

Ventilatorische Rhythmogenese im isolierten Insektennervensystem

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von Hussam Peter Bustami
aus Göttingen

Göttingen 2001

D7

Referent:

Prof. Dr. R. Hustert

Korreferent:

Dr. R. Lakes-Harlan

Tag der mündlichen Prüfung:

03. Mai 2001

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|--------------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Material und Methoden | 6 |
| 2.1 Neuroanatomische Vorarbeiten | 6 |
| 2.1 Versuchstiere | 8 |
| 2.2 Efferente Entladungen von ventilatorischen Nerven im isolierten Nervensystem | 9 |
| 2.2.1 Präparation der Tiere zur Entnahme des Nervenstranges | 10 |
| 2.2.2 Aufzeichnung efferenter Aktivitäten auf Magnetband-Kassetten | 10 |
| 2.2.3 Analyse der Daten | 12 |
| 2.2.4 Verwendung der Aufnahme-und Analyse Software DATAPAC | 13 |
| 2.3 Einflüsse von Sauerstoff-und Kohlendioxidpartialdrücken auf die Ventilationsrate im isolierten ZNS | 14 |
| 2.4 Intrazelluläre Ableitungen | 17 |
| 2.4.1 Im semiintakten Präparat | 17 |
| 2.4.2 Im isolierten ZNS mit intakter trachealer Versorgung | 18 |
| 2.4.3 Analyse der elektrophysiologischen Daten und erfolgreiche Färbungen | 18 |
| 3 Ergebnisse | 20 |
| 3.1 Neuroanatomische Vorarbeiten | 20 |
| 3.2 Efferente ventilatorische Muster | 22 |
| 3.2.1 Langzeitaufnahmen ventilatorischer Aktivitäten | 23 |
| 3.2.1.1 Ventilationsmuster von <i>Taeniopoda eques</i> | 23 |
| 3.2.1.2 Ventilationsmuster von <i>Locusta migratoria</i> | 25 |
| 3.2.1.3 Pausenlängen-Histogramm | 28 |
| 3.2.2 Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Atemgas- partialdrücken | 29 |
| 3.2.2.1 Einfluß variierender Sauerstoffpartialdrücke auf die Ventilation | 29 |
| 3.2.2.2 Sauerstoffantwortkurve und ANOVA-Test | 34 |
| 3.2.2.3 Einfluß variierender CO ₂ -Partialdrücke | 37 |
| 3.3 Identifizierte Interneurone | 41 |
| 3.3.1 Im semiintakten Präparat | 41 |
| 3.3.2 Im isolierten ZNS mit intakter trachealer Versorgung | 44 |
| 3.3.3 Klassifizierung der Interneurone | 59 |
| 3.3.4 Intrazellulärer Nachweis von Sauerstoffsensitivität | 59 |
| 4 Diskussion | 62 |
| 5 Literaturliste | 83 |
| 6 Zusammenfassung | 92 |
| 7 Anhang | |

Abstract

Ventilation and underlying neural rhythmogenesis were investigated on the behavioural, neuroanatomical and neurophysiological level in different locust species (*Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Schistocerca americana*, *Taeniopoda eques*).

Staining with CoCl_2 revealed the anatomy of putative ventilatory interneurons in the metathoracic ganglion. One possible ventilatory intersegmental interneuron could be characterised due to the position of the soma and the anatomical structure.

Possible receptor cells exposed on the surface of the ganglion which might detect respiratory gases in the hemolymph were stained with dextrane-linked fluorescein and revealed neurite-like endings reaching into the ganglion. Their function might be detection of changing partial pressures in the surrounding medium.

In an isolated locust nerve cord preparation (mesothoracic – first abdominal ganglion) efferent ventilatory patterns could be recorded without interference from sensory feedback and were compared to patterns in intact animals. A wide range of ventilatory patterns occurred depending on temperature, physiological condition of the used animal and on oxygen supply of the tissue. Two extreme patterns (with transient forms) occur: continuous, often high frequency ventilation and low frequency discontinuous ventilation (typical insect “group ventilation”) with long pauses between two burst groups. Clear discontinuous ventilatory patterns occurred regularly when the ventral tracheal supply of the ganglion was maintained. By comparing results from various insect species it could be demonstrated that regular ventilatory patterns are produced in the isolated locust CNS.

Experimental change of partial pressures of O_2 and CO_2 in the ambient atmosphere showed a significant correlation to ventilatory frequencies for the isolated CNS (in intact animals: *Taeniopoda eques* and *Schistocerca americana*). Increased concentration of CO_2 raises the frequency and increased oxygen lowers the frequency. This is clear evidence for the presence of internal oxygen receptors of the CNS that could be a separate type of chemoreceptors as well as oxygen sensitive neurons. Exposure to increased levels of oxygen elicited clear ventilatory rhythms causing excitatory input from (a) presynaptic cell(s) in one identified interneuron.

With intracellular recording and staining with Lucifer Yellow ventilatory interneurons in the metathoracic ganglion from the region of the fused abdominal neuromeres (mainly first fused neuromer) were studied. Experiments were made in semi-intact

preparations and mainly in the isolated CNS with tracheal supply. In the semiintact preparation two new ventilatory interneurons were found, including a local one previously unknown for locusts. In the isolated CNS further 8 ventilatory interneurons were recorded, stained and were named VentIN 1-10. Functionally, they can be subdivided into: “correlated to the ventilatory central pattern generator (CPG)”, “components of the CPG” and “connecting function to other neuronal networks” (e.g. flight, excretion, running etc.). Especially the VentIN4 and 5 revealed new insights in the nature of ventilatory rhythmogenesis in insects.

A multilevel model of ventilatory rhythmogenesis is suggested:

A basic network of interneurons in the metathoracic ganglion produces a continuous synaptical output of EPSPs to second order interneurons which, depending on their output threshold are activated and feed back inhibitory or excitatory input to the basic network. These interneurons could be connected to “third or fourth order” interneurons in the abdominal ganglia or neuromeres which drive the ventilatory motoneurons. Sensory or metabolic influences, which should almost be eliminated in the isolated CNS, provide input to the different network levels and adapt it to other physiological needs. Tonicly active interneurons couple ventilation to other facultatively linked networks (moulting, excretion or flight, walking and stridulation) and give an additional drive to the basic network.



(*Taeniopoda eques*)

1. Einleitung

Die Atmung bei Insekten ist eines der grundlegenden Verhaltensmuster rhythmischer Funktionen des Körpers, das eine hinreichende Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff sichert. Bei Arthropoden erfolgt die Gasversorgung über ein Tracheensystem, das aus einem immer feiner verzweigten Röhrensystem chitinöser Struktur besteht. Die feinsten Ausläufer reichen bis zu einzelnen Zellen, die dadurch eine direkte Sauerstoffversorgung erhalten. Je nach der Insektenkörpergröße existiert Atmung in Form von passivem Gasaustausch durch Diffusion bis hin zu aktiver Konvektion im trachealen System, hauptsächlich vermittelt durch die koordinierte motorische Aktivität (Chapman, 1998). Diese aktive Ventilation erfolgt über eine Reihe respiratorischer Muskeln (Snodgrass 1935, Hustert, 1974), die durch Kontraktion des Abdomens (Miller, 1960, Lewis et al., 1973; Hustert, 1974, Rose et al., 2000), in Koordination mit alternierender Stigmenaktivität (Verschlußklappen am äußeren Ende der Tracheen), einen stetigen Luftstrom durch das Insekt hervorrufen. Die motorische Aktivität wird von rhythmischer neuronaler Kontrolle getrieben, welche bei Heuschrecken im zentralen Rhythmusgenerator (CPG, von engl.: central pattern generator) entsteht, der sich im Metathorakalganglion befindet (Review: Burrows, 1996). Die neuronalen Muster dieses ventilatorischen CPGs zeigen eine weite Bandbreite von Intervallen der

Atemzüge. Sie sind hauptsächlich von Verhaltens- oder Stoffwechszuständen abhängig, die Einfluß auf das Tier ausüben. Eine Heuschrecke unter Stress wird hohe Frequenzen abdominaler ventilatorischer Bewegungen zeigen (Harrison et al., 1991; Krolikowski & Harrison, 1996; Greenlee & Harrison, 1998). Eine Heuschrecke im Ruhezustand hingegen zeigt Ventilationsmuster mit langsamen und diskontinuierlichen abdominalen Pumpbewegungen (Quinlan & Hadley 1993, Lange et al. 2000). Zwischen diesen zwei Extremformen kommen viele Übergangsmuster vor (Bustami & Hustert, 2000). Sie entstehen aus dem zugrundeliegenden CPG. Dieser ist ein neuronales Netz - von z. T. bekannten Interneuronen (Pearson, 1980; Ramirez & Pearson, 1989, Ramirez, 1998) - das die Rhythmen für die Motoneurone erzeugt, welche die ventilatorischen Muskeln versorgen.

Basierend auf der grundlegenden Rhythmizität dieses CPGs können Stoffwechseleinflüsse, Hormoneinflüsse, Sinneseinflüsse, neuronale Einflüsse und Verhaltenseinflüsse den rhythmischen Ausgang modifizieren. Viele dieser Aspekte sind bereits untersucht worden:

Bei Heuschrecken analysierten Ramirez & Pearson (1989) ventilatorische Mustergeneration während hochfrequenter Atmung im semiintakten Präparat, indem sie zum CPG gehörende Interneurone mit sog. "resetting properties" suchten, d. h. Depolarisierung solcher Interneurone sollte zu einer Phasenverschiebung oder Neukonstitution des Rhythmus führen. Solche Interneurone sind vorwiegend im Metathorakalganglion lokalisiert. Dort befindet sich wahrscheinlich der primäre Oszillator des aus intersegmentalen Interneuronen bestehenden ventilatorischen Netzwerkes.

Die Beziehung von körperlicher Aktivität zur Atmung (Sauerstoffverbrauch) wurde bei folgenden Verhaltensweisen untersucht: Heuschreckenatmung und tracheale Atmung während Flugaktivität (Weis-Fogh, 1967), für den Flugmetabolismus in bezug auf Sauerstoffkonsum der Libelle *Erythemis simplicicollis* (Harrison und Lighton, 1998) und für Laufen bei verschiedenen Schabenarten (Herreid und Full, 1983).

Der Einfluß von Hypoxie und Hyperkapnie auf ventilatorische Bewegungen wurde im Wasserinsekt *Cornutus corydalus* studiert (Kinnamon et al., 1984). Die Relation interner physiologischer Parameter wie pH, P_{CO_2} und anderer trachealer Gaskonzentrationen zur Ventilationsrate wurde bei den Feldheuschrecken (Acrididae) *Melanoplus differentialis* und *Schistocerca americana* studiert

(Krolikowski und Harrison, 1995). So konnte gezeigt werden, daß der PCO_2 einen Einfluß auf Ventilationsraten in Heuschrecken ausübt. Temperaturänderungen verursachen Übergänge zwischen kontinuierlicher und diskontinuierlicher CO_2 -Abgabe bei Honigbienen (Lighton und Lovegrove, 1990). Atmungsmuster wurden zum Wasserverlust in *Drosophila melanogaster* korreliert (Williams et al. 1997 und 1998). Genetische Unterschiede von Atmungsmustern entwickelten sich bei Populationen von *Drosophila*, die mit unterschiedlichen Feuchtigkeitsbedingungen gezüchtet wurden.

Ventilatorische Muster im isolierten ZNS

Ein typisches ventilatorisches Muster ruhender Insekten wurde diskontinuierliche Atmung (DV von engl.: discontinuous ventilation) genannt (Schneidermann, 1956). Dieses Muster findet sich oft bei Insekten, so z.B. bei Ameisen (Lighton, 1990; Lighton und Berrigan, 1994; Quinlan und Lighton, 1999), Feldheuschrecken (Harrison et al., 1995; Lange et al. 2000), Honigbienen (Lighton und Lovegrove, 1990), Laufkäfern (Punt et al., 1957), Schaben (Kestler et al., 2000) und bei anderen Insektenarten (Kestler, 1984). Die endogene Aktivität des durch die afferente Rückkopplung ungestörten CPGs ist nie intensiver betrachtet worden (aber siehe: Case, 1961; Komatsu, 1982).

In den meisten der bisherigen Untersuchungen zum ventilatorischen Netzwerk verursachte das verletzte Abdomen (durch die notwendige Präparation hervorgerufen) unnatürliche afferente Rückwirkungen auf zugrundliegende Neurone des Rhythmusgenerators, hauptsächlich resultierend in heftiger hochfrequenter Ventilation. In dieser Arbeit wurde deswegen ein neuer Ansatz zusammen mit der "traditionellen" Methode - der intrazellulären Suche nach Interneuronen des CPG - versucht: Atmungsmuster von einem isolierten Nervensystem müßten vergleichbar sein mit Mustern, die sich auch bei intakten ruhenden Tieren finden. In diesem Fall sollte der motorische Output von einem isolierten Zentralnervensystem (ZNS) die nahezu reine endogene Aktivität des ventilatorischen CPGs darstellen. Langzeitversuche mit dem isolierten Heuschrecken-ZNS sind in der Lage, die weite Bandbreite von motorischen Mustern ohne externen Stress zu charakterisieren, die auch für intakte Tiere in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnten (Hustert, 1975). Ein vorrangiges Ziel dieser Untersuchungen war eine grundlegende Vorbereitung für weiterführende Experimente auf dem intrazellulären Niveau des

Netzes (CPG), das endogen ventilatorische Muster erzeugt. Weiterhin ermöglicht das isolierte ZNS, bei dem insbesondere die Aufrechterhaltung trachealen Gasaustausches sehr stabilisierend auf den ventilatorischen Rhythmus wirkt, die Wirkung verschiedenster Parameter wie z.B. Gas-Partialdrücke (s. Kap. 2.4) , pH-Werte, Transmitter usw. zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Beschreibung dieser Muster wurden mit den Erkenntnissen früherer Studien, mit Aussagen über Atmung in Heuschrecken und in verschiedenen Spezies der Hexapoden, verglichen.

Untersuchung des Einflusses von Partialdrücken atmungsrelevanter Gase

Die Untersuchungen an isolierten ZNS erlaubten es zu ermitteln, ob und in welcher Weise externe Parameter den endogenen Rhythmus beeinflussen können. Partialdrücke von CO₂ und O₂ standen zwar seit längerer Zeit in der Diskussion, einen modulatorischen Einfluß auf die ventilatorische Rhythmogenese auf neuraler Ebene und im intakten Insekt zu haben (Hazelhoff, 1927; Case, 1957a; Miller 1964; Kinnamon et al., 1984; Harrison et al. 1991; Harrison, 1997, Henderson et al., 1998), während aber bei z. B. Säugern die Existenz von Rezeptoren zur Messung der Atemgaspartialdrücke im Blut seit langem bekannt ist, war - insbesondere für die Frage nach Sauerstoffrezeptoren (Kinnamon et al., 1984) - dies im Insektennervensystem noch nicht deutlich beantwortet worden. Untersuchungen hierzu (im Rahmen einer messtechnischen Kooperation mit dem Labor von Jon Harrison, ASU, Tempe, AZ) zeigten einen direkten hochsignifikanten Einfluß von Sauerstoffpartialdrücken auf den ventilatorischen Rhythmus im isolierten ZNS eines Insekts. Dies erbrachte somit den ersten direkten Nachweis eines Sauerstoffrezeptors, der Ventilation beeinflusst. Auch Hinweise auf einen zentralen CO₂-Rezeptor im Insekten-ZNS konnten erbracht werden.

Suche nach ventilatorischen Interneuronen des Zentralen Mustergenerators

Netzwerke respiratorischer Interneurone bei Insekten wurden in der Vergangenheit mehrfach untersucht (Pearson, 1980; Burrows, 1975 u. 1982; Komatsu, 1984; Ramirez und Pearson, 1989; Otto und Janiszewski, 1989, Ramirez 1998). Insgesamt liegen aber, im Gegensatz zu den Untersuchungen an anderen Rhythmusgeneratoren (Flug, Laufen), am Netzwerk der Ventilation bisher vergleichsweise wenige Resultate vor. Dies beruht nicht zuletzt auf der weiten

intersegmentalen Verzweigung dieses neuronalen Netzwerkes über das Insekten-ZNS und der kleinen Somata der Interneurone, von denen schwer abzuleiten ist.

Eine Reihe von Interneuronen, die sog. "resetting properties" haben (s.o.) und das Zusammenspiel des ventilatorischen mit anderen rhythmischen Netzwerken (Ramirez, 1998) konnten zwar gezeigt werden, jedoch wurde der primäre Antrieb der Ventilation bisher nicht gefunden. Mit Hilfe des in dieser Studie beschriebenen isolierten ZNS-Präparates konnten sensorische Einflüsse ausgeschaltet und ein möglicherweise basaler Antrieb nun auch intrazellulär gezeigt werden. Descendierende Interneurone, deren Somata in den verschmolzenen Neuromeren des Metathorakalganglions sitzen, könnten ein "inneres Uhrwerk" antreiben, das auf andere Interneurone in den Abdominalganglien aufschaltet, die ihrerseits wieder mitunter eine positive Rückkopplung auf das Uhrwerk haben können. Anhand der in dieser Arbeit auf intrazellulärer Ebene gewonnenen Erkenntnisse konnte ein erweitertes und neues Modell zur ventilatorischen Rhythmogenese entwickelt werden, welches die verschiedenen Ebenen von Netzwerkeigenschaften mit einbezieht.

Die vorgenommenen Arbeiten zur Entwicklung und Charakterisierung eines isolierten ZNS-Präparates, die Untersuchungen externer Parameter und schließlich die intrazellulären Arbeiten an diesem Präparat haben Erkenntnisse zur ventilatorischen Rhythmogenese erbracht und unser Grundverständnis der Funktionsweise neuronaler Netzwerke in Insektennervensystemen erweitert.

2. Material und Methoden

2.1 Neuroanatomische Vorarbeiten

Backfills

Vor Beginn der elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgten neuroanatomische Untersuchungen, die die Lage evtl. ventilatorischer, projizierender Interneurone erhellen sollten. Aus früheren Untersuchungen zur ventilatorischen Rhythmogenese der Atmung war bekannt, daß wichtige Bestandteile des CPG sich im Bereich des Metathorakalganglions befinden. Mit Hilfe retrograder Kobaltfüllung der Axone ganzer Konnektive, die vorzugsweise hinter dem zweiten freien Abdominalganglion nach anterior durchgeführt wurden, sollten die Lage potentieller Atemneurone, ihrer Somata und ihre Neuritenverzweigungen im Metathorakalganglion für spätere intrazelluläre Ableitungen dargestellt werden.

Präparation:

Das Tier wurde unter Kältenarkose von ventral oder dorsal geöffnet. Das Nervensystem wurde so frei gelegt, daß der Bereich der Konnektive hinter dem 2. freien Abdominalganglion sichtbar wurde. Das Konnektiv wurde mit einer Feinschere durchtrennt und das durchtrennte Ende in eine Art Vaselinetöpfchen, welches den Farbstoff (3% CoCl_2) enthielt, gelegt. Durch den natürlichen axonalen Transport und/oder durch Diffusion konnte der Farbstoff dadurch die Axone im Konnektiv ins Metathorakalganglion gelangen. Das Präparat wurde über Nacht im Kühlschrank belassen, damit dem Farbstoff genügend Zeit zur Ausbreitung blieb. Bei erfolgreicher Färbung konnte man nun den Verlauf der Axone und die Somata erkennen. Als Farbstoff wurden schwermetallhaltige Salzlösungen verwendet. Kobaltchlorid oder Kobalthexaminchlorid kamen zum Einsatz. Die Entwicklung der Präparate geschah wie folgt beschrieben:

- Fällung der Kobaltionen unter dem Abzug durch eine verdünnte (3%) Ammoniumsulfidlösung $[(\text{NH}_4)_2\text{S}]$, wodurch die Kobaltionen in Form von CoS vorliegen und die Strukturen dunkel färben (Konzentration: 2 Tropfen $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ auf 2 ml Ringer).
- Das Präparat ca. 10 min in der verdünnten $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ -Lösung belassen.

- Spülen des Präparates in Ringer zwei mal 5 min. Präparat ggf. vorsichten und /oder freilegen besonders interessanter Strukturen in der Peripherie. Fixieren in künstlich gealterter Bouinlösung (Pitmann, 1972) im Kühlschrank über Nacht.

Stark gefärbte Präparate wurden wie folgt weiterbehandelt:

- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:

| | |
|--------------|-----------|
| 50% Alkohol | 10-20 min |
| 70% Alkohol | 10-20 min |
| 90% Alkohol | 10-20 min |
| 100% Alkohol | 10 min |
| 100% Alkohol | 10 min |
- Die Präparate konnten von dieser Stufe aus direkt in Salicylsäuremethylester (Methylsalicylat) gegeben werden. Dort werden sie nach 10-20 min durchsichtig.

Weniger gut gefärbte konnten wie folgt silberintensiviert (nach Bacon & Altmann 1977) werden (vor dem Entwässern):

- In der Entwicklerstammlösung bei 60°C im Dunkeln inkubieren. (Inhalt der Lösung: Zitronensäure; Hydrochinon; Saccharose; Gummi arabicum aufgefüllt mit aqua dest.). Dauer: 1-2 h
- Silberintensivierung: auf 10 Teile der Entwicklerstammlösung wird ein Teil 1% Silbernitratlösung gegeben (auf 10 ml aqua dest. 0,1g AgNO₃-Lösung geben; daraus 1 ml in 10 ml Entwicklerstammlösung). Präparat für 30-40 min in die heiße Lösung (50-60°C) geben.

Wichtig: diese Lösung muß vor der Intensivierung immer frisch angesetzt und die Lösung alle 20 min erneuert werden, da sonst zu viele Reduktionskeime entstehen.

Die Präparate wurden im Dunkeln so lange in der Entwicklerstammlösung gelassen, bis sie eine tabakbraune Färbung annahmen. Kontrolle der Präparate erfolgte alle 5 min. Anschließendes Abstoppen der Reaktion in 50°C warmem aqua dest., dann warmes und kaltes aqua dest. Gesamtdauer: 5 min. Das Entwässern und Aufklaren erfolgte wie oben beschrieben für Präparate, die nicht intensiviert wurden.

Dextranfärbungen von Ganglienoberflächen

Ausgehend von der Beobachtung, daß eine Strömung im Ringerbad beim isolierten ZNS starke Effekte hervorrief, kam die Frage auf, ob sich vielleicht Strukturen an der Ganglienoberfläche befinden, welche rezeptorische Eigenschaften besitzen könnten.

