b>32</b>
2.10 Proboscis Extension Response (PER) Versuche bei <i>Drosophila</i> .....	<b>34</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
3.1 Injektionsversuche .....	<b>35</b>

3.2	Konzentrationsreihen.....	36
3.3	Reaktion in Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumkonzentration.....	41
3.4	Reaktion der sensorischen fCO-Neurone .....	43
3.5	Beinbewegungen von <i>Drosophila melanogaster</i> unter Einfluss von Pymetrozin.....	57
3.6	Negative Gravitaxis bei <i>Drosophila melanogaster</i> unter Einfluss von Pymetrozin.....	60
3.7	Proboscis Extension Response (PER) Versuche an <i>Drosophila melanogaster</i> ..	64
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>65</b>
4.1	Elektrophysiologische Versuche.....	65
4.2	Mechanoelektrische Transduktion bei <i>Drosophila melanogaster</i> .....	68
4.3	Zusammenfassende Diskussion .....	69
	<b>Literatur .....</b>	<b>71</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>81</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>82</b>

## Zusammenfassung

Pymetrozin ist ein Insektizid, welches gegen Blattläuse eingesetzt wird. Es induziert bei Insekten eine Streckung der Beine und des Rüssels, tötet sie aber nicht direkt, da es über die Zeit seine Wirkung verliert. Jedoch überleben Blattläuse eine Applikation nicht, da sie bewegungsunfähig verhungern. Experimente mit Europäischen Wanderheuschrecken haben gezeigt, dass Pymetrozin auf die Gesamtaktivität von sensorischen Neuronen des femoralen Chordotonalorgans (fCO) wirkt (Ausborn et al. 2005; Kaufmann et al. 2004). Der zu Grunde liegende Wirkmechanismus von Pymetrozin ist bisher allerdings unbekannt.

Anhand der Ergebnisse lassen sich zwei mögliche Wirkmechanismen von Pymetrozin vermuten: (1) Pymetrozin beeinflusst den mechanoelektrischen Transduktionsprozess oder (2) beeinflusst die Transformation von Rezeptorpotentialen zu Aktionspotentialen.

Die Stabheuschrecke, *Carausius morosus*, deren Sinnesorgane gut beschrieben sind, wird auch durch Pymetrozin beeinflusst und hebt aufgrund dessen die Beine. Reaktionen werden ab einer Konzentration von 100 nM hervorgerufen. Einzelne sensorische Neurone des fCOs sind sensitiv für Änderungen der Position (P), Geschwindigkeit (V) und Beschleunigung (A) der Tibia (Hofmann et al. 1985). Die Reaktionen dieser unterschiedlichen sensorischen Zellen auf Pymetrozin kann durch intrazelluläre Ableitungen in den Axonen auf Höhe des Eingangs zum Ganglion gemessen werden (Büschges 1994). Ich konnte zeigen, dass positions- und geschwindigkeitssensitive Zellen während einer dauerhaften Stimulation des fCOs durch Pymetrozin tonisch und somit unabhängig vom Stimulus aktiv werden und später keine Aktionspotentiale mehr generieren. Unabhängig vom Zelltyp werden spontan aktive fCO-Zellen sowie inaktive Zellen durch Pymetrozin aktiviert und sind daraufhin unabhängig von der späteren Stimulation des fCOs bevor auch diese keine Aktionspotentiale mehr generieren. Dabei ist die Reaktion unabhängig davon, ob das fCO währenddessen stimuliert wird und wie die Vorspannung des fCOs ist.

Auch *Drosophila melanogaster* wird durch Pymetrozin beeinflusst, was mithilfe von Videos des Laufverhaltens gezeigt werden konnte. Durch negative Gravitaxisversuche sowie Proboscis Extension Response (PER) Versuche ließ sich außerdem feststellen, dass die kanalbildenden Proteine NompC, Nanchung und Inactive, die am mechanoelektrischen Transduktionsprozess im Johnstonschen Organ, einem Chordotonalorgan, beteiligt sind, nicht als Target für Pymetrozin dienen.

Gleiche Ergebnisse in Stabheuschrecken und *Drosophila* ließen sich für unbekannte Insektizide feststellen, deren chemischer Aufbau und Wirkweise nicht bekannt sind.



## Abstract

Pymetrozine is one selective insecticide against pest insects particularly against aphids. It induces a stretched posture of the legs and proboscis. This effect vanishes over time after application. Experiments in locusts indicate that pymetrozine affects gross sensitivity of sensory neurons in the femoral chordotonal organ (fCO) (Ausborn et al. 2005; Kaufmann et al. 2004). However, the mode of action of pymetrozine is presently unknown.

According to previous findings two possible explanations exist for the mode of action of pymetrozine: (1) Pymetrozine affects the mechano-electrical transduction process or (2) affects transformation of receptor potential towards action potentials.

The stick insect, *Carausius morosus*, that has well characterized sensory organs, is also affected by pymetrozine by lifting its legs. Potent concentrations of pymetrozine start at 100 nM. Single fCO sensory cells are sensitive to changes of position (P), velocity (V) and/or acceleration (A) of the tibia (Hofmann et al. 1985). The reactions of these sensory cells to pymetrozine can be recorded intracellularly in the axons at the level of the entrance to the segmental ganglion (Büschges 1994). We show that P-sensitive and V-sensitive cells become tonic during stimulation after pymetrozine application and later they are not able to generate action potentials anymore. Independent of cell type, active sensory cells as well as silent sensory cells become tonically active with pymetrozine treatment until they are also not able to generate spikes anymore. Thereby it is regardless of whether the fCO is stimulated or not as well as the pretension of the fCO.

*Drosophila melanogaster* is also affected by pymetrozine what I showed in movies of walking behaviour. In negative gravitaxis experiments and PER (proboscis extension response) experiments it is shown that the channel proteins NompC, Nanchung und Inactive, which are involved in the mechano-electrical transduction process, are not the target side for pymetrozine.

Similar results in stick insects und *Drosophila* are shown for other insecticides with unknown mode of action and chemical composition.

# 1 Einleitung

## 1.1 Pymetrozine

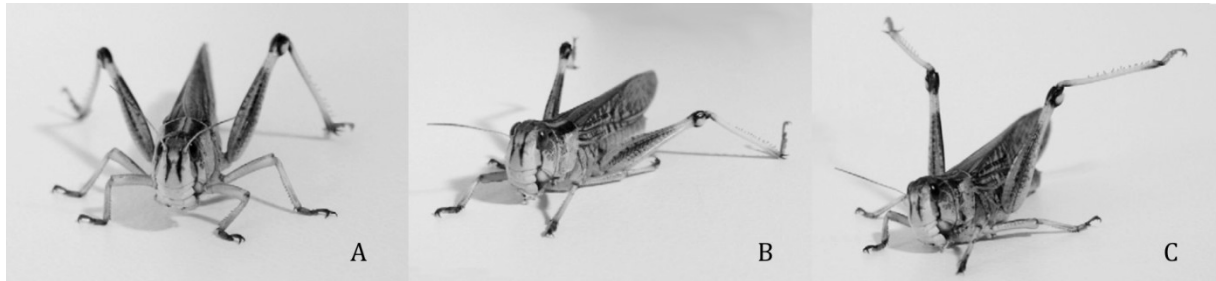
Moderne Insektizide müssen sowohl hochspezifisch, als auch in geringen Konzentrationen wirksam sein, um im Pflanzenschutz eingesetzt werden zu können, um Nebenwirkungen für den Menschen und andere, vor allem nützliche, Tiere so gering wie möglich zu halten. Ein besonderes Problem in der Landwirtschaft stellen Blattläuse dar, da sie Überträger von Pflanzenviren sind. Über 100 Blattlausarten schädigen weltweit mehr als 4000 Getreidearten und können sich aufgrund ihrer parthenogenetischen Fortpflanzung effizient verbreiten (Dixon 1977; Foster et al. 2002; Margaritopoulos et al. 2010). Durch das Saugen des Phloemsaftes kommt es zur schnellen Übertragung eines Virus von einer Pflanze zur nächsten. Um diesen Kreislauf zu unterbrechen, gibt es derzeit wenig effektive Insektizide, da Blattläuse und andere pflanzensaftsaugende Tiere, wie zum Beispiel die Braunrückige Reiszikade (*Nilaparvata lugens*) und Weiße Fliegen (*Trialeurodes vaporariorum*), Resistenzen entwickeln oder die Wirkstoffe nicht langanhaltende Wirkung zeigen (Foster et al. 2003; He et al. 2011). Zwei wirksame Insektizide sind Pymetrozin, ein Pyridinazomethin und Flonicamid, ein Pyridincarboxamid (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Strukturformel von Pymetrozin und Flonicamid.** (Ausborn et al. 2005; Morita et al. 2007).

Blattläuse, die an Pflanzen saugen, die mit diesen Insektiziden behandelt wurden, weisen ein gestörtes Fressverhalten auf (Wyss und Bolsinger 1997). Es ist ihnen dabei nicht mehr möglich ihren Proboscis zum Trinken einzusetzen, woraufhin sie nach einigen Stunden verhungern (Fuog et al. 1998; Harrewijn und Kayser 1997; Morita et al. 2007; Sechser et al. 2002). Ausborn und Kollegen (2005) fanden heraus, dass Pymetrozin auf Chordotonalorgane wirkt. Nachdem der Europäischen

Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) das Insektizid gespritzt wurde streckten die Tiere ihre Hinterbeine in die Höhe und konnten diese nicht mehr natürlich bewegen (Abb. 1.2).



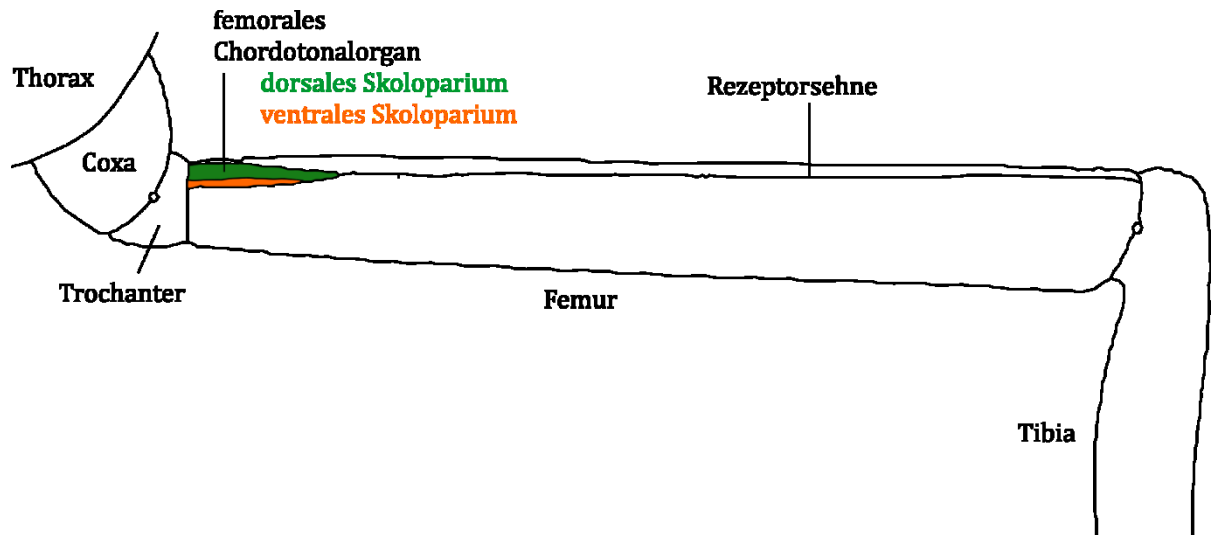
**Abb. 1.2: Wirkung von Pymetrozin auf eine Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*).** (A) Normale Haltung einer Wanderheuschrecke bevor Pymetrozin injiziert wurde. (B,C) Wanderheuschrecke nach der Injektion von Pymetrozin. (B) Wanderheuschrecke, die ihre Beine anfängt auszustrecken und Stehen darauf nicht mehr möglich ist: Anfängliche Wirkung von Pymetrozin. (C) Wanderheuschrecke mit Beinen, die in die Höhe gestreckt sind: endgültige Wirkung von Pymetrozin (verändert nach Ausborn et al. 2005).

Extrazelluläre Ableitungen zeigten dabei, dass die Extensor Tibiae Motoneurone, welche von den Afferenzen des femoralen Chordotonalorgans (fCO) innerviert werden, tonische aktiv wurden, nachdem das fCO mit einer Pymetrozinlösung umspült wurde, im Gegensatz zur phasischen Reizantwort zuvor (Abb. 2.5). Dies führte zum dauerhaften Heben der Beine. Andere Sinnesorgane, wie z.B. Campaniforme Sensillen oder die Haare der Tegula, zeigten keine Reaktion auf Pymetrozin (Ausborn et al. 2005).

## 1.2 Femorales Chordotonalorgan (fCO)

Das femorale Chordotonalorgan ist ein Propriozeptor, der die Stellung und Bewegung des Femurs im Verhältnis zur Tibia misst (Femur-Tibia-Gelenk, im Folgenden abgekürzt als FT-Gelenk). Diese Eigenschaft ist für Insekten sowohl während des Laufens, als auch beim Stehen von großer Bedeutung (Bässler 1977a; Hofmann et al. 1985; Kittmann und Schmitz 1992). Das Sinnesorgan liegt proximal auf der dorsalen Seite des Femurs und ist durch eine lange Sehne mit der Tibia verbunden. Die Bewegungen der Tibia können so mittels der Elongation des

femorales Chordotonalorgan auf die einzelnen Zellen des fCO übertragen werden. Die fCO-Zellen sind bei der Stabheuschrecke in zwei Kompartimente aufgeteilt, die sogenannten Skoloparien (Abb. 1.3).

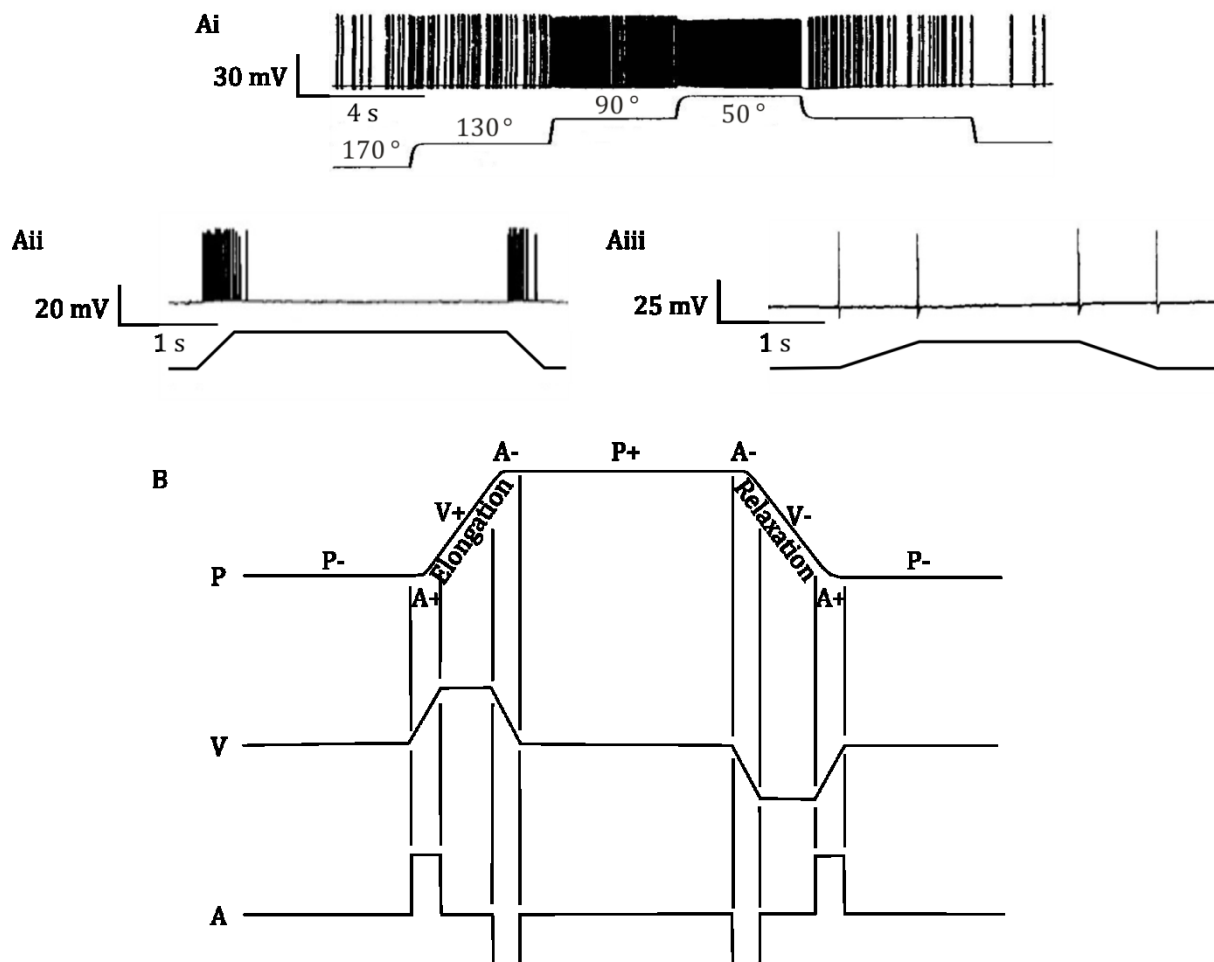


**Abb. 1.3: Schema eines Beines der Stabheuschrecke *Carausius morosus* und die Lage des femoralen Chordotonalorgans im Femur.** Das femorale Chordotonalorgan dorsal im proximalen Teil des Femurs. Die Rezeptorsehne zieht sich durch den gesamten Femur bis zum dorsalen Teil des Femur, wo die Sehne mit der Tibia verbunden ist, um so die Bewegungen der Tibia an das femorale Chordotonalorgan weiterzuleiten (verändert nach Bässler 1977b).

Das dorsale Skoloparium besteht aus ungefähr 400 Zellen, die sensitiv auf Vibrationen reagieren (Füller und Ernst 1974). Das ventrale Skoloparium besteht aus 80 Zellen, die Änderungen der Position (P), der Geschwindigkeit (V) und der Beschleunigung (A) der Tibia, im Verhältnis zum Femur, messen können (Bässler 1993; Büschges 1989; Büschges 1994; diCaprio et al. 2002; Stein und Sauer 1999). Die verschiedenen Zelltypen lassen sich während einer trapezförmigen Stimulation des fCOs (Abb. 1.4) eindeutig definieren. Dabei stellte die Elongation der Rezeptorsehne eine Flexion der Tibia dar und die Relaxation der Rezeptorsehne eine Extension der Tibia. Bei der Bestimmung der unterschiedlichen Zelltypen kommt es darauf an, zu welcher Phase der Stimulation die Zellen aktiv sind (Abb. 1.4B). Hierbei können sowohl Reinformen der Sensitivität auftreten (Abb. 1.4A), als auch Mischformen (Büschges 1989; Hofmann und Koch 1985; Hofmann et al. 1985). Das fCO ist der relevante Sensor der Femur-Tibia-Rückkopplungsschleife. Die Axone des fCO verlaufen durch den Nervus

cruris in das thorakale Ganglion, wo die Signale der Afferenzen indirekt über Interneurone und nachgeschaltete Motoneurone des Extensor-Tibia-Muskels und Flexor-Tibia-Muskels oder direkt über diese Motoneurone weitergeleitet werden, so dass die Kontraktion und Relaxation der Tibia-Muskeln hervorgerufen wird. Beide Muskeln sind verantwortlich für die Bewegungen der Tibia (Bässler 1993; Büschges 1989; Büschges 1994). Der Flexor wird von bis zu 25 erregenden und zwei hemmenden Motoneuronen innerviert (Goldammer et al. 2012). Der Extensor Muskel wird hingegen nur von drei Motoneuronen innerviert: Dem erregenden Slow-Extensor-Tibia-Motoneuron (SETi), dem erregenden Fast-Extensor-Tibia-Motoneuron (FETi) und dem hemmenden Common Inhibitor (CI). Die Axone dieser drei Motoneurone verlaufen durch den F2-Nerv (Extensor-Nerv), wo sie mit Hilfe einer Hakenelektrode auch extrazellulär abgeleitet werden können (Bässler 1977a; Bässler 1993; Bässler und Storrer 1980). Im inaktiven Tier kommt es in dieser Rückkopplungsschleife zum sogenannten Widerstandsreflex. Während einer Flexion der Tibia, also der Elongation der fCO Rezeptorsehne kommt es zur Aktivierung des SETi und FETi, was zu einer Extension der Tibia, also Relaxation der fCO-Sehne, führt. Während der Relaxation kommt es zur Hemmung des SETi und FETi, was dazu führt, dass wieder eine Flexion der Tibia stattfindet. Dieser Widerstandsreflex, also die gegensätzliche Reaktion zum ausgeführten Reiz, bewirkt eine fast unbewegte Körperhaltung und ist notwendig, um beim Stehen die Körperhaltung aufrecht zu erhalten und so für die Stabheuschrecke überlebenswichtig (Bässler 1983; Bässler 1993). Dieser Widerstandsreflex ist auch von anderen Tieren bekannt, wie zum Beispiel Crustaceen, der dadurch für eine stabile Körperhaltung sorgt (Barnes 1977; Head und Bush 1991). Bei Säugern ist dieses Phänomen als Dehnungsreflex der Muskulatur beschrieben. Dabei wird durch eine Muskeldehnung beim Tier eine Spannungszunahme des zuvor gedehnten Muskels hervorgerufen. Diese Dehnungsreflexe werden in tonische Reflexe für langsame Bewegungen und phasische Reflexe für schnelle Bewegungen unterschieden. Die tonischen Dehnungsreflexe dienen der Aufrechthaltung, also der Aktivierung der Haltemuskeln. Das wohl bekannteste Beispiel eines phasischen Widerstandsreflexes ist der Kniesehnenreflex. Dabei wird durch Dehnung der Patellarsehne der Extensor im Oberschenkel (*Musculus quadriceps*)

ruckartig gedehnt und somit auch die damit verbundene Muskelspindel. Über einen monosynaptischen Reflexbogen wird die Kontraktion des Muskels hervorgerufen (Allum und Pfaltz 1985; Lehmann-Horn 2007; Wiesendanger 1997).



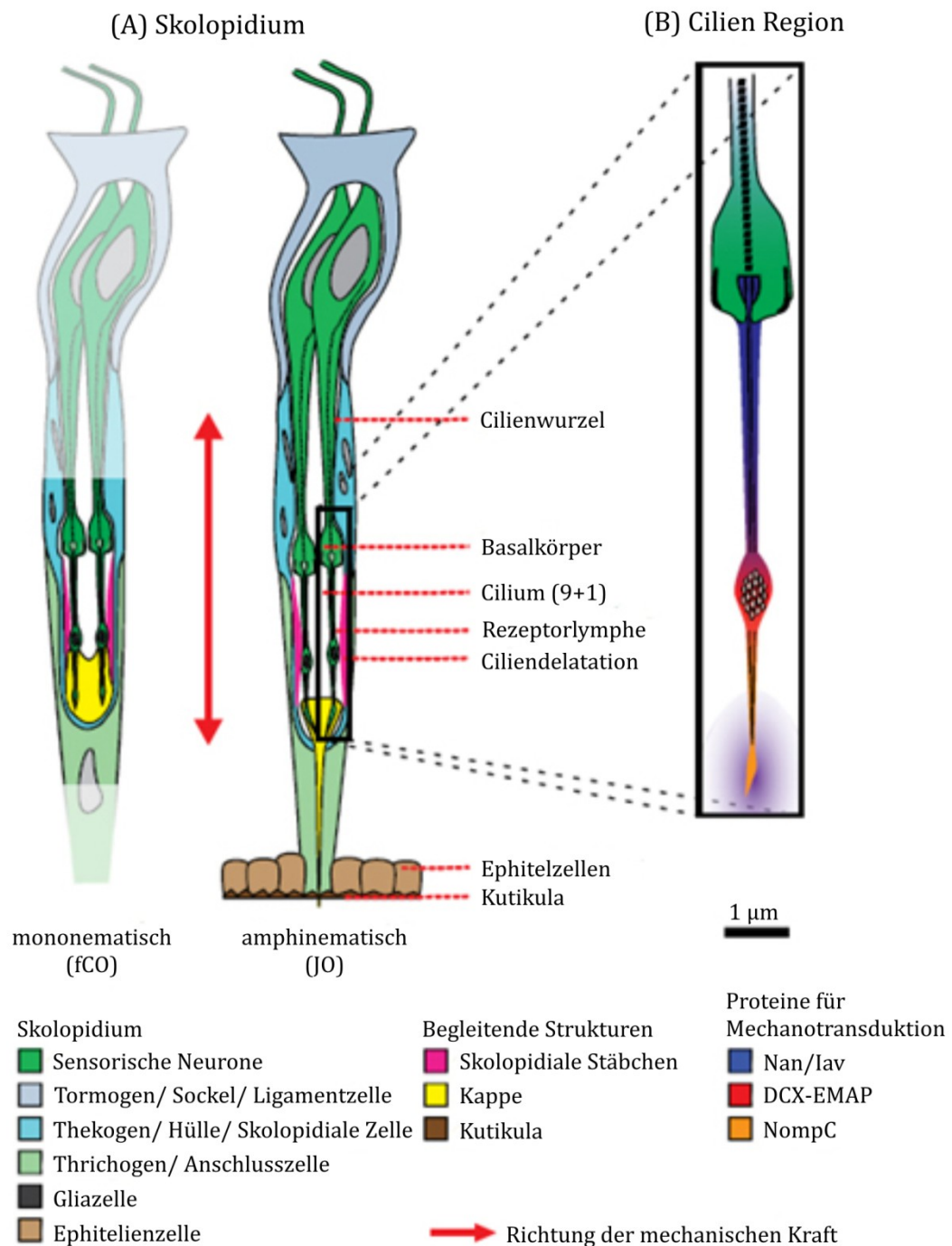
**Abb. 1.4: Einzelne Zelltypen der sensorischen Neurone des femoralen Chordotonalorgans.** (Ai) P+ Zelle: Je kleiner der FT-Winkel, desto höher ist die Frequenz der Aktionspotentiale der Zelle. Die Zelle ist somit eine positionssensitive Zelle, die auf positive Auslenkungen reagiert. (Aii) V+-Zelle: Die Zelle ist während der Elongation und Relaxation aktiv. (Aiii) A+- Zelle: Die Zelle ist beschleunigungssensitiv und reagiert sowohl auf positive, als auch auf negative Beschleunigung. (B) Eine trapezförmige Stimulationsspur. P = positionssensitiv, V = geschwindigkeitssensitiv, A = beschleunigungssensitiv. Abhängig vom Reaktionszeitpunkt der Zelle wird ihre Eigenschaft definiert. Dabei kann es sowohl reine P, V oder A Zellen geben, als auch Mischformen (verändert nach Büschges 1989; Hofmann und Koch 1985; Hofmann et al. 1985).