Um diese möglichen Oberflächenstrukturen im Ganglion zu finden, welche u.U. in die ventilatorische Rhythmogenese involviert sind (atemgassensitive Neurone oder Gliazellen) wurden verschiedene Farbstoffe (FITC und Dextran) auf das Metathorakalganglion appliziert. Dies geschah, indem die Tiere durch Kühlung auf 0°C narkotisiert wurden, dann im Bereich des Metathorakalganglions ein Fenster i. d. Cuticula gemacht, um das ZNS lokal freizulegen. Nach einer Einwirkungszeit von 10 Minuten wurde das Dextran entfernt, das Präparat weiterentwickelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Erfolgreiche Färbungen wurden fotografisch dokumentiert.

2.2 Versuchstiere

Vier Heuschreckenarten, *Schistocerca gregaria*, *Schistocerca americana*, *Locusta migratoria* und *Taeniopoda eques* wurden in dieser Studie wiederholt verwendet. In einem Einzelexperiment wurde auch die ventilatorische Rhythmizität eines isolierten ZNS von *Anacridium aegypticum* aufgezeichnet (s. Anhang). Alle genannten Arten sind Einwohner trockener Gebiete oder von Wüsten. *Taeniopoda eques* wurde aufgrund guter Vergleichbarkeit mit Atmungsuntersuchungen ausgewählt, die an dieser Feldheuschrecke vorgenommen wurden (Harrison et al., 1995).

Locusta migratoria und *Schistocerca gregaria* werden in der Kolonie in Göttingen gezüchtet und vornehmlich mit jungem Weizen gefüttert. Die Tiere werden bei 25-35°C in einem 12stündigen Tag- und Nachtrhythmus gehalten. *Taeniopoda eques* wurden ähnlich aus Eigelegen herangezogen, die freundlicherweise von Dr. Jon Harrison, Arizona State University zur Verfügung gestellt wurden. Die Untersuchungen an *Taeniopoda eques* zur Atemgassensivität erfolgten während eines Forschungsaufenthaltes in den USA (s. Kapitel 2.4) an

2.3 Efferente Entladungen von ventilatorischen Nerven im isolierten Nervensystem

Um die ventilatorische Aktivität im ZNS der Versuchsheuschrecken bestmöglich abzuleiten, wurde in extrazellulären Ableitungen die Frequenz efferenter Gruppenentladungen ("Bursts") von Aktionspotentialen der Einheiten relevanter Nerven, welche bekanntermaßen Axone von Motoneuronen der Atmung enthalten, registriert. Dazu waren vorhergehende Präparationen zur Isolierung des Nervenstrangs erforderlich.



Abbildung 1:

Foto eines isolierten Heuschrecken-ZNS (*Taeniopoda eques*) mit intakter Tracheenversorgung. Der isolierte Nervenstrang besteht aus Mesothorakalganglion (ms), Metathorakalganglion (mt) und dem 1. freien Abdominalganglion (ag 4). Der Nervenstrang ist mit einer dünnen Schicht Ringerlösung überspült und die durchtrennten Enden der Tracheen öffnen sich zur Oberfläche (ce). Dies gewährleistet einen guten Gasaustausch durch Diffusion. Das Foto wurde während der messtechnischen Kooperation im Labor von Jon Harrison, ASU, Tempe 1999, aufgenommen.

2.3.1 Präparation der Tiere zur Entnahme des Nervenstranges

Vor der Entnahme des Nervenstranges, wurden die Tiere durch Kühlung auf nahe 0° immobilisiert. Der Kopf wurde genauso wie die hinteren Segmente vom Abdomen abgeschnitten. Das Darmsystem wurde entfernt, und der dorsale Teil des Tieres mit seitlichen Einschnitten abgetrennt. Der ventrale Teil, der das Nervensystem enthält, wurde fixiert mit der Ventralseite nach unten mit Insektennadeln in einer kleinen Petrischale auf Sylgarduntergrund (Dow Corning) und mit Ringerlösung (Clements und May, 1974) vital gehalten. Dann wurde das Nervensystem isoliert, indem die peripheren Nerven gekappt wurden. Die Konnektive wurden unterhalb des Prothorakalganglions bis hinter dem 1. freien Abdominalgang durchtrennt, welches direkt hinter dem Metathorakalganglion liegt. Der nun isolierte Nervenstrang wurde in eine kleine Petrischale übertragen und mit Sauerstoff gesättigter Heuschreckenringerlösung umspült (nach Clements und May (1974), pH 6,8, mit Saccharose).

Bei den Versuchen im semiintakten Präparat wurde das ZNS nicht entfernt. Die relevanten Nervenstümpfe wurden von der Dorsalseite des Tieres mit einer Saugelektrode abgeleitet.

Bei einer zweiten Präparation wurde die tracheale Versorgung des Metathorakalganglions beibehalten, indem die ventralen Tracheen vorsichtig mit herauspräpariert und zusammen mit dem isolierten Nervensystem in die Petrischale überführt wurden. Die Enden der ventralen Haupttracheen wurden mit der Atmosphäre in Kontakt gebracht und hielten sich selbsttätig offen. So war eine Sauerstoffversorgung gewährleistet (s. Abbildung 1). In diesem Fall war eine regelmäßige Umspülung der Ganglien nicht erforderlich.

2.3.2 Aufzeichnung efferenter Aktivitäten auf Magnetband-Kassetten

Aktivitäten ventilatorischer Motoneurone wurden von ventralen Nerv2(N2)-Nervenstümpfen des isolierten Nervenstrangs (oder im semiintakten Präparat) - mit primär expiratoischer Aktivität - und von Mediannerven mit primär antagonistischer inspiratorischer Aktivität mit Saugelektroden abgeleitet. Ventilatorische Rhythmen dauerten zuverlässig für mindestens drei Stunden an, oft aber auch vier oder fünf Stunden. Das dritte Neuomer (=verschmolzenes drittes Abdominalganglion) wurde

bevorzugt, weil hier die neuronale Versorgung der ventilatorischen Muskeln des dritten und vierten Abdominalsegments lokalisiert ist. Diese Segmente sind bei abdominalen Pumpbewegungen mit am stärksten involviert.

Bei in situ Präparationen korrespondierten ventilatorische abdominale Pumpbewegungen mit dem beobachteten Output, d.h. mit den respiratorischen Bursts aus den Nervenenden.

Der Standardversuchsaufbau für die in dieser Arbeit vorgenommenen extrazellulären Versuche bestand aus folgenden Geräten:

- Saugelektrode zur Registrierung der Aktionspotentiale aus dem efferenten Nerv
- AC-Verstärker 10-1000X verstärkend, Hoch- und Tiefpaßfilter (Eigenbau Werkstatt Zoologie).
- Oszilloskop (HM 605, HAMEG GmbH, Frankfurt), machte die efferenten Aktivitäten sichtbar.
- Lautsprecher, diente als Audiomonitor.
- Ein Tapedeck (TASCAM Portastudio Tapedeck), diente zur Aufzeichnung und Speicherung der Aktivität.

Externe Bedingungen (Temperatur, Ringerlösung, pH, Sauerstoff) wurden während der Aufnahmen innerhalb einer geringen Schwankungsbreite stabil gehalten. Die Temperatur im Ringerbad wurde regelmäßig mit einem Thermometer überprüft. Bei der Präparation mit beibehaltener trachealer Versorgung - d.h. wenn keine Perfusion des isolierten ZNS nötig war - wurde der Ringerspiegel konstant gehalten, indem verdunstete Flüssigkeit im Bad durch destilliertes Wasser ersetzt wurde. Dies schloß eine Änderung der Ringerkonzentration im Bad aus. Es kam gepufferte Ringerlösung zum Einsatz (Clements & May, 1974), dessen pH-Wert auf 6.8 gesetzt wurde. Bei den Experimenten, bei denen die Tracheen vom isolierten ZNS entfernt worden waren, sicherte eine Perfusion des Bades mit stark mit Luft begastem Ringer (durch Aquariumpumpe) eine konstante O₂-Versorgung im Bad. Außerdem wurde eine Anreicherung von z.B. CO₂ verhindert. Oberhalb des isolierten ZNS befand sich nie mehr als ca. 1 mm Ringerflüssigkeit. Dies sicherte zusätzlich eine ausreichende O₂-Versorgung und die Abgabe von CO₂.

2.3.3 Analyse der Daten

Die gespeicherten Daten von efferenter ventilatorischer Aktivität konnten auf einem Achtkanal-Schreiber ausgedruckt werden (UNISCRIP digital, PICKER International GmbH). Zur Erhaltung von Mittelwerten wurden in Minutenintervallen die Anzahl der Bursts gezählt. Nur eindeutige Bursts (z.T. mit größerer Spikeamplitude über anhaltender tonischer Aktivität) wurden als ventilatorische Aktivität gewertet. Immer wenn wenigstens ein Intervall ohne Burstaktivität auftrat, wurde dies als diskontinuierliche Ventilation (DV) gewertet (in Anlehnung an frühere Arbeiten: Lighton, 1990; Harrison et al., 1995 u. a.).

Die Ergebnisse dieser Analysen wurden als sequentielle Frequenzhistogramme dargestellt (ventilatorische Frequenz aufgetragen gegen den Aufnahmezeitraum in Minutenintervallen).

Zur Analyse der Rohdaten wie oben beschrieben wurden einige wichtige Parameter wie folgt definiert:

Burst: Eine hochfrequente Entladung von Spikes (Aktionspotentialen) ventilatorischer Motoneurone, die ca. 0,5-1,5 sec dauern kann.

Wann ein Burst endete war, bei inspiratorischen Nerven, eindeutig von evtl. unterlagerter tonischer Aktivität zu unterscheiden, da die inspiratorischen Phasen immer relativ gleichmäßig lang sind (Hustert, 1974). Bei expiratorischer Aktivität können bei eindeutiger hochfrequenter Atmung und diskontinuierlicher Atmung Bursts deutlich voneinander getrennt werden. In Übergangsphasen (s. Ergebnisse) gab es jedoch z.T. sehr langanhaltende (mehrere Sekunden lang) expiratorische Bursts (entsprechend sehr flacher Ausatmung im intakten Tier), bei denen es zu Überlagerungen mit sehr kurzen tonischen Abschnitten innerhalb eines Burst kam, bevor die antagonistische inspiratorische Aktivität einsetzte (sichtbar in Nerven mit sowohl inspiratorischen als auch expiratorischen Motoneuronen). Hierbei unterlag die Burstzählung manchmal - bei größtmöglicher Genauigkeit - einer gewissen Schwankungsbreite.

Burstperiode: Zeitabschnitt - in dem sich wiederholende Bursts ereignen - der von vorhergehenden und darauffolgenden Zeitabschnitten durch mindestens eine Minute ohne Burstaktivität getrennt ist.

Pausen: Zeitabschnitt von mindestens einer Minute Länge, in dem keine Burstaktivität erfolgt.

Zählintervall: Für die sequentiellen Histogramme wurden Intervalle von einer Minute Länge verwendet. Innerhalb dieser Intervalle wurden die Bursts gezählt.

Kontinuierliche Ventilation: Lange Burstperiode mit einer hohen Bandbreite von Frequenzen (Abb. 2)

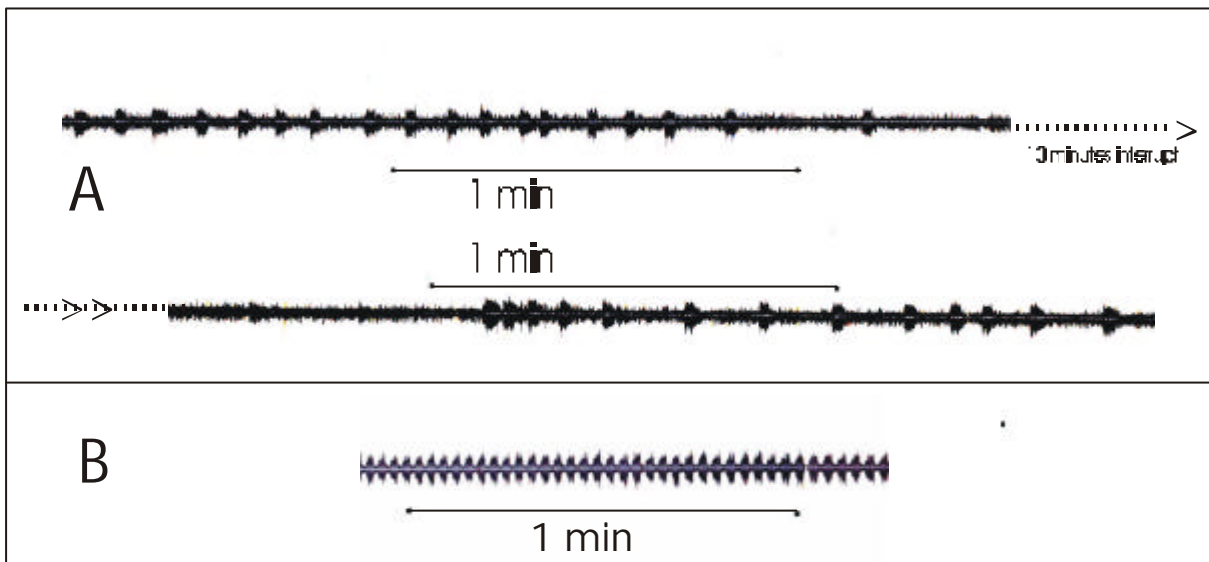


Abbildung 2:

Efferente ventilatorische Aktivität, die extrazellulär von den Stümpfen efferenter Nerven (hier metathorakaler Mediannerv) in einem isolierten Heuschrecken-ZNS (*Locusta migratoria*) aufgenommen wurden. A: Langzeitaufnahme mit variablen inspiratorischen Burstmustern, die als sequentielles Frequenzhistogramm auch in Abbildung 9 dargestellt sind. Die Daten in A zeigen eindeutig diskontinuierliche Ventilationsmuster. B: Aufnahme während hochfrequenter Ventilation.

Diskontinuierliche Atmung: Zeitabschnitt, in dem Burstperioden durch absolut aktivitätsfreie Intervalle oder Intervalle mit lediglich tonischer Aktivität voneinander getrennt sind (Abb. 2).

Zur näheren Charakterisierung der beobachteten Atmungsmuster wurden Pausenlänge-Histogramme - basierend auf den sequentiellen Frequenzhistogrammen - erstellt (Kapitel 3.2.1.3).

2.3.4 Verwendung der Aufnahme- und Analyse-Software DATAPAC 2000

Zusätzlich zu den unter 2.3.2 und 2.3.3 beschriebenen Analyse- und Aufnahmemethoden trat später eine moderne integrierte Softwareanwendung hinzu. Es handelt sich um das Datenanalyseprogramm DATAPAC 2000 (Version 2.0, Run Technologies; mit AD-Wandlerkarte DAS-PCI/JR 1200/JR bis max. 16 Kanäle), mit

dem man elektrophysiologische Aktivitäten direkt auf Computerfestplatte aufzeichnen kann. Die Aktivität wird durch die zugehörige Software simultan auf dem Computermonitor 1:1 abgebildet, wodurch der Monitor gleichzeitig auch als Oszilloskop fungiert. Dabei wurde bei der hier vorliegenden Arbeit eine Datenabtastrate von 10 kHz gewählt, d.h. die eingehenden Signale wurden 10 000 mal/Sekunde erfaßt und zu dem Signal verschmolzen. Dies erlaubte anschließend eine hohe Auflösung der Aktionspotentiale (sowie der Bursts) bei verschiedenen Verstärkungen und Zeitablenkungen. Man konnte die Monitoranzeige als EMF-Datei exportiert und später mit einem Bildverarbeitungsprogramm (Corel Draw, Corel Photo Paint) für die Belange einer grafischen Darstellung mit den zugehörigen Neuronen (s. Ergebnisse) weiterverarbeiten. Diese Form der Datenaufzeichnung wurde sowohl für extrazelluläre als auch intrazelluläre Ableitungen verwendet.

2.4 Einflüsse von Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücken auf die Ventilationsrate im isolierten ZNS

Im Rahmen eines ca. zweimonatigen Forschungsaufenthaltes in den USA (Oktober und November 1999) im Labor von Jon Harrison, Arizona State University, Tempe, AZ, sollte die Frage geklärt werden, welche externen Faktoren einen Einfluß auf die beobachteten Ventilationsmuster haben können. Dazu wurde das in Abbildung 1 dargestellte isolierte ZNS mittels einer Gasmixapparatur unterschiedlichen Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidpartialdrücken ausgesetzt. In Abbildung 3 ist schematisch der Versuchsaufbau wiedergegeben.

Die Instrumente bestanden aus folgenden Komponenten:

Grass P5 Serie AC-Vorverstärker, Grass RPF 107 - regulierte Energieversorgung, Tektronix 5113 Dual Beam Speicheroszilloskop, Gould 220 Schreiber, Realistic SA-10 Solid State-Stereoverstärker und Lautsprecher.

Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid aus Gasflaschen wurden über einen Omega Rotatometer geliefert, der über sog. "*soapfilm bubble meters*" kalibriert war. Flaschen waren mit einem Omega verbunden, mit dessen Hilfe die Gaszusammensetzung eingestellt wurde. Eine Saugereinrichtung leitete das Gasgemisch über ein Gerät zur Kontrolle des durchfließenden Volumens in einen verschlossenen Glaskolben, in

dem sich Wasser befand. Dort perlte das Gasgemisch über einen Belüftungsstein in die umgebende Atmosphäre. Ein zweiter abgehender Schlauch führte das mit Luftfeuchtigkeit gesättigte Gasgemisch in die Petrischale mit dem Präparat (s. Abb. 3). Mit Hilfe eines Amatek S3A O₂-Analyzers wurde noch einmal der Sauerstoffgehalt des Gasgemisches kontrolliert.

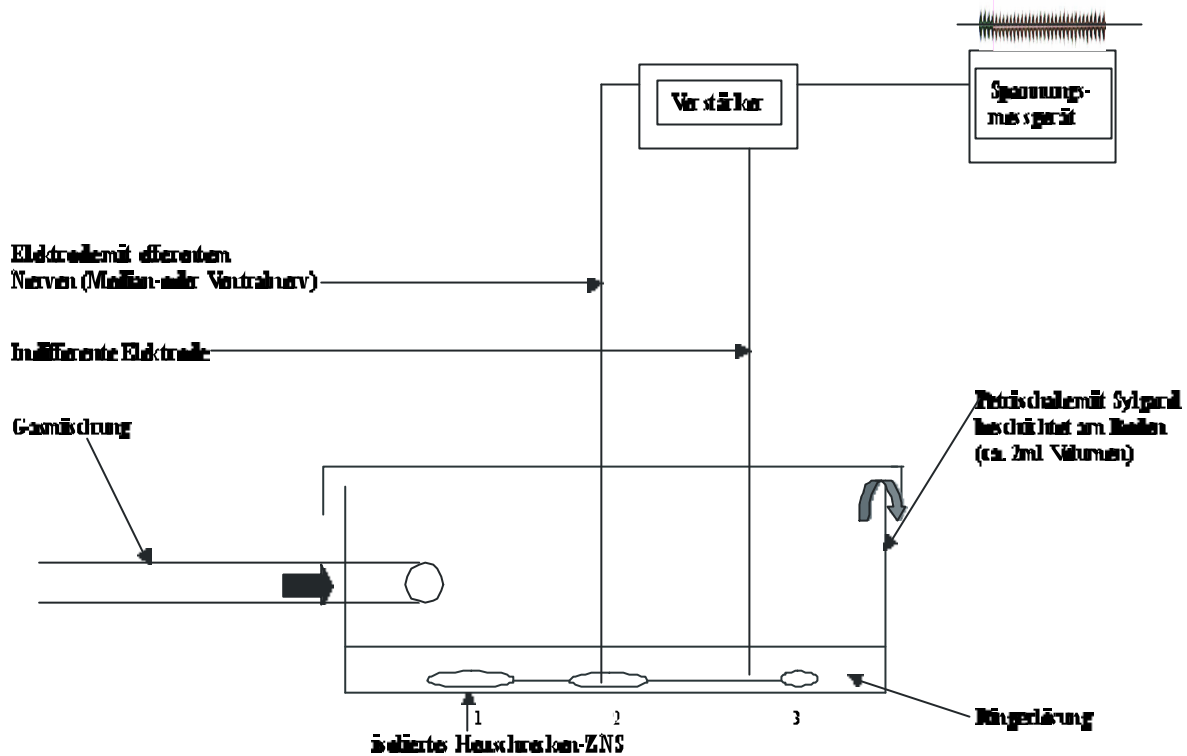


Abbildung 3:

Schematischer Versuchsaufbau für die Untersuchung von Atemgassensivitäten des isolierten Heuschrecken-ZNS. Über eine Gasmixapparatur wurde eine kleine Petrischale mit verschiedenen Gasgemischen geflutet. Die dickeren Pfeile zeigen die Richtung des Luftstroms. 1 = Mesothorakalganglion, 2 = Metathorakalganglion, 3 = erstes freies Abdominalganglion. Zum Vergleich s. auch Abbildung 1.

Die verwendeten Versuchstiere waren Wildfänge von *Taeniopoda eques*, die südlich von Tuscon, nahe der mexikanischen Grenze im US-Bundesstaat Arizona, kurz vor Beginn der Experimente gefangen wurden. Zusätzlich erfolgten Versuche an *Schistocerca americana*, die aus der Zuchtkolonie der Abteilung von Jon Harrison entstammten. Die Tiere wurden wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben präpariert und das ZNS isoliert. Um einen Vergleich zu den Daten des isolierten Präparates zu erhalten, wurden auch intakte Tiere verschiedenen Partialdrücken ausgesetzt.

Die Rohdaten wurden wie folgt ermittelt:

- a) Im isolierten ZNS: Extrazelluläre Ableitung von relevanten Nervenstämpfen - wie vorhergehend beschrieben (s. Kap. 2.3.2) - diente der Ermittlung der ventilatorischen Aktivität. Der Einfluß der verschiedenen Partialdrücke wurde durch in möglichst kurzen Abständen erfolgendes manuelles Zählen ventilatorischer Bursts mittels einer Zähluhr ermittelt (d.h. ca. alle 3-5 Minuten Registrierung der Atmungsaktivität für jeweils eine Minute).
- b) Im intakten Tier: die abdominalen ventilatorischen Pumpbewegungen wurden gezählt (wie in a beschrieben). Die Tiere wurden lose in einem Plastikzylinder (mit einem inneren Durchmesser von ca. 2 cm) mit Wollbällchen gehalten wodurch die Bewegungsfreiheit eingeschränkt wurde. Der Plastikzylinder wurde an beiden Enden mit Gummistopfen verschlossen. Das Gasgemisch strömte mit ca. 100 ml/min durch den Zylinder. Jedes Tier wurde 2%, 10%, 20%, 21% und 100% Sauerstoff in zufälliger Reihenfolge ausgesetzt.

Im isolierten Präparat wurden zwei Variationen verwendet:

- 1.) Um eine große Datenbasis zu erhalten wurde in dem einen Präparat die tracheale Versorgung entfernt, da hier eine deutlichere Antwort auf verschiedene Partialdrücke zu sehen war.
- 2.) Für stabile und lang anhaltende Ableitungen wurden mit den Ganglien auch die zu ihnen führenden Tracheen mit aus dem Tier entnommen, wie in Kap. 2.3.1 beschrieben (s. Abb. 1).

Die Daten wurden anschließend in Form von Sauerstoff-Antwortkurven graphisch ausgewertet. Mittels des ANOVA-Tests (englisch für: analysis of variance) für wiederholte Messungen wurden Mittelwerte berechnet und statistisch ihre Signifikanz untersucht. Die Berechnungen betrachten, ob die Ventilationsraten statistisch signifikant korreliert zu sich ändernden Sauerstoffpartialdrücken sind.

Das verwendete System zur Durchführung der statistischen Berechnungen war SYSTAT (Wilkinson, 1989). Die Berechnungen erfolgten im Labor von Jon Harrison.

Soweit nichts anderes angeführt wird, erfolgten Präparation, Ableitung, Verwendung von Ringer wie vorab beschrieben (s. Kap. 2.3).

Die statistischen Berechnungen, die ausgeführt wurden (s. Tabelle 1), erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Jon Harrison.

2.5 Intrazelluläre Ableitungen

In dem isolierten Präparat, dessen Entwicklung und Charakterisierung in den beiden vorhergehenden Kapiteln beschrieben wurde, erfolgten intrazelluläre Ableitungen, um einzelne Neurone des dem ventilatorischen Rhythmus zugrundeliegenden CPGs zu finden, sie mittels intrazellulärer Färbetechnik darzustellen und ihre Funktion im Netzwerk elektrophysiologisch zu charakterisieren.

2.5.1 Im semiintakten Präparat

Zur Aufnahme und Färbung einzelner Zellen im Ganglion wurden intrazelluläre Standardtechniken verwendet. Die verwendeten Geräte waren: DC-Verstärker mit Impedanzwandler (Modell Syummous, UK), Mikroelektroden aus Glaskapillaren (innerer Durchmesser 0,78 mm, äußerer Durchmesser 1mm), sie wurden an einem Elektroden-Horizontalpuller hergestellt (DMZ Universal-Puller, Zeitz-Instrumente GmbH, München), Leitz-Mikromanipulator, Farbstoff war Lucifer Yellow. Der Widerstand der Elektroden betrug zwischen 50-100 M Ω . Die Elektrodenflüssigkeit in den Elektroden ist LiCl₂. Die neuronale Aktivität wurde auf Band aufgezeichnet (wie für die Extrazelluläraufnahmen, AC gekoppelt, s. Kapitel 2.3.2). Wann immer möglich, wurde simultan ein extrazellulärer Monitor (Ventral-oder Mediannerv) mit ventilatorischen Entladungen mit abgeleitet.

Durch Injektion von negativem Strom (Hyperpolarisation) wurde der Farbstoff in die Zelle gepumpt. Die Laufzeit des Farbstoffs betrug ca. 10-30 min für eine erfolgreiche Färbung. Das ZNS wurde anschließend in Paraformaldehyd (PFA) fixiert, in aufsteigender Alkoholreihe fixiert, mit Methylsalicylat aufgeklärt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Experimente erfolgten zum einen in semiintakten Präparaten (s. Kapitel 2.3.1), mit belassener afferenter Versorgung des ZNS und zum anderen im isolierten ZNS (s.u.). Beim semiintakten Präparat wurde das Ganglion auf einer Miniaturplattform festgelegt. Die Ganglienoberfläche, das Neurilemm wurde mittels vorsichtiger Proteaseapplikation (max. 10-30 sec.) durchlässiger für die Intrazellulärelektrode gemacht. Der Einstich erfolgte von dorsal (im isolierten ZNS von ventral), möglichst im kommissuralen Bereich des 1 Abdominalneuromers, wo sich die Neuriten der Interneurone stark verzweigen.

Das Metathorakalganglion wurde primär nach relevanten Interneuronen abgesucht, weil hier vermutlich der CPG lokalisiert ist, speziell in der Region der verschmolzenen Abdominalganglien (Neuromere).

2.5.2 Im isolierten ZNS mit intakter trachealer Versorgung

Die experimentellen Bedingungen und die Art der Ableitung, Färbung usw. waren wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Das Präparat war mit Insektennadeln fixiert wie in Abbildung 1 gezeigt. Der Einstich der Mikorelektroden erfolgte dann auch von ventral, weil sich dort die Tracheen befinden und sich zur Oberfläche der Badlösung öffneten. Der Ganglienstrang mußte nicht mit Hilfe einer Plattform festgelegt werden, sondern lag flach auf dem Boden der Präparatwanne aus Weichsilikon (Sylgard) auf.

2.5.3 Analyse der elektrophysiologischen Daten und erfolgreiche Färbungen

Die elektrophysiologischen Daten wurden für einzelne Interneurone auf Band aufgenommen und anschließend ausgedruckt wie es für die extrazellulären Daten beschrieben ist (s. Kapitel 2.3.3 und 2.3.4). Erfolgreiche Färbungen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und zur besseren Darstellung der Anatomie des Somas, der Neuriten, des Axons und der Position des Neurons im Ganglion fotografisch dokumentiert und gezeichnet. Dies geschah wie folgt:

Fotoaufnahmen erfolgten mit einer Digitalkamera (Marke: Nikon, über den Kameraaufsatz des Mikroskops) von verschiedenen Ebenen des sich im Ganglion verzweigenden Neurons. Die Fotos wurden von der Kamerafestplatte auf einen Computer übertragen und dort mit Bildbearbeitungssoftware betrachtet. DIN-A4 Fotoausdrucke der einzelnen Ebenen des jeweiligen gefärbten Neurons dienten als Matrize zur zeichnerischen Dokumentation aller Ebenen des gesamten Neurons auf Transparentpapier. Diese Zeichnungen wurden dann eingescannt und mit Corel Draw-Grafiksoftware (Version 8.0) in ein idealisiertes Metathorakalganglion eingebettet, so wie es der Lage im Originalpräparat entsprach.

In Anlehnung an die Untersuchungen von Ramirez (1989) sowie auch als Erweiterung des Begriffs eines ventilatorischen Netzwerkneurons durch Berücksichtigung des neuen Ansatzes des isolierten ZNS wurden Interneurone dann

als zugehörig zum ventilatorischen Netzwerk betrachtet, wenn sie mindestens 3 der 4 u. g. Kriterien erfüllen:

- sie feuern rhythmisch (auch simultan mit einem extrazellulären Monitor, oder visuell sichtbar simultan mit abdominalen Ventilationsbewegungen des semiintacten Präparates)
- sie haben Resetting-Eigenschaften, d.h. bei einer Injektion mit depolarisierendem (oder hyperpolarisierendem) Strom über die Elektrode erfolgt eine Rücksetzung des ventilatorischen Rhythmus auch im extrazellulären Monitor
- sie feuern rhythmisch im isolierten ZNS bei intakter trachealer Versorgung des Metathorakalganglions, d.h. sie erhalten keinen ersichtlichen afferenten Input.
- die Anatomie weist eine deutliche Struktur deszendierender Kommandoneurone auf, wie sie vorab (Ramirez 1989, Pearson 1980) mehrfach als typisch für ventilatorische Interneurone gezeigt wurde.

Ergänzend dazu wurden Interneurone, die nicht alle oder nur vereinzelte Kriterien erfüllten als zum "Netzwerk korreliert" oder "verschaltend auf andere Netzwerke" bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Neuronanatomische Vorarbeiten

Axonale Kobaltfärbungen über durchtrennte Nervenendigungen ("Konnektivbackfills")

Die Konnektivbackfills ergaben in einem Fall die Färbung eines descendierenden Kommandoneurons, dessen Axon bis mindestens hinter das zweite freie Abdominalganglion zieht und dessen Struktur der bisher bekannter ventilatorischer Interneurone entspricht. Das Soma liegt lateral in den Neuomeren und das Axon zieht nach kontralateral, um dann in das Konnektiv abzustiegen. In Abbildung 4 ist fotografisch die relative Lage im Ganglion gut zu erkennen. Abbildung 5 zeigt das Neuron zeichnerisch dargestellt, aus mehreren Aufnahmen, mit verschiedenen Schärfeebenen innerhalb des Ganglions und somit den Gesamtverlauf den IN zeigend. In einer weiteren - hier nicht dokumentierten Färbung - gelang es ein IN ähnlicher Struktur im 1. Neuomer zu färben zu dem wahrscheinlich homologe Neurone im 2. und 3. Neuomer zu erkennen waren.

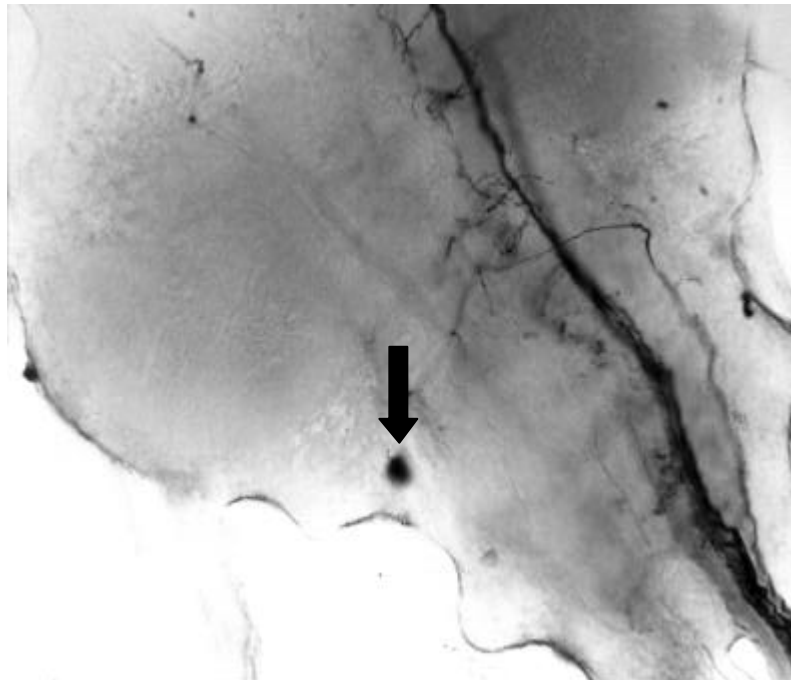


Abbildung 4

Vermutlich ventilatorisches Interneuron im 1. Neuomer (Pfeil) des Metathorakalganglions von *Locusta migratoria*, welches bis mindestens zum 3. freien Abdominalganglion deszendiert. Konnektivbackfill mit 6% CoCl_2 hinter dem 2. freien Abdominalganglion, silberintensiviert. Erkennbar sind die Lage und der Verlauf ohne Feinverzweigungen. Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera, welche die Abspeicherung der Abbildung unter dem Mikroskop als Bilddatei ermöglicht.

Dieses IN zeigte ebenfalls ein laterales Soma mit nach kontralateral ziehendem Axon, welches anschließend ins Konnektiv deszendierte.

Aufgrund der Färbung hinter dem 2. freien AG ist mit Sicherheit zu sagen, daß die Axone mindestens auch bis in 3. freie AG deszendieren.

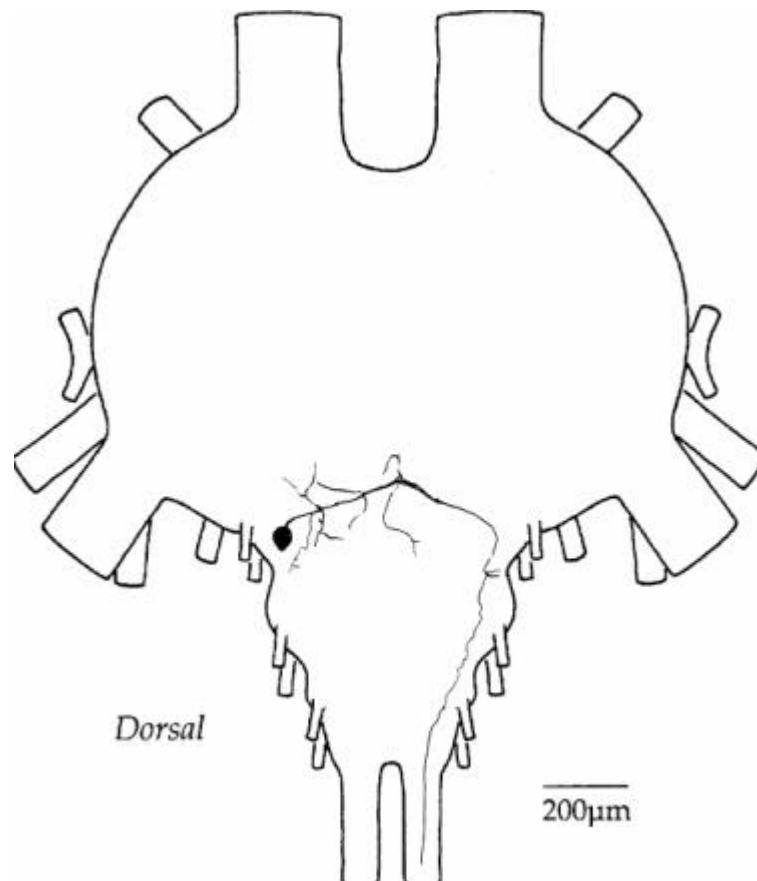


Abbildung 5

Vermutlich ventilatorisches Interneuron im 1. Neuromer eines idealisierten Metathorakalganglions von *Locusta migratoria*, welches bis mindestens zum 3. freien Abdominalganglion deszendiert. Konnektivbackfill mit 6% CoCl₂ hinter dem 2. freien Abdominalganglion, silberintensiviert. Erkennbar sind die Lage und der Verlauf ohne Feinverzweigungen. Die Zeichnung ist eine Kombination aus mehreren Fotoaufnahmen wie in Abbildung 4.

Dextranfärbungen der Ganglienoberfläche

Die Oberflächenfärbungen mit FITC ergaben keine deutlichen Ergebnisse. Hingegen konnten durch eine Dextranfärbung (s. Abbildung 6) Oberflächenstrukturen optisch sichtbar gemacht werden, durch welche Dextran in die oberste Schicht des Ganglions eindringen konnte. Eine Art Pore ist sichtbar, die eine neuritenartige Struktur aufweist. Weiterhin ist eine große Zahl kleinerer zellartiger Strukturen erkennbar. Zusätzlich sind Fettzellen erkennbar.

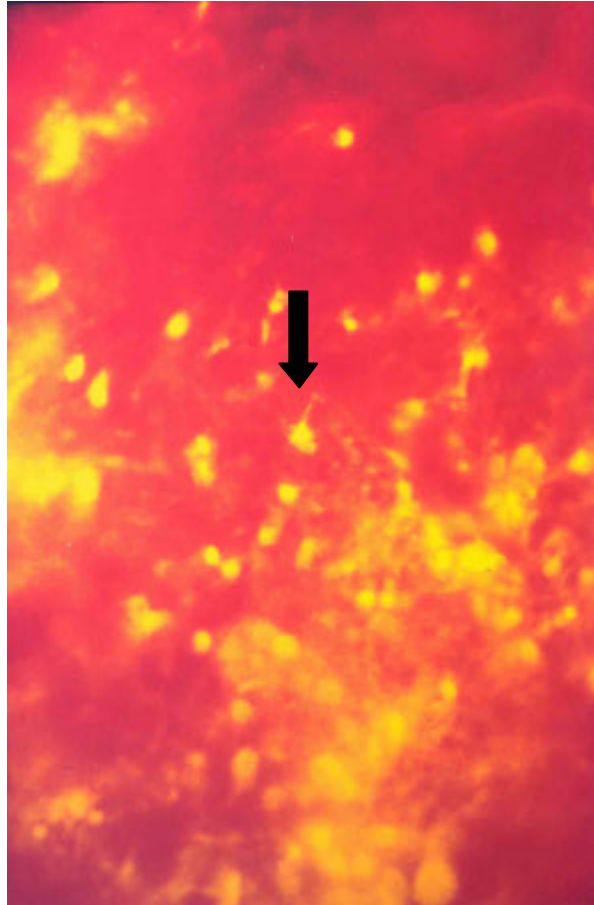


Abbildung 6: Dextranoberflächenfärbung eines Teilbereichs des Metathorakalganglions (Dorsalansicht). Nach Entfernung der Fettschicht über dem Neurilemm wurde ein kleiner Pool aus Vaseline gebaut, in den Dextran mit TRITC appliziert wurde. Die Einwirkzeit betrug ca. 10-20 Minuten. Es zeigen sich eine Reihe von Zellen, von denen manche eine Art Verlängerung aufweisen, die als Dendrit interpretiert werden können. Der kleine schwarze Blockpfeil zeigt auf eine solche Zelle.

3.2 Efferente ventilatorische Muster

Die extrazellulären Ableitungen ventilatorischer Muster von isolierten Nervensträngen verschiedener Heuschreckenarten ergaben eine hohe Bandbreite von Atmungsformen, die sich zwischen diskontinuierlicher und stressbedingt kontinuierlicher Atmung bewegten.

Die Untersuchungen zur Atemgas-Sensitivität ergaben unerwartete Resultate hinsichtlich möglicher Rezeptoren für Sauerstoff und Kohlendioxid.

3.2.1 Langzeitaufnahmen ventilatorischer Aktivitäten

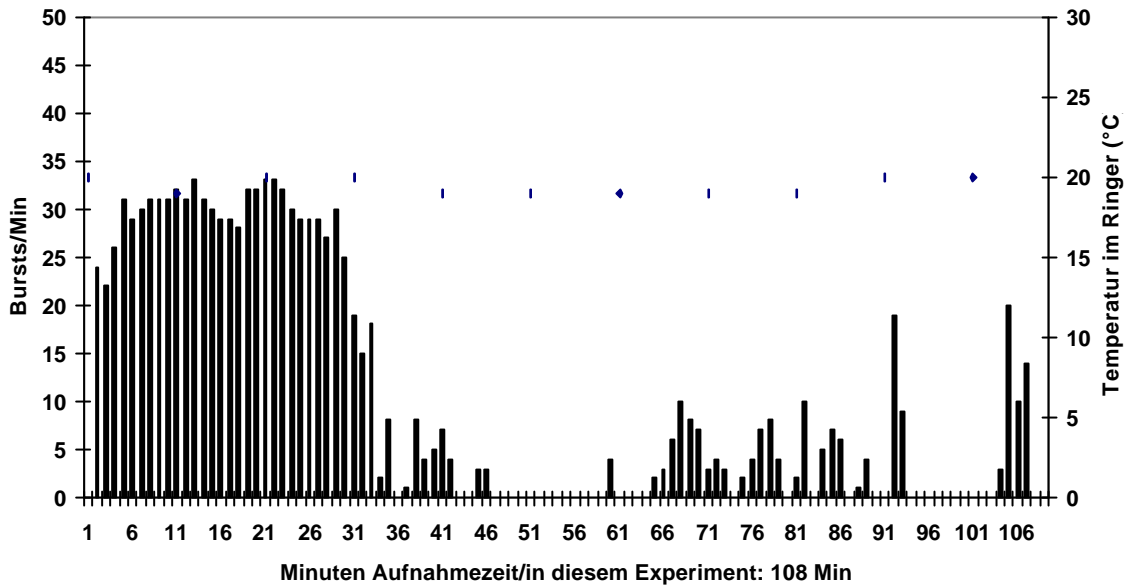
3.2.1.1 Ventilationsmuster von *Taeniopoda eques*

Die efferenten Muster ventilatorischer Motoneurone des isolierten ZNS zeigen eine große Bandbreite von totaler Inaktivität bis hin zu kontinuierlicher Rhythmizität (Abbildung 7A und 7B). Um eine Klassifikation dieser großen Bandbreite zu ermöglichen, wurden zwei grundlegende Ventilationsmuster definiert (diskontinuierliche und gestresste kontinuierliche Atmung). Die vorliegenden Daten zeigen beide Typen mit Übergängen zwischen ihnen. Es zeigt sich relativ häufig diskontinuierliche Ventilation.

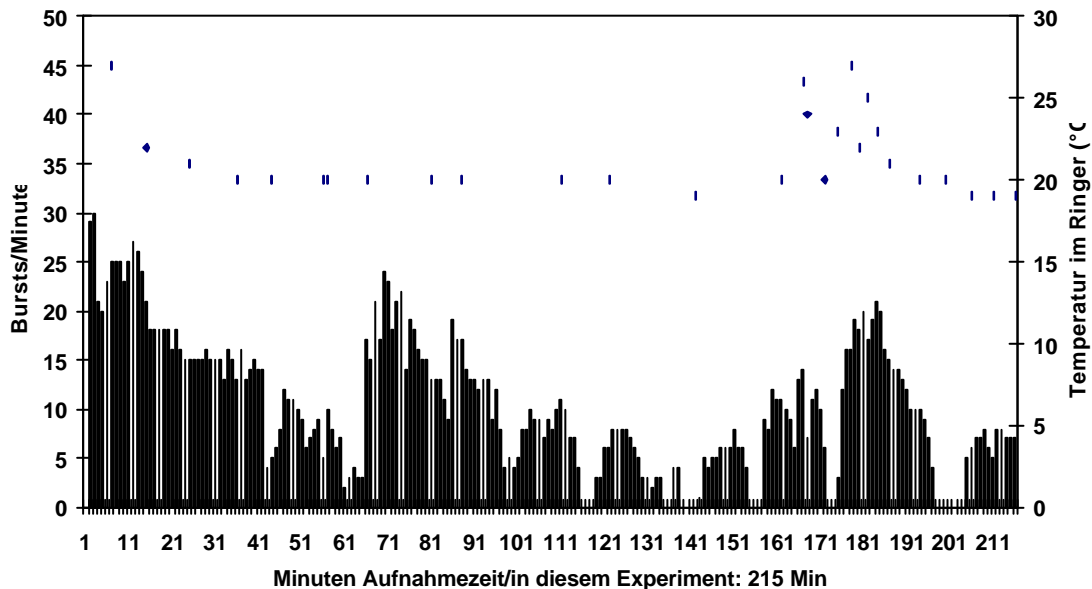
In Abbildung 7A fängt die Ventilation mit hohen Frequenzen von über 30 Bursts/Minute an. Nach einer halben Stunde entwickeln sich diskontinuierliche Atmungsmuster mit Pausen von bis zu 16 Minuten zwischen zwei Burstperioden.