### 1.3 Detaillierter Aufbau eines Chordotonalorgans

Mechanosensorische Organe werden in zwei Typen unterschieden: Typ I Zellen sind monodendritisch und nehmen mit Hilfe von Cilien mechanische Reize auf. Typ II Rezeptoren sind hingegen multidendritische Zellen, die keine Cilien ausbilden. Chordotonalorgane zählen somit zu den Typ I Mechanorezeptoren. Sie gelten aufgrund ihrer Lage im Körper als interne Rezeptoren im Gegensatz zu Borsten und Campaniformen Sensillen, die externe Mechanorezeptoren darstellen (Field und Matheson 1998; Keil 1997; Kernan 2007; Tracey Jr et al. 2003; Yack 2004). Dabei unterscheiden sich die Untereinheiten der Chordotonalorgane in mononematische und amphinematische Skolopidien. Amphinematische Skolopidien, wie zum Beispiel im Johnstonschen Organ, sind durch eine verlängerte Dendritenhülle mit den Epithelzellen der Kutikula verbunden (Abb. 1.5 A) (Schmidt 1969). Bei mononematischen Skolopidien, wie im femoralen Chordotonalorgan, ist die Dendritenhülle hingegen durch Mikrotubuli zu einer kutikulären Kappe modifiziert und über Fibrillen mit der Cilienmembran verbunden (Graber 1881; Keil 1997). Die einzelnen Skolopidien enthalten je nach Insektenspezies ein (monodynales Skolopidium) bis vier bipolare Neurone (heterodynales Skolopidium) (Yack 2004), sowie drei umgebende Zellen: Eine Ligamentzelle, eine skolopidiale Zelle und eine Anschlusszelle (Abb. 1.5). Die Ligamentzelle befindet sich am proximalen Ende des Skolopidiums und umschließt dort den Axonhügel. Die skolopidiale Zelle umgibt den Dendriten der sensorischen Zelle. Die Anschlusszelle ist am distalen Ende der skolopidialen Zelle und dient der Verbindung des mononematischen Skolopidiums mit dem Cilium, indem sie einerseits die dendritische Kappe einschließt und andererseits direkt oder indirekt an epidermale Zellen gebunden ist. Durch die hohe Konzentration der longitudinalen Mikrotubuli und des extrazellulären Bindegewebes spielen sie eine kritische Rolle in der physiologischen Antwort der mechanosensitiven Rezeptoren und sind verantwortlich für die unterschiedlichen Sensitivitäten in verschiedenen Chordotonalorganen, da ihre viskoelastischen Eigenschaften stark variieren können (Eberl und Boekhoff-Falk 2007; Keil 1997; Yack 2004). Die bipolaren Neurone selbst bestehen aus einem proximal verlaufenden Axon und einem distalen Dendriten. Im äußeren Segment hat jedes Neuron eine Schwellung, die

Ciliendilatation. Diese ist durch eine hohe Elektronendichte gekennzeichnet. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Bereich für Geräusch- und Vibrationswahrnehmung von Bedeutung ist (Field und Matheson 1998; Keil 1997; Schmidt 1969; Yack 2004).





**Abb. 1.5: Zellulärer Aufbau von Mechanorezeptoren (Chordotonalorgane) und ihren homologen Strukturen.** (A) Skolopidien sind aus verschiedenen Zelltypen aufgebaut und durch anliegende Strukturen mit benachbartem Gewebe verbunden, so dass mechanische Reize aufgenommen und verarbeitet werden können. (B) Im Transduktionsprozess spielen unterschiedliche Proteine, die sich in der ziliaren Region befinden, eine Rolle (verändert nach Wiek 2013).

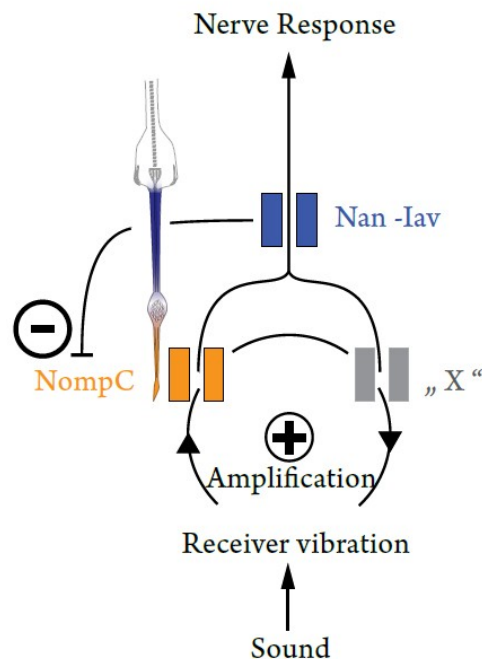
## 1.4 Mechanoelektrische Transduktion im Chordotonalorgan

Das Chordotonalorgan, welches ein Mechanorezeptor ist, wandelt mechanische Reize in elektrische Signale um. Hierzu werden Ionenkanäle, die als Transduktionskanäle dienen, genutzt, die aufgrund eines Reizes, z.B. der Auslenkung einer Antenne oder der Tibia, eine Änderung des Membranpotentials in der Sinneszelle hervorrufen (Bechstedt und Howard 2008; Gillespie und Walker 2001; Nadrowski et al. 2008). Es wird vermutet, dass die dendritische Kappe aufgrund ihrer hohen Dichte an Mikrotubuli als Reizempfänger dient. In der dendritischen Kappe von Typ I Mechanorezeptoren ist das extrazelluläre Bindeprotein NompA (TRPN1, No transient receptor potential) lokalisiert (Abb. 1.5), welches als extrazellulärer Anker die mechanischen Reize aufnehmen kann (Cheng et al. 2010a; Chung et al. 2001). Als Transduktionskanal ist NompC (Walker et al. 2000) sehr wahrscheinlich. NompC ist am distalen Ende des mechanosensorischen Ciliums lokalisiert (Lee et al. 2010; Liang et al. 2011) und könnte dort als Ionenkanal zur Umwandlung und Verstärkung der mechanischen Reize dienen (Effertz et al. 2012; Effertz et al. 2011; Göpfert et al. 2006) (Abb. 1.5 & Abb. 1.6). Dafür spricht auch, dass das homologe *C. elegans* Protein TRP-4 eine porenformende Untereinheit des Mechanotransducers ist, jedoch nicht allein als Ionenkanal funktioniert und daher mit anderen Proteinen interagieren muss (Gong et al. 2013; Kang et al. 2010; Li et al. 2006).

Zusätzlich zu NompC scheinen die Proteine Nanchung (Nan) und Inactive (Iav) am Transduktionsprozess beteiligt zu sein (Abb. 1.5 B). Sie bilden im proximalen Teil des mechanosensorischen Ciliums Heteromultimere, die auch *in vitro* auf mechanische Reize reagieren, wie z.B. hypoosmotischen Stress (Gong et al. 2004; Kim et al. 2003; Liedtke und Kim 2005). Nachgeschaltet von NompC wirkt der Nan-Iav Kanal durch negative Rückkopplung auf NompC. Bei einem Ausfall dieses Kanals kommt es zu einer Erhöhung der Verstärkung durch NompC und somit einer selbsterhaltenden Oszillation (Göpfert et al. 2006; Lu et al. 2009). Gleichzeitig werden die elektrischen Signale aber nicht mehr zum Nerv geleitet, was dafür spricht, dass der Nan-Iav Kanal essentiell für die Reizweiterleitung ist. Zusätzlich zu NompC scheint es aber noch einen weiteren als Verstärker

wirkenden Kanal zu geben, da auch in *NompC* Knock-out Mutanten Reizantworten gemessen werden konnten (Abb. 1.6).

Nan und Iav gehören zu den TRP vanilloid (TRPV) Kanälen und sind somit, wie andere TRP Kanäle, auch durchlässig für Kationen. Zusätzlich zu TRPN und TRPV gibt es noch TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin) und TRPA (ankyrin) (Clapham 2003; Nilius 2007). TRP Kanäle sind Tetramere bei denen jede Untereinheit aus sechs Transmembransegmenten besteht (S1-S6) und eine porenformende Region zwischen S5 und S6 hat. Die meisten TRP Kanäle haben sowohl einen Amino (N) Terminus mit einer Ankyrin Repeat Domäne als auch einen Carboxyl (C) Terminus, die beide verantwortlich für Protein-Protein-Interaktionen sein können. Zusätzlich sind oft noch regulatorische Domänen an den N und C Termini vorhanden (Cheng et al. 2010b; García-Sanz et al. 2004; Liedtke und Kim 2005; O’Neil und Heller 2005).



**Abb. 1.6: Mögliche Zusammenhänge der Kanäle im Transduktionsprozess eines Chordotonorgans.** Im Johnstonschen Organ von *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass *NompC* als Transduktionskanal in Frage kommt und vom nachgeschaltet liegenden *Nan-Iav* Kanal über negative Rückkopplung gesteuert wird, da ohne die Aktivität des *Nan-Iav* Kanals eine selbsterhaltende Oszillation durch *NompC* entsteht. Gleichzeitig wird aber die Weiterleitung der Potentiale zum Nerv unterbrochen, weshalb davon auszugehen ist, dass der *Nan-Iav* Kanal für die Weiterleitung der elektrischen Signale benötigt wird. Zusätzlich muss es aber noch einen unbekanntes Kanal „X“ geben, da in *NompC* Knock-out Mutanten weiterhin eine geringe Verstärkung der Signale möglich ist (Göpfert et al. 2006; Lu et al. 2009; Wiek 2013).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es durch intrazelluläre Ableitungen herauszufinden, in welcher Form Pymetrozin auf das Chordotonalorgan wirkt. Dabei stellt sich vor allem die Frage, ob die einzelnen Zelltypen der sensorischen Neurone alle gleich reagieren und es daher immer zur selben Reaktion der Extensor Tibia Motoneurone kommt. Ausborn und Kollegen (2005) wurde gezeigt, dass die Summenaktivität der fCO-Afferenzen nach der Zugabe von Pymetrozin ansteigt. Andere Sinnesorgane, wie die Campaniformen Sensillen, der Streckrezeptor des Flügels und die Haarsensillen der Tegula der Wanderheuschrecke, sind hingegen nicht beeinflussbar durch Pymetrozin. Durch diese Arbeit soll geklärt werden, welche der spezifischen Strukturen des Chordotonalorgans als Target für Pymetrozin dient. Dabei stellt sich die Frage, ob die sensorischen Neurone des Chordotonalorgans aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften (P-, V-, und A-sensitiv) verschieden auf Pymetrozin reagieren und die Aktivität der Afferenzen die Summe aus unterschiedlichen Reaktionen ist. Oder kommt es zu einer Aktivierung aller im Chordotonalorgan vorhandenen Afferenzen, unabhängig davon, auf welche Stimulusphase (Abb. 2.5) die Zellen eigentlich reagieren. Wenn die Zellen auf verschiedene Weise reagieren ist zu klären, wie dieser Unterschied aussieht. Welche der Zellen werden aktiviert? Sind die Zellen, die für eine Streckung des Beins aktiviert werden auch die, die während der Summenableitung bei Ausborn und Kollegen (2005) unter Pymetrozin aktiv wurden? Oder kommt es zur Aktivierung anderer, vorher inaktiver, Zellen? Gibt es auch Zellen, die gehemmt, also inaktiv, werden, obwohl diese vorher während der Elongation des Chordotonalorgans aktiv waren? Bei den Zellen die aktiviert werden, also eventuell unabhängig vom Stimulus Aktionspotentiale generieren, soll gezeigt werden, ob sich nur der Verlauf der Aktionspotentialfrequenz über den Stimulus ändert oder auch die Eigenschaften der Aktionspotentiale, wie die Amplitude oder die Form, um Rückschlüsse auf die Wirkweise und somit den Ort der Reaktion zu ziehen.

Desweiteren soll an verschiedenen *Drosophila*-Mutanten getestet werden, ob die bisher bekannten Proteine im Chordotonalorgan, welche am Prozess der Transduktion beteiligt sind, mit Pymetrozin interagieren und die Funktion des Insektizides in verschiedenen Knock-out Mutanten gestört ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

#### 2.1.1 Stabheuschrecken: *Carausius morosus*

Für die jeweiligen Versuche wurden weibliche Tiere der Stabheuschreckenart *Carausius morosus* genutzt. Diese stammten aus der Kolonie der Universität zu Köln und wurden bei künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus (12 Std/ 12 Std) bei ca. 25 °C und 55-70 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Gefüttert wurden die Tiere mit Brombeer-Blättern (*Rubus fruticosus*), die zweimal pro Woche erneuert wurden.

#### 2.1.2 *Drosophila melanogaster*

Die Fliegenstämme wurden auf einem Nährbrei aus 180 g Maisgries, 1 l Wasser, 10 g Sojamehl, 18,5 g Cenovis, 7,5 g Agar-Agar, 40 g Zuckerrübensirup, 40 g Diamalt und 2,5 g Nipagin gehalten. Dabei wurden sie einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus (12 Std/ 12 Std) bei ca. 25 °C und 65 % Luftfeuchtigkeit ausgesetzt.

Tab. 2.1: In den Experimenten verwendete Stöcke von *Drosophila melanogaster*.

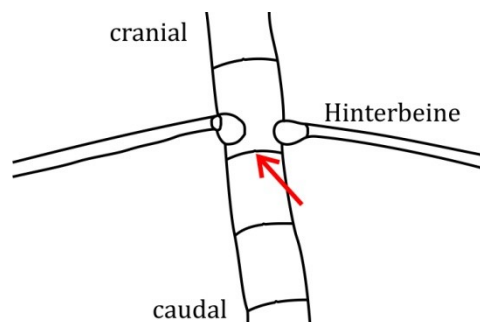
Name	Genotyp	Chr.	Literatur	zur Verfügung gestellt von
<b>Gr5a-Gal4</b>	Gr5a-Gal4-6/CyO;Dr/Tm3	2	Chyb et al. 2003	Paul Graham, Yale
<b>Gr5a-Gal4</b>	Gr5a-Gal4/CyO;Gr5a-Gal4/TM2	2;3		Kristin Scott, Berkeley
<b>Inactive</b>	iav/FM7c(SN <sup>+</sup> );;NP0761/TM3	1	Gong et al. 2004	Martin Göpfert, Göttingen
<b>UAS-iav</b>	iav <sup>2</sup> ;;UAS-iav/TM6b,Hu	3	Lehnert et al. 2013	Rachel Wilson, Harvard
<b>NompC</b>	;NompC3/CyO;NP0761/TM6b	2	Walker et al. 2000	Martin Göpfert, Göttingen
<b>UAS-NompC</b>	w,UAS-NompC-GFP	X	Yan et al. 2013	Yuh Nung Jan, San Fransisco
<b>Nanchung</b>	w;;nan <sup>dy5</sup> /TM6b	3	Kim et al. 2003	Jörg Albert, London
<b>UAS-nan</b>	w;p[UAS-58421.1]UAS-nan	2	Sénatore et al. 2010	Jörg Albert, London

## 2.2 Insektizide

Die Insektizide wurden von Bayer CropScience, Monheim, Deutschland, zur Verfügung gestellt (Stocklösung 10 mM in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO)). Für die Injektionsexperimente wurden Stocklösungen mit der Konzentration 20 mg/ml genutzt. Für alle weiteren Versuche wurden die 10 mM Stocklösungen in *Carausius*-Ringer (0,003 % Pluronic F68 (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)) (Weidler und Diecke 1969) auf die jeweils benötigte Konzentration verdünnt. Folgende Insektizide wurden genutzt: Pymetrozin, Flonicamid, BCS-CJ75565, BCS-CK98573, BCS-AH27783, BCS-BZ72191, BCS-AJ11868, BCS-AA86075. Bei allen Insektiziden, außer Pymetrozin und Flonicamid, ist die Zusammensetzung der Molekülstruktur nicht bekannt.

## 2.3 Injektionsversuche an *Carausius morosus*

Um die Wirksamkeit der Insektizide im intakten Tier zu testen wurden 3  $\mu$ l [20 mg/ml] des jeweiligen Insektizides unter die Kutikula zwischen die Hinterbeine injiziert. Die Nadel wurde dabei zwischen zwei Segmenten flach unter die Kutikula geführt, um ein einstechen in den Darm weitestgehend zu verhindern (Abb. 2.1). Nach der Injektion wurden in der ersten Stunde alle 5 Minuten Fotos von den Tieren gemacht, dann bis zur dritten Stunde alle 30 Minuten und dann stündlich bis zur zehnten Stunde. Das letzte Foto wurde 24 Stunden nach der Injektion gemacht. Bei den verwendeten Insektiziden handelte es sich um Pymetrozin, Flonicamid, BCS-CJ75565, BCS-CK98573, BCS-AH27783, BCS-BZ72191.



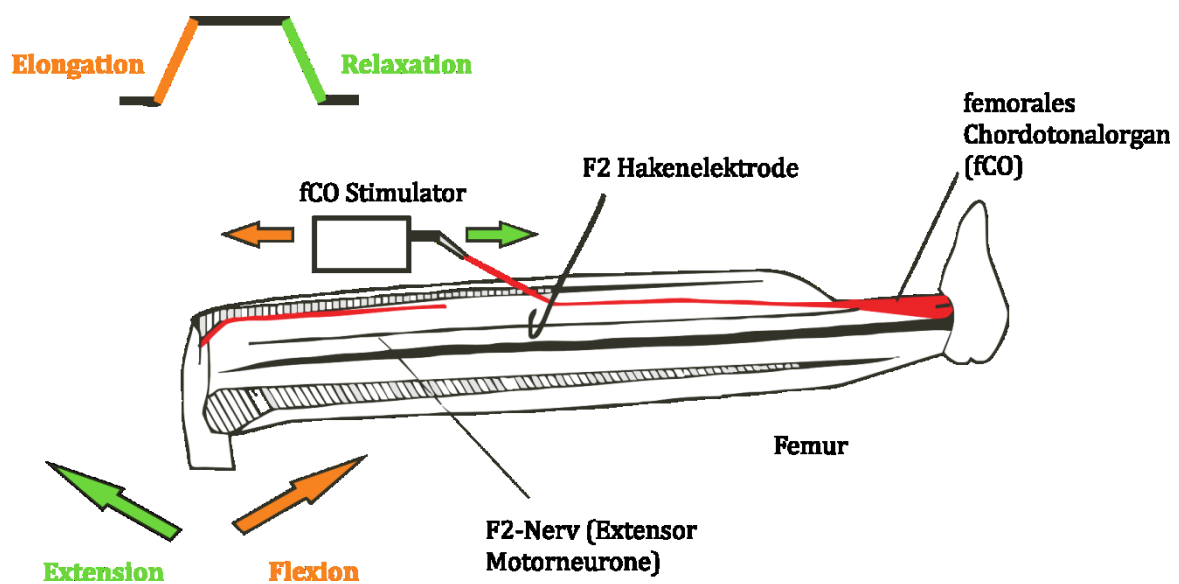
**Abb. 2.1: Schema von *Carausius morosus* (ventrale Darstellung).** Die Injektionsstelle zwischen den Hinterbeinen der Stabheuschrecke *Carausius morosus*. Die Nadel wurde flach eingeführt, um den Darm nicht zu verletzen.

## 2.4 Elektrophysiologische Methoden

### 2.4.1 fCO - Stimulation

Durch eine mechanische Stimulation des femoralen Chordotonalorgans wird die Bewegung der Tibia nachempfunden. Dadurch werden die sensorischen Neurone des fCOs kontrolliert stimuliert und es lässt sich im fixierten Tier der Widerstandsreflex auslösen der am F2-Nerven extrazellulär abgeleitet werden kann.

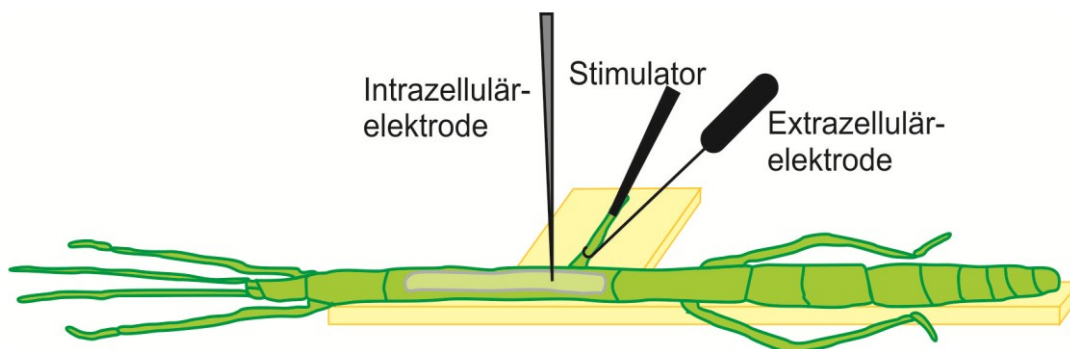
Zur Stimulation des fCOs wurde die Sehne des Organs im offenen Femur (Präparation siehe 2.4.2 extrazelluläre Ableitung) in einer Klammer befestigt, die mit einem mechanischen Stimulator verbunden war. Dieser Stimulator war ein benutzerdefinierbarer Rampen-Generator (Hofmann und Koch 1985). Die trapezförmigen Rampen hatten dabei eine Auslenkung von 300  $\mu\text{m}$ , was einer Tibiabewegung von ungefähr 60 ° entspricht (Weiland et al. 1986) (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2: Schematische Zeichnung der Femur-Präparation für die Stimulation des femoralen Chordotonalorgans (fCO) und extrazelluläre Ableitung des F2-Nerves (Hellekes 2012).** Der Femur wurde dorsal geöffnet, sodass die Sehne des fCO mithilfe einer Klammer in einen Stimulator gespannt werden konnte, der rampenförmige Bewegungen ausführte (Stimulationsspur links oben). Gleichzeitig wurde mit einer Hakenelektrode der F2-Nerv extrazellulär abgeleitet. Bei der Präparation wurde darauf geachtet, dass das fCO frei lag, um von der Insektizidlösung umspült werden zu können.

### 2.4.2 Extrazelluläre Ableitung

Für die extrazellulären Ableitungen wurden Methoden verwendet, die bereits in der Literatur beschrieben sind (Büschges 1989; Büschges 1994; Sauer et al. 1995): Beim Versuchstier (*Carausius morosus*) wurde sowohl das linke Mittelbein komplett entfernt als auch das rechte Mittelbein im oberen Drittel der Tibia abgeschnitten. Dann wurde das Tier mit der ventralen Seite nach oben auf eine Plattform aus Venerit geklebt, die Vorder- und Hinterbeine parallel zum Körper befestigt und das rechte Mittelbein rechtwinklig zum Körper fixiert (Abb. 2.3), wobei der Femur-Tibia-Winkel bei ungefähr  $120^\circ$  lag. Zur Fixierung diente Zahnzement (Protemp II; 3M ESPE, St. Paul). Für die extrazelluläre Ableitung wurde ein längliches Fenster in die ventrale Seite des Femurs geschnitten und das Bein dann mit *Carausius*-Ringer umspült. So konnte der F2-Nerv mithilfe einer modifizierten Hakenelektrode abgeleitet werden (Schmitz et al. 1991) (Abb. 2.2). Sowohl Aufnahmen, als auch die Stimulationsspur wurden hundertfach verstärkt (Vorverstärker MA101, Elektronikwerkstatt, Universität zu Köln) und dann noch einmal verstärkt und gefiltert (4-Kanal-Anpassungs-Verstärker ModelMA102, Elektronikwerkstatt, Universität zu Köln). Aufgezeichnet und analysiert wurden die Daten mit Spike2 (Version 7.01, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Großbritannien).



**Abb. 2.3: Schematischer Versuchsaufbau für extra- und intrazelluläre Versuche.** Im rechten Mittelbein, welches im  $90^\circ$  Winkel zum Thorax befestigt wurde, konnte das fCO stimuliert und der F2-Nerv mit einer Hakenelektrode abgeleitet werden. Im Thorax wurde das mesothorakale Ganglion auf einem Ganglienhalter befestigt und mit einer scharfen Glaselektrode konnten die sensorischen Neurone des fCOs abgeleitet werden.