Abbildung 7B zeigt die Ergebnisse eines Experiments, in dem der Nervenstrang zwar isoliert wurde, aber im Abdomen belassen war. Wie in den anderen hier beispielhaft gezeigten Experimenten wurden sämtliche Nervenverbindungen, die Konnektive zwischen Prothorakal- und Mesothorakalganglion sowie zwischen dem 1. und 2. freien Abdominalganglion durchtrennt. Die Verbindung zu den Tracheen wurde beibehalten, was eine Versorgung des Nervenstrangs mit Sauerstoff sicherte. Bewegungen der abdominalen Muskeln - der Segmente posterior vom 1. freien Abdominalganglion - bewirkten eine Umspülung des Nervenstrangs mit Ringerlösung. Während der ersten 113 Minuten zeigte das Ganglion kontinuierliche Atmungsmuster, die aber durch hohe Frequenzschwankungen geprägt waren. Eine Pause von mehreren Minuten leitete einen Abschnitt von diskontinuierlicher Atmung ein, der bis zum Ende der Aufnahme anhielt. Diese Langzeitaufnahme (215 Minuten) ist durch starke kontinuierliche aber auch diskontinuierliche Atmung gekennzeichnet, mit Übergangsformen zwischen beiden. Ähnliche Muster fanden sich auch in anderen Experimenten, deren Verläufe im Anhang dokumentiert sind (s. Anhang I).

A

Taeniopoda eques

B

Deafferentiertes ZNS im Abdomen belassen (*Taeniopoda eques*)**Abbildung 7:**

Ventilatorische Aktivität von Langzeitaufnahmen (**A** u. **B**) efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS ohne Tracheen (**A**) von *Taeniopoda eques*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. In beiden Aufnahmen tritt diskontinuierliche Atmung auf. In **B** wurde das ZNS im Abdomen belassen aber deafferentiert und die Versorgung durch die Tracheen erhalten. Die kontinuierlichen Abschnitte in **B** zeigen unregelmäßige Oszillationen von hohen zu niedrigen und wieder zu hohen Frequenzen. Außerdem ist zu erkennen, daß mit steigender Ringertemperatur die Frequenz steigt. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt. Diamantensymbol: Temperatur, Skala = rechte y-Achse.

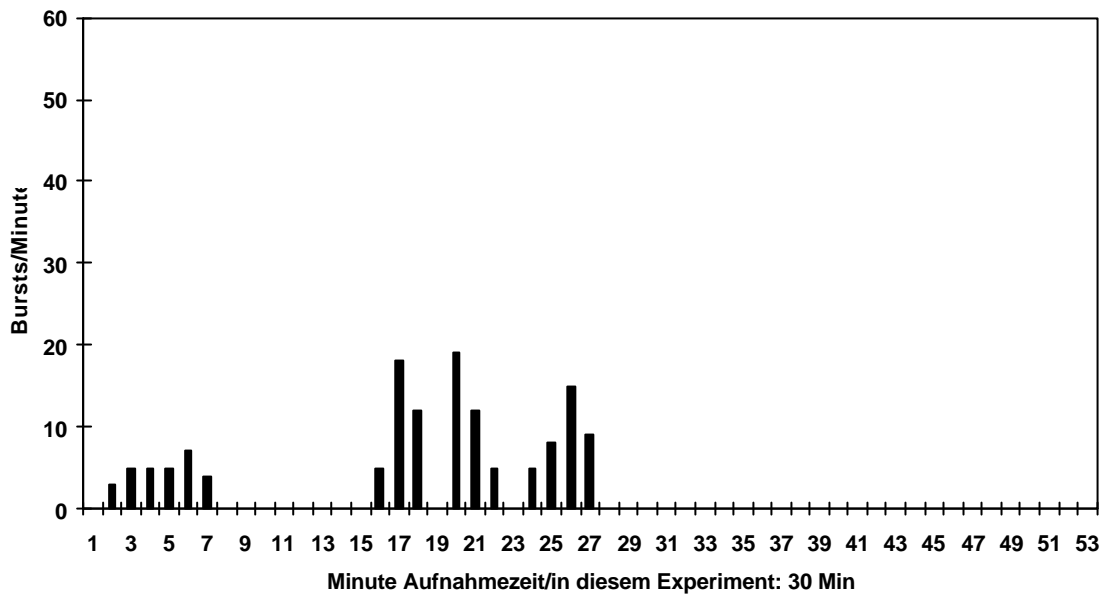
Bei Minute 175 wurde die Temperatur der Ringerlösung erhöht, um eventuelle Reaktionen der Atmungsmuster zu sehen. Ein Anstieg der Frequenz (Bursts/Minute) erfolgte, der parallel zum Temperaturanstieg war. Mit dem Abfallen der Temperatur verringerte sich auch wieder die Frequenz. Die maximale Ventilationsrate betrug 30 Bursts/Minute.

3.2.1.2 Ventilationsmuster von *Locusta migratoria*

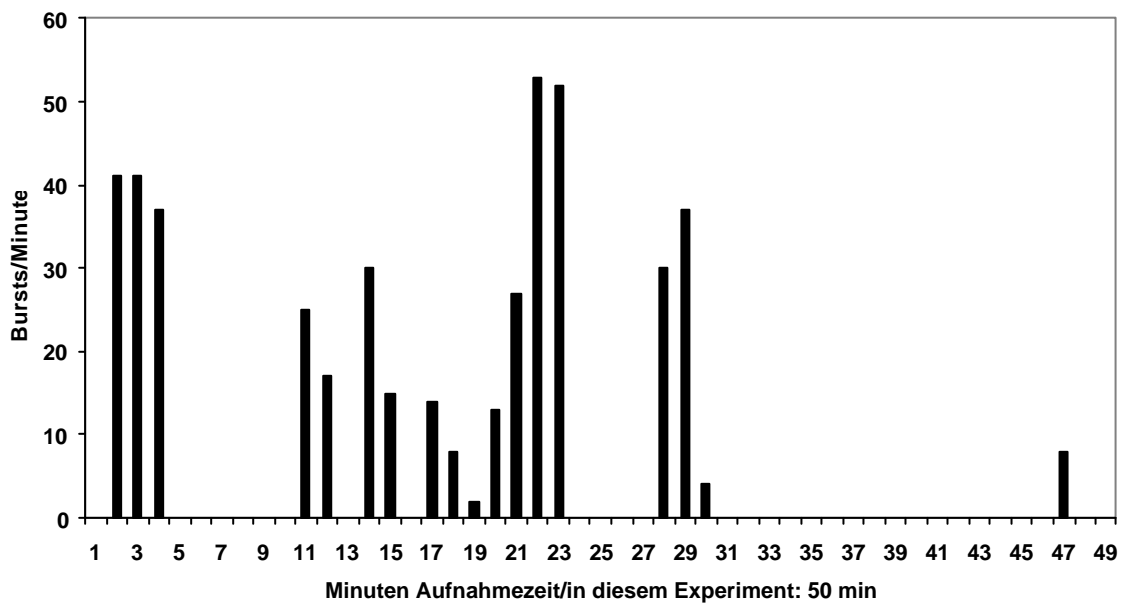
Die Atmungsmuster im isolierten Nervensystem von *Locusta migratoria* zeigen ebenfalls eine große Bandbreite zwischen totaler Inaktivität und kontinuierlicher Rhythmizität inclusive diskontinuierlicher Atmungsmuster. Diskontinuierliche Atmung zeigt sich in Abbildung 8A mit einer maximalen Burstfrequenz von 19 Bursts/Minute. Ein weiteres Beispiel für eine Atmungssequenz des isolierten Präparates ist in Abbildung 8B dargestellt. Diskontinuierliche Atmung mit unregelmäßigen Oszillationen ereignen sich innerhalb einer Burstperiode. Ähnliche Muster der Atmung konnten bei intakten, ungestörten Tieren beobachtet werden. Diese Beobachtungen erfolgten mittels Videoaufnahmen von abdominalen Pumpbewegungen. Die maximale Ventilationsrate betrug 55 Bursts/Minute. Ähnlich hohe Frequenzen konnten bei *Schistocerca americana* beobachtet werden (s. Kapitel 3.2.2.3).

Als Referenzaufnahme wurde eine Langzeitaufnahme von fast 400 Minuten gemacht (Abbildung 9). Die tracheale Versorgung des Nervenstrangs wurde beibehalten wie vorab beschrieben (s. Kapitel 2.3.1 und Abbildung 2). Es entwickelte sich ein deutlicher und stabiler DV-Rhythmus. Zum Ende der Aufnahme die Pausenlängen zwischen 15-20 Minuten. Auch die Länge der Burstperioden zeigte mit 4-6 Minuten eine relative Regelmäßigkeit. Die Abschnitte der Burstperioden waren gekennzeichnet durch sog. Gruppenatmung (welche charakteristisch für Insektenatmung ist), d.h. die Bursts folgten aufeinander oftmals ohne Unterbrechung für mehrere Minuten. Beispielhaft ist dies auch in den dargestellten Rohdaten in Abbildung 1A zu sehen. Die Frequenz innerhalb der Burstperioden betrug zum Ende hin ca. 10-15 Bursts/Minute. Die Temperatur im Ringer betrug konstant ca. 18-19°C. Ähnliche Ventilationsfrequenzen fand Miller (1960) bei Temperaturen zwischen 18-20°C.

A

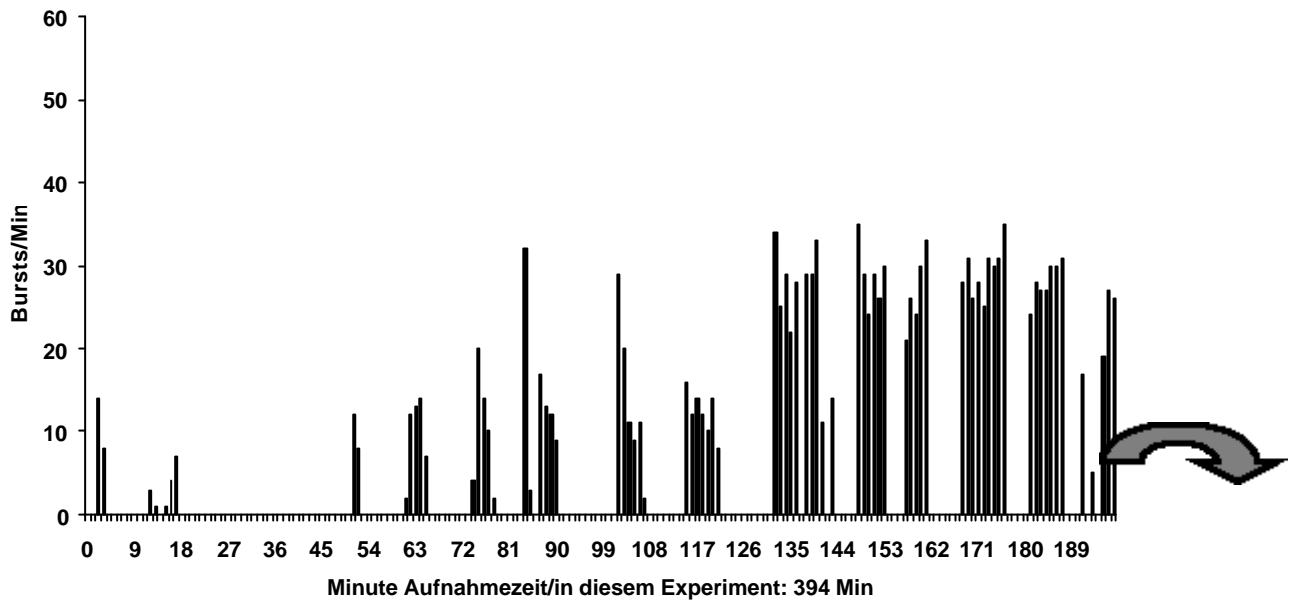
Locusta migratoria

B

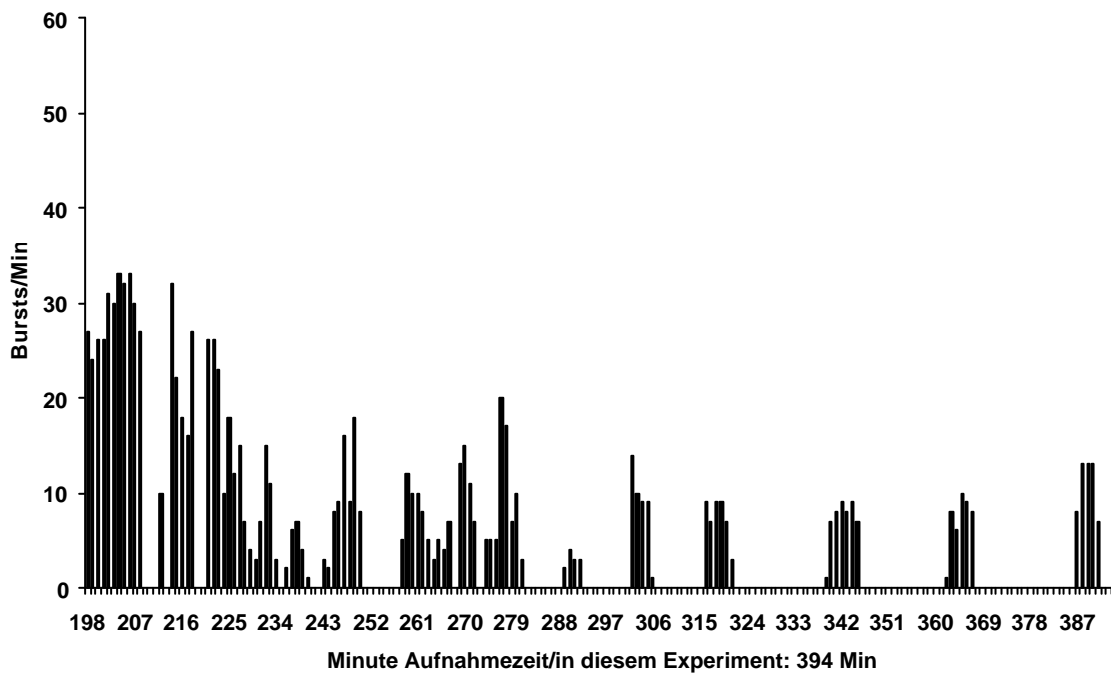
Locusta migratoria**Abbildung 8:**

Ventilatorische Aktivität von Langzeitaufnahmen (A u. B) efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS ohne Tracheen von *Locusta migratoria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. In beiden Aufnahmen tritt diskontinuierliche Atmung auf. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

A

Isoliertes ZNS mit trachealer Versorgung (*Locusta migratoria*)

B

**Abbildung 9:**

Ventilatorische Aktivität von einer Langzeitaufnahme (A u.B) eines efferenten Nerven (metathorakaler Mediannerv des 3. Neuromers) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Locusta migratoria*. Die tracheale Versorgung wurde beibehalten. Sequentielles Histogramm von Bursts/Minute. In A und B dieser Aufnahme ist ein ausgeprägter und wiederkehrender DV-Rhythmus zu sehen. In A dauern die meisten Burstperioden 5 bis 6 Minuten. Die Pausen in B dauern zwischen den Burstperioden bis zu 15-20 Minuten. Die Temperatur im Ringer betrug 18-19°C.

Weitere Langzeitexperimente von *Locusta migratoria*, aber auch von *Schistocerca americana* und *Schistocerca gregaria* sind im Anhang dokumentiert (s. Anhang).

3.2.1.3 Pausenlänge-Histogramm

Die typische Dauer einer Pausenlänge zwischen zwei Burstperioden ventilatorischer Muster für *Taeniopoda eques* (nur bei den Experimenten, bei denen die Tracheen entfernt wurden) betrug ca. 1-2 Minuten bei allen durchgeführten Experimente. Bei *Locusta migratoria* dauerte die Mehrzahl der Pausen eine Minute (s. Abbildung 10). Es zeigt sich eine Bevorzugung kurzer Pausenlängen, ähnlich der Verteilung von *Taeniopoda eques*. Dies weist evtl. auf eine Tendenz hin (statistisch allerdings nicht überprüft), daß *Locusta migratoria* schneller atmet. Die Art ist auch sonst in ihrem Verhalten agiler als *Taeniopoda eques*. Miller (1960) fand bei kontinuierlichen Aufnahmen für *Schistocerca gregaria* Atmungsmuster, die denen von *Locusta migratoria* ähneln. Die Burstperioden waren hier auch oft von Pausen von einer Minute unterbrochen.

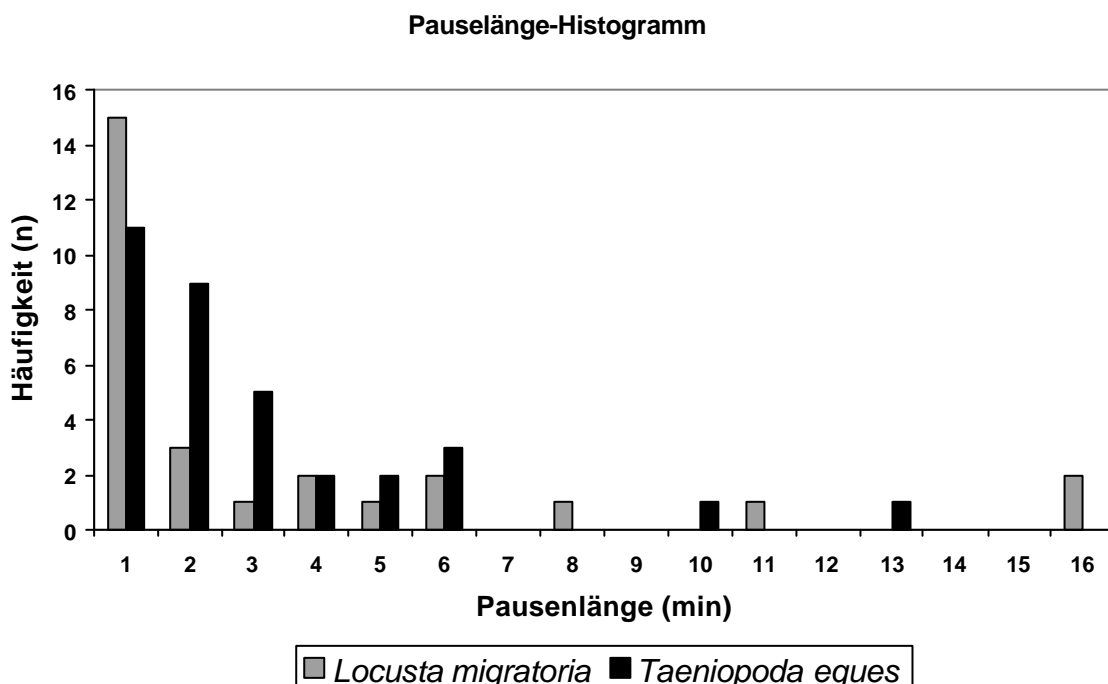


Abbildung 10:

Pausenlänge-Histogramm von Langzeitaufnahmen efferenter ventilatorischer Nerven (metathorakaler Median-oder Ventralnerv) in isolierten ZNS von *Taeniopoda eques* (7 Experimente) und *Locusta migratoria* (7 Experimente) ohne tracheale Versorgung. Die Pausenlängen zwischen zwei Burstperioden wurden gezählt. Pausenlängen von einer bis zwei Minuten überwiegen offenbar i.d. Präparationen. Längere Pausen, wie sie in den Präparaten mit beibehaltener trachealer Versorgung auftreten (Abbildung 9), sind selten.

3.2.2 Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Atemgaspartialdrücken

Die Experimente an *Taeniopoda eques* und *Schistocerca americana* ergaben sowohl für die Experimente mit Sauerstoff als auch für Kohlendioxid Effekte auf die Ventilation.

Die dargestellten Registrierungen sind für jeden Experimentansatz exemplarisch mit einer repräsentativen Abbildung gezeigt. Die Gesamtheit der durchgeführten Experimente sind im Anhang aufgeführt und können als weiterer Vergleich herangezogen werden (s. Anhang II).

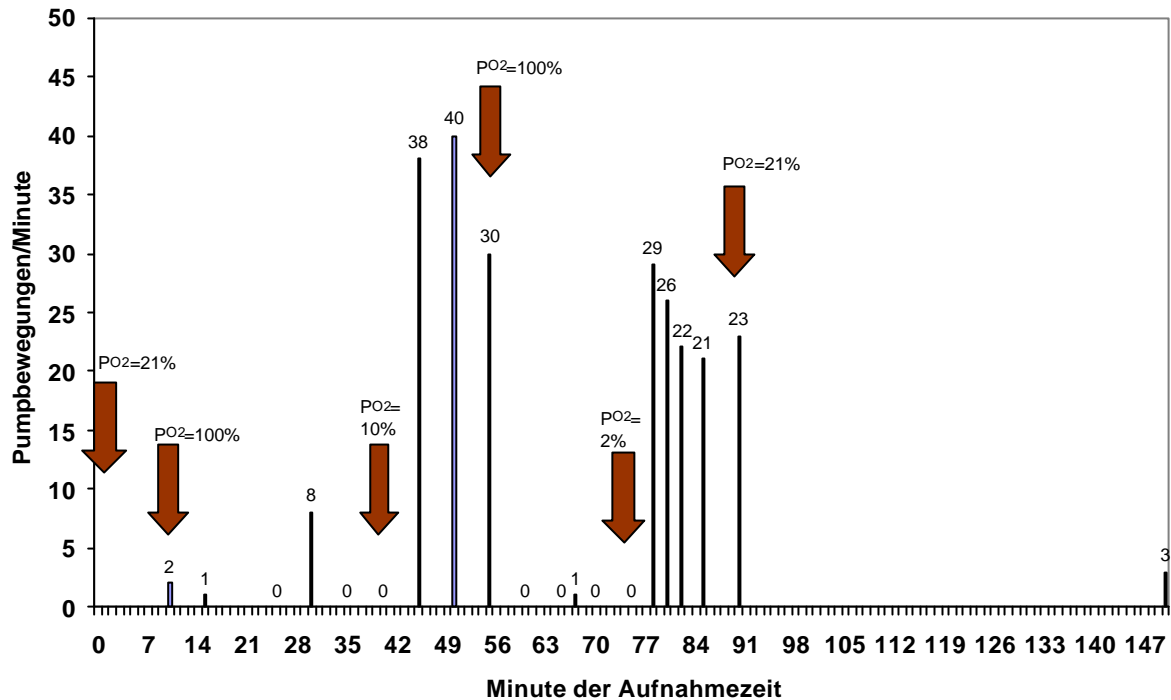
3.2.2.1 Einfluß variierender Sauerstoffpartialdrücke auf die Ventilation

Der Einfluß verschiedener Sauerstoffpartialdrücke wurde untersucht, indem die Änderungen der ventilatorischen Aktivität (abdominale Pumpbewegungen/Minute bzw. Bursts/Minute) registriert wurden. Wie unter Kapitel 2.4 beschrieben wurde im isolierten ZNS und am intakten Tier untersucht. Für *Taeniopoda eques* und *Schistocerca americana* zeigten sich klare Effekte.

Taeniopoda eques:

Intaktes Tier:

Die Einflüsse verschiedener Sauerstoffpartialdrücke auf das intakte Tier sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Pfeile zeigen an, wann die Gasmischung in ihrem Sauerstoffgehalt zwischen 2 und 100% geändert wurde. Im Abstand von ca. 2-5 Minuten erfolgten Messungen. Es wurden für eine Minute die abdominalen Pumpbewegungen gezählt. Bei sinkendem Sauerstoffgehalt in der Kammer mit dem Versuchstier stieg die Frequenz der abdominalen Pumpbewegungen. In Einzelexperimenten führten aber auch niedrigere Partialdrücke nicht zu einer Steigerung der Ventilationsrate sondern zu längeren und tieferen Atemzügen (s. Anhang).

Intaktes Tier (*Taeniopoda eques*)**Abbildung 11:**

Ventilatorische Aktivität des lubber grasshopper ("Pferdefaulpelzgrashüpfers") *Taeniopoda eques*. Frequenzhistogramm von abdominalen Pumpbewegungen/Minute (Säulen) unter variierenden Partialdrücken (in %) von Sauerstoff (PO₂). In Zeitintervallen zwischen zwei Säulen erfolgten keine Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - die die Kammer mit dem Tier durchströmen - ist durch die senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke steigern die Ventilation und hohe senken die ventilatorische Aktivität. Hauptanteil des Gasgemisches war N₂.

*Isoliertes ZNS**a) mit trachealer Versorgung*

Abbildung 12 zeigt - exemplarisch für die vorgenommenen Experimente - den Verlauf der Atmung im isolierten ZNS von *Taeniopoda eques*. Die Datenmenge, die mit diesem Ansatz erzielt wurde, ermöglichte keine aussagekräftige statistische Analyse, wie sie es mit den beiden anderen hier geschilderten Versuchsansätzen möglich war.

**Isoliertes ZNS mit intakter trachealer Versorgung
(*Taeniopoda eques*)**

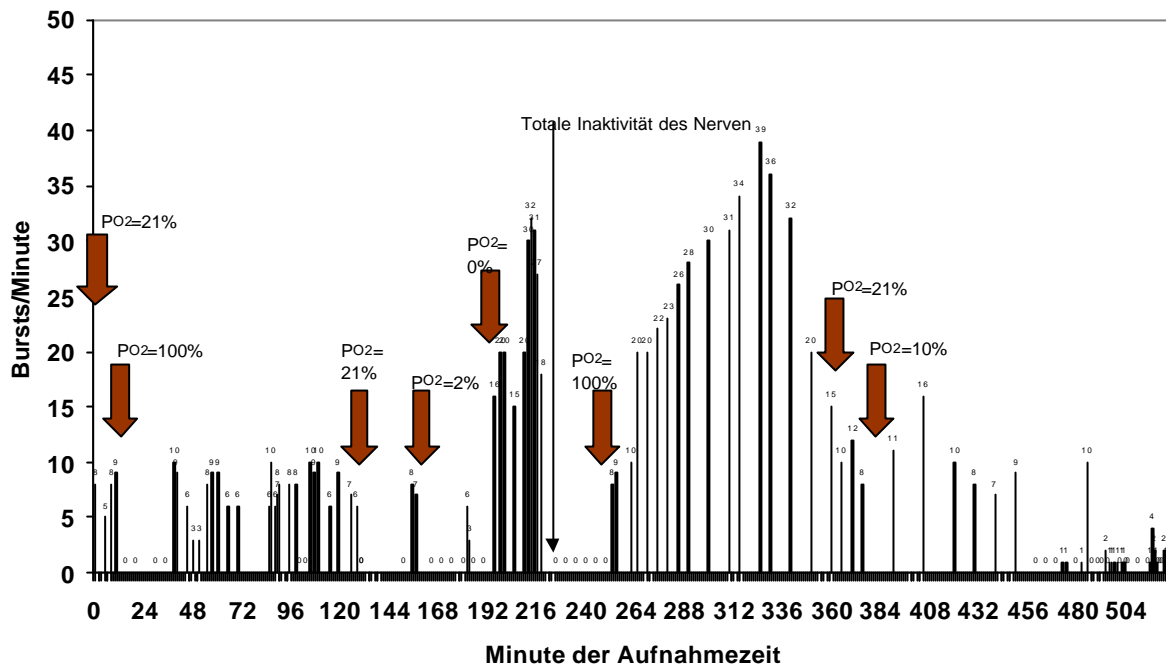


Abbildung 12:

Efferente ventilatorische Aktivität in einem isolierten ZNS mit intakter trachealer Versorgung - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - des Lubber grasshoppers ("Pferdefaulpelzgrashüpfer") *Taeniopoda eques*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Sauerstoffpartialdrücken. In Zeitintervallen zwischen zwei Säulen erfolgten keine Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - welche die Kammer mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke (Hypoxie) steigern die Ventilation und hohe (Hyperoxie) senken die ventilatorische Aktivität. Hauptanteil des Gasgemisches war N₂. Nach Hypoxie und totaler Inaktivität der efferenten ventilatorischen Entladungen (dünner langer Pfeil) erfolgt eine Erholung von dem Hypoxieeffekt.

Wenn im isolierten ZNS die tracheale Versorgung beibehalten wurde, erfolgte die Antwort auf Änderungen des Sauerstoffpartialdrucks mit einer langen Verzögerung (s. Abbildung 12) und dies auch dann erst deutlich, nachdem der Sauerstoffgehalt 0% (Anoxie) betrug. Das ZNS reagierte heftig auf Hypoxie und erholte sich wieder, nachdem es 100% Sauerstoff ausgesetzt wurde. Nachdem der O₂-Gehalt auf 0% gesetzt wurde, stieg die ventilatorische Frequenz immer steiler an und fiel schließlich auf Null ab. Dies wurde bei Säugern biphasische Antwort genannt (Bureau et al., 1984; Haddad and Jiang, 1993) und wird als typische Reaktion auf Hypoxie betrachtet.

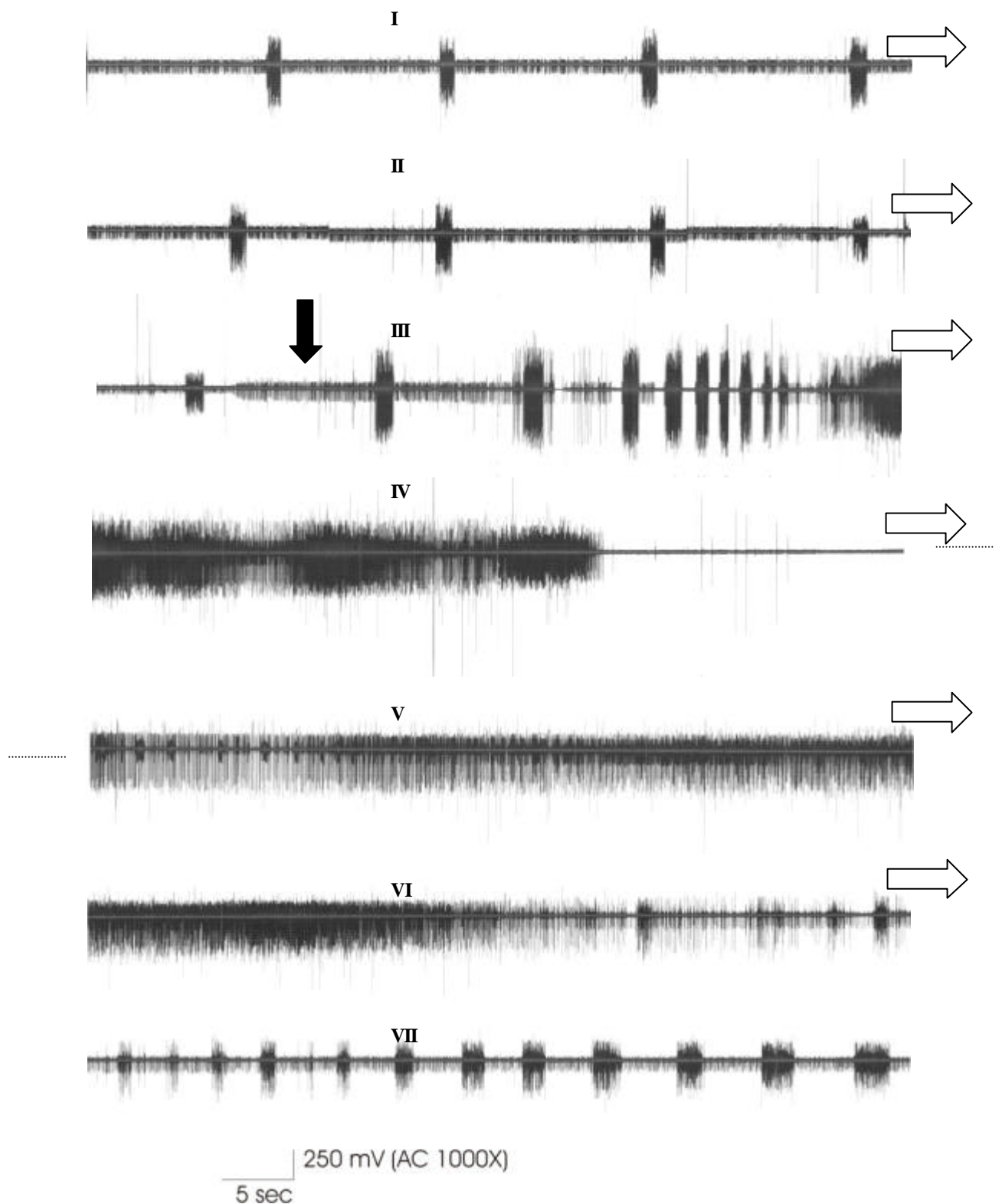


Abbildung 12-I:

Hypoxieeffekte im isolierten Heuschrecken ZNS. Efferente ventilatorische Aktivität (Mediannerv 3. AG) im isolierten ZNS von *Schistocerca gregaria*. Zu Beginn wurde die tracheale Versorgung belassen. Es zeigte sich Ruheatmung mit niedrigen Atemfrequenzen (I-II). Nach Entfernung der Tracheen (schwarzer Pfeil in III) erfolgte unmittelbar eine deutliche Steigerung der ventilatorischen Frequenz, die schließlich zu völliger Inaktivität führte (III-IV). Nach erneuter Begasung mit O₂ (Beginn der Begasung zwischen IV-V, hier nicht dargestellt, Unterbrechung (ca. 1 Min.) symbolisiert durch gestrichelte Linien) begann wieder Aktivität (zuerst nur tonisch), die schließlich zu ventilatorischen Bursts führte (V-VII). Vergl. Abb. 12.

In Abbildung 12-I sind hierzu elektrophysiologische Aufnahmen am Beispiel von *Schistocerca gregaria* dargestellt. Die tracheale Versorgung wurde zuerst beibehalten. Abgeleitet wurde am Mediannerv des 3. Abdominalneuromers. Es zeigte sich niederfrequente Ventilation. Dann wurden die Tracheen entfernt, was in diesem Fall zu einer sofortigen Frequenzsteigerung und anschließendem Ausfall jeglicher Aktivität führte. Nachdem eine direkte Begasung des ZNS mit 100%igen Sauerstoff erfolgte, fing wieder eine tonische Aktivität an, die schließlich zu erneuter rhythmischer Entladung der Mediannervmotoneurone führte.

b) ohne tracheale Versorgung

Wurde die tracheale Versorgung entfernt (Abbildung 13), war zwar die Vitalitätsphase des isolierten ZNS kürzer als mit trachealer Versorgung, jedoch reagierte das Präparat schneller auf die Änderungen der Partialdrücke mit Änderungen der Ventilationsrate, so daß die anfallende Datenmenge statistische Auswertungen ermöglichte (Abb. 14, Tabelle 1). Weitere durchgeführte Experimente sind ebenfalls dokumentiert (s. Anhang).

Isoliertes ZNS (*Taeniopoda eques*)

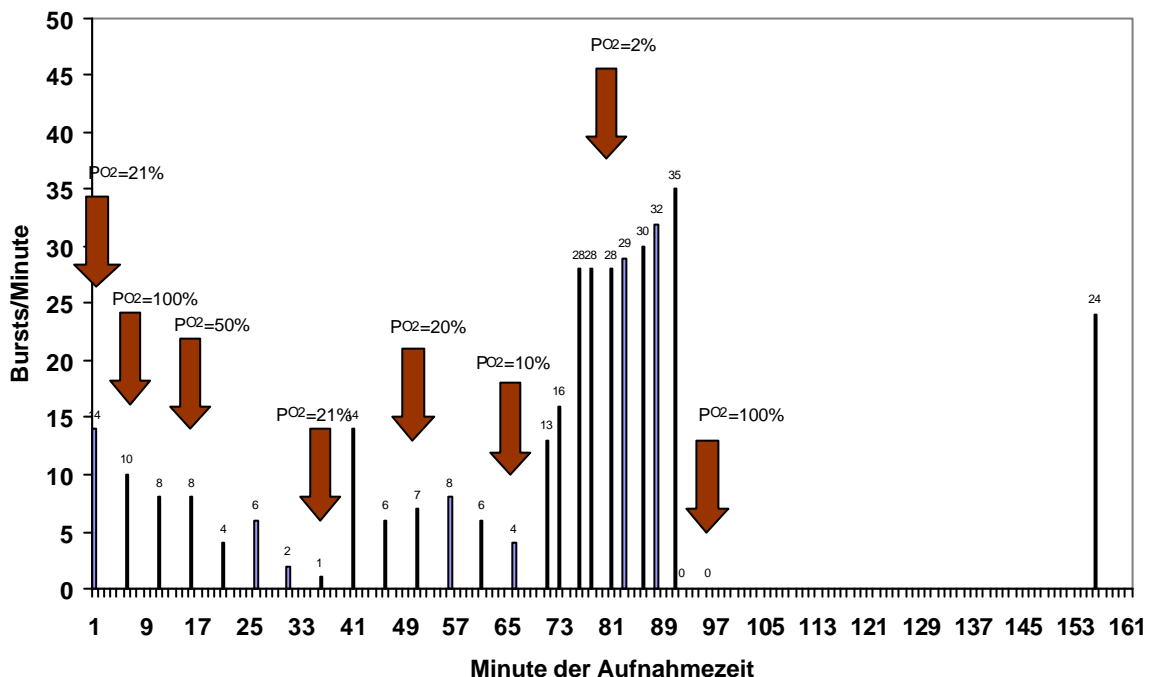


Abbildung 13:

Efferente ventilatorische Aktivität in einem isolierten ZNS - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - des "Pferde-Faulpelzgrashüpfers" *Taeniopoda eques*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Sauerstoffpartialdrücken. In Zeitintervallen zwischen zwei Säulen erfolgten keine Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - welche die Kammer mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke steigern die Ventilation und hohe senken die ventilatorische Aktivität. Hauptanteil des Gasgemisches war N₂.

3.2.2.2 Sauerstoffantwortkurven und ANOVA-Test

In Abbildung 14 sind die Sauerstoffantwortkurven für das isolierte ZNS ohne tracheale Versorgung und das intakte Tier gezeigt. Für das isolierte ZNS wurden aus sechs Experimenten die Mittelwerte für die ventilatorische Frequenz genommen. Für das intakte Tier waren es die Mittelwerte aus sieben Langzeitaufnahmen. Es zeigt

sich ein Zusammenhang zwischen steigendem Sauerstoffpartialdruck und sinkender ventilatorischer Aktivität. Die statistische Analyse mittels ANOVA-Test für wiederholte Messungen ergab einen hochsignifikanten Wert ($P=0,001$) für das isolierte ZNS und einen signifikanten ($P=0,00186$) für das intakte Tier.

In anderen Worten: die Ventilationsraten wurden durch den Sauerstoffgehalt hochsignifikant (signifikant) verändert.

Die Daten weisen daher auf einen ventilationsändernden Sauerstoffrezeptor hin (s. Diskussion).

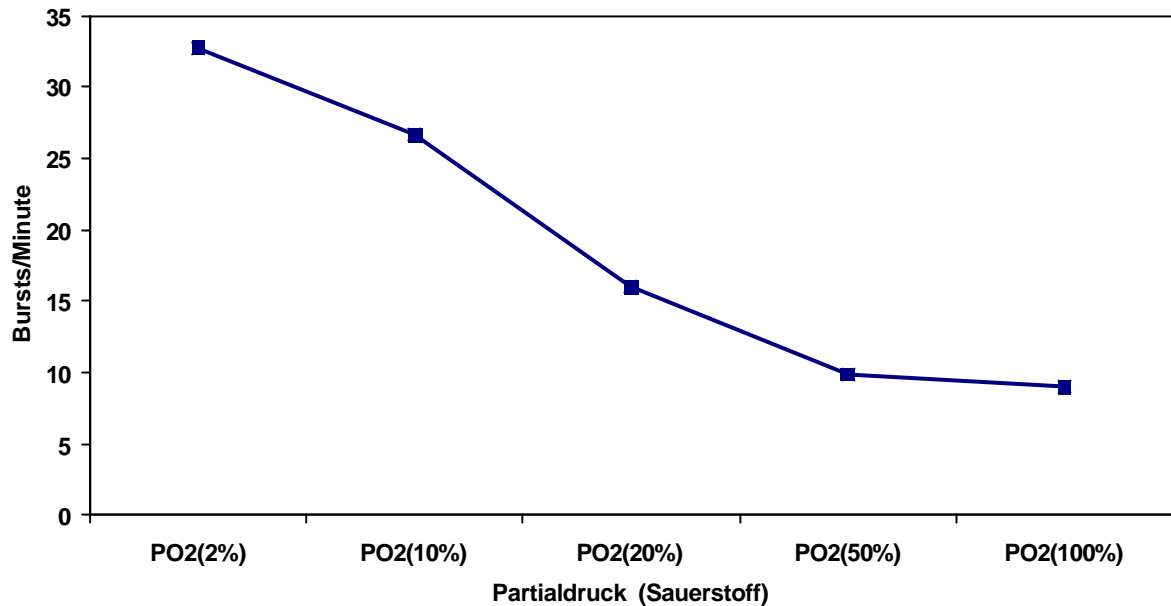
Die Ventilationsraten für die verschiedenen Sauerstoffpartialdrücke im intakten Tier und im isolierten ZNS sind noch einmal zusammenfassend mit den errechneten Signifikanzwerten in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1:

Effekte von variierenden Sauerstoffpartialdrücken im Gasgemisch - welches die Kammern mit dem isolierten ZNS/intakten Tier durchströmte - auf die Ventilationrate (*Taeniopoda eques*) und kritische Werte des ANOVA-Tests (Varianzanalyse für wiederholte Messungen).

| Partialdruck O ₂ (% des Gasgemisches) | Ventilationsrate (Bursts bzw. abdominale Pumpbewegungen/Min) | |
|---|---|----------------------------|
| | Isoliertes ZNS (N=6) | Intaktes Tier (N=7) |
| 2 | 32,8 | 22,5 |
| 10 | 26,6 | 22,7 |
| 20 | 16,0 | 18,1 |
| 21 | - | 17 |
| 50 | 9,8 | - |
| 100 | 9,1 | 8,8 |
| Kritischer Wert ANOVA-test | P=0,001, d.h. hochsignifikant | P=0,00186,d.h. signifikant |

Sauerstoffantwortkurve, isoliertes ZNS vom Pferde-Faulpelzgrashüpfer (*Taeniopoda eques*) - Mittelwerte aus sechs Langzeitaufnahmen



Sauerstoffantwortkurve, für intaktes Tier vom Pferde-Faulpelzgrashüpfer (*Taeniopoda eques*) - Mittelwerte aus 7 Langzeitaufnahmen

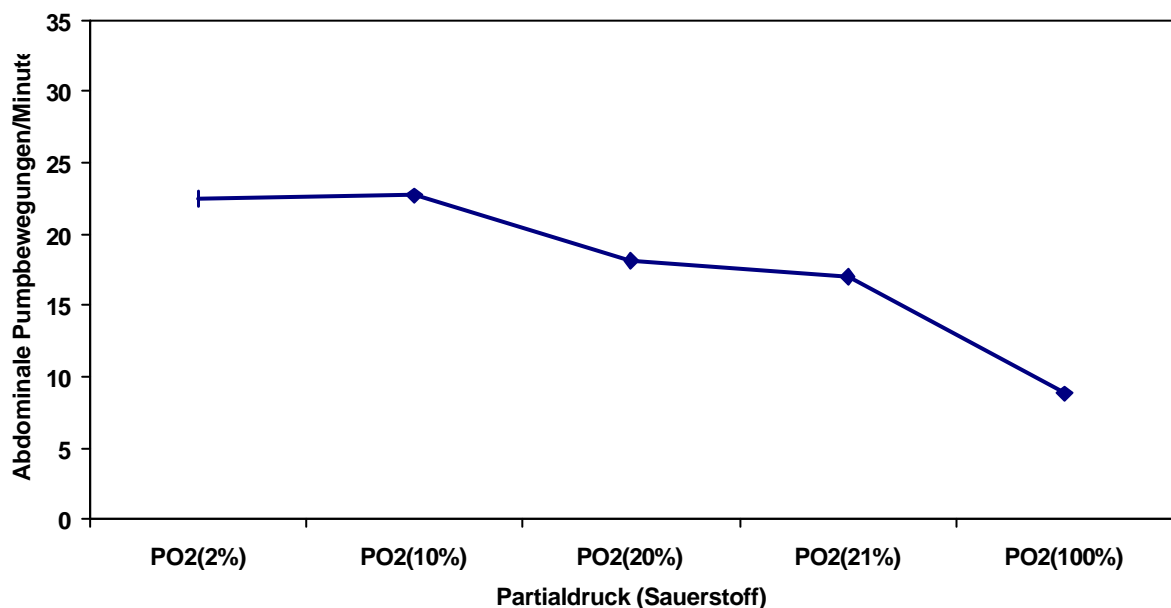


Abbildung 14:

Sauerstoffantwortkurven: **A:** ventilatorische Aktivität im isolierten Nervensystem vom "Pferde-Faulpelzgrashüpfer" *Taeniopoda eques* gegen Partialdrücke von Sauerstoff (PO₂). Mittelwerte von sechs Langzeitaufnahmen. **B:** intaktes Tier. Mittelwerte von sieben Langzeitaufnahmen. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA-Test für wiederholte Messungen. Die Messungen der ventilatorischen Aktivität (Bursts/Minute) sind signifikant bezüglich der Sauerstoffpartialdrücke, d.h. steigende ventilatorische Aktivität ist signifikant korreliert mit sinkendem Sauerstoffgehalt der Luft. $P = 0,001$. Für das intakte Tier ergab sich ebenfalls eine signifikante Korrelation von steigender Atemaktivität des Tieres und sinkendem Sauerstoffgehalt der Luft in der Kammer $P=0,00186$ (in Anlehnung an Harrison 1999, persönliche Mitteilung)

3.2.2.3 Einfluß variierender CO₂-Partialdrücke auf die Ventilation

Für verschiedene CO₂-Partialdrücke wurde ebenfalls der Verlauf der Ventilation im isolierten ZNS untersucht. Bei diesem Versuchsansatz wurden Heuschrecken der Art *Schistocerca americana* (eine enge Verwandte der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*) für die Experimente verwendet. Exemplarisch ist auch für diese Experimente ein Beispiel in Abbildung 15 wiedergegeben. Die Verläufe der übrigen Experimente sind wiederum dem Anhang zu entnehmen.