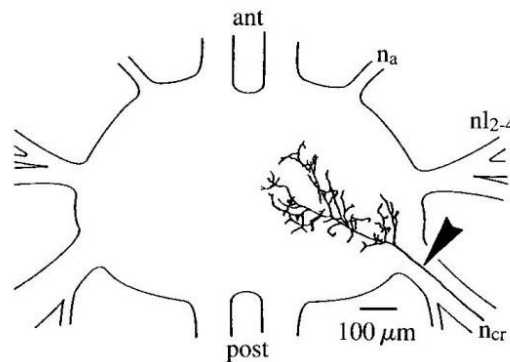


Die extrazellulären Ableitungen dienten parallel zu intrazellulären Ableitungen als Positivkontrolle: Einerseits um sicherzustellen, dass das Tier noch vital ist, auch wenn keine Reaktionen in den afferenten Neurone des fCOs zu sehen war. Andererseits zur Kontrolle, ob die femoralen Motoneurone, wie bei Ausborn et al. (2005) beschrieben, durch die Insektizide aktiviert wurden, auch falls einzelne afferente Neurone nicht auf die Zugabe von Insektiziden reagieren sollten.

### **2.4.3 Intrazelluläre Ableitung**

Für die intrazellulären Ableitungen wurde der Thorax des Versuchstieres (*Carausius morosus*) im Bereich des mesothorakalen Ganglions ventral geöffnet und mit Minutien aufgespannt. Der Darm und das Fettgewebe wurden entfernt, so dass das Nervengewebe, besonders das mesothorakale Ganglion, frei lag. Der Thorax wurde mit *Carausius*-Ringer (pH = 7,2, Weidler und Diecke 1969) gefüllt. Daraufhin wurde das Ganglion auf einem mit Wachs beschichteten Ganglienhalter platziert (Abb. 2.3). Die äußere Ganglienhülle wurde mit Kaktusnadeln (*Nopalea dejecta*) aufgespannt, wodurch das Ganglion am Halter befestigt wurde, um Bewegungen des Ganglions zu verhindern. Nach dem Absaugen des Ringers wurde die nun freiliegende innere Ganglienhülle mit Pronase E (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 40 Sekunden angedaut, um das Eindringen der Glaselektrode in das Ganglion zu erleichtern. Danach wurde das Ganglion mehrfach mit Ringer gespült und der Thorax wieder mit Ringer gefüllt.

Die Aktivität der sensorischen Neurone des fCOs wurde in deren Axonen gemessen. Dafür wurden die Zellen im Eintrittsbereich des Nervus cruris ins Ganglion intrazellulär abgeleitet (Abb. 2.4).



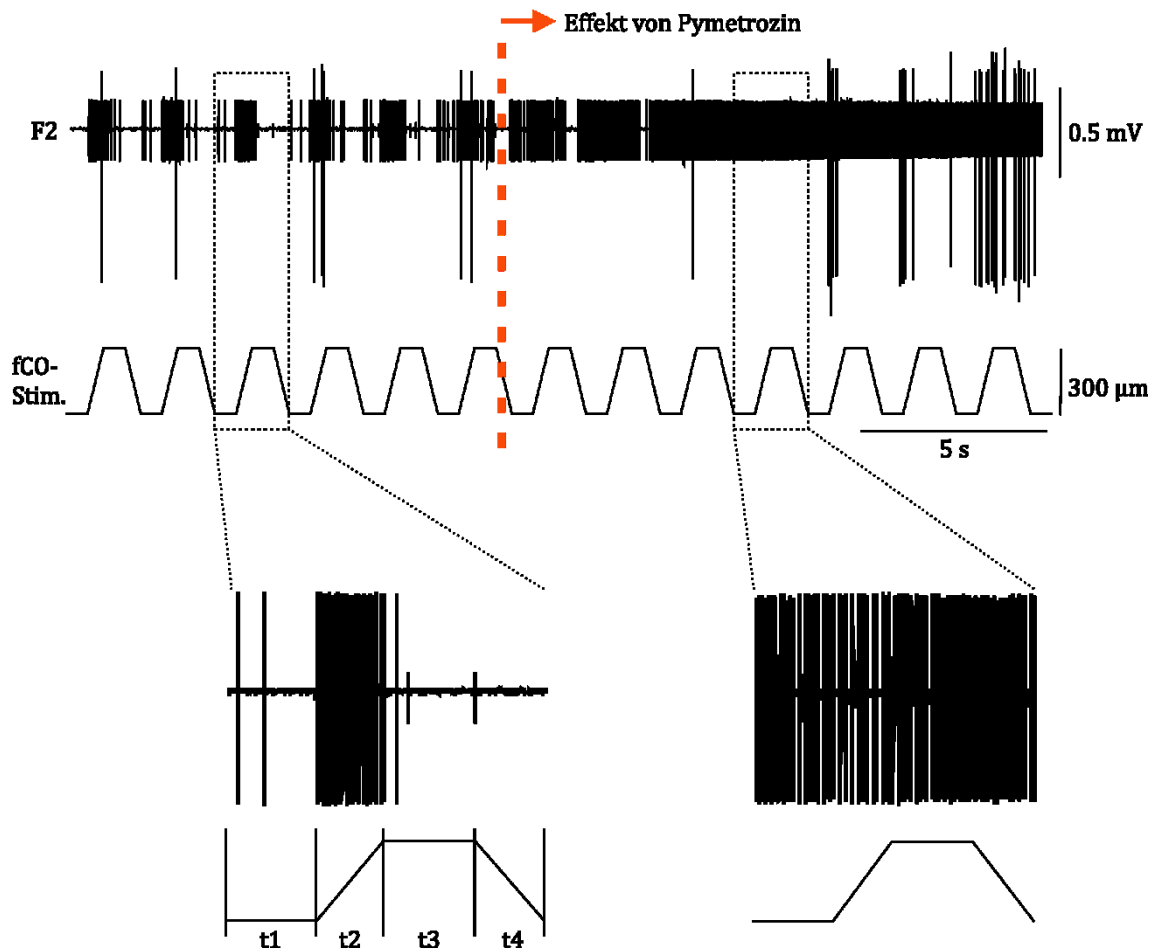
**Abb. 2.4: Struktur der sensorischen Neurone des fCOs im Ganglion.** Elektrische Ströme in den Neuronen werden im Übergangsbereich des Nervus cruris ( $n_{cr}$ ) zum mesothorakalen Ganglion gemessen (Pfeil) (Büschges 1994).

Die verwendete Glaselektrode war mit 3 M Kaliumacetat und 0,1 M Kaliumchlorid Lösung gefüllt und hatte einen Widerstand von 20-35 M $\Omega$ . Die intrazellulären Ableitungen wurden sowohl mit einem 4-Kanal-Anpassungsverstärker Model MA102 (Elektronikwerkstatt, Universität zu Köln) verstärkt als auch durch einen Brückenverstärker (Ba-1S, npi electronic GmbH, Tamm, Deutschland) verstärkt und gefiltert. Zur Analog-Digital-Umwandlung wurde der CED 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Großbritannien) mit einer Zwischenschnittstelle genutzt. Aufgezeichnet und analysiert wurden die Daten mit Spike2 (Version 7.01, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Großbritannien).

## 2.5 Konzentrationsreihen der Insektizide an *Carausius morosus*

Zur Bestimmung der wirksamen Konzentrationen verschiedener Insektizide wurde der F2-Nerv extrazellulär abgeleitet und gleichzeitig das fCO stimuliert. Das fCO wurde mit jeweils 30 ml Lösungen verschiedener Konzentrationen umspült. Dabei wurde mit 1 nM begonnen und in Zehnerpotenzen bis zu 10  $\mu$ M erhöht. Anhand der Aktivität des F2-Nervs konnte so bestimmt werden ab welcher Konzentration ein Insektizid wirksam war. Die Wirksamkeit eines Insektizids wurde hierbei definiert durch die Angleichung der Aktivität (Aktionspotentialfrequenz) während der Elongationsphase an die Aktivität während der Relaxationsphase (Abb. 2.5), also des Momentes indem die Extensor Motoneurone nicht mehr auf den Stimulus reagieren, sondern unabhängig davon

Aktionspotentiale generieren. Der F2-Nerv zeigte somit bei Einfluss durch ein Insektizid eine tonische Aktivität, im Vergleich zur phasischen Aktivität während der Reflexumkehr. Für die Auswertung wurden jeweils nach Zugabe der 30 ml einer Konzentration drei aufeinanderfolgende fCO-Stimulationen ausgewertet. Dazu wurden die Aktivität während der Elongation (Anzahl der Aktionspotentialfrequenz) und die Aktivität während der Relaxation (Aktionspotentialfrequenz) gemittelt. Dann wurde die normierte Frequenz in Prozent aufgetragen, wobei die Aktivität während der Vorkontrolle mit Ringer als 100% festgelegt wurde. Falls ein Insektizid keine Wirkung zeigte wurde Pymetrozin (1  $\mu$ M) als Positivkontrolle genutzt, um einen Präparationsfehler auszuschließen. In diesem Versuch wurden folgende Insektizide verwendet: Pymetrozin, Flonicamid, BCS-CJ75565, BCS-CK98573, BCS-AH27783, BCS-BZ72191, BCS-AJ11868, BCS-AA86075.



**Abb. 2.5: Beispiel für den positiven Effekt eines Insektizides, hier Pymetrozin.** Die phasische Aktivität der Extensor Motoneurone verändert sich nach Zugabe eines Insektizids zu einer tonischen Aktivität. Die Aktivität der Extensor Motoneurone (F2) wird somit durch das Insektizid stimulusunabhängig. t1 bis t4 beschreiben die einzelnen Phasen der Stimulation: t1 = relaxierte Phase, t2 = Elongation, t3 = elongierte Phase, t4 = Relaxation.

## 2.6 Berechnung der Frequenzdifferenz von verschiedenen Phasen eines Stimulus

Um zu sehen, wie sich die Reaktion auf einen Stimulus über die Zeit verändert und wann eine Zelle stimulusunabhängig Aktionspotentiale generiert, wurde die Differenz der Aktivität von Neuronen während verschiedener Stimulationsphasen berechnet ( $\Delta f$ ). Sobald die Aktivität gleich hoch war, also die Differenz gegen null ging, konnte davon ausgegangen werden, dass die Zelle nicht mehr auf den Stimulus reagiert. Dabei wurden zwei  $\Delta f$  unterschieden:  $\Delta f(P)$  und  $\Delta f(V)$ .

$$\Delta f(V) = \frac{APs(t2)}{1 \text{ sek}} - \frac{APs(t3)}{1 \text{ sek}}$$

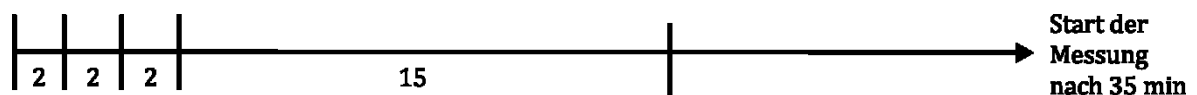
$$\Delta f(P) = \frac{APs(t3)}{1 \text{ sek}} - \frac{APs(t1)}{1 \text{ sek}}$$

$\Delta f(P)$  und  $\Delta f(V)$  beziehen sich auf die Aktivität von einzelnen sensorischen Neuronen des fCOs.  $\Delta f(P)$  berechnet die Differenz zwischen elongierter und relaxierter Phase,  $\Delta(V)$  die Differenz zwischen Elongation und elongierter Phase (Phasenbeschreibung: Abb. 2.5).

## 2.7 Reaktion in Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumkonzentration bei *Carausius morosus*

### 2.7.1 Gesenkte Calciumkonzentration: Habituation und Reaktion auf Pymetrozin

Um zu testen ob die Reaktion auf Pymetrozin calciumabhängig ist, wurden extrazelluläre Ableitungen des F2-Nervs durchgeführt, während denen die Calciumkonzentration der Ringerlösung geändert wurde. Wie bei di Caprio et al. (2002) wurde dabei Calcium durch Barium (7,5 mM) ersetzt, um eine Reaktion bei reduziertem Calcium zu erzeugen. Barium hat die Eigenschaft mit Calcium-Bindestellen zu interagieren und so das intrazelluläre Calcium zu verdrängen, gleichzeitig kann es aber keine calciumabhängige Reaktion hervorrufen. Der Ringeraustausch wurde viermal in Abständen von 2 Minuten durchgeführt und danach noch ein fünftes Mal nach 15 Minuten. Nach dem letzten Ringeraustausch wurde noch einmal Zeit gelassen bevor die Messungen starteten, sodass der modifizierte Ringer insgesamt 30-35 Minuten wirken konnte (Abb. 2.6). Während des Stimulationsprotokolls wurden fünf Zyklen hintereinander geschaltet, die jeweils aus 2 Minuten Ruhe und 1 Minute Dauerstimulation bestanden. Dieses Protokoll wurde vor und nach dem Ringeraustausch gestartet, um die AP-Frequenz der Kontrolle (vor dem Ringeraustausch) und die der Messung unter modifiziertem Ringer zu vergleichen. Diese Messreihe diente der Beantwortung der Frage, ob die Habituation während der Stimulusantwort über die Zeit Calcium abhängig ist und sich so aufgrund der Zugabe des Bariums ändert. Danach wurde eine Lösung aus dem modifizierten Ringer und Pymetrozin auf das femorale Chordotonalorgan gegeben um zu kontrollieren, ob weiterhin die Reaktionsfähigkeit auf das Insektizid gegeben ist.



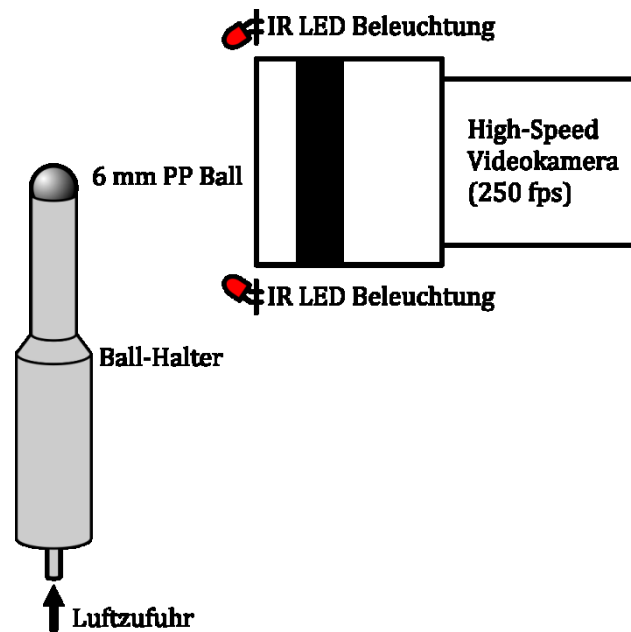
**Abb. 2.6: Zeitliche Reihenfolge der Spülvorgänge.** Die ersten vier Spülvorgänge hatten jeweils einen Abstand von 2 Minuten. Der fünfte und letzte Spülgang fand 15 Minuten nach dem vierten statt. Nach insgesamt 35 Minuten Spülzeit startete die Messreihe.

### **2.7.2 Erhöhte Calciumkonzentration: Reaktion auf Pymetrozin**

In diesen Versuchen wurde der Calciumgehalt des Ringers von 7,5 mM auf 22,5 mM erhöht, um die Auswirkungen einer erhöhten Calciumkonzentration zu testen. Der Ringer wurde, wie in Abschnitt 2.7 beschrieben, ausgetauscht. Nach dem Austausch wurde auch hier Pymetrozin mit dem modifizierten Ringer über das fCO gespült, um zu sehen ob eine Reaktion noch möglich ist.

## **2.8 Beinbewegungen von *Drosophila melanogaster* unter Einfluss von Pymetrozin**

Um die Laufbewegungen von *Drosophila* unter Einfluss von Pymetrozin zu beobachten, wurden Videos von Fliegen auf einem luftgelagerten Laufball aufgenommen. Am Thorax der Fliege wurde eine Halterung mit blaulichthärtendem Kleber (3M ESPE Sinfony) befestigt, sodass die Fliege mithilfe von Mikromanipulatoren (Narishige, Japan) in eine natürliche Laufposition über dem auf dem Halter liegenden Ball platziert werden konnte. Neben dem Ball wurde eine Kamera (AOS-S-PRI, AOS Technologies AG, Baden Daettwil, Schweiz; Auflösung 320 x 240, Bildrate 250 fps, Shutterzeit 400  $\mu$ s) aufgebaut, deren Objektiv von einem Ring aus Infrarot-Leuchten umgeben war (Abb. 2.7). So konnte die Fliege gleichmäßig beleuchtet werden, jedoch konnte die Fliege das Licht nicht wahrnehmen und wurde so nicht beeinflusst. Gefilmt wurde die Fliege von der Seite, um die Koordination der zur Kamera gerichteten Beine analysieren zu können. Aufgezeichnet und umgewandelt wurden die Videos mit der Software AOS Imaging Studio V.3.4.7 (AOS Technologies AG, Baden Daettwil, Schweiz). Pymetrozin wurde über eine Fütterung während des Versuches zugeführt. Die Fliegen wurden zuvor 16 Stunden nur mit Wasser gefüttert. Während des Versuches wurde ihnen dann Mangosaft mit Pymetrozin aus einer Hamilton-Spritze angeboten, sodass sie diesen trinken konnten, während sie schon über dem Laufball befestigt waren (Abb. 3.16 A).



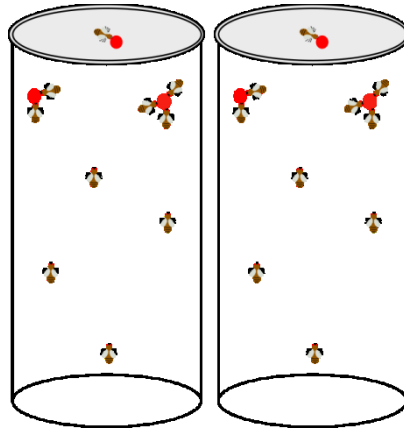
**Abb. 2.7: Schematischer Versuchsaufbau zum Filmen der Laufbewegungen einer *Drosophila*.** Die Fliege wird auf einem Ball platziert, der durch einen Halter gestützt wird, durch den mit Hilfe eines Luftstroms der Ball zum Schweben gebracht wird. Eine High Speed Videokamera filmt die Fliege von der Seite. Die Beleuchtung wird durch einen Kranz aus IR LEDs, der um das Objektiv der Kamera läuft, sichergestellt. (Abbildung zur Verfügung gestellt von T. Bockemühl, Universität zu Köln)

## 2.9 Negative Gravitaxis bei *Drosophila melanogaster* unter Einfluss von Pymetrozin

Zur Bestimmung der Wirksamkeit der Insektizide auf die einzelnen *Drosophila*-Mutanten wurden Versuche durchgeführt, bei denen negative Gravitaxis untersucht wurde. Das natürliche Verhalten zeigt sich dadurch, dass die Fliegen in einem Glasröhrchen nach oben laufen, also negatives gravitaktisches Verhalten zeigen. Dieses Verhalten sollte eingeschränkt sein, sobald die Fliegen Insektizide zu sich genommen haben, da sie zum einen durch die Aufnahme des Insektizides eine eingeschränkte Beinkoordination aufweisen müssten. Zum anderen sollte der Orientierungssinn gestört sein, da die Aufnahme des Insektizides direkt die Chordotonalorgane der Antennen beeinflusst. Das Chordotonalorgan in den Antennen von *Drosophila*, das Johnstonsche Organ (JO), dient auf der einen Seite dem Hören, auf der anderen Seite aber auch der Registrierung der Gravitation (Kamikouchi et al. 2009). Für diese unterschiedlichen Wahrnehmungen sind verschiedene Populationen von sensorischen Neuronen zuständig, die zu



unterschiedlichen Regionen im Gehirn projizieren. Sobald diese Neurone durch Pymetrozin beeinflusst werden, sollte die Fliege Schwierigkeiten mit der Orientierung haben, da sie nicht mehr eindeutig die Gravitation feststellen kann.



**Abb. 2.8: Versuchsaufbau für negative Gravitaxis Versuche.** In jeweils einem Glas wurden 10 Fliegen, die 20 Stunden zuvor nur Wasser bekommen haben, mit Kontrolllösung (links) bzw. Insektizidlösung (rechts) (rote Punkte) gefüttert. 15 und 30 Minuten nachdem die Fliegen in die Gläser überführt wurden, wurde die Anzahl der Tiere auf dem Boden des Glasröhrchens gezählt.

Für den Versuch wurden zwei Glasröhrchen genutzt, in dem jeweils zehn Fliegen (Männchen und Weibchen getrennt) getestet wurden (Abb. 2.8), die zuvor 20 Stunden bei 25 °C hungerten, indem sie nur Wasser, aber kein Futter bekamen. Am oberen Rand der Gläschen wurden für die Kontrollgruppen Tropfen einer 5 %-ige Saccharoselösung mit DMSO aufgetragen, für die Insektizid-Gruppen eine 1 µM Insektizid-Saccharoselösung. Die Lösungen waren außerdem mit roter Lebensmittelfarbe versetzt, um durch die Verfärbung des Abdomens erkennen zu können ob die Tiere getrunken haben. Nach Zugabe der Fliegen in die jeweiligen Gläschen wurde nach 15 min und 30 min gezählt, wie viele Tiere sich dann auf dem Boden des Röhrchens befunden haben. Für die Auswertung wurde mit dem t-Test berechnet, ob die Anzahl der Fliegen in den Kontrollgruppen und die der Insektizidgruppen sich unterscheiden. Signifikanz wurde in Abbildungen markiert durch: \* für ein Signifikanzlevel von  $p < 0.05$ , \*\* für  $p < 0.01$ , und \*\*\* für  $p < 0.001$ .

## **2.10 Proboscis Extension Response (PER) Versuche bei *Drosophila***

Dieser Versuch diente dazu herauszufinden, ob die einzelnen Proteine, die im Transduktionsprozess im Chordotonalorgan beteiligt sind, durch Pymetrozin und andere Insektizide beeinflusst werden. Die Proteine wurden mithilfe der UAS-Gal4-Methode in Gr5a-Rezeptoren eingefügt, um so über den PER eine Reaktion erkennen zu können (Phelps und Brand 1998).

Die Präparation wurde wie bei Shiraiwa und Carlson (2007) beschrieben durchgeführt. Die Fliegen wurden erst 3 - 4 Tage in frischen Futtergläschen mit normalem Futter gehalten. Danach wurden sie für 24 - 28 Stunden bei 23 °C hungern gelassen indem ihnen nur noch Wasser zur Aufnahme zur Verfügung stand. Mithilfe eines Luftstroms wurden einzelne Fliegen in einer gelben Pipettenspitze (1 – 200 µl) platziert. Die Pipettenspitze wurde auf Augenhöhe der Fliege abgeschnitten und eingekerbt, sodass der Kopf der Fliege mit dem Proboscis frei lag. Mittels eines kleinen Dochtes aus Kimwipe, der mit der jeweiligen Kontroll- oder Versuchslösung getränkt war, wurden die Lösungen mit dem Labellum in Kontakt gebracht. Als Negativstimulus wurde Wasser genutzt, als Positivstimulus eine Saccharoselösung (100 mM). Nur, wenn die Fliegen vor und nach einem Versuch nicht auf das Wasser, jedoch auf die Zuckerlösung reagierten, wurden die Ergebnisse als messbar gewertet. Die Lösungen der Insektizide hatten eine Konzentration von 10 µM. In diesem Versuch wurden folgende Insektizide verwendet: Pymetrozin, BCS-AH27783, BCS-BZ72191, BCS-AJ11868.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Injektionsversuche

Mithilfe der Injektionsversuche sollte die allgemeine Wirksamkeit der Insektizide auf Stabheuschrecken untersucht werden, da diese bisher nur bei anderen Tierarten, wie zum Beispiel Blattläusen (*Aphis gossypii* und *Myzus persicae*) und Wanderheuschrecken (*Locusta migratoria*), gezeigt wurde (Ausborn et al. 2005; Harrewijn und Kayser 1997). Dabei lässt sich zusammenfassen, dass alle getesteten Insektizide ähnliche Reaktionen bei den Stabheuschrecken hervorrufen (Abb. 3.1). In der Regel zeigten die Stabheuschrecken gestreckte Beine. Diese Reaktion trat nach weniger als 5 Minuten auf, teilweise schon 10-20 Sekunden nach der Injektion. Die Tiere waren jedoch nicht direkt bewegungsunfähig, sondern zeigten weiterhin laufähnliche Bewegungsabläufe, die jedoch nur noch 1-2 Minuten andauerten. Die Bewegungsunfähigkeit hielt mindestens über die nächsten 10 Stunden an. Nach 24 Stunden konnten noch leichte Bewegungseinschränkungen registriert werden. Jedoch war ein klarer Rückgang dieser Einschränkung bei allen Insektiziden zu erkennen, bis hin zur problemlosen Laufbewegung.

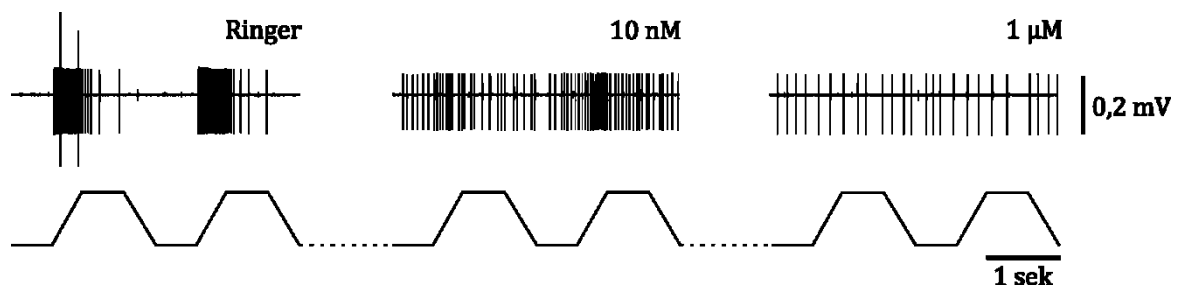


**Abb. 3.1: Injektionsversuche.** Das Verhalten einer Stabheuschrecke (*Carausius morosus*) nach einer Injektion mit Pymetrozin. In der Kontrolle ist zu sehen, dass die Stabheuschrecke auf ihren angewinkelten Mittel- und Hinterbeine steht. Die Vorderbeine sind gerade nach vorne gestreckt, was ein natürliches Verhalten der Stabheuschrecke ist. Bei mit Pymetrozin injizierten Tieren war bereits nach 1 Minute eindeutig die Wirkung von Pymetrozin zu erkennen. Die Beine waren während der Laufbewegung sehr stark gestreckt und konnten teilweise nicht mehr gebeugt werden. Nach nur wenigen Minuten war das Tier bewegungsunfähig. Dieser Zustand hielt über mehrere Stunden an. Nach 24 Stunden war das Tier jedoch wieder normal beweglich.