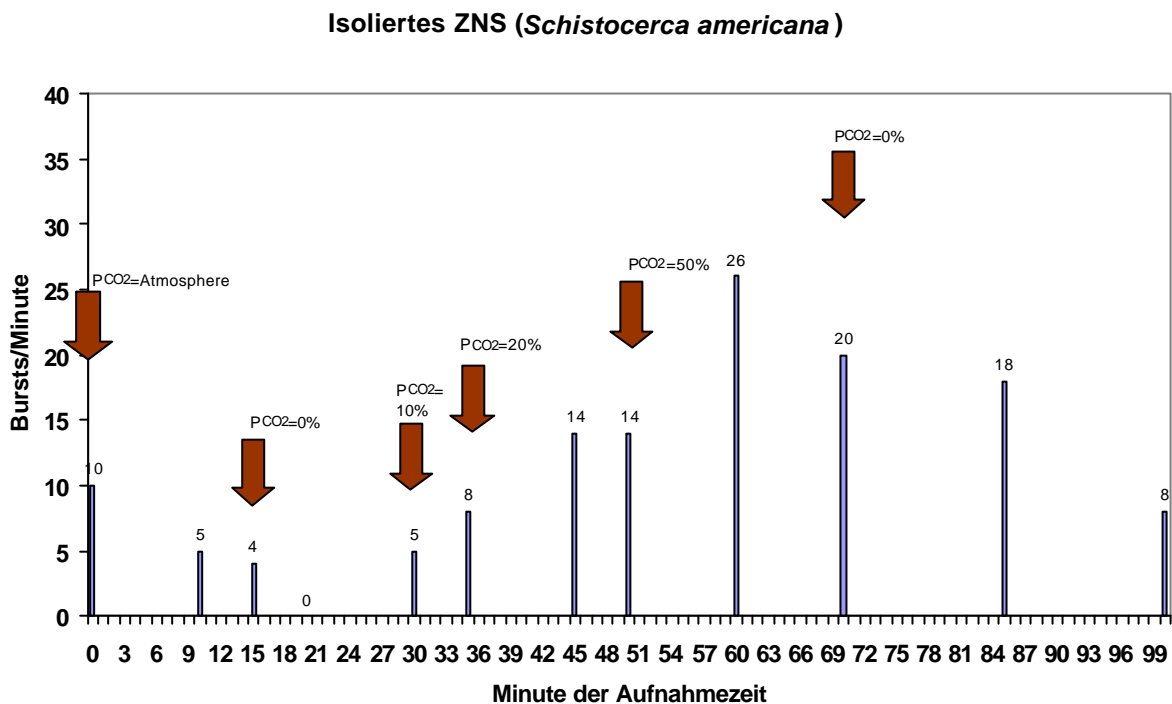


Abbildung 15:

Efferente ventilatorische Aktivität in einem isolierten ZNS - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - der amerikanischen Wüstenheuschrecke *Schistocerca americana*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Kohlendioxidpartialdrücken. In Zeitintervallen zwischen zwei Säulen erfolgten keine Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Kohlendioxidpartialdrücken - welche die Kammer mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Kohlendioxidpartialdrücke senken die Ventilationsrate und hohe steigern die ventilatorische Aktivität. Hauptanteil des Gasgemisches waren N₂ und Sauerstoff. Sauerstoff wurde bei 50 % stabil gehalten; bei Änderung des CO₂-Gehaltes wurde N₂ entsprechend variiert.

Die Ventilationsrate variiert infolge verschiedener CO₂-Gehalte der Luft in der Kammer mit dem isolierten ZNS. Ab einer CO₂-Konzentration von 20% im Gasgemisch ist ein deutlicher Anstieg der Ventilationsrate zu sehen.

Dieser Sachverhalt ist auch bereits bei intakten Tieren von *Schistocerca americana* beobachtet worden (Harrison, persönliche Mitteilung), daher wurden die Aufnahmen lediglich im isolierten ZNS durchgeführt.

Kohlendioxid-Antwortkurve, isoliertes ZNS in Ringerlösung der amerikanischen Wüstenheuschrecke (*Schistocerca americana*) - Durchschnittswert aus vier Langzeitaufnahmen

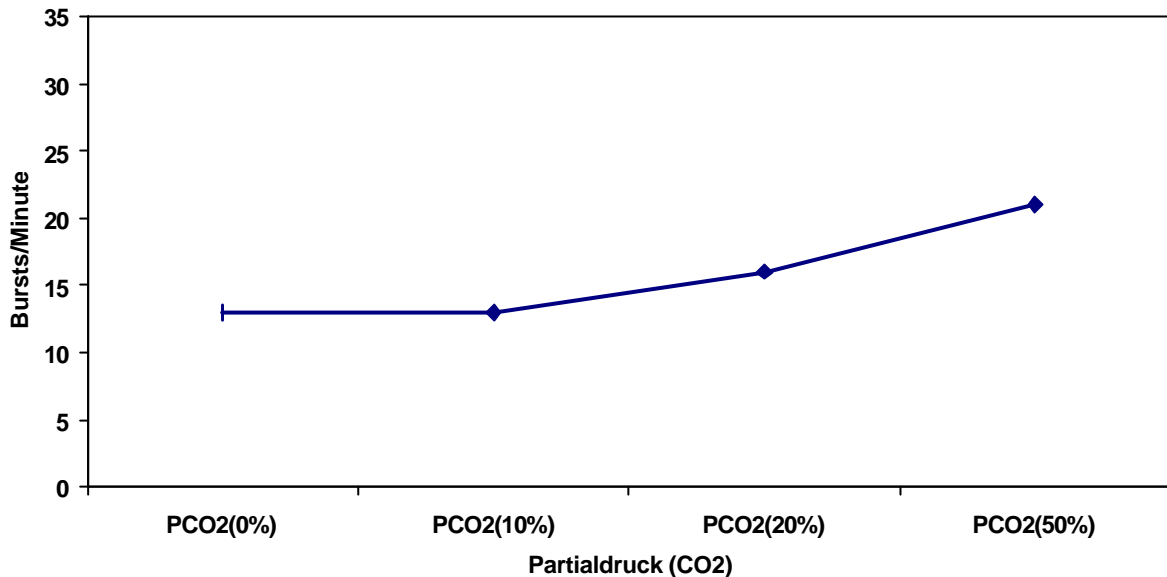


Abbildung 16:

Kohlendioxidantwortkurve: ventilatorische Aktivität im isolierten Nervensystem der amerikanischen Wüstenheuschrecke gegen Partialdrücke von Kohlendioxid (PCO₂). Mittelwerte von vier Langzeitaufnahmen. Es zeigt sich eine steigende ventilatorische Aktivität mit steigendem CO₂-Gehalt des Gasgemisches, das die Petrischale durchströmte. Bei diesen Experimenten wurde der N₂-Gehalt bei stabilem O₂-Gehalt variiert. Basis der Gasgemische waren N₂ und Sauerstoff.

Eine statistische Auswertung, wie sie für die verschiedenen Sauerstoffpartialdrücke vorgenommen wurde, erfolgte auch für Kohlendioxid, trotz der geringen Anzahl (n=4) aussagekräftiger Experimente. Die statistische Auswertung (Abbildung 16) ergab für die Stichprobenzahl von n=4 einen kritischen Wert von P=0.01, d.h. es gab einen schwach signifikanten Effekt von CO₂ auf die Ventilationsraten.

Bei einigen Experimenten zur CO₂-Sensitivität des isolierten ZNS (im Anhang grafisch dokumentiert) wurden bei Erhöhung der CO₂-Gehalte im Gasgemisch bei konstantem N₂ die Anteile Sauerstoff variiert. Die Effekte von CO₂ waren bei diesen Versuchen deutlicher als bei konstantem O₂-Anteil von 50% (s. Anhang II, dA-C), wie es für den Versuch in Abbildung 15 galt.

In Abbildung 17 ist der Zusammenhang zwischen CO₂- und Sauerstoffgehalt für *Taeniopoda eques* in einer kombinierten Grafik dargestellt. Hier zeigt sich keine

deutliche gesteigerte Ventilationsrate ab 10% CO₂. Vielmehr sind die Werte für 10%, 20% und 50% nahezu gleich. Es handelte sich um ein Einzelexperiment mit *Taeniopoda eques* (alle anderen CO₂-Versuche wurden mit *Schistocerca americana* durchgeführt). Insgesamt ist ein deutlicher Effekt erst ab 10% CO₂ zu erkennen, und die O₂-Partialdrücke scheinen keinen unmittelbaren Einfluß zu haben. Auch im intakten Tier konnten bei einzelnen Experimenten teilweise (bei den Sauerstoffversuchen) keine Frequenzerhöhungen beobachtet werden. Jedoch führte Hypoxie immer zu deutlich tieferen Ventilationsbewegungen des Abdomens, d.h. mit jedem Atemzug wurden größere Luftvolumina eingeatmet.

Für *Schistocerca americana* konnte dies nicht so eindeutig beobachtet werden wie bei *Taeniopoda eques*.

Anders hingegen zeigt sich die Kohlendioxidantwortkurve bei variiertem Sauerstoffpartialdruck für *Schistocerca americana*, welche in Abbildung 18 zu sehen ist: man erkennt einen deutlich stärkeren Anstieg der Ventilationsraten bei gleichzeitig sinkendem Sauerstoffpartialdruck im Vergleich zu Abbildung 16, wo bei den zugrundeliegenden Experimenten der Sauerstoffgehalt konstant bei 50% lag.

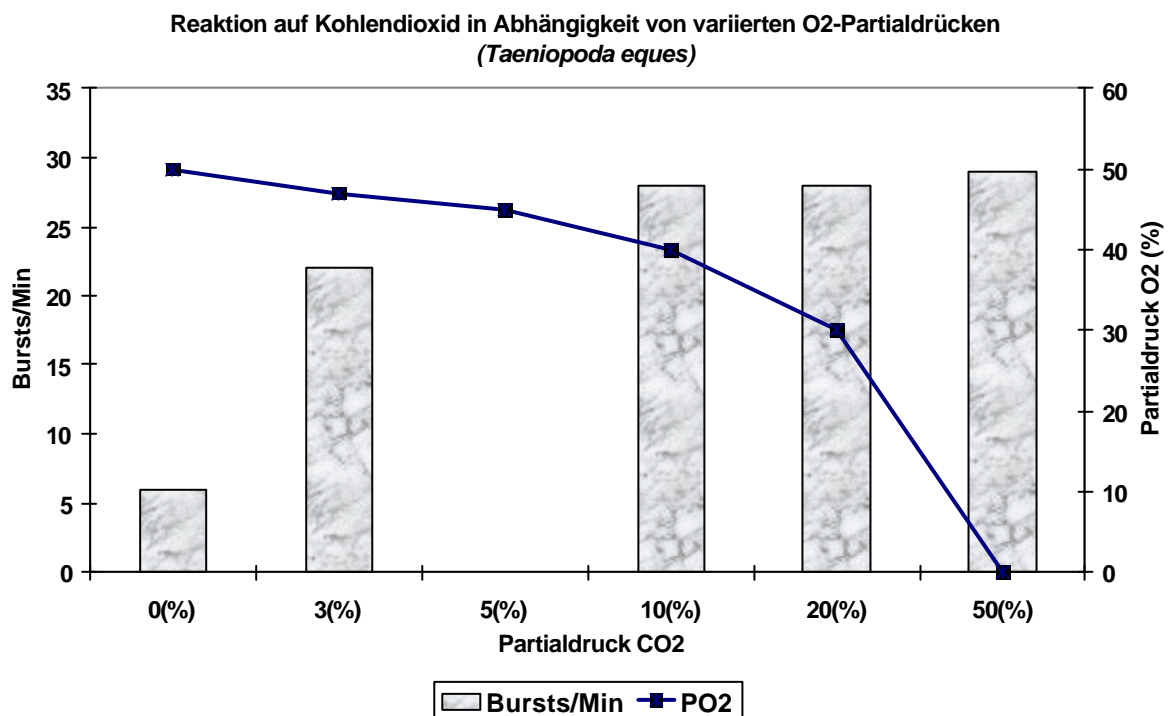


Abbildung 17:

Ventilationsraten im isolierten ZNS beim Grashüpfer *Taeniopoda eques* mit steigenden Kohlendioxidpartialdrücken (5% CO₂ kein Meßwert aufgenommen). Der Sauerstoffpartialdruck wurde ebenfalls variiert im Gasgemisch. Für die Untersuchungen der Kohlendioxidantworten wurde nur in diesem Experiment *Taeniopoda eques* verwendet. Hauptanteil des Gasgemisches waren N₂ und Sauerstoff. Bei Änderung des Kohlendioxidpartialdrucks wurde Sauerstoff entsprechend angepaßt.

Kohlendioxid-Antwortkurve, isoliertes ZNS in Ringerlösung der amerikanischen Wüstenheuschrecke (*Schistocerca americana*); CO₂-Antwortkurve bei variierten O₂-Partialdrücken, Durchschnittswert aus zwei Experimenten

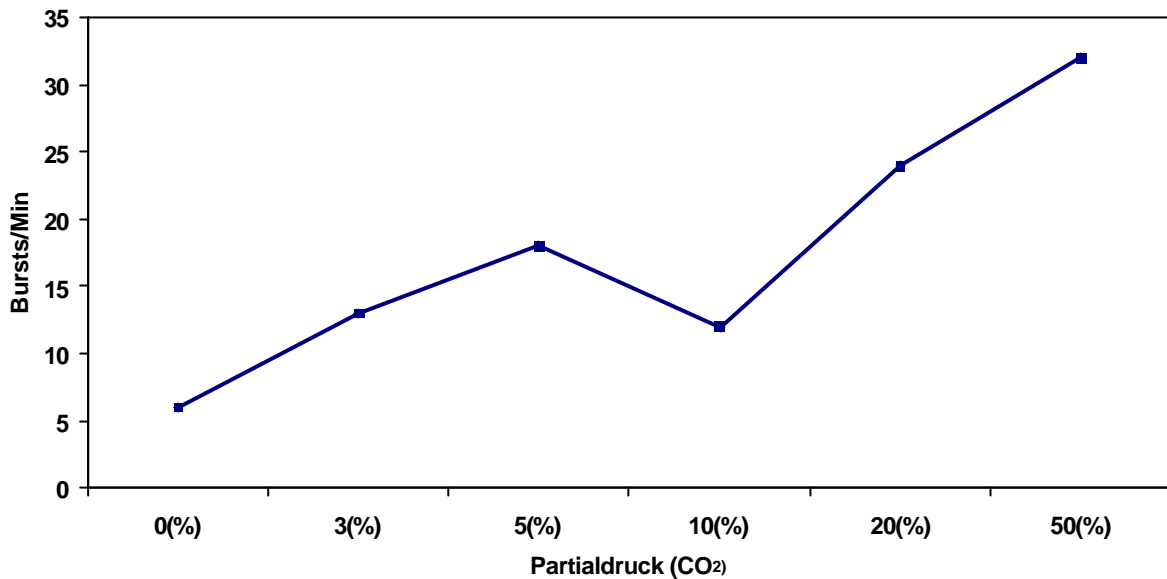


Abbildung 18:

Kohlendioxidantwortkurve: Auftragung ventilatorischer Aktivität im isolierten Nervensystem der amerikanischen Wüstenheuschrecke gegen Partialdrücke von Kohlendioxid (PCO₂). Mittelwerte von zwei Langzeitaufnahmen. Bei diesen Experimenten wurde der O₂-Gehalt variiert bei stabilem N₂-Gehalt. Der Sauerstoffgehalt im Gasgemisch betrug bei 0% CO₂ 50%, bei 3% CO₂ 47%, bei 5% CO₂ 45%, bei 10% CO₂ 40%, bei 20% CO₂ 30% und bei 50% CO₂ 0%. Es zeigt sich eine deutlich steigende ventilatorische Aktivität mit steigendem CO₂-Gehalt des Gasgemisches - das die Petrischale durchströmte - erst ab einem Sauerstoffgehalt von 30%. Bei absoluter Hypoxie (0% Sauerstoff) steigt die Ventilationsrate am deutlichsten. Bei Hyperoxie (mehr als 20% Sauerstoff) bewirken selbst hohe CO₂-Partialdrucke > 3% (im Vergleich zur üblichen Konzentration in der natürlichen Luft < 0,3%) keine deutliche Steigerung der ventilatorischen Aktivität. Hauptanteil des Gasgemisches waren N₂ und Sauerstoff. Bei Änderung des Kohlendioxidpartialdrucks wurde Sauerstoff entsprechend angepaßt.

3.3 Identifizierte Interneurone

Bei dieser Untersuchung konnten Interneurone identifiziert werden, die zum ventilatorischen Rhythmus korreliert aktiv sind und solche, die Teil des rhythmusgenerierenden Netzwerkes selbst sein könnten.

Es konnte von insgesamt 10 ventilatorischen Interneuronen elektrophysiologisch abgeleitet werden und ihre Morphologie mit Lucifer Yellow dargestellt werden. Zwei Färbungen waren im semiintakten Präparat und acht im isolierten ZNS erfolgreich.

Die Interneurone sind von 1 bis 10 durchnummeriert (VentIN1-10). Eine Klassifikation nach vermutlicher Funktion, Anatomie etc. ist im Kapitel 3.3.3 dargestellt (s. Tabelle 2).

3.3.1 Im semiintakten Präparat

In Voruntersuchungen am isolierten ZNS wurden im nicht deafferentierten, semiintakten Präparat ventilatorisch aktive Regionen im Metathorakalganglion stärker eingegrenzt. Im Verlaufe dieser Experimente gelang es, bisher nicht identifizierte Interneurone zu finden, deren Aktivität mit dem ventilatorischen Netzwerk in Verbindung gebracht werden konnten. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die Grundstruktur dieser Interneurone und ihre relative Lage im Metathorakalganglion. Exemplarisch ist ein Ausschnitt aus der ventilatorischen Aktivität der hier gezeigten Neurone dargestellt. Die Färbungen erfolgten mit Lucifer Yellow.

Beide Interneurone haben ihr Soma im anterioren Bereich des 1. verschmolzenen Abdominalneuromers bzw. im Bereich des eigentlichen Metathorakalganglions in der Nachbarschaft des großen Beinnervs. Das Interneuron der Abbildung 19 (im folgenden ventilatorisches Interneuron1 - VentIN1 - genannt) zeigt Korrelation zum ventilatorischen Netzwerk (obere Spur: Mediannerv, untere Spur: expiratorisches Interneuron). Es handelt sich um ein lokales Interneuron.