### 3.2 Konzentrationsreihen

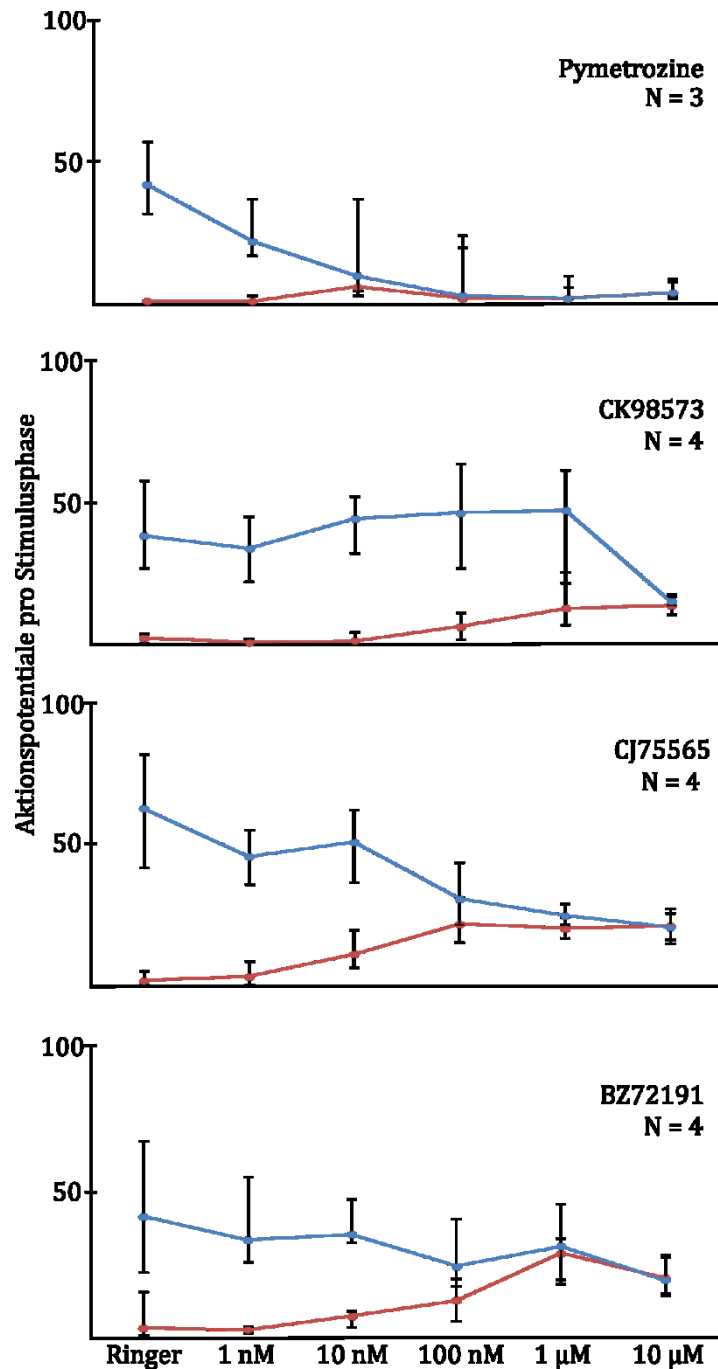
Mit Hilfe von Konzentrationsreihen sollten die jeweiligen Wirkkonzentrationen der einzelnen, vor allem unbekanntem Insektizide bestimmt werden. Als wirksam galt ein Insektizid, wenn es dazu führte, dass der Widerstandsreflex der Extensor Motoneurone in eine anhaltende Aktivität über eine komplette Stimulationsrampe überführt wurde, was einer Streckung des Beines gleichzusetzen ist (Abb. 2.5).

Pymetrozin zeigte sich eindeutig als potentestes Insektizid ( $N = 3$ ). Eine Reaktion zeigte sich schon bei 1 nM und verstärkte sich noch bis zur fast völligen stimulationsunabhängigen Aktivität bei 100 nM (Abb. 3.3). Diese Ergebnisse zeigen jedoch nicht das bereits beschriebene Alles-Oder-Nichts-Prinzip (Ausborn et al. 2005), sondern eine konzentrationsabhängige Abstufung der Reaktion (Abb. 3.2).



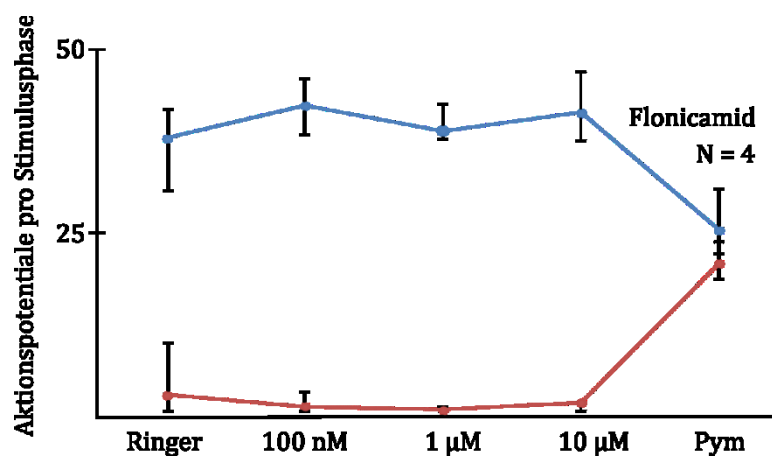
**Abb. 3.2: Vergleich der Extensor Motoraktivität (F2-Nerv) unter dem Einfluss von Ringer und zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Pymetrozin.** Während der Kontrollphase mit Ringer ist ein eindeutiger Widerstandsreflex zu sehen, das heißt während der Elongation sind die Extensor Motoneurone aktiv und während der Relaxation gehemmt. Bei einer Konzentration von 10 nM ist diese Hemmung weitestgehend aufgehoben, jedoch lässt sich immer noch eine höhere Aktivität während der Elongation erkennen. Dieser Unterschied ist bei einer Konzentration von 1 µM nicht mehr zu sehen. Die Extensor Motoneurone sind somit unabhängig vom Stimulus aktiv.

CK98573 ( $N = 4$ ) ist ab einer Konzentration von 10 µM wirksam, was in diesem Fall nicht durch eine vorherige graduelle Wirksamkeit zu erkennen war, wie zum Beispiel bei CJ75565 und BZ72191 (Abb. 3.3). CJ75565 ( $N = 4$ ) zeigte schon bei 1 nM leichte Wirksamkeit, die sich bei 100 nM noch verstärkte und bei 10 µM zur vollen Ausprägung kam. Bei BZ72191 ( $N = 4$ ) schien die Wirksamkeit erst ab 100 nM einzusetzen und verstärkte sich bis zum maximalen Effekt bei 10 µM.



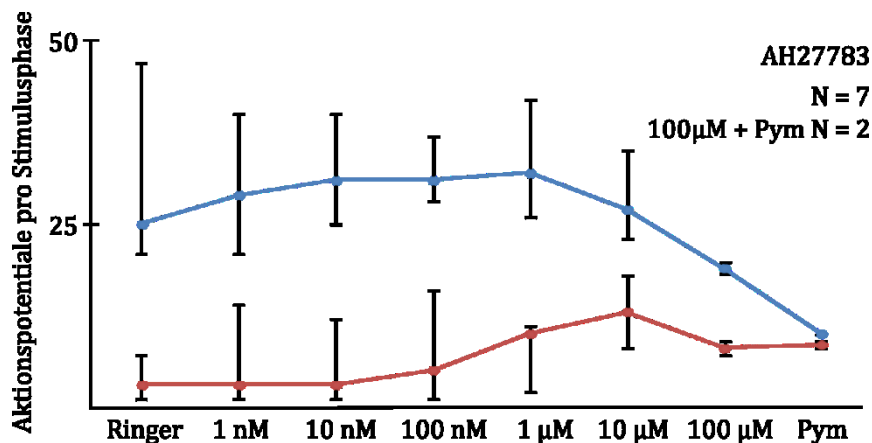
**Abb. 3.3: Konzentrationsreihen der Insektizide Pymetrozin, CK98573, CJ75565 und BZ72191.** Blaue Linie: Aktionspotentiale pro Elongation; Rote Linie: Aktionspotentiale pro Relaxation. Gezeigt sind Mediane und Quantile. Sobald Die Wirkung von Pymetrozin setzte bereits bei geringen Konzentrationen ein (1 nM) und stieg dann konzentrationsabhängig, bis zur stimulationsunabhängigen Aktivität, weiter an. Die Wirkung von CK98573 zeigte bei 1 μM schon eine Tendenz, setzte aber bei 10 μM ein, was im Vergleich zu allen anderen Insektiziden ungewöhnlich spät war. CJ75565 und BZ72191 haben ihren maximalen Effekt bei 10 μM, wobei bei CJ75565 schon um 1 nM eine Wirkung zu erkennen war, bei BZ72191 hingegen erst ab 100 nM.

Flonicamid hingegen zeigte ein gänzlich anderes Ergebnis (N = 4). Bei den Versuchen war zu erkennen, dass Flonicamid bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keine Reaktion hervorrief, die phasische Reizantwort der Extensor Motoneurone also bestehen blieb. Dieses Phänomen konnte allerdings nicht an der Präparation liegen, da die Kontrolle mit Pymetrozin im Anschluss einwandfrei die erwartete vom Stimulus unabhängige Reaktion hervorrief (Abb. 3.4).



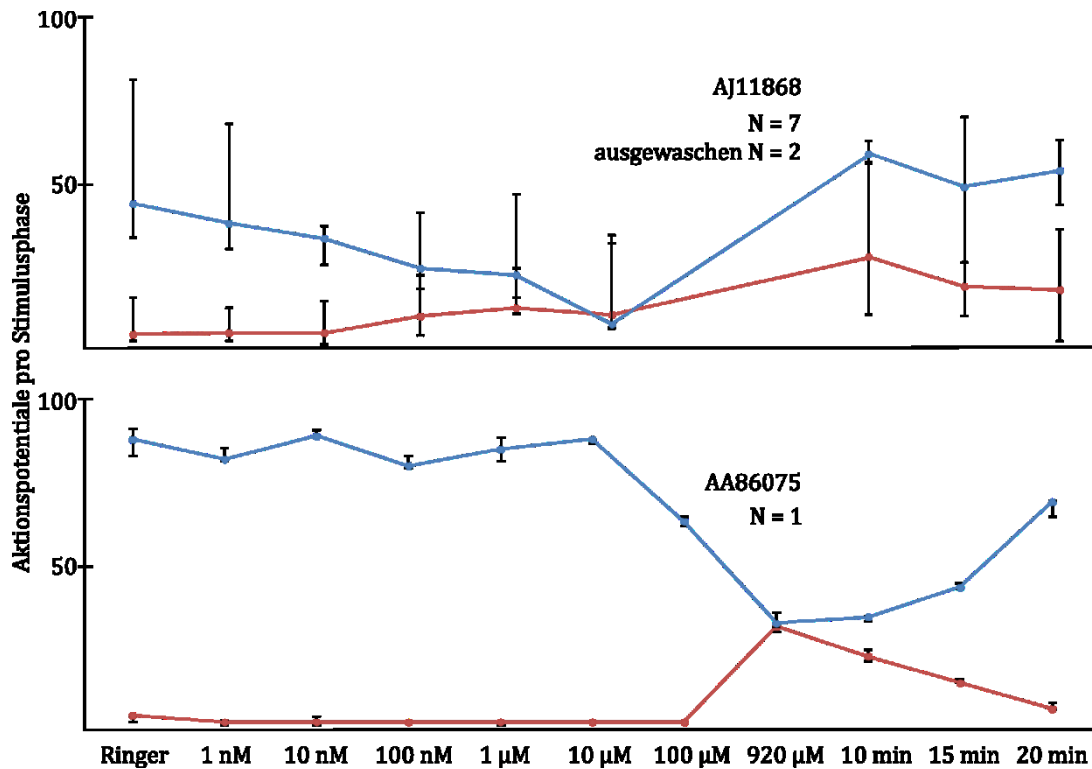
**Abb. 3.4: Flonicamid-Konzentrationsreihe.** Blaue Linie: Aktionspotentiale pro Elongation; Rote Linie: Aktionspotentiale pro Relaxation. Gezeigt sind Mediane und Quantile. Flonicamid zeigte bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keine Wirkung. Eine fehlerhafte Präparation konnte ausgeschlossen werden, da Pymetrozin als Kontrolle die erwartete Wirkung aufwies.

Das Insektizid AH27783 war im Vergleich ein wenig potentes Insektizid (Abb. 3.5). Sowohl bei 10  $\mu\text{M}$  als auch bei 100  $\mu\text{M}$  lässt sich tendenziell erkennen, dass es eine Wirkung hat, jedoch lässt sich keine eindeutige Aussage über die maximal wirksame Konzentration sagen (N = 7). Zur Kontrolle der Präparation wurde auch hier wieder Pymetrozin verwendet.



**Abb. 3.5: AH27783-Konzentrationsreihe.** Blaue Linie: Aktionspotentiale pro Elongation; Rote Linie: Aktionspotentiale pro Relaxation. Gezeigt sind Mediane und Quantile. Die maximal wirksame Konzentration ließ sich nicht bestimmen, jedoch war bei 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  tendenziell eine Wirkung zu erkennen. Die schwache Wirkung war nicht auf die Präparation zurückzuführen, da die Positivkontrolle mit Pymetrozin erfolgreich war.

Die wirksamen Konzentrationen der Insektizide AJ11868 und AA86075 (Abb. 3.6) unterschieden sich hingegen bei den Insektiziden. Die Aktivität der Extensor Motoneurone wurden bei AJ11868 bereits bei 100 nM beeinflusst (N = 7) und die vollständige Wirkung zeigte sich bei 10  $\mu\text{M}$ , wohingegen AA86075 erst in viel höheren Konzentrationen (920  $\mu\text{M}$ ) wirkte (N = 1). Wie durch die Versuche bestätigt, waren die beiden Insektizide auswaschbar (Information durch persönliches Gespräch mit Dr. U. Ebbinghaus, Bayer CropScience), also war, durch erneute Zugabe von Ringer, die Reaktion auf das Insektizid reversibel. Es wurde jedoch nicht ganz wieder der vorherige Reaktionszustand erreicht, was aber daran liegen könnte, dass nur 20 min gespült wurde. Eventuell wäre die Wirksamkeit bei beiden Insektiziden nach längerem Spülen wieder vollständig aufgehoben worden.



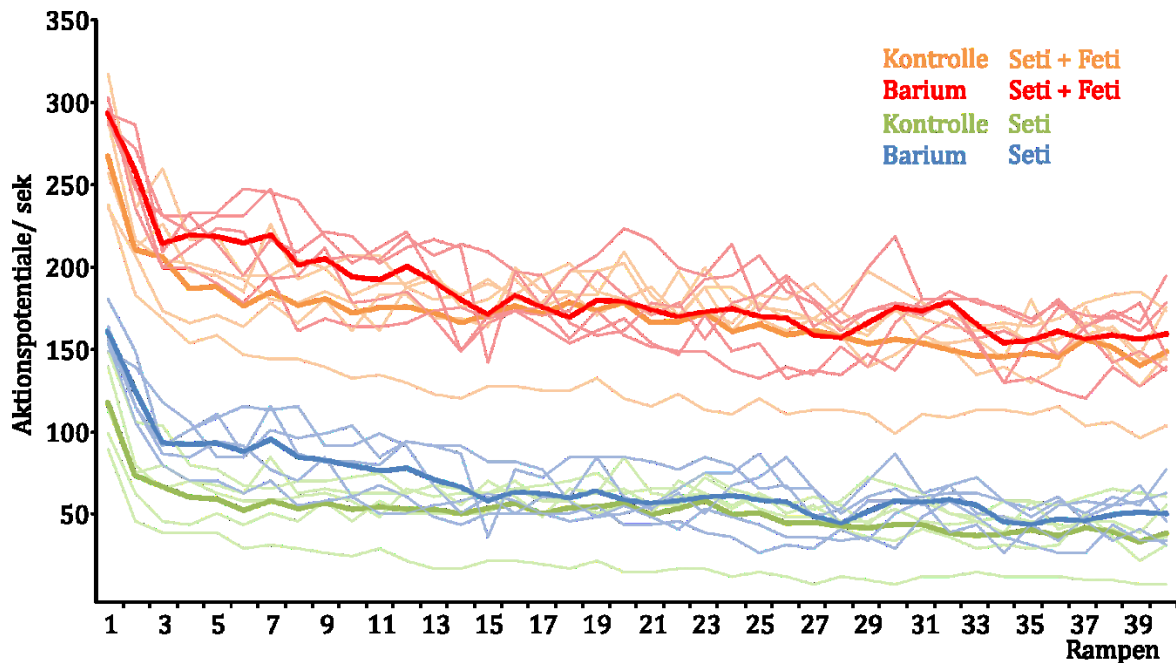
**Abb. 3.6: Konzentrationsreihe der Insektizide AJ11868 und AA86075.** Blaue Linie: Aktionspotentiale pro Elongation; Rote Linie: Aktionspotentiale pro Relaxation. Gezeigt sind Mediane und Quantile. Die Wirkung von AJ11868 setzte schon ab einer Konzentration von 10 nM langsam ein und wirkte vollständig bei einer Konzentration von 10 µM, es kam sogar dazu, dass die Aktivität während der Relaxation höher war, als die während der Elongation, was den negativen Wert erklärt. AA86075 hingegen wirkte erst bei sehr hohen Konzentrationen. Beide Insektizide waren auswaschbar und ihre Wirkung war teilweise reversibel.



### **3.3 Reaktion in Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumkonzentration**

#### **3.3.1 Erniedrigte Calciumkonzentration: Habituation und Reaktion auf Pymetrozin**

Um festzustellen ob die Calciumkonzentration für die Wirksamkeit von Pymetrozin eine Rolle spielt, wurde das Calcium im Ringer durch Barium ersetzt. Dadurch konnte auch gleichzeitig getestet werden, ob die geringe Calciumkonzentration eine Auswirkung auf die Habituation des Widerstandsreflexes des femoralen Chordotonalorgans hat (Abb. 3.7). Anhand der Reaktion der erregenden Extensor Motoneurone ließ sich erkennen, dass es keinen Unterschied zwischen der Reaktion im Kontrollringer und der Reaktion unter Barium gab (orange und rote Kurve, Abb. 3.7). Die Habituation ist also nicht durch den Austausch des Ringers beeinflusst worden. Genauso verhielt es sich mit der Reaktion auf Pymetrozin: Auch diese zeigte sich unter Barium genau wie unter normalem Ringer (grüne und blaue Kurven, Abb. 3.7). Die Extensor Motoneurone zeigten tonische Aktivität und reagierten nicht mehr auf die Stimulation des fCOs. Ob die Reaktion wirklich unabhängig von Calcium bzw. Barium ist oder das Barium nicht zum femoralen Chordotonalorgan diffundieren konnte lässt sich anhand dieses Versuches nicht nachvollziehen.



**Abb. 3.7: Verhalten der Extensor Motoneurone unter Bariumeinfluss.** Die Abbildung zeigt die Aktionspotentialfrequenz über jeweils 40 Rampen. Zu erkennen ist, dass unabhängig, ob Calcium oder Barium im Ringer vorhanden ist, die Adaptation über die Zeit die gleiche ist. Dünn = Einzelmessungen pro Ableitung; Dick = Mittelwert.

### 3.3.2 Erhöhte Calciumkonzentration: Reaktion auf Pymetrozin

Um zu testen, ob eine erhöhte Calciumkonzentration Auswirkungen auf die Wirksamkeit von Pymetrozin hat wurde der Kontrollringer gegen einen Ringer ausgetauscht, der 22 mM Calcium enthielt. Auch hier ließ sich, wie schon im Experiment mit Barium sagen, dass sich keine Auswirkung auf die Wirkung von Pymetrozin zeigte. Trotz des geänderten Ringers kam es zu einer vom Stimulus unabhängigen Reaktion durch Pymetrozin. Wie schon beim Versuch mit Barium (Abb. 3.7) lässt sich auch hier nicht klären, ob die Reaktion von Pymetrozin wirklich unabhängig von Calcium ist oder sich die intrazelluläre Calciumkonzentration aufgrund des Versuches nicht geändert hat.

### 3.4 Reaktion der sensorischen fCO-Neurone

#### 3.4.1 Pymetrozin

Um festzustellen, ob Pymetrozin spezifisch auf einzelne Typen von sensorischen Zellen wirkt oder auf alle Zelltypen die gleiche Wirkung hat und abhängig von einer fCO-Stimulation, also einem mechanischen Reiz ist, wurden intrazelluläre Einzelzelleitungen von unterschiedlichen Zelltypen gemacht. Mithilfe dieser Versuche sollte gezeigt werden, wie genau Pymetrozin auf die einzelnen Zellen wirkt: (1) Wie sich die Abhängigkeit der Aktivität vom Stimulus verändert. (2) Die Zeit bis zur Wirksamkeit dauert, sowohl in den sensorischen Zellen, als auch im Vergleich dazu in den Extensor Motoneuronen. (3) Wie sich die maximale Frequenz während der einzelnen Stimulationsphasen nach der Wirkung von Pymetrozin verändert.

Abb. 3.8 zeigt die Ableitung einer V+ Zelle bei dauerhafter fCO-Stimulation. Die Reaktion vor der Zugabe von Pymetrozin zeigte eine erhöhte Aktivität während der Elongation des fCOs, weshalb diese Zelle als V+ Zelle definiert wurde. Nach der Zugabe von Pymetrozin wurde die Reaktion stimulusunabhängig und die phasische Reizantwort ändert sich so zu einer tonischen Aktivität über den gesamten Stimulus. Diese Reaktion war auch bei weiteren Zelltypen unter Dauerstimulation zu beobachten (P-V+, P+V+, V-). An  $\Delta f$  (Abb. 3.9), also der Differenzberechnung einzelner Stimulationsphasen, lässt sich die Unabhängigkeit der Reaktion vom Stimulus gut erkennen, da die Differenz über die Zeit gegen Null geht. Die durchschnittliche Frequenz der vom Stimulus unabhängigen Reizantwort bei der abgeleiteten V+ Zelle war jedoch nicht so hoch, wie die während der Elongation zuvor. Während der Kontrollmessung erreichte die Frequenz ca. 190 Hz, nach der Wirkung von Pymetrozin maximal 120 Hz (Tab. 3.2).

Desweiteren wurde die Reaktion von sensorischen Zellen auf Pymetrozin ohne fCO-Stimulation getestet, um herauszufinden, ob die Wirksamkeit von Pymetrozin abhängig von einem mechanischen Reiz ist. Dabei waren die abgeleiteten Zellen in der Phase ohne fCO-Stimulation spontan aktiv (Abb. 3.10, mittelgroße Amplitude). Trotz der fehlenden fCO-Stimulation zeigten sie die gleiche Reaktion auf Pymetrozin, wie die Zellen unter Dauerstimulation. Dies war unabhängig vom Zelltyp (V+, V-, P+V-). Alle Zellen wurden aktiv nachdem das fCO mit Pymetrozin

umspült wurde und reagierten danach nicht mehr auf einen Stimulus. Hier zeigte sich die Frequenzentwicklung jedoch anders als bei der vorherigen V+ Zelle unter Dauerstimulation. Während der Kontrollphase zeigten sich Frequenzen von bis zu 30 Hz während der elongierten Phase (P+) und bis zu 60 Hz während der Relaxation (V-). Nach der Applikation von Pymetrozin hingegen stieg die Frequenz bis auf 80 Hz an (Tab. 3.2).

Um nun herauszufinden, ob die Reaktion abhängig von der spontanen Aktivität einer Zelle während des Umspülens des fCOs mit Pymetrozin ist, wurde das fCO so entspannt, dass es einer getreckten Haltung der Tibia entsprach, also einem Femur-Tibia Winkel von 180°. Diese Ausgangsstellung führte dazu, dass die abgeleiteten Zellen ohne Stimulation des fCOs keine Aktionspotentiale generierten. Auch bei diesen Zellen (V+, P+V+-, P+A-) zeigte Pymetrozin die zuvor beschriebene Wirkung (Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Die Zellen wurden nach kurzer Zeit alle aktiv und konnten danach nicht mehr auf ihre ursprüngliche Weise auf einen Stimulus reagieren. Die Frequenz nach der Zugabe von Pymetrozin war auch hier mit bis zu 80 Hz geringfügig höher als bei der Kontrollstimulation, bei der während der Elongation (V+) eine Frequenz von bis zu 75 Hz auftrat, während der elongierten Phase (P+) bis zu 23 Hz und während der Relaxation (V-) bis zu 54 Hz (Tab. 3.2). In Abb. 3.8 ist zusätzlich zu sehen, dass die V+ Zelle unter der anhalten Stimulation die Aktivität kontinuierlich beibehält. Die setzte sich fort bis zum Abbruch der Ableitung wenige Minuten später. Dieses Phänomen ist allerdings nur bei dieser einen Zelle zu erkennen. Bei allen anderen Zellen brach die Aktivität spontan, wie in Abb. 3.10 zu sehen, ab.

Der Beginn der Aktivitätsveränderung aufgrund von Pymetrozin zeigte sich bei den Extensor Motoneuronen (F2-Nerv) unterschiedlich im Vergleich zur Aktivität der sensorischen Neurone des fCOs. Die Extensor Motoneurone wurden, wie schon bei Ausborn (2005) beschrieben alle tonisch aktiv und reagierten nicht mehr auf die Stimulation des fCOs. Der Zeitpunkt der maximalen Frequenzveränderung aufgrund von Pymetrozin ist jedoch unterschiedlich: In zwei Ableitungen zeigt sich der Verlust der Stimulusabhängigkeit der Extensor Motoneurone zum gleichen Zeitpunkt wie bei den sensorische Neuron (Abb. 3.8 und Abb. 3.11) (dauerhafte Stimulation: zweimal V+), in fünf Ableitungen später als das sensorische fCO-

Neuron (Abb. 3.10) (dauerhafte Stimulation: V-; ohne Stimulation, aktiv: P+V-, V+, V-; nicht klar definierte Stimulation: P+V+-) und in einer Ableitung sogar früher (dauerhafte Stimulation: P-V+). Bei drei Ableitungen konnte aufgrund der nicht vorhandenen F2-Ableitung keine Aussage getroffen werden. Die Zeiten der Latenz vom Beginn der Spülung mit Pymetrozin bis zur höchsten durchschnittlichen Frequenz sind, sowohl für die sensorischen Neurone des fCOs als auch für die Extensor Motoneurone im F2-Nerv, in Tab. 3.2 aufgeführt.

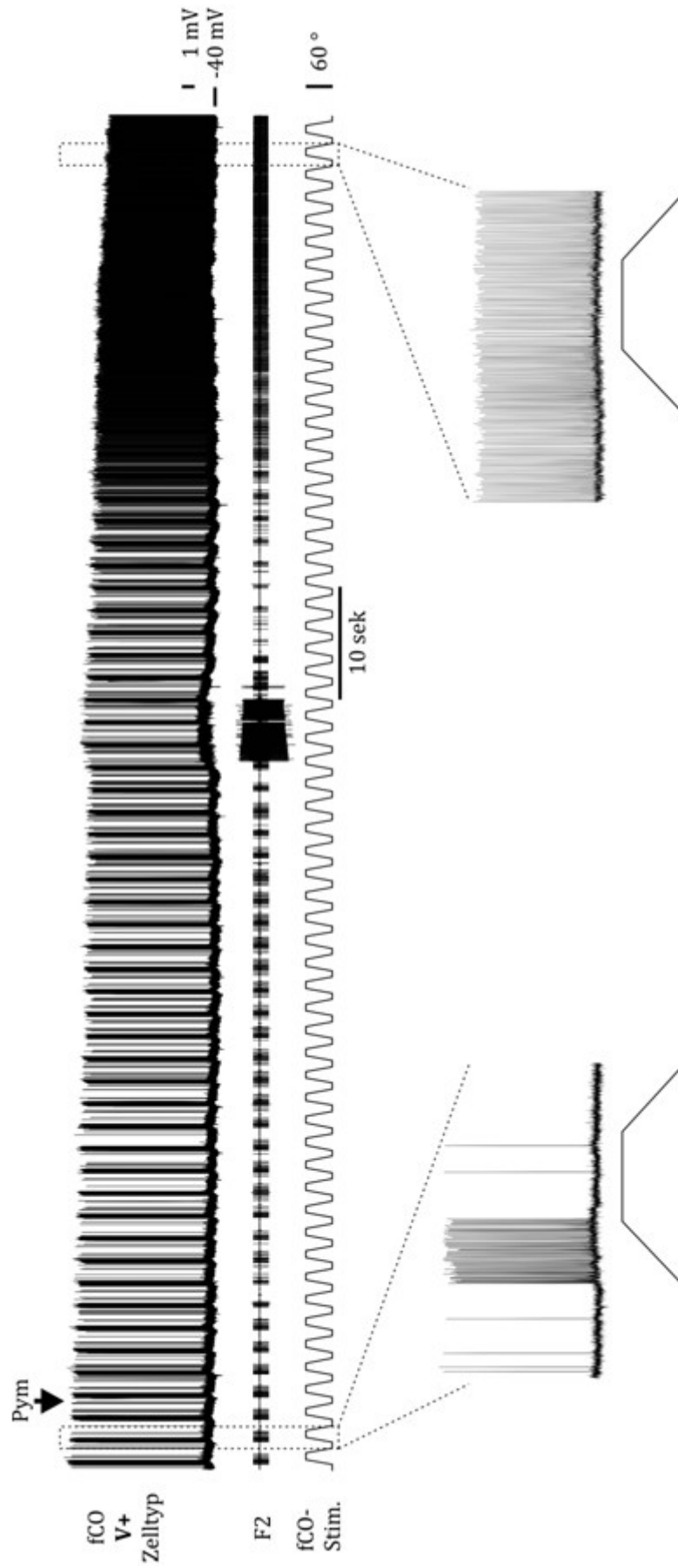
Damit lässt sich zusammenfassen, dass Pymetrozin auf alle getesteten Zelltypen (A+ nicht getestet) wirkt, indem die Aktionspotentiale der sensorischen Zellen erst Stimulus unabhängig generiert werden und die Zellen dann inaktiv sind (Tab. 3.1). Während der Änderung der Frequenz aufgrund von Pymetrozin lässt sich keine Änderung in der Amplitude oder sonstigen Form der Aktionspotentiale erkennen.

**Tab. 3.1: Anzahl der abgeleiteten Zelltypen.** Zelltypen, die aus mehreren Untereinheiten bestanden, wurden hier aufgetrennt, um die Anzahl der gemessenen Zelltypen zu verdeutlichen. Eine Auflistung der abgeleiteten Zellen, ohne Aufspaltung in einzelne Untertypen ist in Tab. 3.2 zu sehen. Die Aktivität beschreibt, ob eine Zelle ohne eine Stimulation spontan aktiv ist oder inaktiv.

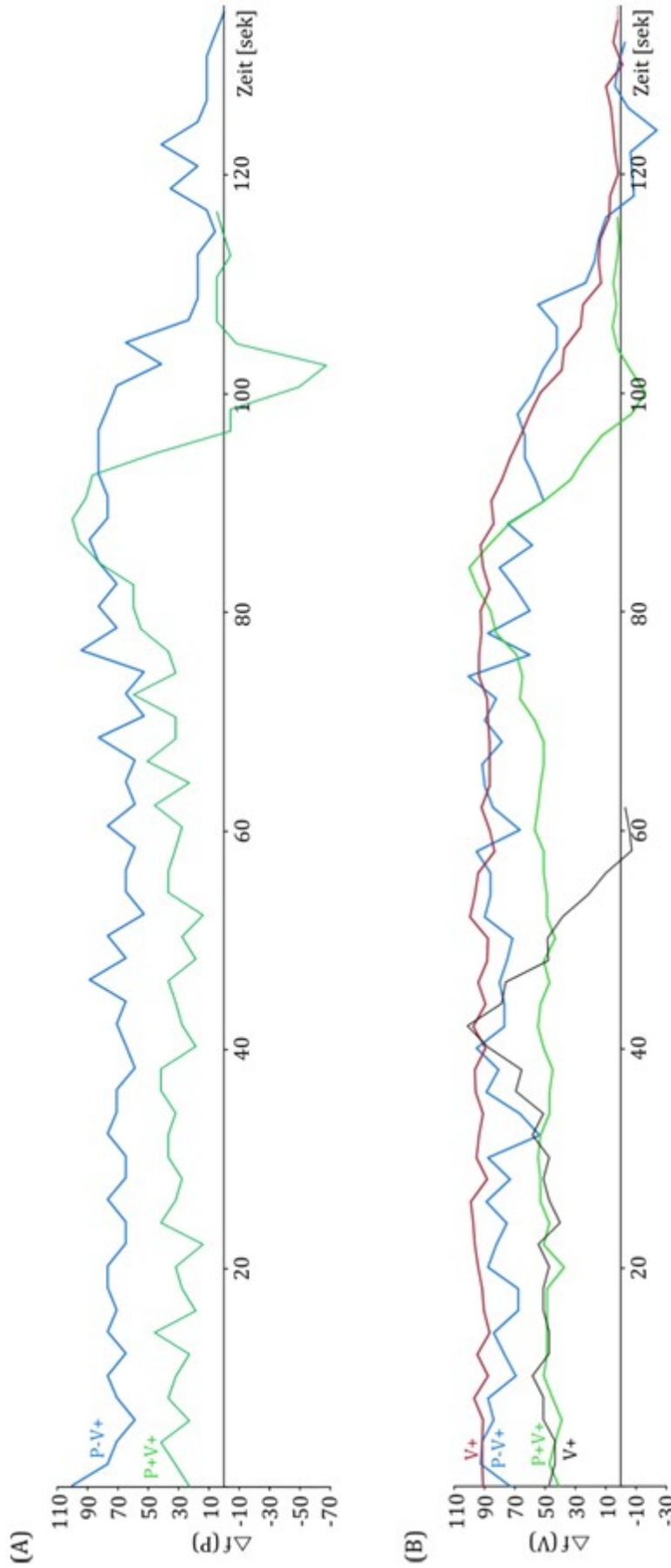
	Aktivität	P+	P-	V+	V-	A-
Dauerstimulation		1	1	5	1	
ohne Stimulation	+	1		1	2	
ohne Stimulation	-	2		2	1	1

**Tab. 3.2: Maximum der durchschnittlichen Frequenzen der intrazellulär abgeleiteten Zellen im Vergleich zum Maximum der durchschnittlichen Frequenz nach der Wirkung von Pymetrozin.** Die Maximale Frequenz wurde während der gesamten Ableitung durch Spike2 in Zeitabschnitten von 0,1 Sekunde berechnet. Die Frequenzen wurden für die Untereinheiten einzeln bestimmt. Diese Messungen wurden kurz vor Beginn der Spülung mit Pymetrozin gemacht. Die Aktivität der Zellen verhielt sich nicht einheitlich gegenüber den Kontrollmessungen ohne Pymetrozin. Orange bedeutet, dass die Frequenz über der Frequenz unter Pymetrozin-Einfluss war. Grün bedeutet, dass die Frequenz der Kontrolle unter der Frequenz der Zelle mit Pymetrozin lag. Die Latenz beschreibt den Zeitraum zwischen dem Beginn des Spülens mit Pymetrozin und dem Zeitpunkt der maximalen Frequenz unter dem Einfluss von Pymetrozin. Es ist zu erkennen, dass die Latenz sehr schwankend ist und am längsten während der Dauerstimulation auftritt.

Zelltyp (jeweils n = 1)	P+	P-	V+	V-	A-	Pymetrozin	Latenz fCO	Latenz F2
<i>Dauerstim.</i>								
P-V+		76 Hz	115 Hz			73 Hz	115 sek	110 sek
P+V+	67 Hz		140 Hz			137 Hz	95 sek	-
V+			190 Hz			120 Hz	117 sek	118 sek
V+			76 Hz			114 Hz	50 sek	50 sek
V-				160 Hz		141 Hz	91 sek	123 sek
<i>ohne Stim., aktiv</i>								
P+V-	30 Hz			60 Hz		80 Hz	63 sek	81 sek
V+			40 Hz			36 Hz	75 sek	95 sek
V-				310 Hz		145 Hz	57 sek	86 sek
<i>ohne Stim., inaktiv</i>								
P+V+-	23 Hz		75 Hz	54 Hz		80 Hz	52 sek	59 sek
P+A-	70 Hz				61 Hz	76 Hz	35 sek	-
V+			30 Hz			79 Hz	29 sek	-

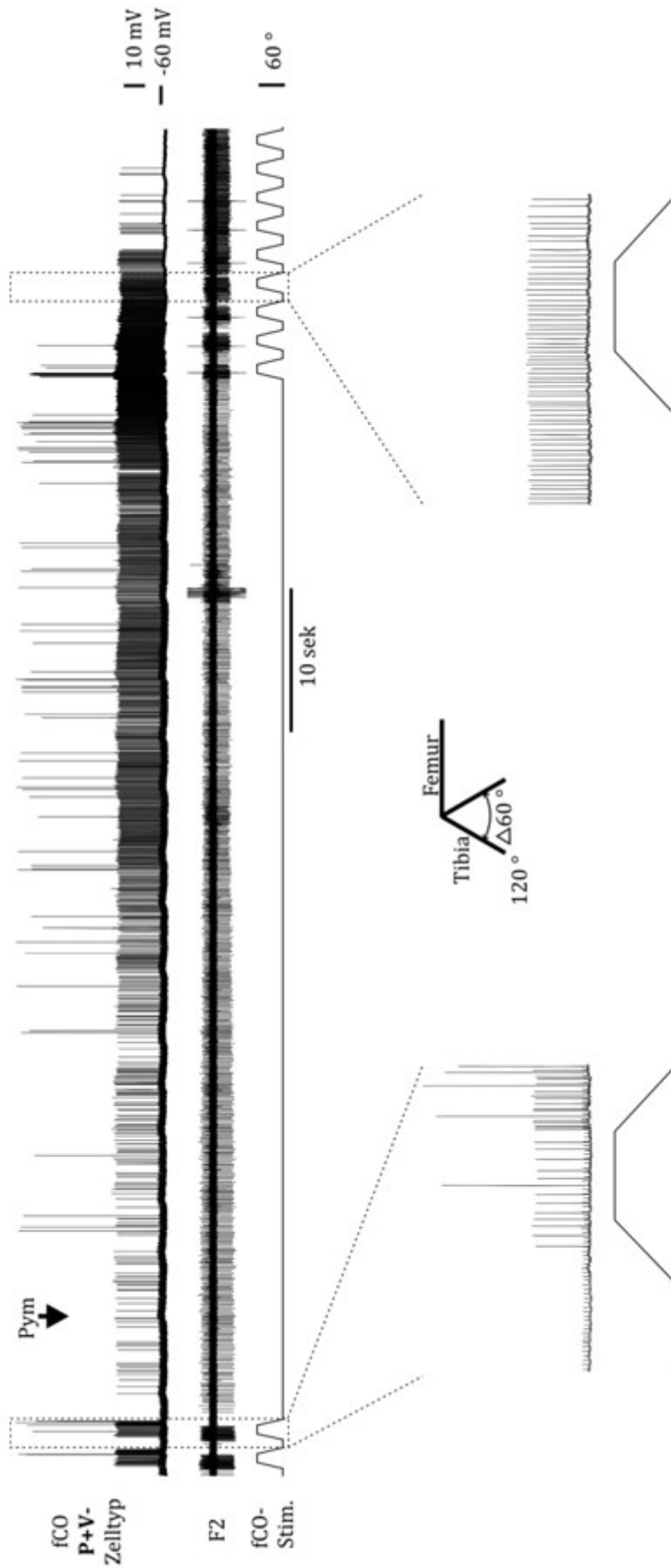


**Abb. 3.8: Intrazelluläre Einzelzelleitung einer V+ Zelle unter andauernder rampenförmigen Stimulation des femoralen Chordotonalorgans.** Vor der Wirkung von Pymetrozin generiert die Zelle Aktionspotentiale während der Elongation des femoralen Chordotonalorgans (V+). Durch Pymetrozin wird diese Sensitivität aufgehoben und die Zelle generiert unabhängig vom Stimulus Aktionspotentiale. Diese Aktivität dauert bis zum Abbruch der Messung an. Die Aktivität des SETi im F2-Nerv erhöht sich erst etwas später als die des sensorischen Neurons und bleibt fortlaufend bestehen. Allerdings kommt es zu einer völligen Unabhängigkeit der Aktivität von der Stimulation.

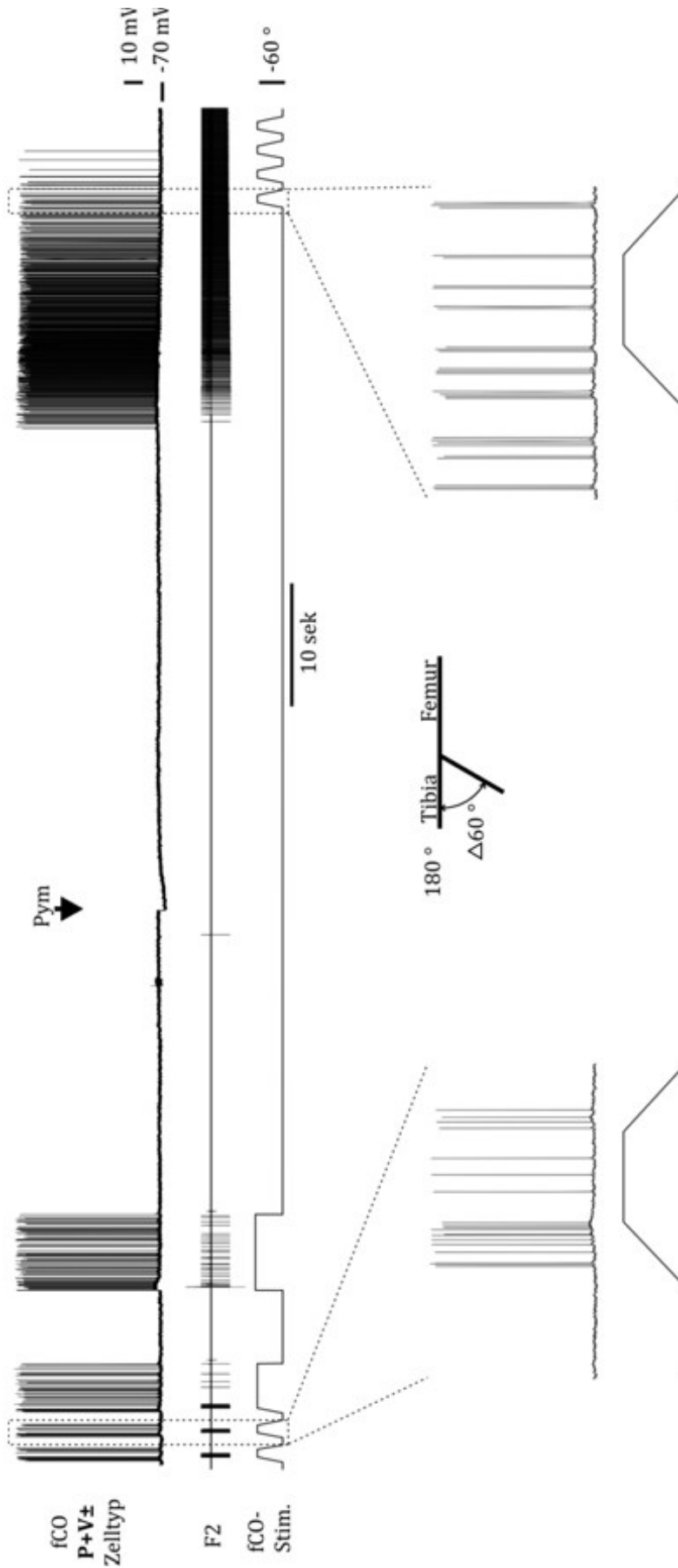


**Abb. 3.9: Zeitlicher Verlauf der Aktivitätsdifferenz verschiedener Stimulationsabschnitte.** (A)  $\Delta f(P)$  beschreibt die Differenz der Aktivität während der elongierten und der relaxierten Phase. (B)  $\Delta f(V)$  beschreibt die Differenz der Aktivität während der Elongation und der elongierten Phase.  $\Delta f$  ist dabei normiert, wobei der höchste Wert (Aktionspotentialfrequenz) als 100 festgelegt wird. Durch die Wirkung von Pymetrozin geht die Differenz gegen null, was bedeutet, dass die Zelle stimulationsunabhängig aktiv ist. In manchen Zellen kommt es zuvor noch zu einem gegensätzlichen Aktivitätsniveau (Werte unter 0), was bedeutet, dass die Bereiche der Stimulation, in denen die Zellen vor der Zugabe von Pymetrozin weniger aktiv sind, nun aktiver sind, als im Vergleichsbereich.

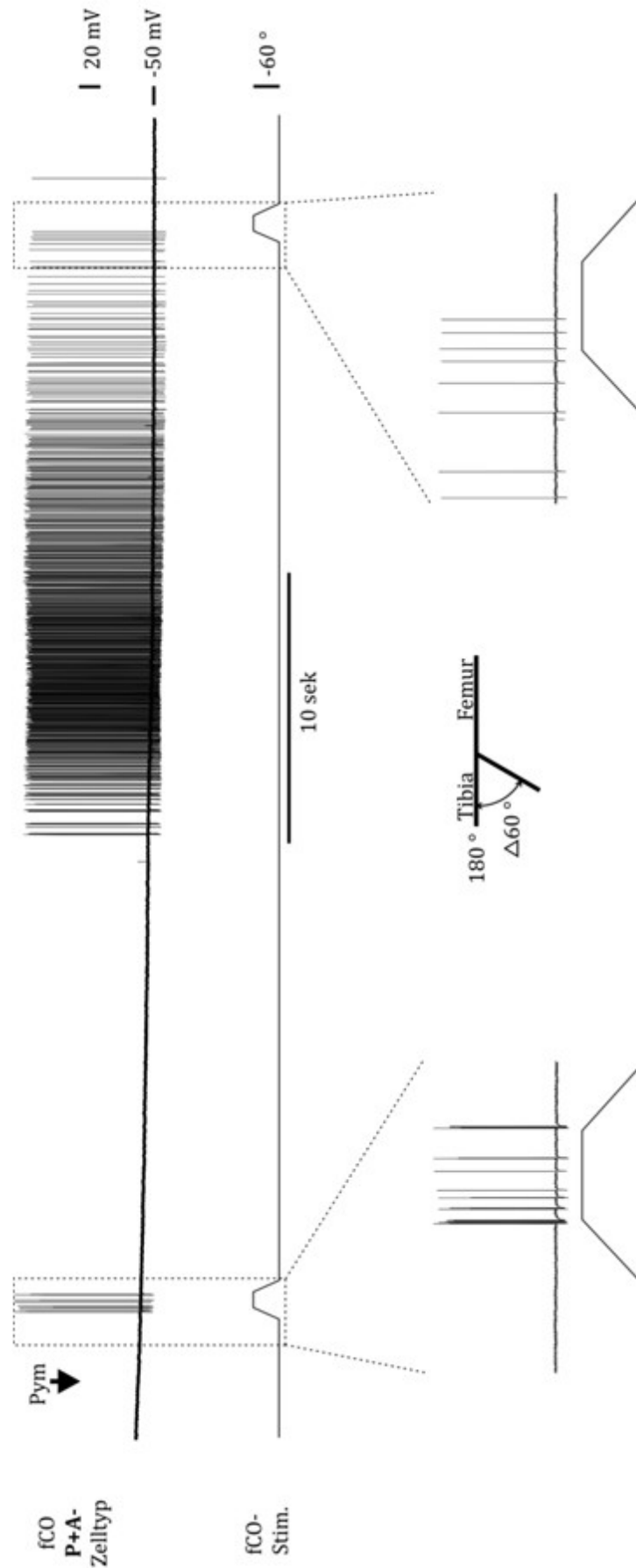




**Abb. 3.10: Intrazelluläre Einzelzelleableitung einer P+V-Zelle bei unterbrochener Stimulation des femoralen Chordotonalorgans.** Vor der Wirkung von Pymetrozin generiert die Zelle Aktionspotentiale (20 mV Amplitude; die anderen Aktionspotentiale sind die einer anderen Zelle, die parallel abgeleitet wurde) während der elongierten Phase (P+) und der Relaxation (V-) des femoralen Chordotonalorgans. Durch Pymetrozin wird diese Sensitivität fast aufgehoben und die Zelle generiert fast unabhängig vom Stimulus Aktionspotentiale. Die Aktivität bricht jedoch zum Ende hin nicht sofort vollständig ab, sondern es kommt erst nach der Generierung von Aktionspotentialen zu Beginn der elongierten Phase. Die Aktivität während der Relaxation hingegen ist kurz vor dem Abbruch der Zellaktivität nicht mehr vorhanden. Die Aktivität des SETi im F2-Nerv erhöht sich erst später als die des sensorischen Neurons und bleibt fortlaufend bestehen. Allerdings kommt es zu einer völligen Unabhängigkeit der Aktivität von der Stimulation.



**Abb. 3.11: Intrazelluläre Einzelzellaufleitung einer P+V+- Zelle bei unterbrochener Stimulation des femoralen Chordotonalorgans.** Vor der Wirkung von Pymetozin generiert die Zelle Aktionspotentiale während der elongierten Phase (P+), der Elongation (V+) und der Relaxation (V-) des femoralen Chordotonalorgans. Durch Pymetozin wird diese Sensitivität aufgehoben und die Zelle generiert unabhängig vom Stimulus Aktionspotentiale. Die Aktivität bricht jedoch kurze Zeit später ab. Eine erneute Erregung durch eine Stimulation ist dann nicht mehr möglich. Um sicherzustellen, dass die Zelle keine spontane Aktivität ohne eine Stimulation zeigt wurde das Chordotonalorgan so ausgeklent, als wäre das Bein gestreckt, also  $60^\circ$  von der ursprünglichen Auslenkung ( $120^\circ$ ) entfernt. Während der Stimulation wurde das Bein zwischen  $180^\circ$  und  $120^\circ$  bewegt. Der SETi im F2-Nerv ist zeitgleich mit dem sensorischen fCO-Neuron aktiviert, es kommt jedoch nicht zu einem Abbruch der Aktivität.