Das Interneuron der Abbildung 20 (im folgenden ventilatorisches Interneuron2 - VentIN2 - genannt) hat die typische Struktur eines ventilatorischen Kommandoneurons. Es handelt sich um ein deszendierendes Neuron, dessen Soma kontralateral zum in das Konnektiv absteigenden Axon liegt. In diesem Fall

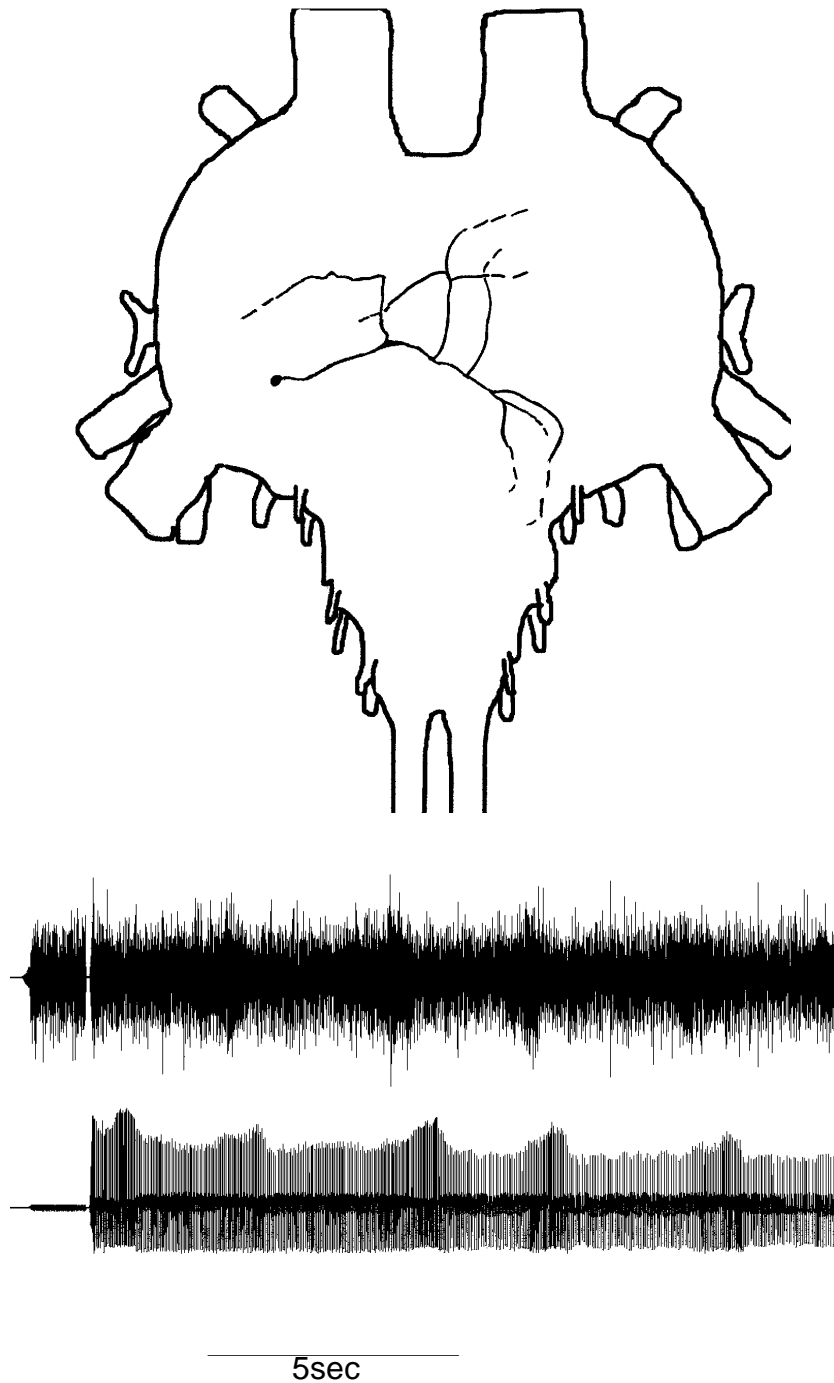


Abbildung 19 (VentIN-1)

Lokales Interneuron mit rhythmischer Aktivität (Lucifer Yellow-Färbung), die korreliert ist zur Ventilation im Metathorakalganglion von *Locusta migratoria*, Dorsalansicht. Dargestellte electrophysiologische Daten: Obere Spur = extrazellulärer Monitor (Ventral-oder Mediannerv d. Metathorakalganglions), Untere Spur = Aktivität des expiratorischen IN (weitere Erläuterungen s. Text)

verhinderten technische Probleme die Ableitung extrazellulärer Daten. Daher sind lediglich intrazelluläre electrophysiologische Daten dargestellt. Stattdessen konnte visuell eine Korrelation zwischen den rhythmischen Entladungen und ventilatorischen abdominalen Pumpbewegungen hergestellt werden. Depolarisierung trieb es an und Hyperpolarisierung hemmte es.

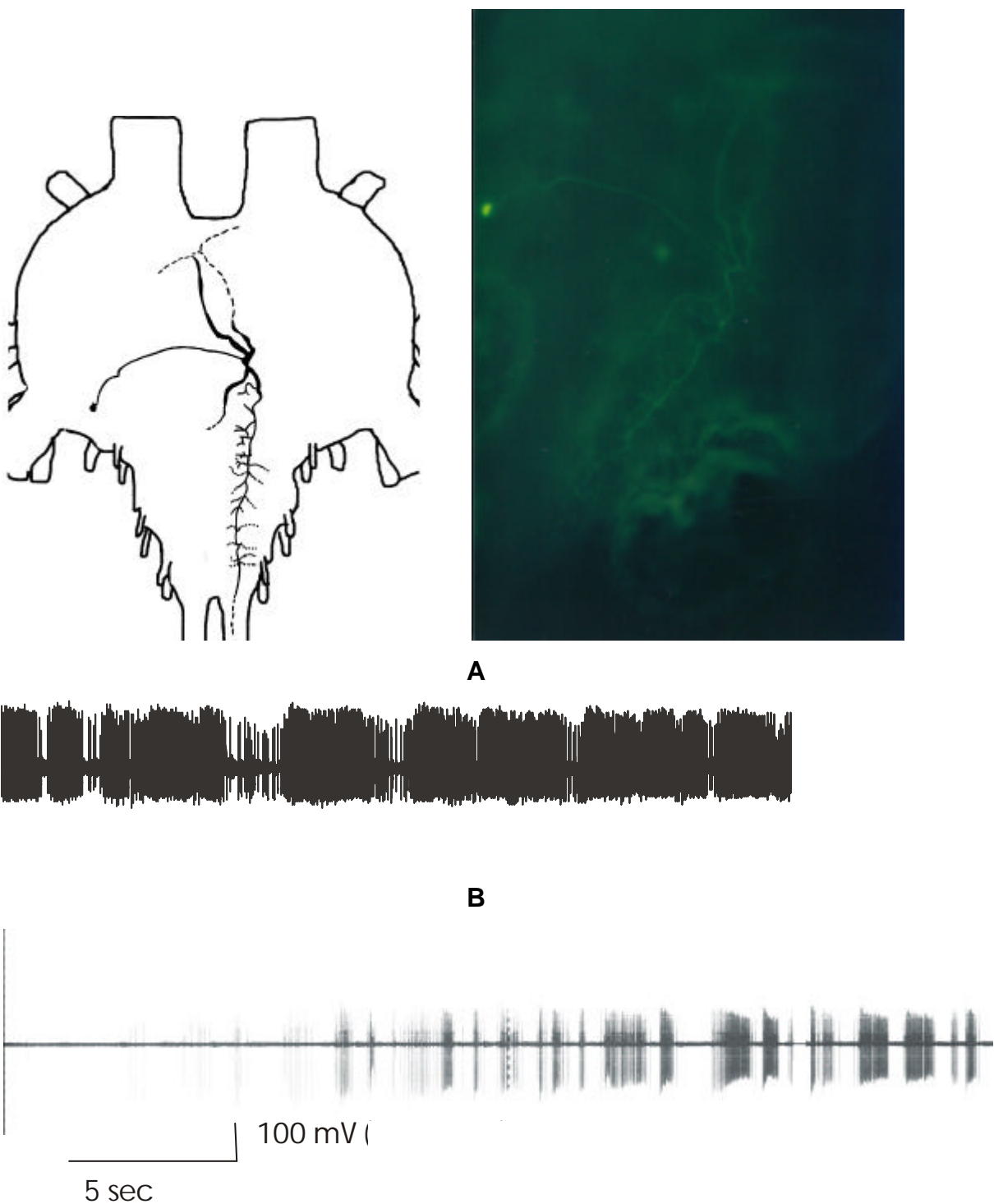


Abbildung 20 (VentIN-2)

Intersegmentales Interneuron mit rhythmischer Aktivität, die zur Ventilation korreliert ist (visuelle Kontrolle). Lucifer Yellow-Färbung im Metathorakalganglion von *Locusta migratoria*, Dorsalansicht. **A**: Intrazelluläre Aktivität des IN nach Depolarisierung. Simultan mit den Entladungen dieses Neurons konnten abdominale Pumpbewegungen der ventilatorischen Muskulatur beobachtet werden. **B**: während Hyperpolarisation, welche den Rhythmus unterdrückt, spontan neu beginnende Aktivität.

Während einer Reihe von intrazellulären Experimenten, die wie o. g. durchgeführt wurden, wurde die Mikro-Glaselektrode immer in eine bestimmte Region des Metathorakalganglions gestochen. Es handelt sich um die im Bereich der medianen Mittellinie liegende Neuropilregion, in deren Bereich sich die bisher identifizierten ventilatorischen Interneurone stark verzweigen.

Insbesondere der Bereich im 1. Neuomer wurde immer wieder gezielt nach Interneuronen abgesucht. Einstiche erfolgten im semiintakten Präparat von dorsal und im isolierten von ventral, aufgrund der ventral liegenden Tracheen, die sich zur Atmosphäre öffnen sollten (vergl. Kapitel 2.5 und s. Abbildung 1).

Die Einstiche in dieser möglicherweise verschaltenden Region führten immer zu einem starken Effekt auf die efferente ventilatorische Aktivität der Monitornerven oder auf abdominale Pumpbewegungen. Dies konnte auch mehrfach über den Audiomonitor beobachtet werden (Aufnahme aus technischen Gründen nicht verfügbar).

3.3.2 Im isolierten ZNS mit intakter trachealer Versorgung

Im isolierten Präparat mit intakter trachealer Versorgung wurden mehrfach ventilatorische Neurone abgeleitet, ohne daß eine ausreichende Färbung gelang. Lediglich die Lage der Somata in den lateralen Bereichen der Neuomere deutete auf eine ähnliche Struktur hin, wie sie für bisher bekannte ventilatorische Interneurone typisch war.

Die Interneurone, die eine elektrophysiologische Ableitung und eine Färbung ermöglichten, sind im folgenden dokumentiert.

In Abbildung 21 ist fotografisch die Lage eines solchen Somas zu erkennen (VentIN3). Das Soma ist relativ klein und liegt lateral im Neuomer. Es zeigt eine (vermutlich) inspiratorische Aktivität (s. auch Tabelle 2).

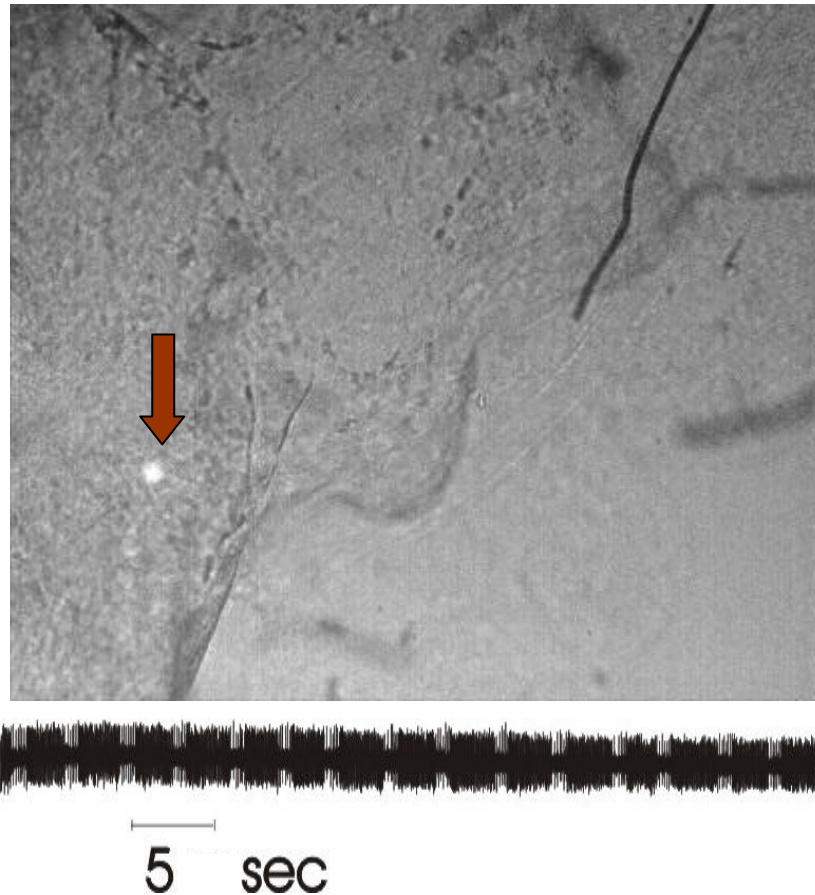


Abbildung 21 (VentIN-3)

Ventilatorisches Neuron mit kleinem Soma im Metathorakalganglion von *Locusta migratoria* welches lateral im Bereich des 1. Neuromers lokalisiert ist. Nur das Soma ist gut gefärbt, hat aber eine charakteristische Lage und Größe für ventilatorische Interneurone. Der Pfeil zeigt auf das gefärbte Soma, Die gezeigte Spur demonstriert die rhythmische Aktivität des Neurons.

Das Interneuron VentIN-4 konnte im isolierten ZNS über einen längeren Zeitraum gehalten und erfolgreich gefärbt werden. Seine Physiologie konnte relativ gut beobachtet werden und zeigte einige Charakteristika, mit deren Hilfe einige neue Erkenntnisse zur ventilatorischen Rhythmogenese gelangen. Die Anatomie dieses deszendierenden "Kommandoneurons" (deszendierendes Axon in abdominale Ganglien) ist in Abbildung 22 fotografisch und zeichnerisch dokumentiert.

Die Daten lassen erkennen (Abb. 22-I und 22-II), daß das Kommandoneuron präsynaptischen Input (IPSPs und EPSPs, Abb. 22-II) von offenbar aufgeschalteten Neuronen vom CPG erhält. Die EPSPs werden nur gelegentlich überschwellig und führen zu einem Burst (s. Abbildung 22-IB). Die Abbildung 22-IC zeigt eine heftige Reaktion des Neurons (in Form von hochfrequenter Dauerrhythmik) bei Rücksetzung ("rebound") der Hyperpolarisierung. Es ist also selbst positiv rückgekoppelt auf das antreibende Netzwerk. Im ungestörten Zustand (Abbildung 22-IA) zeigten sich

diskontinuierliche Burstmuster, mit kleinen Gruppen aufeinander folgender Bursts, getrennt durch kleinere Pausen.

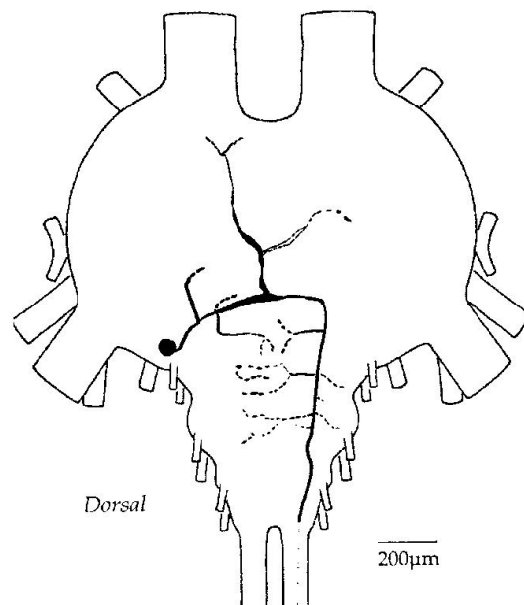
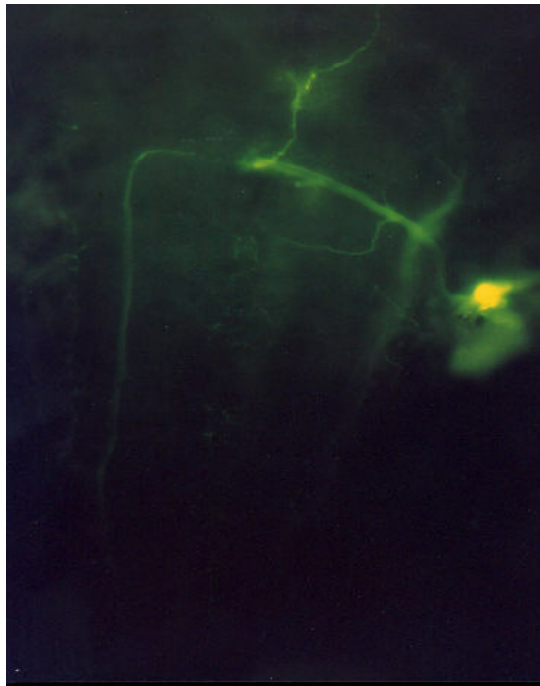
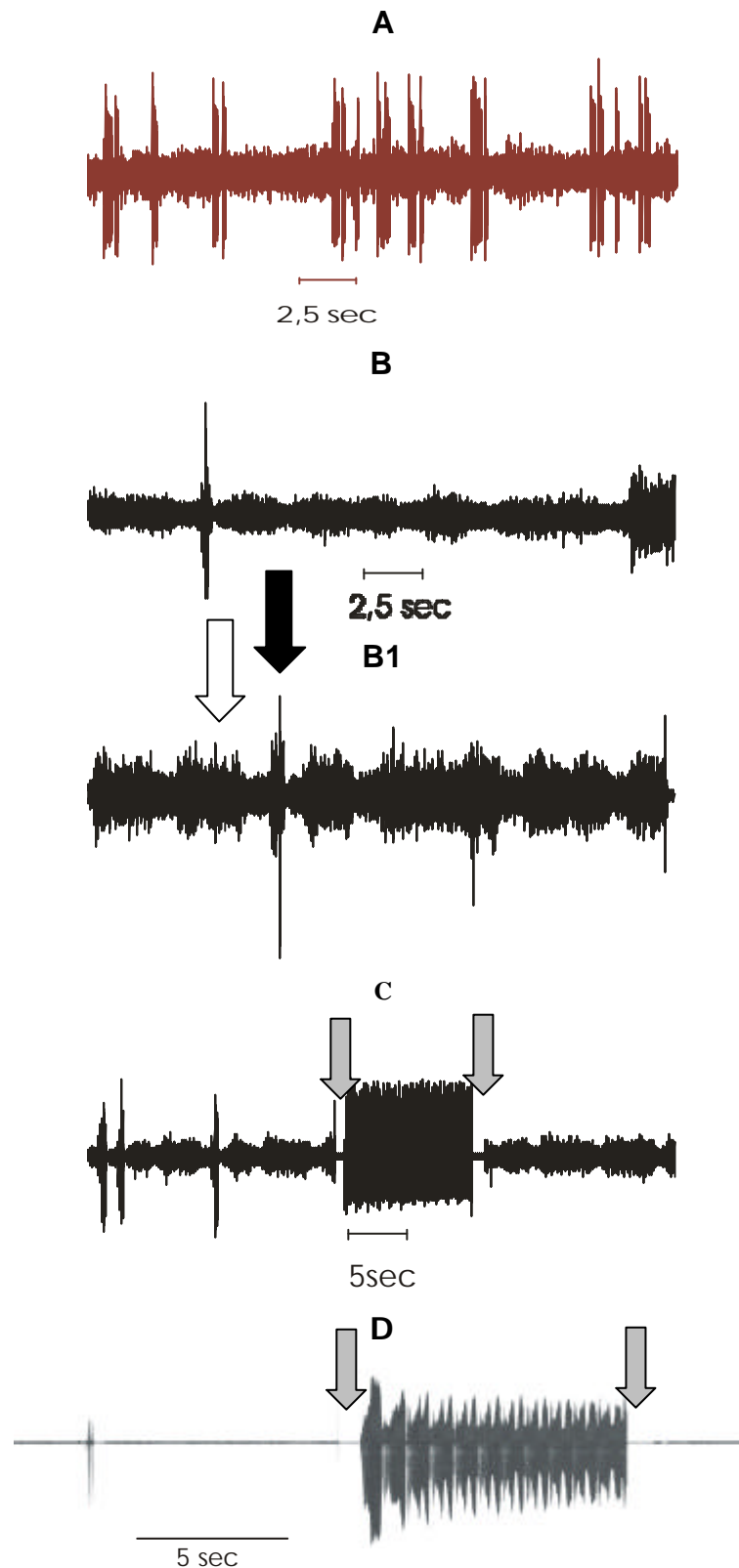


Abbildung 22 (VentIN-4)

Intersegmentales "Kommandoneuron" des ventilatorischen Netzwerkes, mit Soma, 1. Neuriten, Verzweigungen und Feinverzweigungen, die feine synaptische Endigungen im Bereich des 2. und 3. Neuromers enthielten. Das Axon zieht nach kontralateral und deszendiert dann ins Konnektiv (Lucifer Yellow-Färbung). Foto: Ventralansicht

**Abbildung 22-I:**

Elektrophysiologische Daten zum Interneuron in Abbildung 22

Die in **A** gezeigte elektrophysiologische Aktivität zeigt das Neuron im unbeeinflussten Zustand. Kleine Burstgruppen sind erkennbar. In **B** ist die Aktivität zu sehen, in der eine Dauerhyperpolarisierung durch die injizierte Elektrode erfolgte. Die erste Spur in **B** wurde mit der halben Verstärkung der anderen Aufnahmen aufgezeichnet. Es zeigen sich unter-schwellige PSPs (weißer Pfeil), gefolgt von überschwellig ausgelösten Bursts von Aktionspotentialen (schwarzer Pfeil). In **C** wurde die Hyperpolarisierung zurückgesetzt (rebound und erneute Hyperpol., durch Pfeile angezeigt). In **D** Rücksetzung der Inhibition und erneute Hyperpolarisierung (Pfeile) in stärkerer Vergrößerung (2X). Es folgt eine heftige Reaktion in Form von immer schneller werdenden Burstserien.