**Abb. 3.12: Intrazelluläre Einzelzellausleitung einer P+A-Zelle bei unterbrochener Stimulation des femoralen Chordotonalorgans.** Vor der Wirkung von Pymetrozin generiert die Zelle Aktionspotentiale während der elongierten Phase (P+) und dem Übergang der Stimulationsphasen vor und nach der elongierten Phase (A-) des femoralen Chordotonalorgans. Durch Pymetrozin wird diese Sensitivität aufgehoben und die Zelle generiert unabhängig vom Stimulus Aktionspotentiale. Die Aktivität bricht jedoch kurze Zeit später ab. Eine erneute Erregung durch eine Stimulation ist dann nicht mehr möglich. Um sicherzustellen, dass die Zelle keine spontane Aktivität ohne eine Stimulation zeigt wurde das Chordotonalorgan so ausgelenkt, als wäre das Bein gestreckt, also 60° von der ursprünglichen Auslenkung (120°) entfernt. Während der Stimulation wurde das Bein zwischen 180° und 120° bewegt. Eine Ableitung des F2-Nerven war hier leider nicht möglich.

### 3.4.2 Flonicamid

Wie bereits unter 3.2 beschrieben ließ sich bei der extrazellulären Ableitung des F2 keine Einfluss durch Flonicamid feststellen. Auch bei der intrazellulären Ableitung einer V+ Zelle kam es zu keiner Reaktion auf Flonicamid, weder bei einer Konzentration von 10 nM noch bei einer von 1 µM. Eine fehlerhafte Präparation konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die Positivkontrolle am Ende des Versuches mit Pymetrozin funktionierte. Dieses Ergebnis, in Kombination mit den Ergebnissen aus den positiven Injektionsversuchen und der Bestimmung der Konzentrationsreihe, stimmt mit der Vermutung überein, dass Flonicamid ein sogenanntes „Pro-Insektizid“ ist (Dr. U. Ebbinghaus, Bayer CropScience; persönliches Gespräch, Nauen und Bretschneider 2002), also eine Substanz, die erst im Körper verstoffwechselt werden muss, um wirksam zu sein.

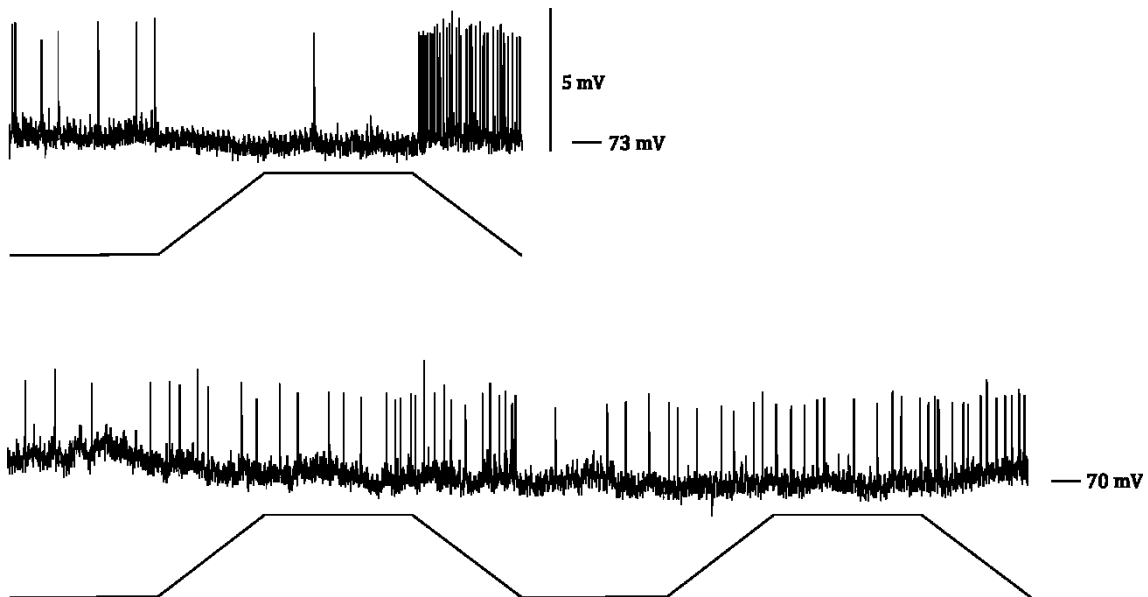
### 3.4.3 Wirkung unbekannter Insektizide auf das femorale Chordotonalorgan

Auch die drei unbekanntes Insektizide AJ11868, AH27783 und BZ72191 wurden an intrazellulären Ableitungen der sensorischen Neurone des Chordotonalorgans getestet, während diese nicht stimuliert, aber trotzdem spontan aktiv waren.

#### 3.4.3.1 AJ11868

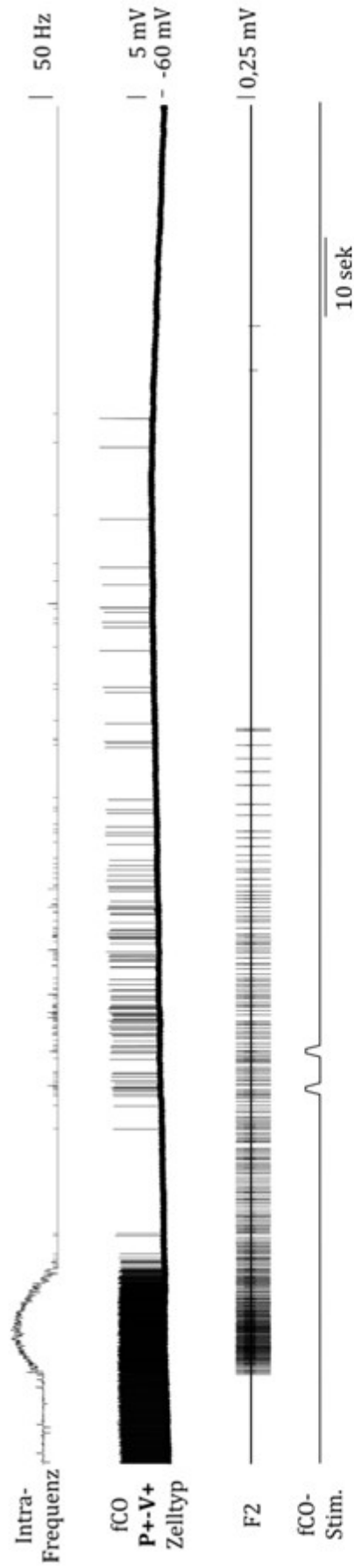
AJ11868 wurde an zwei Zellen getestet. Bei einer P-V- Zelle wurde eine Konzentration von 1 µM verwendet. Dabei lässt sich erkennen, dass das Insektizid zwar eine Wirkung zeigte, diese aber nicht ausreichte, um die Sensitivität auf den Stimulus des fCOs aufzuheben. Es ließ sich weiterhin eine erhöhte Reaktion während der Relaxation (V-) erkennen (Abb. 3.13, untere Spur). Bei einer Konzentration von 10 µM (P+-V+ Zelle) ließ sich jedoch eine vollständige Abnahme der Sensitivität erkennen. Außerdem brach auch hier, wie schon bei Pymetrozin, die Aktivität der Zelle nach kurzer Zeit ab. Jedoch kam es für einen Zeitraum von ca. 100 Sekunden zu einer erneuten, sehr schwachen, spontanen Aktivität (Abb. 3.14), was darauf hindeuten könnte, dass selbst 10 µM keine ausreichend anhaltende Wirkung auf das femorale Chordotonalorgan hat. Parallel dazu ließ sich bei der Ableitung des F2-Nervs erkennen, dass das SETi zum selben Zeitpunkt wie das sensorische Neuron aktiviert wurde und kurze Zeit später auch keine

Aktionspotentiale generierte, was im Vergleich zu den Pymetrozinversuchen ungewöhnlich ist. Auch in diesem Versuch, wie schon bei der Bestimmung der Konzentrationsreihen, konnte AJ11868 ausgewaschen werden. Innerhalb von 5 Minuten zeigten sich wieder die ersten Aktionspotentiale und ca. 25 Minuten später reagierte die sensorische fCO-Zelle wieder wie zuvor auf den Stimulus.



**Abb. 3.13: Ableitung einer P-V- Zelle, vor (oben) und nach (unten) dem Kontakt mit dem Insektizid AJ11868 (1 µM).** Die Zelle ist in der Kontrollableitung sensitiv während der relaxierten Phase und der Relaxation der Stimulation. Nach der Zugabe von Ringer mit einer Konzentration von 1 µM AJ11868 ist die Zelle auch während der elongierten Phase aktiv, aber es lässt sich noch eindeutig der V- Anteil der Zelle erkennen. Die Konzentration scheint also noch nicht hoch genug zu sein, um eine vollständige Wirkung hervorzurufen.





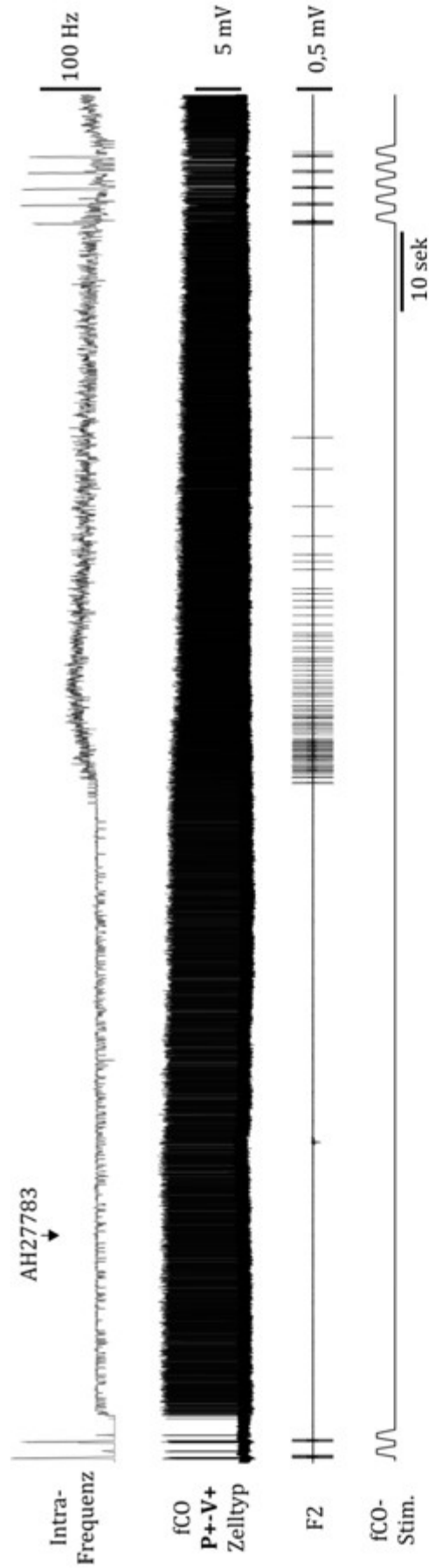
**Abb. 3.14: Wirkung von AJ11868 auf eine P+-V+ Zelle des fCOs.** Zu Beginn der gezeigten Ableitung der Zelle ist die starke Aktivität der Zelle zu erkennen, die aufgrund des Insektizids ansteigt (Applikation vor dem gezeigten Ausschnitt). Wie schon bei Pymetrozin kam es dann auch hier zu einem Abbruch der Aktivität. Diese inaktive Phase wurde jedoch für ca. 100 Sekunden von einer erneuten, sehr schwachen, spontanen Aktivität unterbrochen. Die Aktivität der Extensor Motoneurone im F2-Nerv war zu Beginn der Ableitung nicht aktiv, da keine Stimulation das fCOs gegeben war. Durch das Insektizid kam es zur gleichen Zeit wie beim sensorischen Neuron zu einer Aktivität des SETis im F2-Nerv die am Anfang die höchste Frequenz aufzeigt und dann bis zum vollständigen Abbruch abnahm und nicht wie bei den Messungen mit Pymetrozin andauernd weiter feuerte.

### 3.4.3.2 BZ72191

Auch das Insektizid BZ72191 zeigte eine ähnliche Wirkung, wie Pymetrozin. Allerdings schien 10  $\mu\text{M}$  nicht, wie bei der Bestimmung der Konzentrationsreihe ermittelt, die maximal wirksame Konzentration zu sein. Nachdem die Reaktion der Zelle unabhängig vom Stimulus war, konnten immer wieder Schwankungen in der Frequenz der Aktionspotentiale gemessen werden, jedoch kam es nie zu einem Abbruch der Aktivität. Diese Schwankungen bestanden bis zu 20 Minuten nach dem mit dem Auswaschen begonnen wurde. Ungefähr weitere 10 Minuten später reagierte die P+-V+ Zelle wieder in ihrer ursprünglichen Art auf den Stimulus (Abbildung nicht vorhanden). Bei diesem Versuch reagierten die Extensor Motoneurone früher als das sensorische Neuron. Aufgrund des Verlustes der F2-Ableitung kann jedoch keine Aussage getroffen werden, wann die Aktivität der Extensor Motoneurone wieder abhängig vom Stimulus war.

### 3.4.3.3 AH27783

Das letzte Insektizid, welches an sensorischen Neuronen getestet wurde, war AH27783. Auch hier kam es bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einem Anstieg der Aktivität, jedoch nicht zu einer vollständigen Entkopplung vom Stimulus. Dieses Ergebnis war aufgrund der vorher bestimmten Konzentrationsreihe zu erwarten gewesen, da sich selbst bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keine maximale Wirkung erkennen ließ (Abb. 3.15). Die Aktivität der Extensor Motoneurone war ähnlich der Aktivität der sensorischen Zelle: Zwar kam es kurz zu einer Aktivierung der Neurone, diese brach jedoch nach kurzer Zeit wieder ab. Trotzdem reagierten sie danach auch weiterhin auf den Stimulus. Im Gegensatz zu den zwei vorhergegangenen Insektiziden, wurde dieses nicht als auswaschbar beschrieben, jedoch ließ sich auch hier eine Verbesserung der Reaktion auf den Stimulus, durch erneute Zugabe von Ringer feststellen.



**Abb. 3.15: Wirkung von AH27783 auf eine P+-V+ Zelle des fCOs.** Nach der Zugabe des Insektizids kam es sowohl zu einer Erhöhung der Frequenz im schon zuvor aktiven sensorischen Neuron als auch zu einer kurzen Aktivierung des SETis. Allerdings war das Insektizid nicht potent genug, um eine vollständige Unabhängigkeit vom Stimulus zu erreichen. Sowohl die sensorische Zelle, als auch der SETi reagierten noch auf den Stimulus, wobei beim sensorischen Neuron keine klare Identifikation des Zelltypen mehr möglich war.

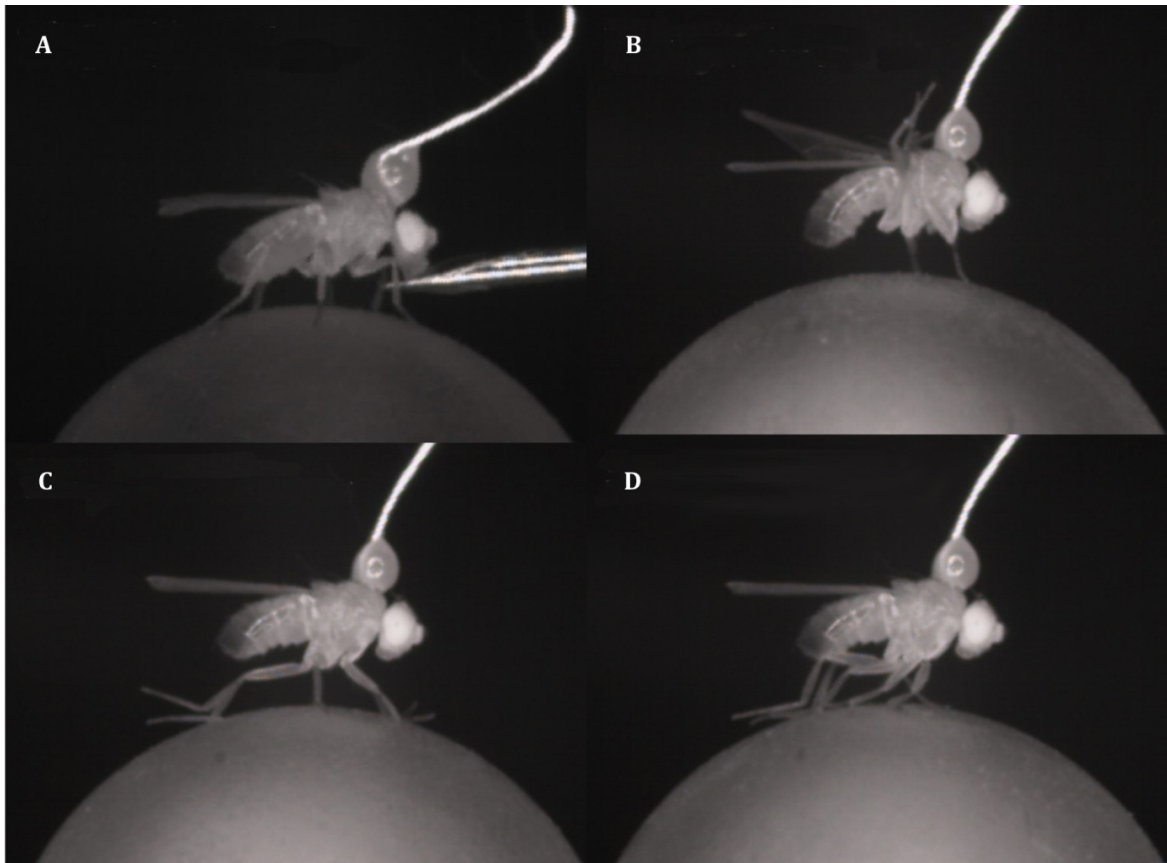


### 3.5 Beinbewegungen von *Drosophila melanogaster* unter Einfluss von Pymetrozin

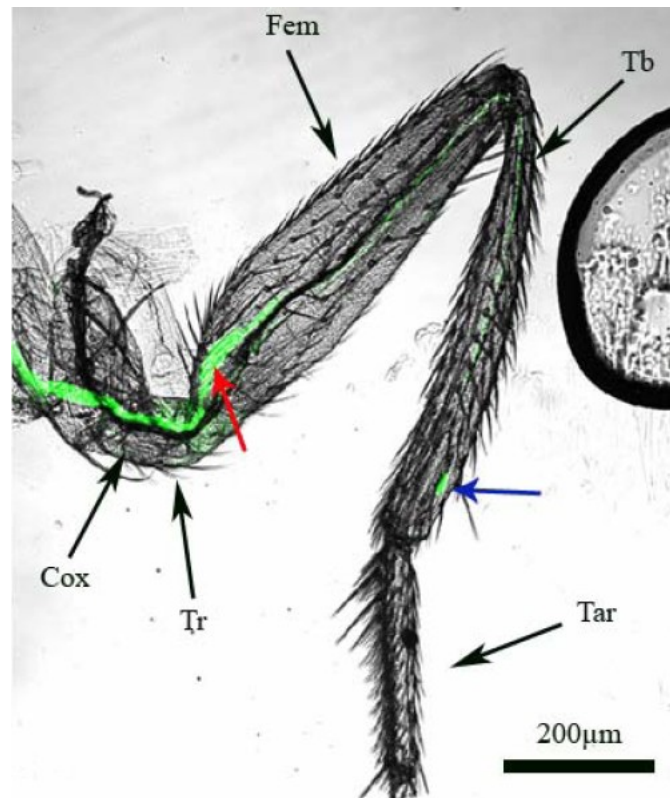
Um herauszufinden, ob Pymetrozin auch auf *Drosophila melanogaster* wirkt und welche Verhaltensänderungen während des Laufens hervorgerufen werden wurden die Beinbewegungen von *Drosophila* unter dem Einfluss von Pymetrozin bei drei verschiedenen Konzentrationen beobachtet. Wie viel die Fliegen getrunken haben, konnte allerdings nicht genau bestimmt werden. Die erste Fliege wurde mit einer Pymetrozinlösung mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  gefüttert, die zweite mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  und die dritte mit 1 mM. Alle drei Fliegen zeigten ähnliche Verhaltensweisen, die sich mit Erhöhung der Konzentrationen des Insektizids verstärkten. Bei der ersten Fliege (1  $\mu\text{M}$  Pymetrozin) zeigten sich erst nach ca. zehn Minuten erste leichte Bewegungsveränderungen. Die Fliege schien eher auf ihren Tibia-Tarsus-Gelenken (im folgenden TT-Gelenke genannt) zu gehen, als auf ihren Tarsen (ähnlich wie bei Abb. 3.16 C). Nur wenige Minuten später hob sie ihre Hinterbeine auf Höhe ihres Abdomens nach oben und es waren leichte, regelmäßige Zuckungen der Tarsen zu erkennen, woraufhin das der Kamera zugewandte Hinterbein einmal senkrecht nach oben gestreckt wurde. Danach machte die Fliege wieder normale Laufbewegungen. Wenige Minuten später streckte die Fliege ihre Beine wieder nach hinten wobei das FT-Gelenk durchgestreckt war, das TT-Gelenk jedoch im 90° Winkel nach oben abgewinkelt war. Danach lief die Fliege wieder auf ihren TT-Gelenken, bis sie schließlich, ca. 30 Minuten nach dem Füttern, wieder normal lief. Die zweite Fliege, die mit 100  $\mu\text{M}$  Pymetrozin im Saft gefüttert wurde zeigte bereits nach zwei bis drei Minuten Bewegungsveränderungen. Genau wie bei der ersten Fliege fing diese Fliege an auf ihren TT-Gelenken zu gehen, kurze Zeit später konnte sie die Richtungsbewegungen ihrer Beine nicht mehr kontrollieren und die Beine rutschten zu allen Seiten weg. Dieses Verhalten ging so weit, dass die Beine kurzzeitig unter ihrem Körper nach hinten wegrutschen (ähnlich wie bei Abb. 3.16 D). Diese Bewegungen zeigten sich immer wieder, wurden jedoch regelmäßig durch annähernd normale Laufsequenzen unterbrochen, bei denen es allerdings manchmal die Beine in der Schwingphase höher als normal waren. Bei der dritten Fliege zeigten sich innerhalb von zwei Minuten erste unnormale

Bewegungsabläufe. Immer wieder streckte die Fliege ihre Hinterbeine grade nach hinten, wobei sie ihre Tarsen im 90 ° Winkel nach oben abwinkelte. Während dessen zeigte sie auch, anders als die Fliegen zuvor, Zuckungen ihrer Flügel, die darauf zurückzuführen sein könnten, dass auch in der Bewegungskontrolle der Flügel Chordotonalorgane beteiligt sind (Field und Matheson 1998; Kim et al. 2003). Schließlich war für kurze Zeit nur noch das Flügelzucken zu sehen bis die Fliege nach ungefähr vier Minuten vier Beine (alle Kameraseitigen und das der Kamera abgewandte Hinterbein) senkrecht in die Höhe streckte und für mehrere Sekunden in dieser Position verweilte (Abb. 3.16 B). Danach ließ sie die Beine wieder herunter, stellte sie aber nicht wieder auf dem Ball ab, sondern verweilte am Draht hängend in der Luft. In den folgenden Minuten versuchte die Fliege immer wieder zu gehen. Dabei lief sie meist auf ihren TT-Gelenken (Abb. 3.16 C) und konnte sich nicht richtig am Ball festhalten, was dazu führte, dass ihre Beine unkoordiniert in alle Richtungen abrutschten wie zum Beispiel in Abb. 3.16 zu sehen, wo alle sechs Beine gleichzeitig abrutschten und durch die Bewegung des Balles nach hinten gelenkt wurden.

Eine genauere Beschreibung der Beinbewegungen als die Bestimmung der Gelenkstellung im Raum war bei diesen Versuchen nicht möglich, da die Beine sich nicht nur in einer Ebene, sondern in allen Ebenen bewegten, zum Beispiel auch unter dem Körper. Dadurch war nicht gewährleistet, die wirkliche Stellung der Gelenke in allen Ebenen zu bestimmen, vor allem auch, weil die Beine, wenn sie sich nebeneinander befanden, nicht immer gut zu sehen waren und somit nicht gut nach zu verfolgen gewesen wären. Das Gehen auf den TT-Gelenken lässt sich, genau wie die Flügelzuckungen, durch die Chordotonalorgane erklären. Das tibiale Chordotonalorgan (tCO) ist für die Bewegungen des Tarsus im Verhältnis zur Tibia mitverantwortlich (Abb. 3.17). Genau wie beim fCO in der Stabheuschrecke, könnte es hier der Fall sein, dass das Abwinkeln der Tarsen durch Pymetrozin hervorgerufen wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Pymetrozin auch auf die Chordotonalorgane von *Drosophila* wirkt. Es ist jedoch eine höhere Konzentration nötig um eine langanhaltende Reaktion hervorzurufen.



**Abb. 3.16: Beinbewegungen von *Drosophila* vor (A) und nach (B-D) dem Einfluss von Pymetrozin (1 mM).** (A) Eine Fliege trinkt, auf einem Laufball stehend, Saft aus einer Hamilton-Spritze, der mit Pymetrozin versetzt war. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Fliege ihre natürlichen Beinbewegungen. (B) Ungefähr 5 Minuten nach dem Trinken zeigte sich eine eindeutige Wirkung von Pymetrozin. Die Fliege streckte die, der Kamera zugewendeten Beine am Trochanter-Femur Gelenk nach oben. (C) Nach ungefähr 16 Minuten ließ sich erkennen, dass die Fliege nicht mehr wie zuvor mit den Tarsen, sondern mit dem Tibia-Tarsus-Gelenk auftrat, da die Tarsen nach oben gesteckt wurden. (D) Kurze Zeit später, also ungefähr in der 17. Minute, schaffte die Fliege es nicht mehr, ihre Beine am Ball zu fixieren, wodurch sich die Beine unterhalb des Körpers, durch die Bewegung des Balles mitgezogen, nach hinten bewegten.



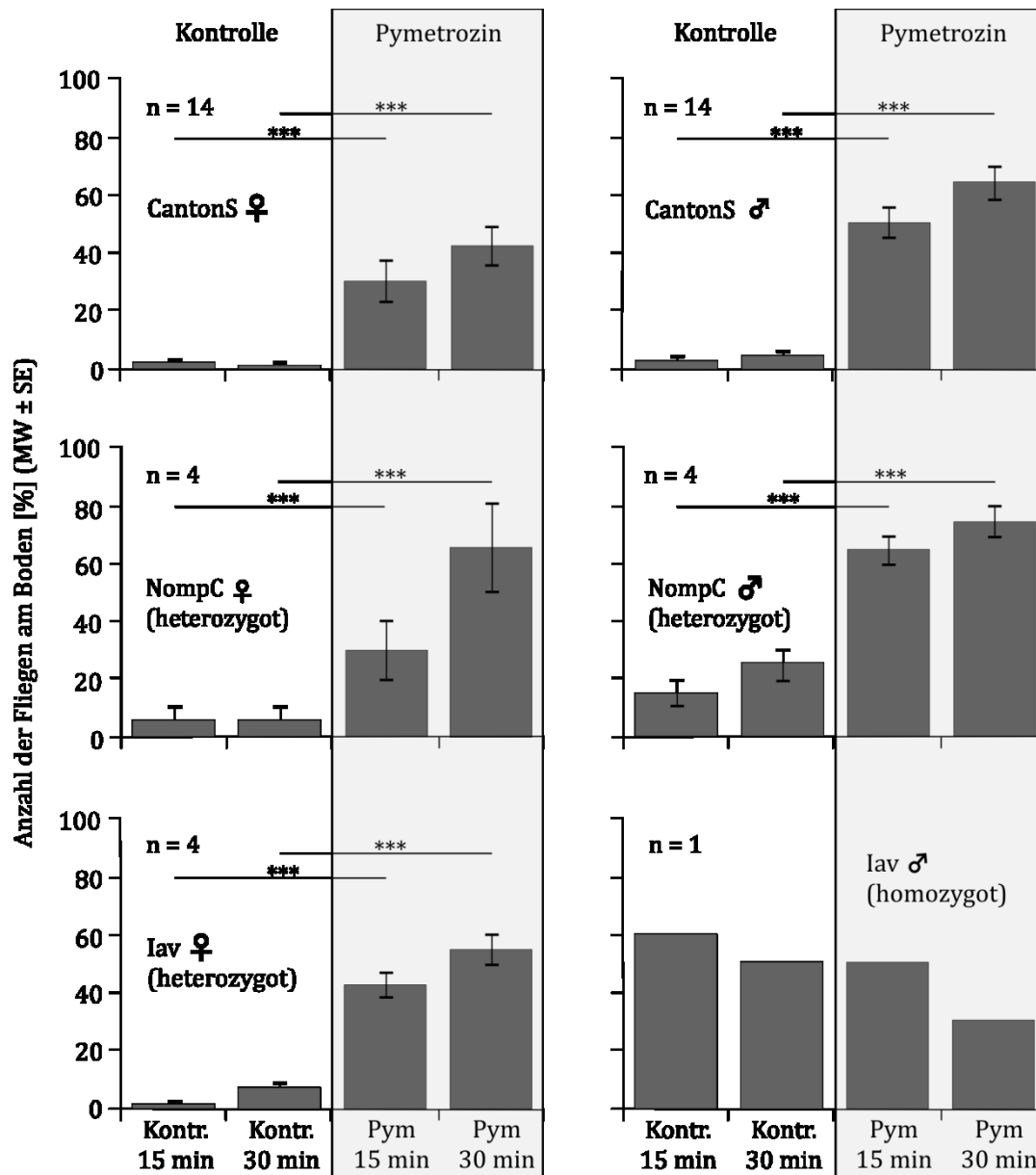
**Abb. 3.17: Färbung des femoralen und tibialen Chordotonalorgans im Bein von *Drosophila melanogaster*.** Zu sehen ist das femorale Chordotonalorgan (fCO, roter Pfeil) im Femur und das tibiale Chordotonalorgan in der Tibia (tCO, blauer Pfeil). Das tCO dient der Bewegungskontrolle der Tarsen gegenüber der Tibia. Cox = Coxa, Tr = Trochanter, Fem = Femur, Tb = Tibia, Tar = Tarsus (Wiek 2012).

### 3.6 Negative Gravitaxis bei *Drosophila melanogaster* unter Einfluss von Pymetrozin

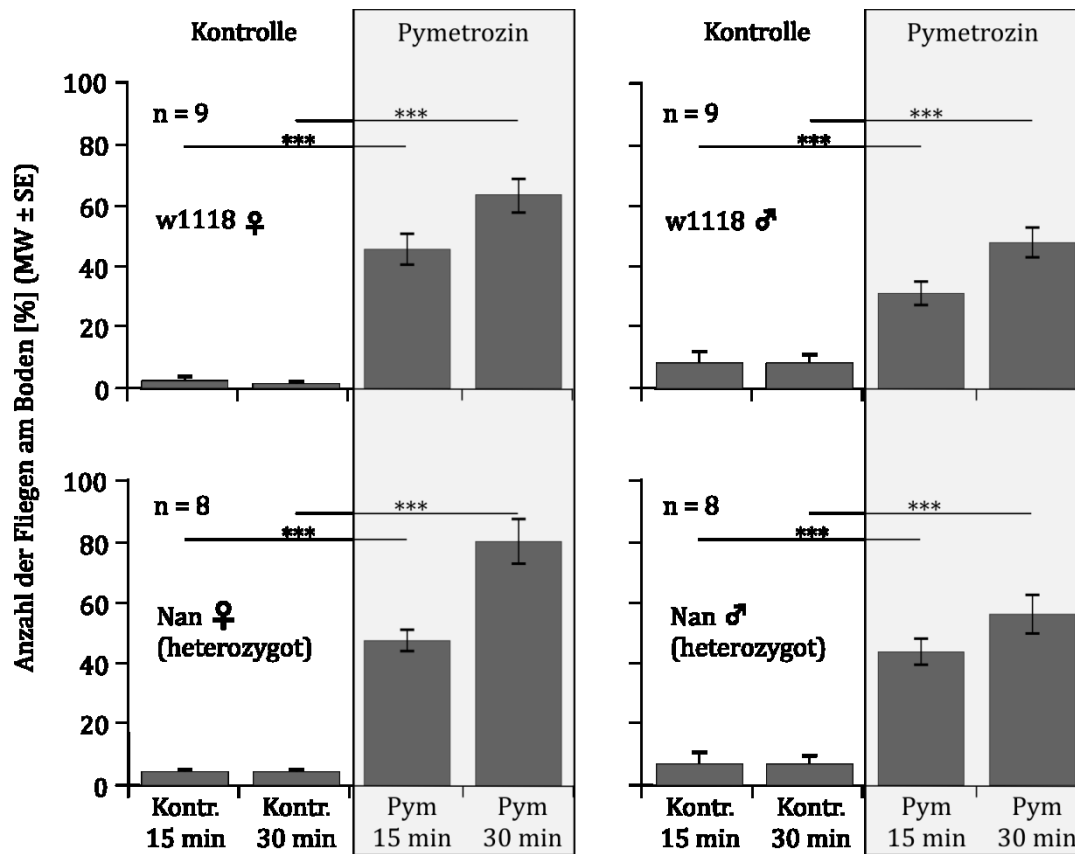
Die Versuche zur Negativen Gravitaxis sollten dazu dienen einen Einblick zu bekommen, ob die Fliegen noch auf Pymetrozin reagieren, wenn einzelne Proteine im Chordotonalorgan mutiert sind. Als Kontrolle diente sowohl ein *CantonS* Stock als auch *w<sup>1118</sup>*. Wie in Abb. 3.18 zu erkennen ist, befanden sich im Kontrollgläschen fast keine Fliegen auf dem Boden. Bei den Weibchen änderte sich dieses Verhalten hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) nachdem die Pymetrozinlösung von den Fliegen getrunken wurde, sodass sich nach 15 Minuten ungefähr 30 % der Fliegen auf dem Boden befanden, nach 30 Minuten sogar um die 40 %. Bei den Männchen verschob sich die Anzahl der sich auf dem Boden befindenden Tiere sogar schon nach

15 Minuten auf ungefähr 50 % und nach 30 Minuten sogar auf um die 60 %. Dieser Unterschied zwischen Männchen und Weibchen könnte sich auf die unterschiedliche Körpergröße zurückführen lassen, da Männchen kleiner sind als Weibchen und somit stärker auf Pymetrozin reagieren könnten. Bei den heterozygoten *NompC*-Mutanten lässt sich ein ähnliches Bild erkennen. Bei den Weibchen steigt die Anzahl der sich auf dem Boden befindlichen Fliegen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) an. Dabei befinden sich um die 30 % der Fliegen nach 15 Minuten auf dem Boden und nach 30 Minuten um die 60 %. Bei den Männchen steigt die Anzahl sogar nach 15 Minuten auf um die 60 % an und nach 30 Minuten auf ungefähr 70 %. Bei den weiblichen *Iav*-Mutanten zeigt sich auch dieses Verhalten. Unter Pymetrozin befand sich nach 15 Minuten ungefähr die Hälfte der Tiere auf dem Boden, nach 30 Minuten sogar um die 60 %. Die Männchen verhielten sich hingegen anders. Aufgrund der homozygoten Mutation (X-Chromosom) ist das Verhalten der Tiere schon in der Kontrollgruppe so gestört, dass sie bereits hier nicht im Stande sind die Wände der Gläschen hochzulaufen und sich daher auch kein Unterschied zu der Gruppe mit Pymetrozin ergeben kann. Dass keine Fliege von der Pymetrozinlösung getrunken hatte wurde auch dadurch bestätigt, dass keines der Tiere ein rotes Abdomen hatte, welches durch die Lebensmittelfarbe in der Lösung entstanden wäre (Abb. 3.18).

Abb. 3.19 zeigt, dass auch die *Nan*-Mutanten sich wie zuvor beschrieben verhalten und ihr Verhalten unterscheidet sich auch hier hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) zwischen der Kontrolle und der Insektizidgruppe. Bei den Weibchen befinden sich nach 15 Minuten mehr als 40 % der Tiere auf dem Boden, nach 30 Minuten sogar über 80 %. Bei den Männchen ist der Unterschied etwas geringer. Nach 15 Minuten sind 40 % der Fliegen auf dem Boden, nach 30 Minuten fast 60 %. Auch die Fliegen des Kontrollstocks *w<sup>1118</sup>* verhalten sich wie bereits beschrieben. Dabei befinden sich nach 15 min fast 50 % der Weibchen und ungefähr 30 % der Männchen auf dem Boden, nach 30 Min 60 % der Weibchen und 50 % der Männchen (Abb. 3.19).



**Abb. 3.18: Vergleich der negativen Gravitaxis von *Drosophila* mit und ohne Pymetrozin: *CantonS*, *NompC* und *Iav*.** Der Kontrollstock (*CantonS*) ließ sowohl bei den Weibchen als auch bei den Männchen einen Effekt von Pymetrozin erkennen. In der Pymetrozin-Gruppe war der Anteil an Fliegen, die auf dem Boden waren, hochsignifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Dieses Ergebnis zeigte sich schon nach 15 Minuten und war nach 30 Minuten noch verstärkt. Die *NompC*-Mutanten verhielten sich ähnlich. Auch hier ist zu erkennen, dass die Fliegen, die Lösung mit Pymetrozin getrunken haben, sich signifikant bzw. hochsignifikant öfter auf dem Boden befinden als die Kontrollgruppen (15 min:  $p < 0,05$ ; 30 min:  $p < 0,001$ ). Auch die weiblichen *inactive* (*Iav*)-Mutanten verhielten sich auf diese Weise, im Gegensatz zu den Männchen, welche aufgrund der homozygoten Mutation (X-Chromosom) auch schon in der Kontrollgruppe nicht gut in der Lage waren die Wand des Gläschens hochzulaufen und dadurch auch keine Möglichkeit hatten an das Futter zu gelangen. Auch bei den *nanchung* (*Nan*)-Mutanten war der Unterschied der Kontrolle zur Insektizidgruppe hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 3.19: Vergleich der negativen Gravitaxis von *Drosophila* mit und ohne Pymetrozin: *w<sup>1118</sup>* und *Nan*.** Auch bei den *nanchung* (*Nan*)-Mutanten war der Unterschied der Kontrolle zur Insektizidgruppe hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Der Kontrollstock (*w<sup>1118</sup>*) zeigte sowohl bei den Weibchen als auch bei den Männchen das gleiche Verhalten wie schon alle anderen Tiere. Auch hier war der Unterschied zwischen der Kontrolle und der Insektizidgruppe hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).

### 3.7 Proboscis Extension Response (PER) Versuche an *Drosophila melanogaster*

Durch die Proboscis Extension Response (PER) Versuche (Shiraiwa und Carlson 2007) sollte gezeigt werden, ob Pymetrozin und andere Insektizide mit den im Transduktionsprozess beteiligten Proteinen des Chordotonalorgans interagieren und so als Target für diese dienen. Dazu wurden die Proteine des Chordotonalorgans mithilfe der UAS-Gal4-Methode in Gr5a-Rezeptoren gekreuzt. Durch das Austrecken des Rüssels konnte so festgestellt werden, wenn die Insektizide auf einzelne Proteine wirken, die sich nun in den zuckersensitiven Rezeptoren befanden. Die Versuche wurden nur gezählt, wenn die Fliege sowohl vor als auch nach der Insektizidlösung negativ auf die Negativstimulus (dH<sub>2</sub>O) und positiv auf die Positivstimulus (Saccharoselösung 100 mM) reagierte. Bei allen drei getesteten Proteinen ließ sich die gleiche Wirkung der Insektizide erkennen. Durch Pymetrozin kam es sowohl bei *NompC* (N = 7), als auch bei *Iav* (N = 3) und *Nan* (N = 6) zu keiner positiven Antwort des Proboscis. Auch AH27783 führte zu keiner Reaktion (*NompC* (N = 3), *Iav* (N = 2), *Nan* (N = 3)). Gleiches zeigte sich auch bei BZ72191 (*NompC* (N = 4), *Iav* (N = 1), *Nan* (N = 3)) und AJ11868 (*NompC* (N = 4), *Iav* (N = 1), *Nan* (N = 3)). Zusammenfassend reagierte keine der Fliegen auf die Insektizide (Tab. 3.3).

**Tab. 3.3: Prozentsatz der Proboscis Reaktionen auf die verschiedenen Insektizide unter Berücksichtigung der getesteten Proteine.** Wie zu erkennen ist hat keine der Fliegen auf die Insektizide reagiert. Dabei ist diese Reaktion völlig unabhängig von den getesteten Proteinen. Auf die Positivkontrolle (Saccharoselösung) reagierten sie zu 100 %, was zeigt, dass sie motiviert genug waren um auf Reize zu antworten.

	<b>NompC</b>	<b>Iav</b>	<b>Nan</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	0 %	0 %	0 %
<b>Saccharose</b>	100 %	100 %	100 %
<b>Pymetrozin</b>	0 %	0 %	0 %
<b>AH27783</b>	0 %	0 %	0 %
<b>BZ72191</b>	0 %	0 %	0 %
<b>AJ11868</b>	0 %	0 %	0 %



## 4 Diskussion

### 4.1 Elektrophysiologische Versuche

#### 4.1.1 Pymetrozin

Wie bereits in früheren Studien gezeigt wurde, führt Pymetrozin bei Insekten dazu, dass diese, wie im Fall der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* und der Stabheuschrecke *Cuniculina impigra*, ihre Beine heben (Ausborn et al. 2005), oder wie im Fall von Blattläusen (*Aphis fabae* und *Aphis gossypii*), ihre Rüssel nicht mehr bewegen können und verhungern, da für sie keine Möglichkeit mehr besteht Nahrung aufzunehmen (Harrewijn und Kayser 1997). Das hier gezeigte Injektionsexperiment zeigte deutlich, dass auch die Stabheuschrecke *Carausius morosus* durch Pymetrozin beeinflusst wird, da auch diese, wie die Wanderheuschrecke, ihre Beine streckt und nicht mehr laufen kann. Im Gegensatz zu den Blattläusen überlebt die Stabheuschrecke, wie auch die Wanderheuschrecke, die Injektion, da sie länger ohne Futter auskommen, als Blattläuse (Abb. 3.1) und die Wirkung von Pymetrozin mit der Zeit nachlässt. Nach 24 Stunden lässt sich bei den meisten Stabheuschrecken wieder das natürliche Laufverhalten auslösen. Die Tiere zeigen also sowohl regelmäßige Stemm- und Schwingphasen, sowie natürliche Gelenkwinkelstellungen (Büschges et al. 2008). Auch die Aktivität der Extensor Motoneurone zeigt die Wirkung von Pymetrozin auf die sensorischen Neurone des femoralen Chordotonalorgans bei der Stabheuschrecke *Carausius morosus*, ähnlich wie bei der Wanderheuschrecke (Ausborn et al. 2005). Die Extensor Motorneurone, die sowohl unter dem direktem Einfluss der Afferenzen des femoralen Chordotonalorgans stehen als auch Signale durch Interneurone bekommen (Bässler 1993), wurden tonisch aktiviert, also unabhängig von der Stimulation des Chordotonalorgans.

Durch die Ableitungen des F2-Nervs konnte für Pymetrozin eine Wirkkonzentration von ca. 10 nM bestimmt werden. Man konnte erkennen, dass die Extensor Motoneurone ab dieser Konzentration tonisch aktiv wurden und keine Reflexantwort auf den Stimulus mehr hervorgerufen wurde. Jedoch lässt sich die Wirkung von Pymetrozin nicht wie bei Ausborn und Kollegen (2005) mit einem

Alles-Oder-Nichts-Prinzip erklären, da es hier zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Wirkung kam (Abb. 3.2 und Abb. 3.3). Durch die Ableitungen der sensorischen Neurone konnte gezeigt werden, dass alle Zelltypen des femoralen Chordotonalorgans auf Pymetrozin reagierten. Erst wurde ihre Aktivität unabhängig von der Stimulation des femoralen Chordotonalorgans und kurze Zeit später brach die die Generation der Aktionspotentiale der sensorischen Neurone ab. Kaufmann und Kollegen (2004) zeigten, dass Pymetrozin einen Einfluss auf das serotoninerge System hat, ohne die Wirkung vollständig zu definieren. In ihren Versuchen zeigte Pymetrozin ähnliche wie Serotonin, einen spontanen Anstieg an tonischer Aktivität, die schließlich abbrach. Der gleiche Frequenzverlauf konnte auch in meinen Versuchen bestätigt werden.

Diese tonische Spontanaktivität könnte auch mit Octopamin in Zusammenhang stehen. Ramirez und Kollegen (1993, Stabheuschrecke) und Matheson (1997, Wanderheuschrecke) zeigten, dass Octopamin spontane Aktivität in sensorischen Zellen des femoralen Chordotonalorgans hervorruft. Dafür war kein Stimulus notwendig, wie auch bei den hier gezeigten Versuchen, sondern Octopamin wirkte, wenn das Chordotonalorgan in einer fixierten Position gehalten wurde (Ramirez et al. 1993), was auch zu meinen Ergebnissen passt.

#### **4.1.2 Flonicamid**

Die Injektion von Flonicamid führte wie bei Pymetrozin dazu, dass die Tiere ihre Beine streckten (Abb. 3.1). Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Pymetrozininjektionen zeigten sich bei den extrazellulären (Abb. 3.4) und intrazellulären Versuchen hingegen keine Veränderung. Dieses Ergebnis lässt die Spekulation zu, dass Flonicamid ein Pro-Insektizid sein könnte (persönliches Gespräch mit Dr. U. Ebbinghaus, Bayer CropScience). Dies bedeutet, dass Flonicamid erst im Körper verstoffwechselt werden muss, um wirken zu können. Diese Eigenschaft ist bereits von anderen Insektiziden, wie zum Beispiel Indoxacarb bekannt, welches durch eine Abspaltung einer N-Methoxycarbonyl-Gruppe zu einem NH-Derivat wird und dadurch als effektiver Natrium-Kanal-Blocker in Schmetterlingslarven fungiert (Nauen und Bretschneider 2002; Wing et

al. 1998). Eine Verstoffwechslung war bei der Präparation für die extra- und intrazellulären Ableitungen nicht möglich, da nur das Bein mit der Lösung umspült wurde, weshalb Flonicamid nicht wirken konnte.

#### **4.1.3 Unbekannte Insektizide**

Die unbekanntenen Insektiziden (AJ11868, BZ72191 und AH27783) waren eindeutig weniger potent als Pymetrozin, wirkten aber auch auf das femorale Chordotonalorgan. Der Grund dafür lässt sich nicht definieren, da zu den Insektiziden keine Informationen, wie zum Beispiel die chemische Struktur, bekannt sind. Die geringere Wirksamkeit zeigte sich sowohl durch die geringe Änderung der Aktivität der Extensor Motoneurone (AJ11868: Abb. 3.6; BZ72191: Abb. 3.3; AH27783: Abb. 3.5), als auch durch die geringe Änderung der Aktivität der sensorischen Neurone des femoralen Chordotonalorgans (AJ11868: Abb. 3.13 und Abb. 3.14; AH27783: Abb. 3.15). Dabei ist zu erkennen, dass BZ72191 und AJ11868 erst ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  vollständig wirken. AH27783 hingegen zeigt nicht einmal bei 100  $\mu\text{M}$  eine vollständige Wirkung.

Die Ableitungen der sensorischen Neurone legen nahe, dass die Insektizide den gleichen Wirkmechanismus wie Pymetrozin haben könnten, da die Reaktion der Neurone übereinstimmten: Auch bei den unbekanntenen Insektiziden lässt sich erkennen, dass die Reizantwort der sensorischen Neurone unabhängig vom Stimulus des femoralen Chordotonalorgans war. Die dabei auftretende tonische Aktivität ist dabei nicht maximal, da die phasische Reizantwort bei den vorherigen Kontrollmessungen höhere Frequenzen erreicht hatten. Nachdem die Reizantwort unabhängig vom Stimulus war, lässt sich bei fast allen Ableitungen erkennen, dass die Frequenzen geringer werden und schließlich keine Aktionspotentiale mehr generiert werden. Während dieses Prozesses lässt sich keine Veränderung der Amplitude oder des Zeitverlaufes der Aktionspotentiale erkennen.

## 4.2 Mechanoelektrische Transduktion bei *Drosophila melanogaster*

Mechanorezeptoren, wie zum Beispiel Chordotonalorgane, dienen der Umwandlung von mechanischen Reizen in elektrische Signale. Für diesen Prozess werden Ionenkanäle, sogenannte Transduktionskanäle, zur Umwandlung des mechanischen Reizes, zum Beispiel der Bewegung der Tibia im femoralen Chordotonalorgan, in ein elektrisches Signal genutzt. Im Johnstonschen Organ, einem Chordotonalorgan in der Antenne von *Drosophila*, konnte gezeigt werden, dass die Kanäle aus NompC und Iav und Nan entscheidend am Prozess der mechanoelektrischen Transduktion beteiligt sind. Dabei wird vermutet, dass NompC als Transduktionskanal agiert und ein Heteromultimer aus Nan und Iav für eine negative Rückkopplung sorgt (Abb. 1.6) (Gong et al. 2004; Göpfert et al. 2006; Lu et al. 2009).

Es wurde vermutet, dass Pymetrozin mit einem dieser Kanäle interagiert und so aktivierend auf die sensorischen Neurone des Chordotonalorgans wirkt. Durch die hier beschriebenen Versuche konnte gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. Die Kanäle des Chordotonalorgans scheinen nicht als Target für Pymetrozin, AJ11868, BZ72191 oder AH27783 zu dienen: In den Knock-out Versuchen ließ sich nicht erkennen, dass die Wirkung von Pymetrozin eingeschränkt ist, wenn Mutationen an den Kanälen vorliegen (Abb. 3.18 und Abb. 3.19).

Effertz und Kollegen konnten 2012 zeigen, dass nur in Nullmutanten die Transduktion fast vollständig gestört ist. Ergebnisse der Versuche mit *NompC* sollten daher mit Vorsicht betrachtet werden, da keine homozygoten Mutanten vorhanden waren. Auch bei der *Iav*-Knock-out Mutante konnten bei den Weibchen nur heterozygote Tiere getestet werden. Die Männchen hingegen waren homozygot. Dies hatte zur Folge, dass die Tiere in ihrer Koordination so gestört waren, dass sie kein negatives Gravitaxisverhalten zeigen konnten. Dieses eingeschränkte Laufverhalten wurde auch bereits durch Gong und Kollegen (2004) beschrieben. Die *Nan*-Mutanten waren auch nicht homozygot, was eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse erschwert. Aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit der Fliegen und der Interaktion der Kanäle im Transduktionsprozess, wurden *NompC*, *Iav* und *Nan* einzeln in Gr5a-Rezeptoren gekreuzt, um durch Proboscis Extension Response (PER) Versuche

herauszufinden, ob Pymetrozin und andere Insektizide auf NompC, Iav oder Nan einen Einfluss haben, diese also als Target nutzen. Durch diese Versuche konnten die Proteine unabhängig voneinander betrachtet werden, da sie nicht, wie im Transduktionsprozess voneinander abhängig waren. So konnten wechselseitige Beeinflussungen von NompC, Iav und Nan ausgeschlossen werden. Auch hier zeigte sich, dass weder Pymetrozin, noch die anderen Insektizide auf NompC, Iav und Nan wirken (Tab. 3.3). Somit kann ausgeschlossen werden, dass NompC, Iav oder Nan als Target für Pymetrozin und die anderen Insektizide dienen.

### **4.3 Zusammenfassende Diskussion**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Pymetrozin und die unbekanntes Insektizide eventuell nicht auf den mechanoelektrischen Transduktionsprozess wirken. Sowohl die Experimente mit *Drosophila*, als auch die intrazellulären Ableitungen an Stabheuschrecken unterstützen diese Hypothese. Um im Transduktionsprozess zu wirken, müssten die Insektizide an einem noch nicht bekannten Kanal binden und diesen dauerhaft öffnen, sodass es zu einer Aktivierung der Zellen unabhängig von äußeren Stimuli kommen könnte. Allerdings wird vermutet, dass es neben NompC noch einen weiteren Transduktionskanal im Johnstonschen Organ geben muss, da es in NompC Mutanten weiterhin Transduktionssignale gibt (Göpfert et al. 2006; Lu et al. 2009). Die Bindung von Pymetrozin zu diesem Kanal müsste allerdings, ohne die Konzentration der Insektizide zu verringern dafür sorgen, dass spontan nach der tonischen Aktivierung keine Weiterleitung von Signalen mehr möglich ist. Daher ist eher davon auszugehen, dass die Insektizide in der spikegenerierenden Zone wirken und dort dafür sorgen, dass die Transformation der Rezeptorpotentiale zu Aktionspotentialen unabhängig vom Prozess der Transduktion wird bzw. auch ohne Transduktion Aktionspotentiale generiert werden können. Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob es an dieser Stelle im Chordotonalorgan spezifische Strukturen und Kanäle gibt. Da gezeigt wurde, dass Pymetrozin ausschließlich auf das Chordotonalorgan wirkt (Ausborn et al. 2005) kann es nicht an nicht-Chordotonalorgan-spezifische Strukturen binden. Es kommt zusätzlich

ausschließlich zu einer Veränderung der Frequenz und nicht der Amplitude oder sonstigen Form der Aktionspotentiale. Diese Argumente sprechen gegen eine Wirkung auf Natrium- oder Kaliumkanäle, die während De- und Repolarisation eine entscheidende Rolle spielen (Eckert et al. 2000; Hodgkin und Huxley 1952). Auch hier stellt sich allerdings die Frage, wie es dazu kommen kann, dass es erst zu einer Generierung von Aktionspotentialen unabhängig von einem Stimulus kommen kann und dann keine Generierung von Aktionspotentialen mehr möglich ist. Dieses Phänomen könnte zum Beispiel durch die Ermüdung von Rezeptoren bzw. Kanälen zu Stande kommen. Jedoch lässt sich dabei nicht definieren, welche Art von Rezeptoren und Kanälen im Chordotonalorgan dafür infrage kommt. Daher lässt sich zu diesem Zeitpunkt nur feststellen, dass der Wirkmechanismus auf molekularer Ebene von Pymetrozin und den anderen Insektiziden nicht bekannt ist.

## Literatur

- Allum, J. H. J. und Pfaltz, C. R. (1985).** Visual and vestibular contributions to pitch sway stabilization in the ankle muscles of normals and patients with bilateral peripheral vestibular deficits. *Experimental Brain Research* 58(1): 82-94
- Ausborn, J., Wolf, H., Mader, W. und Kayser, H. (2005).** The insecticide pymetrozine selectively affects chordotonal mechanoreceptors *The Journal of Experimental Biology* 208: 4451-4466
- Barnes, W. J. P. (1977).** Proprioceptive influences on the motor output during walking in the crayfish. *Journal of Physiology* 73: 543-564
- Bässler, U. (1977a).** 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: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 121(1): 99-113
- Bässler, U. (1977b).** Verhaltensphysiologie bei Stabheuschrecken. *Biologie in unserer Zeit* 7(2): 48-54
- Bässler, U. (1983).** Neural basis of elementary behavior in stick insects *Springer Berlin/Heidelberg*
- 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
- Bässler, U. und Storrer, J. (1980).** The neural basis of the femur-tibia-control-system in the stick insect *Carausius morosus*. *Biological Cybernetics* 38(2): 107-114
- Bechstedt, S. und Howard, J. (2008).** Hearing mechanics: A fly in your ear. *Current Biology* 18(18): R869-R870
- Büschges, A. (1989).** Processing of sensory input from the femoral chordotonal organ by spiking interneurons of stick insects. *The Journal of Experimental Biology* 144: 81-111
- 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., Akay, T., Gabriel, J. P. und Schmidt, J. (2008).** Organizing network action for locomotion: Insights from studying insect walking. *Brain Research Reviews* 57(1): 162-171
- Cheng, L. E., Song, W., Looger, L. L., Yeh Jan, L. und Nung Jan, Y. (2010a).** The role of the trp channel nompC in *Drosophila* larval and adult locomotion. *Neuron* 67: 373-380

- Cheng, W., Sun, C. und Zheng, J. (2010b).** Heteromerization of trp channel subunits: extending functional diversity *Springer Berlin/ Heidelberg*. 9 pp
- Chung, Y. D., Zhu, J., Han, Y.-G. und Kernan, M. J. (2001).** NompA encodes a pns-specific, zp domain protein required to connect mechanosensory dendrites to sensory structures. *Neuron* 29(2): 415-428
- Chyb, S., Dahanukar, A., Wickens, A. und Carlson, J. R. (2003).** *Drosophila* Gr5a encodes a taste receptor tuned to trehalose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(suppl 2): 14526-14530
- Clapham, D. E. (2003).** Trp channels as cellular sensors. *Nature* 426(6966): 517-524
- diCaprio, R. A., Wolf, H. und Büschges, A. (2002).** Activity-dependent sensitivity of proprioceptive sensory neurons in the stick insect femoral chordotonal organ. *Journal of Neurophysiology* 88(5): 2387-2398
- Dixon, A. F. G. (1977).** Aphid ecology: Life cycles, polymorphism, and population regulation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8(ArticleType: research-article / Full publication date: 1977 / Copyright © 1977 Annual Reviews): 329-353
- Eberl, D. F. und Boekhoff-Falk, G. (2007).** Development of johnston's organ in *Drosophila* *University of the Basque Country Press, Bilbao*. 9 pp
- Eckert, R., Randall, D., Burggren, W. und French, K. (2000).** Biophysikalische Grundlagen neuronaler Erregung. *Tierphysiologie*. Thieme, Stuttgart.
- Effertz, T., Nadrowski, B., Piepenbrock, D., Albert, J. T. und Gopfert, M. C. (2012).** Direct gating and mechanical integrity of *Drosophila* auditory transducers require TrpN1. *Nature Neuroscience* 15(9): 1198-1200
- Effertz, T., Wiek, R. und Göpfert, Martin C. (2011).** NompC trp channel is essential for *Drosophila* sound receptor function. *Current Biology* 21(7): 592-597
- Field, L. H. und Matheson, T. (1998).** Chordotonal organs of insects. *Advances in Insect Physiology* Volume 27: 1-228
- Foster, S. P., Denholm, I. und Thompson, R. (2002).** Bioassay and field-simulator studies of the efficacy of pymetrozine against peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), possessing different mechanisms of insecticide resistance. *Pest Management Science* 58(8): 805-810
- Foster, S. P., Denholm, I. und Thompson, R. (2003).** Variation in response to neonicotinoid insecticides in peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science* 59(2): 166-173



- Füller, H. und Ernst, A. (1974).** Die Ultrastruktur der femoralen Chordotonalorgane von *Carausius morosus* (Br). *G. Fischer*, Jena
- Fuog, D., Fergusson, S. J. und Flückiger, C. (1998).** Pymetrozine: A Novel Insecticide Affecting Aphids and Whiteflies. *Insecticides with Novel Modes of Action*. Springer Berlin/ Heidelberg.
- García-Sanz, N., Fernández-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sánchez, E., Fernández-Ballester, G. und Ferrer-Montiel, A. (2004).** Identification of a Tetramerization Domain in the C Terminus of the Vanilloid Receptor. *The Journal of Neuroscience* 24(23): 5307-5314
- Gillespie, P. G. und Walker, R. G. (2001).** Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature* 413(6852): 194-202
- Goldammer, J., Büschges, A. und Schmidt, J. (2012).** Motoneurons, DUM cells, and sensory neurons in an insect thoracic ganglion: A tracing study in the stick insect *Carausius morosus*. *The Journal of Comparative Neurology* 520(2): 230-257
- Gong, J., Wang, Q. und Wang, Z. (2013).** NompC is likely a key component of *Drosophila* mechanotransduction channels. *European Journal of Neuroscience* 38(1): 2057-2064
- Gong, Z., Son, W., Doo Chung, Y., Kim, J., Shin, D. W., McClung, C. A., Lee, Y., Lee, H. W., Chang, D.-J., Kaang, B.-K., Cho, H., Oh, U., Hirsh, J., Kernan, M. J. und Kim, C. (2004).** Two interdependent TrpV channel subunits, inactive and nanchung, mediate hearing in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 24(41): 9059-9066
- Göpfert, M. C., Albert, J. T., Nadrowski, B. und Kamikouchi, A. (2006).** Specification of auditory sensitivity by *Drosophila* Trp channels. *Nature Neuroscience* 9(8): 999-1000
- Graber, V. (1881).** Die chordotonalen Sinnesorgane und das Gehör der Insekten. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 20(1): 506-640
- Harrewijn, P. und Kayser, H. (1997).** Pymetrozine, a fast-acting and selective inhibitor of aphid feeding. In-situ studies with electronic monitoring of feeding behaviour. *Pesticide Science* 49(2): 130-140
- He, Y., Chen, L., Chen, J., Zhang, J., Chen, L., Shen, J. und Zhu, Y. C. (2011).** Electrical penetration graph evidence that pymetrozine toxicity to the rice brown planthopper is by inhibition of phloem feeding. *Pest Management Science* 67(4): 483-491

- Head, S. und Bush, B. H. (1991).** Proprioceptive reflex interactions with central motor rhythms in the isolated thoracic ganglion of the shore crab. *Journal of Comparative Physiology A* 168(4): 445-459
- Hellekes, K. (2012).** Task-specific modulation of a proprioceptive reflex in a walking insect. *Universität zu Köln, Köln*
- Hodgkin, A. L. und Huxley, A. F. (1952).** A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* 117(4): 500-544
- Hofmann, T. und Koch, U. T. (1985).** Acceleration receptors in the femoral chordotonal organ of the stick insect, *Cuniculina impigra*. *The Journal of Experimental Biology* 114: 225-237
- Hofmann, T., Koch, U. T. und Bässler, U. (1985).** Physiology of the femoral chordotonal organ in the stick insect, *Cuniculina impigra*. *The Journal of Experimental Biology* 114: 207-223
- Kamikouchi, A., Inagaki, H. K., Effertz, T., Hendrich, O., Fiala, A., Gopfert, M. C. und Ito, K. (2009).** The neural basis of *Drosophila* gravity-sensing and hearing. *Nature* 458(7235): 165-171
- Kang, L., Gao, J., Schafer, W. R., Xie, Z. und Xu, X. Z. (2010).** C. elegans Trp family protein Trp-4 is a pore-forming subunit of a native mechanotransduction channel. *Neuron* 67(3): 381-391
- Kaufmann, L., Schürmann, F., Yiallourous, M., Harrewijn, P. und Kayser, H. (2004).** The serotonergic system is involved in feeding inhibition by pymetrozine. Comparative studies on a locust (*Locusta migratoria*) and an aphid (*Myzus persicae*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 138(4): 469-483
- Keil, T. A. (1997).** Functional morphology of insect mechanoreceptors. *Microscopy Research and Technique* 39(6): 506-531
- Kernan, M. (2007).** Mechanotransduction and auditory transduction in *Drosophila*. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 454(5): 703-720
- Kim, J., Chung, Y. D., Park, D.-y., Choi, S., Shin, D. W., Soh, H., Lee, H. W., Son, W., Yim, J., Park, C.-S., Kernan, M. J. und Kim, C. (2003).** A trpV family ion channel required for hearing in *Drosophila*. *Nature* 424(6944): 81-84
- Kittmann, R. und Schmitz, J. (1992).** Functional specialization of the scoloparia of the femoral chordotonal organ in stick insects. *The Journal of Experimental Biology* 173: 91-108

- Lee, J., Moon, S., Cha, Y. und Chung, Y. D. (2010).** *Drosophila* TrpN(=NompC) channel localizes to the distal end of mechanosensory cilia. *PLoS ONE* 5(6): e11012
- Lehmann-Horn, F. (2007).** Motorische Systeme. *Physiologie des Menschen*. Springer Berlin/ Heidelberg.
- Lehnert, Brendan P., Baker, Allison E., Gaudry, Q., Chiang, A.-S. und Wilson, Rachel I. (2013).** Distinct roles of Trp channels in auditory transduction and amplification in *Drosophila*. *Neuron* 77(1): 115-128
- Li, W., Feng, Z., Sternberg, P. W. und Shawn Xu, X. Z. (2006).** A *C. elegans* stretch receptor neuron revealed by a mechanosensitive Trp channel homologue. *Nature* 440(7084): 684-687
- Liang, X., Madrid, J., Saleh, H. S. und 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* 68(1): 1-7
- Liedtke, W. und Kim, C. (2005).** Functionality of the TrpV subfamily of Trp ion channels: Add mechano-Trp and osmo-Trp to the lexicon! *Cellular and Molecular Life Sciences* 62(24): 2985-3001
- Lu, Q., Senthilan, P. R., Effertz, T., Nadrowski, B. und Göpfert, M. C. (2009).** Using *Drosophila* for studying fundamental processes in hearing. *Integrative and Comparative Biology* 49(6): 674-680
- Margaritopoulos, J. T., Tsamandani, K., Kanavaki, O. M., Katis, N. I. und Tsitsipis, J. A. (2010).** Efficacy of pymetrozine against *Myzus persicae* and in reducing potato virus Y transmission on tobacco plants. *Journal of Applied Entomology* 134(4): 323-332
- Matheson, T. (1997).** Octopamine modulates the responses and presynaptic inhibition of proprioceptive sensory neurones in the locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology* 200(9): 1317-25
- Morita, M., Ueda, T., Yoneda, T., Koyanagi, T. und Haga, T. (2007).** Flonicamid, a novel insecticide with a rapid inhibitory effect on aphid feeding. *Pest Management Science* 63(10): 969-973
- Nadrowski, B., Albert, J. T. und Göpfert, M. C. (2008).** Transducer-based force generation explains active process in *Drosophila* hearing. *Current Biology* 18(18): 1365-1372
- Nauen, R. und Bretschneider, T. (2002).** New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook* 13(6): 241-245

- Nilius, B. (2007).** Trp channels in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772(8): 805-812
- O'Neil, R. und Heller, S. (2005).** The mechanosensitive nature of TrpV channels. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 451(1): 193-203
- Phelps, C. B. und Brand, A. H. (1998).** Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* 14(4): 367-379
- Ramirez, J. M., Büschges, A. und Kittmann, R. (1993).** Octopaminergic modulation of the femoral chordotonal organ in the stick insect. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 173(2): 209-219
- Sauer, A. E., Driesang, R. B., Büschges, A. und Bässler, U. (1995).** Information processing in the femur-tibia control loop of stick insects. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 177(2): 145-158
- Schmidt, K. (1969).** Der Feinbau der stiftführenden Sinnesorgane im Pedicellus der Florfliege *Chrysopa Leach* (Chrysopidae, Planipennia). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 99(3): 357-388
- Schmitz, J., Dean, J. und Kittmann, R. (1991).** Central projections of leg sense organs in *Carausius morosus* (Insecta, Phasmida). *Zoomorphology* 111(1): 19-33
- Sechser, B., Reber, B. und Bourgeois, F. (2002).** Pymetrozine: Selectivity spectrum to beneficial arthropods and fitness for integrated pest management. *Anzeiger für Schädlingskunde* 75(3): 72-77
- Sénatore, S., Rami Reddy, V., Sémériva, M., Perrin, L. und Lalevée, N. (2010).** Response to mechanical stress is mediated by the TrpA channel *painless* in the *Drosophila* heart. *PLoS genetics* 6(9): e1001088
- Shiraiwa, T. und Carlson, J. R. (2007).** Proboscis Extension Response (PER) Assay in *Drosophila*. *Journal of visualized experiments : JoVE* 3: 193
- Stein, W. und Sauer, A. E. (1999).** Physiology of vibration-sensitive afferents in the femoral chordotonal organ of the stick insect. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 184(3): 253-263
- Tracey Jr, W. D., Wilson, R. I., Laurent, G. und Benzer, S. (2003).** *Painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell* 113(2): 261-273
- Walker, R. G., Willingham, A. T. und Zuker, C. S. (2000).** A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* 287(5461): 2229-2234

- Weidler, D. J. und Diecke, F. P. J. (1969).** The role of cations in conduction in the central nervous system of the herbivorous insect *Carausius morosus*. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 64(4): 372-399
- Weiland, G., Bässler, U. und Brunner, M. (1986).** A biological feedback control system with electronic input - the artificially closed femur-tibia control system of stick insects. *The Journal of Experimental Biology* 120: 369-385
- Wiek, R. (2012).** Funktion und Morphologie chordotonaler Sensillen im Bein der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Diplom Diplomarbeit. *Universität zu Köln, Köln*
- Wiek, R. J. (2013).** A functional characterisation of *Drosophila* chordotonal organs. Doktor rer.nat. *Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen*
- Wiesendanger, M. (1997).** Motorische Systeme. *Physiologie des Menschen*. Springer Berlin/ Heidelberg.
- Wing, K. D., Schnee, M. E., Sacher, M. und Connair, M. (1998).** A novel oxadiazine insecticide is bioactivated in lepidopteran larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 37(1): 91-103
- Wyss, P. und Bolsinger, M. (1997).** Translocation of pymetrozine in plants. *Pesticide Science* 50(3): 195-202
- Yack, J. E. (2004).** The structure and function of auditory chordotonal organs in insects. *Microscopy Research and Technique* 63(6): 315-337
- Yan, Z., Zhang, W., He, Y., Gorczyca, D., Xiang, Y., Cheng, L. E., Meltzer, S., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (2013).** *Drosophila* NompC is a mechanotransduction channel subunit for gentle-touch sensation. *Nature* 493(7431): 221-225

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b> Strukturformel von Pymetrozin und Flonicamid.....	<b>10</b>
<b>Abb. 1.2:</b> Wirkung von Pymetrozin auf eine Wanderheuschrecke ( <i>Lucusta migratoria</i> ).....	<b>11</b>
<b>Abb. 1.3:</b> Schema eines Beines der Stabheuschrecke <i>Carausius morosus</i> und die Lage des femoralen Chordotonalorgans im Femur. ....	<b>12</b>
<b>Abb. 1.4:</b> Einzelne Zelltypen der sensorischen Neurone des femoralen Chordotonalorgans. ....	<b>14</b>
<b>Abb. 1.5:</b> Zellulärer Aufbau von Mechanorezeptoren (Chordotonalorgane) und ihren homologen Strukturen.....	<b>17</b>
<b>Abb. 1.6:</b> Mögliche Zusammenhänge der Kanäle im Transduktionsprozess eines Chordotonalorgans.....	<b>19</b>
<b>Abb. 2.1:</b> Schema von <i>Carausius morosus</i> (ventrale Darstellung).....	<b>22</b>
<b>Abb. 2.2:</b> Schematische Zeichnung der Femur-Präparation für die Stimulation des femoralen Chordotonalorgans (fCO) und extrazelluläre Ableitung des F2-Nerves (Hellekes 2012).....	<b>23</b>
<b>Abb. 2.3:</b> Schematischer Versuchsaufbau für extra- und intrazelluläre Versuche.	<b>24</b>
<b>Abb. 2.4:</b> Struktur der sensorischen Neurone des fCOs im Ganglion.....	<b>26</b>
<b>Abb. 2.5:</b> Beispiel für den positiven Effekt eines Insektizides, hier Pymetrozin. ....	<b>28</b>
<b>Abb. 2.6:</b> Zeitliche Reihenfolge der Spülvorgänge.....	<b>30</b>
<b>Abb. 2.7:</b> Schematischer Versuchsaufbau zum Filmen der Laufbewegungen einer <i>Drosophila</i> . ....	<b>32</b>
<b>Abb. 2.8:</b> Versuchsaufbau für negative Gravitaxis Versuche.....	<b>33</b>
<b>Abb. 3.1:</b> Injektionsversuche. ....	<b>35</b>
<b>Abb. 3.2:</b> Vergleich der Extensor Motoraktivität (F2-Nerv) unter dem Einfluss von Ringer und zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Pymetrozin.....	<b>36</b>
<b>Abb. 3.3:</b> Konzentrationsreihen der Insektizide Pymetrozin, CK98573, CJ75565 und BZ72191.....	<b>37</b>
<b>Abb. 3.4:</b> Flonicamid-Konzentrationsreihe.....	<b>38</b>
<b>Abb. 3.5:</b> AH27783-Konzentrationsreihe.....	<b>39</b>
<b>Abb. 3.6:</b> Konzentrationsreihe der Insektizide AJ11868 und AA86075.....	<b>40</b>

---

<b>Abb. 3.7:</b> Verhalten der Extensor Motoneurone unter Bariumeinfluss.....	<b>42</b>
<b>Abb. 3.8:</b> Intrazelluläre Einzelableitung einer V+ Zelle unter andauernder rampenförmiger Stimulation des femoralen Chordotonalorgans.....	<b>47</b>
<b>Abb. 3.9:</b> Zeitlicher Verlauf der Aktivitätsdifferenz verschiedener Stimulationsabschnitte.....	<b>48</b>
<b>Abb. 3.10:</b> Intrazelluläre Einzelableitung einer P+V- Zelle bei unterbrochener Stimulation des femoralen Chordotonalorgans.....	<b>49</b>
<b>Abb. 3.11:</b> Intrazelluläre Einzelableitung einer P+V+- Zelle bei unterbrochener Stimulation des femoralen Chordotonalorgans.....	<b>50</b>
<b>Abb. 3.12:</b> Intrazelluläre Einzelableitung einer P+V+- Zelle bei unterbrochener Stimulation des femoralen Chordotonalorgans.....	<b>51</b>
<b>Abb. 3.13:</b> Ableitung einer P-V- Zelle, vor (oben) und nach (unten) dem Kontakt mit dem Insektizid AJ11868 (1 $\mu$ M).....	<b>53</b>
<b>Abb. 3.14:</b> Wirkung von AJ11868 auf eine P+-V+ Zelle des fCOs.....	<b>54</b>
<b>Abb. 3.15:</b> Wirkung von AH27783 auf eine P+-V+ Zelle des fCOs.....	<b>56</b>
<b>Abb. 3.16:</b> Beinbewegungen von <i>Drosophila</i> vor (A) und nach (B-D) dem Einfluss von Pymetrozin (1 mM).....	<b>59</b>
<b>Abb. 3.17:</b> Färbung des femoralen und tibialen Chordotonalorgans im Bein von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	<b>60</b>
<b>Abb. 3.18:</b> Vergleich der negativen Gravitaxis von <i>Drosophila</i> mit und ohne Pymetrozin: <i>CantonS</i> , <i>NompC</i> und <i>Iav</i> .....	<b>62</b>
<b>Abb. 3.19:</b> Vergleich der negativen Gravitaxis von <i>Drosophila</i> mit und ohne Pymetrozin: <i>w<sup>1118</sup></i> und <i>Nan</i> .....	<b>63</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 2.1:</b> In den Experimenten verwendere Stöcke von <i>Drosophila melanogaster</i> . .....	<b>21</b>
<b>Tab. 3.1:</b> Anzahl der abgeleiteten Zelltypen.....	<b>45</b>
<b>Tab. 3.2:</b> Maximum der durchschnittlichen Frequenzen der intrazellulär abgeleiteten Zellen im Vergleich zum Maximum der durchschnittlichen Frequenz nach der Wirkung von Pymetrozin. ....	<b>46</b>
<b>Tab. 3.3:</b> Prozentsatz der Proboscis Reaktionen auf die verschiedenen Insektizide unter Berücksichtigung der getesteten Proteine.....	<b>64</b>



## Danksagung

Bei folgenden Personen möchte ich mich besonders bedanken:

**Prof. Dr. Ansgar Büschges** für die Betreuung meiner Arbeit und dabei sowohl für die fachliche, als auch für die menschliche Unterstützung. (Falls du es noch nicht wusstest: Bist ein echt guter Chef!)

**Prof. Dr. Peter Kloppenburg** für die Übernahme meiner Zweitkorrektur.

**Dr. Ulrich Ebbinghaus** und **Maïke Forstner** von Bayer CropScience sowohl für die Insektizide als auch die thematische Betreuung und Hilfestellung bei Fragen.

**Dr. Till Bockemühl, Elzbieta Godlewska, Anne Tzschichholz, Manuela Ruppert und Anna Schneider** für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

**Carmen Wellmann** für die Unterstützung während der ganzen Arbeit sowohl durch fachlichen und menschlichen Rat als auch durch ihre Süßigkeiten.

**Manuela Ruppert, Thomas Giang** und **Shreyas Jois** für die Gespräche in unserem Büro, die sowohl fachlich hilfreich sein konnten, als auch unglaublich lustig und unterhaltsam.

**Michael Dübbert, Jan Sydow, Sima Seyed-Nejadi, Sherylane Seeliger und Lydia Berlingen** und **Hans-Peter Bollhagen** für die Hilfe bei technischen Problemen, Laborfragen und bürokratischen Hürden sowie dem allgemeinen Uniwahnsinn.

Der **gesamten AG Büschges** für die angenehme Arbeitsatmosphäre und das kollegiale Miteinander, was so manch frustrierende Stunde erleichtert hat.

Und last but not least meinen **Freunden**, egal ob in der Uni oder uniferen, ohne die das ganze Projekt nicht zu schaffen gewesen wäre. Besonderer Dank gilt dabei **Manuel Liebig** und den **Homies** sowie **Elzbieta Godlewska** und **Anne Tzschichholz**.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Ansgar Büschges betreut worden.

Köln, den 26.06.2014