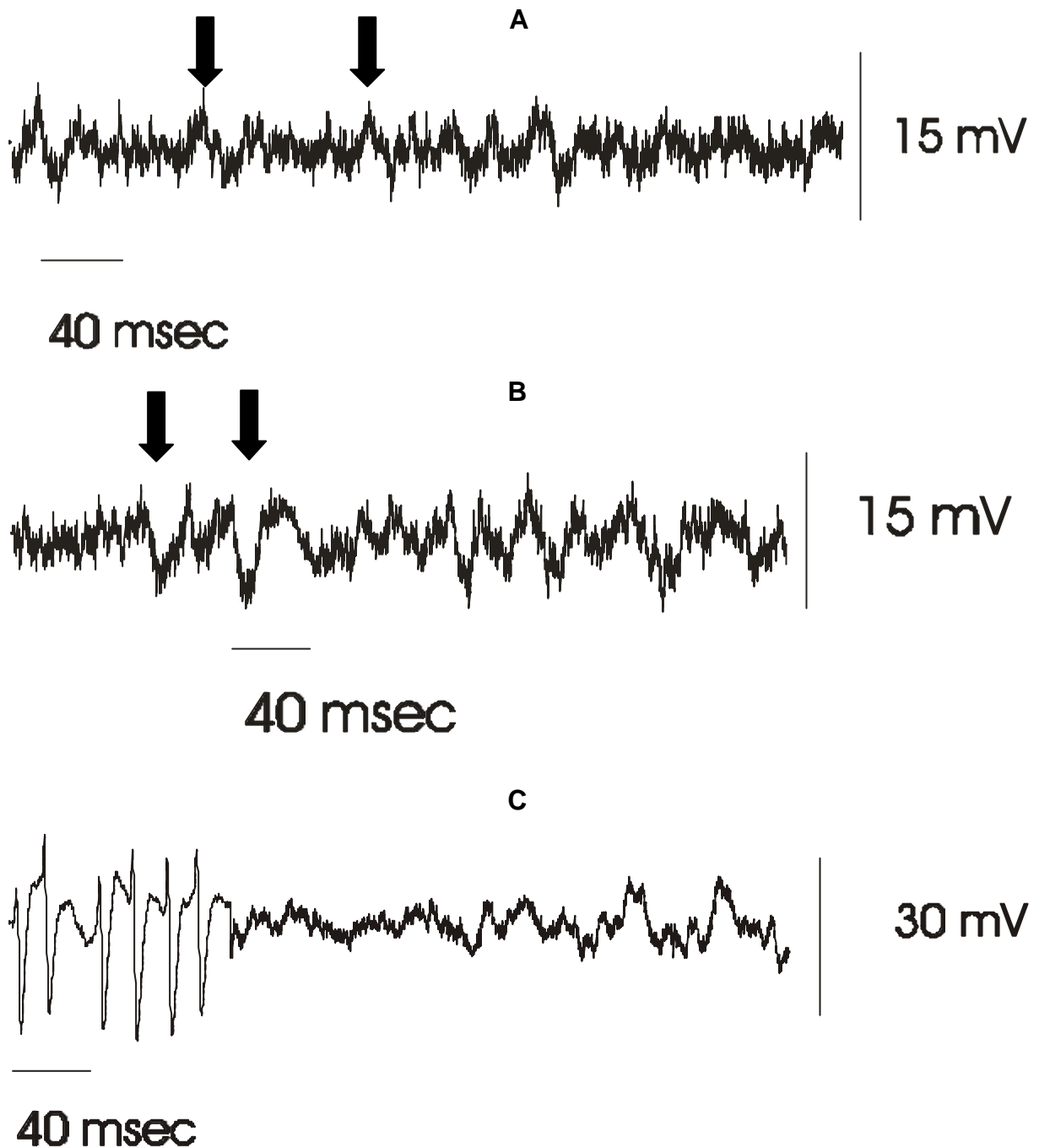


Abbildung 22-II

Fortsetzung elektrophysiologische Daten zu VentIN4 (s. Abb. 22):

In der zeitlichen Dehnung vergrößerte Darstellung der Aktivität des VentIN4. **A:** EPSPs (Pfeile) des zugrundeliegenden 'unterschwelliger Rhythmus'. **B:** IPSPs (Pfeile) des zugrundeliegenden 'unterschwelliger Rhythmus'. **C:** Aktionspotentiale eines Bursts und darauffolgende 'unterschwellige PSP-Serie' (vergl. Abb. 22-I-B). AC-Aufnahmen.

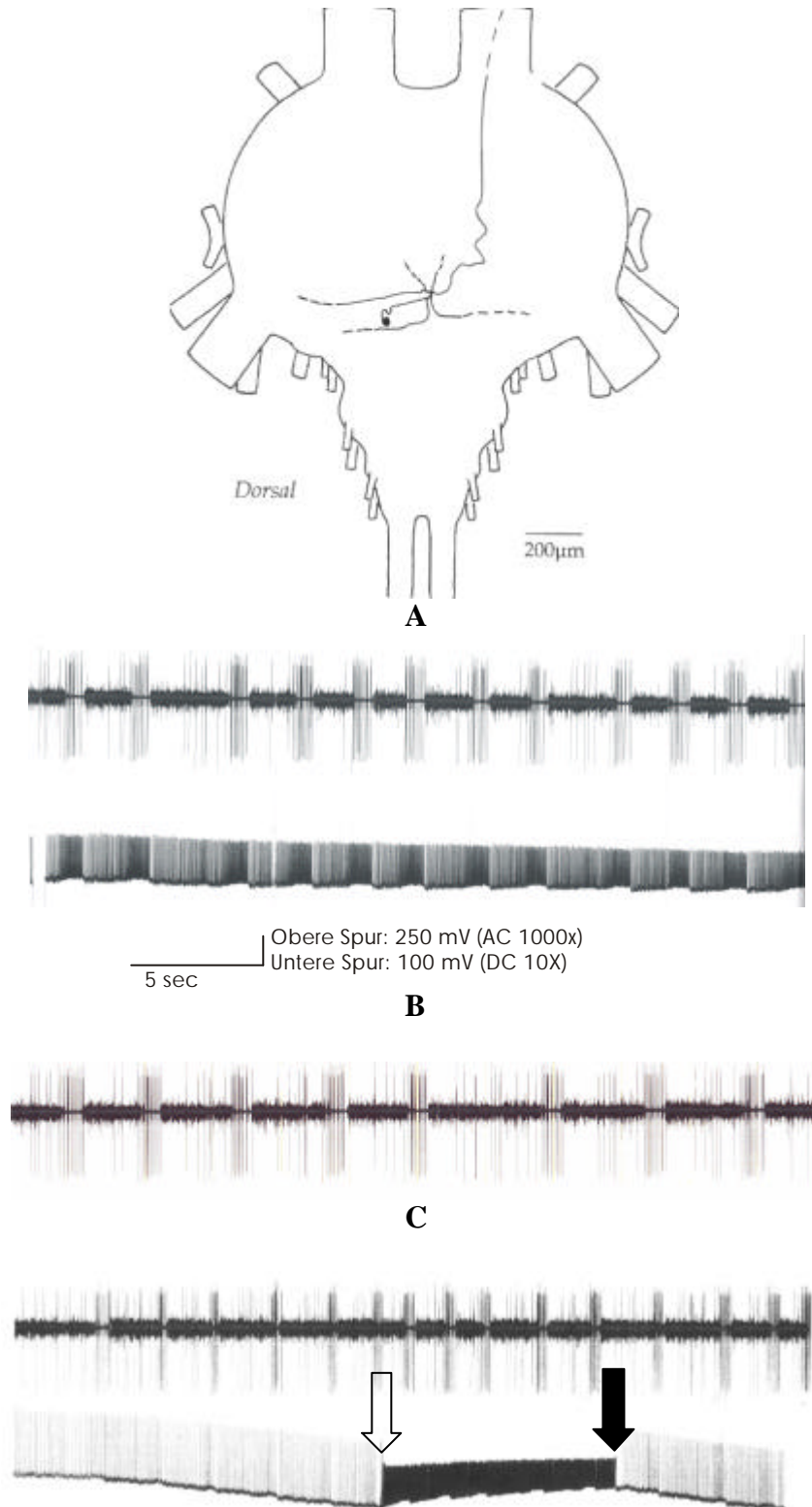


Abbildung 23 (VentIN-5):

Intersegmentales ascendierendes Interneuron im Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria*, das ins Mesothorakalganglion zieht (LY-Färbung). **A**: Simultane inspiratorische Aktivität des N2 (AG 3) mit dem Interneuron. **B**: Extrazelluläre Spur während Dauerhyperpolarisierung. **C**: Rücksetzung der Inhibition (Rebound, weißer Pfeil) des Interneurons, die zu einem heftigen Anstieg der Frequenz und der Intensität der Bursts führt, die auch extrazellulär deutlich erkennbar ist. Schwarzer Pfeil: erneute Hyperpolarisierung. **C**: Die Brückenkompensation des DC-Verstärkers war nicht richtig eingestellt, wodurch bei Hyperpolarisierung die Aufnahmespur nach unten verrutschte (hier bildtechnisch angepaßt)

In Abbildung 23 ist ein Interneuron dargestellt (VentIN-5), welches eine Reihe von Rückschlüssen auf seine ventilatorische Funktion anhand der erhaltenen elektrophysiologischen Daten erlaubt. Die Färbung war nicht ausreichend, um auch die Feinverzweigungen dieses Neurons darzustellen. Das Soma liegt relativ ventral-medial mit nach kontralateral ziehendem Axon, welches dann aszendiert. Auffällig: die beiden ersten Verzweigungen, welche nach posterior ziehen, um dann seitlich relativ gleichmäßig in den lateralen Bereich des 1. Neuromers zu ziehen (Ort der Somata ventilatorischer Kommandoneurone). Es feuert simultan mit der abgeleiteten inspiratorischen Aktivität des N2 des 3. Abdominalneuromers, den großen Einheiten des Monitors (Abbildung 23-A). Depolarisierung führte zwar zu keinem erkennbaren Effekt auf den Rhythmus des Monitors, führte aber zu einer deutlichen Beschleunigung des Interneurons selbst (aus technischen Gründen nicht darstellbar). Hingegen zeigte sich bei Hypolarisierung ein klarer Effekt, der zu einer deutlichen Verlangsamung des inspiratorischen extrazellulären Rhythmus führte (s. Abbildung 23-B). Nur die extrazelluläre Spur konnte dargestellt werden, da ein temporärer Offset der Intrazellulärspur während der Aufzeichnung erfolgte. In Abbildung 23-C ist deutlich erkennbar, daß eine Rücksetzung der Inhibition des Interneurons zu einem heftigen Anstieg der Frequenz und der Intensität der Bursts führte, die auch extrazellulär deutlich erkennbar ist (vergl. Abbildung 22-I-B1).

Abbildung 24 zeigt das VentIN-6, welches wahrscheinlich zum ventilatorischen Rhythmus korreliert ist. Neben einem starken Dauertonus ereigneten sich spontan immer wieder rhythmische Entladungen, wie sie in Abbildung 24-A exemplarisch zu sehen sind.

Depolarisierung beschleunigte die Frequenz der tonischen Entladungen (nicht gezeigt, weil Aufnahme aus technischen Gründen für Darstellung ungeeignet). Während Hyperpolarisation sind deutlich unterlagerte EPSPs anderer, auf das Neuron aufgeschalteter Neurone, erkennbar (B u. C.). Das ventral liegende Soma befindet sich lateral im Bereich des 1. Neuromers. Der primäre Neurit zieht nach kontralateral mit prominenten Verzweigungen im medianen Bereich des Metathorakalganglions.

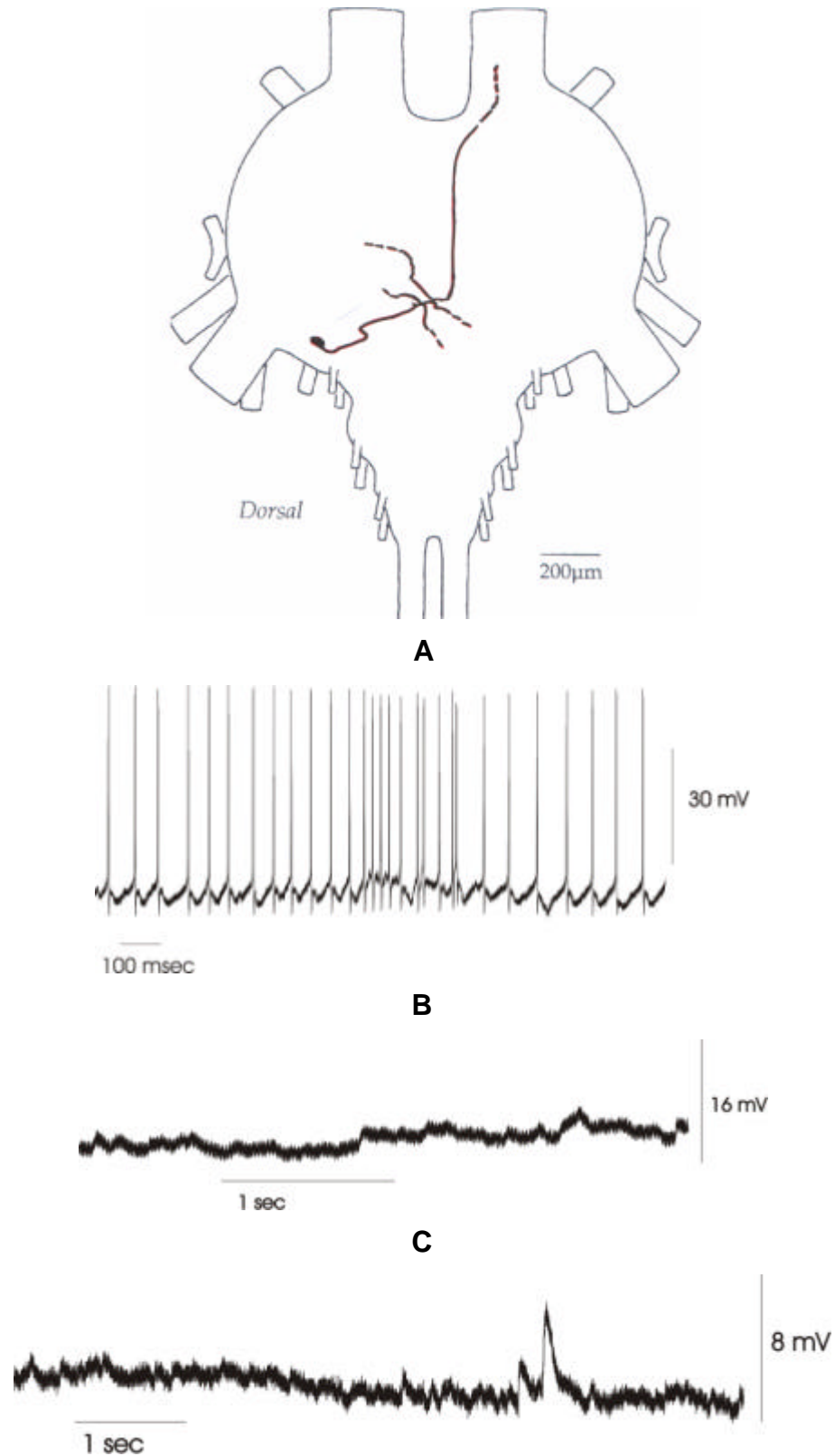


Abbildung 24 (VentIN-6)

Intersegmentales Interneuron (LY-Färbung im) Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria*, **A** rhythmische Entladungen zwischen Dauertonus **B u. C**: Während Hyperpolarisation erkennbar sind unterlagerte EPSPs anderer, auf das Neuron angeschalteter Neurone.

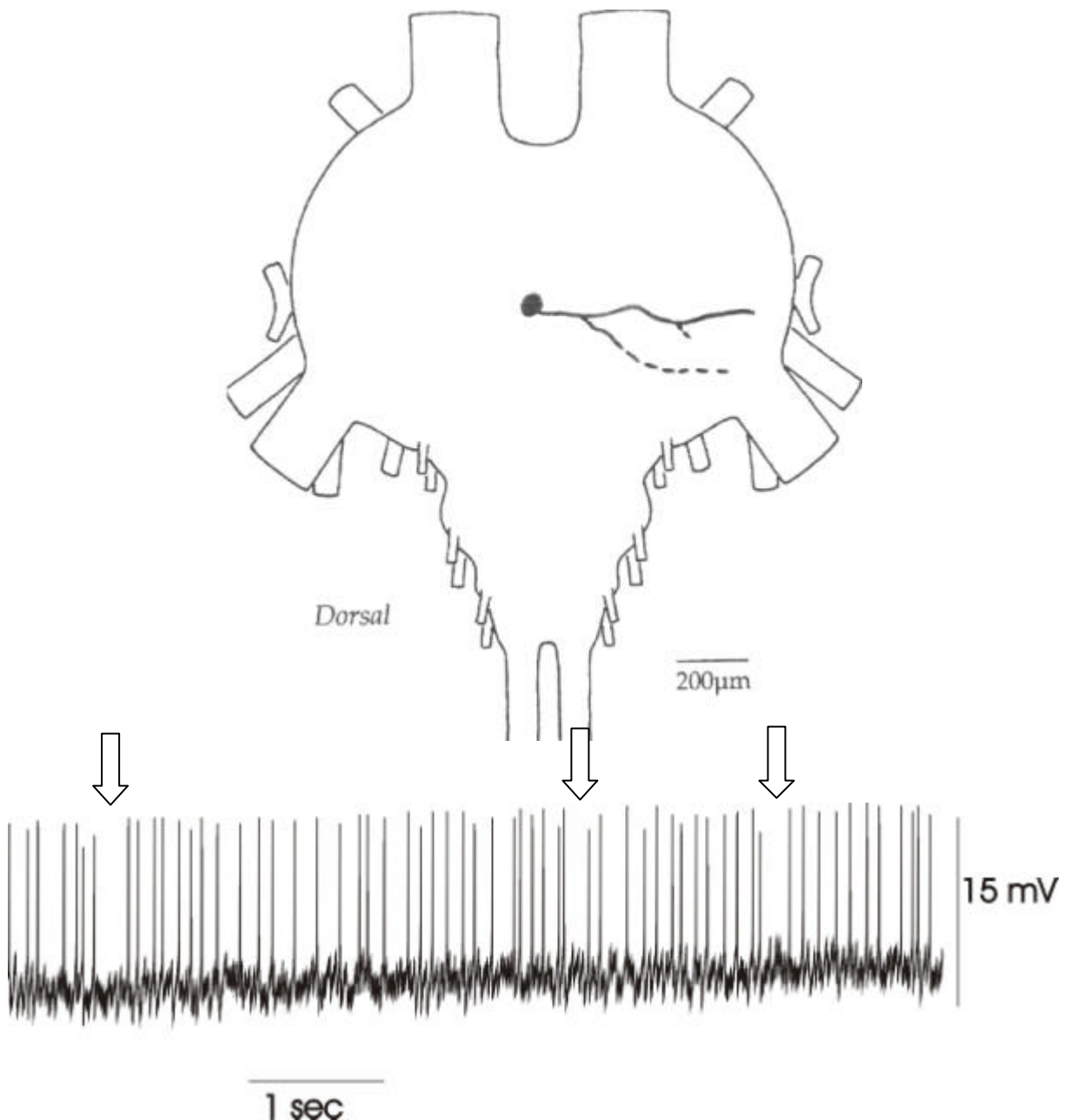


Abbildung 25 (VentIN-7)

Interneuron im Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria* mit Dauertonus und gelegentlich rhythmischen Abschnitten (verdeutlicht durch Pfeile in Ableitung), welches nur leicht gefärbt werden konnte. Das Soma liegt median. Der primäre Neurit zieht nach lateral.

Die Abbildung 25 zeigt das (wahrscheinliche) VentIN-7. Die Färbung war unzureichend und ließ keine nähere Analyse dieses Neurons im medianen Bereich des Metathorakalganglions zu. Ein Dauertonus wurde sporadisch von kurzen Pausen unterbrochen. Evtl. handelt es sich um ein zum ventilatorischen Rhythmusgenerator korreliertes IN, das koordinierend zu anderen Netzwerken wirkt.

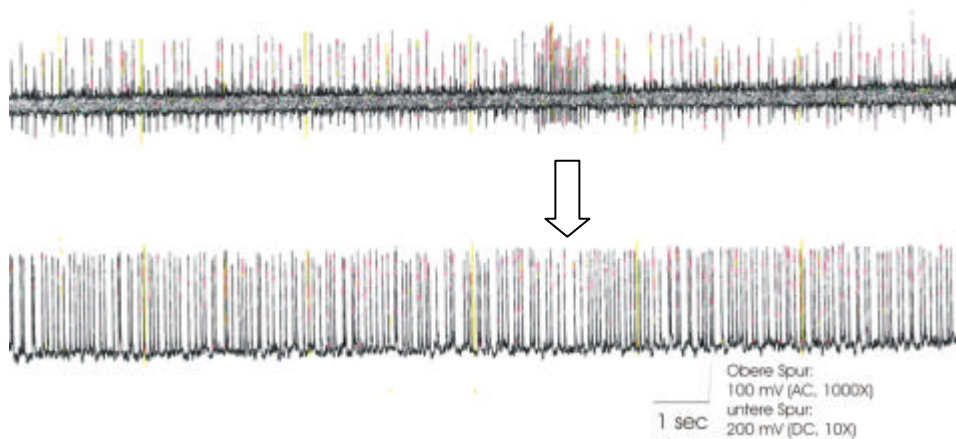
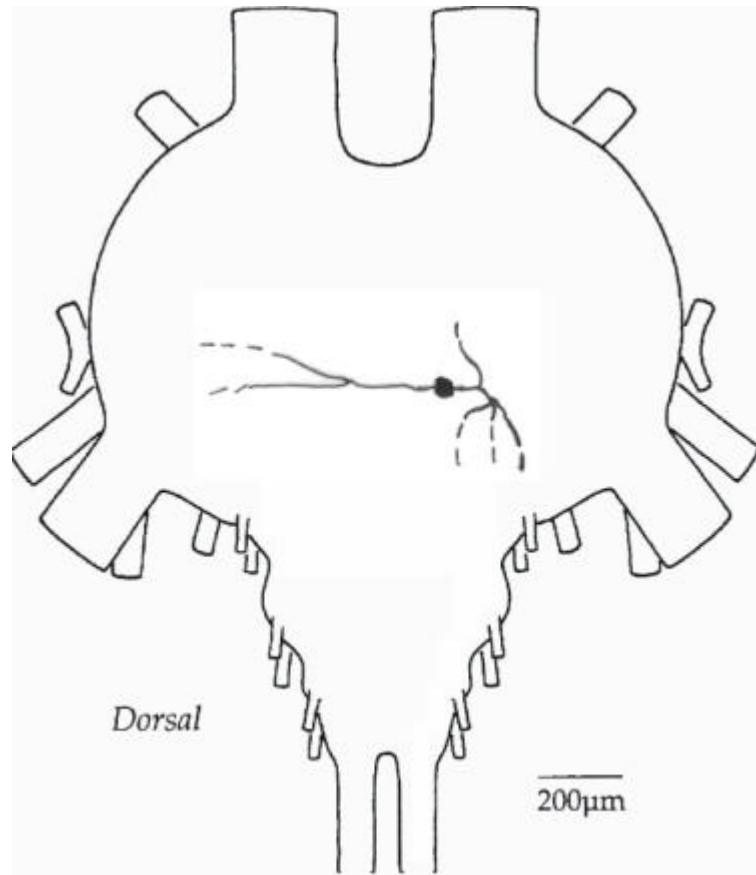


Abbildung 26 (VentIN-8)

Neuron im Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria* (Interneuron?) zur Ventilation korreliert ist. (LY-Färbung) Ableitungen: Monitor (N2, 2-3 Neuomer), expiratorisch aktiv, intrazellulär: inhibitorische Hemmung während Expiration

Die Abbildung 26 dokumentiert ein Neuron im Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria* (Interneuron?), welches zur Ventilation korreliert aktiv ist. (LY-Färbung) In den dargestellten Ableitungen ist ein Antagonismus zu erkennen: Wenn der extrazelluläre Monitor (N2, 2-3 Neuomer) expiratorische rhythmische Entladungen zeigt, wird das Neurons gehemmt (weißer Pfeil). Depolarisierung und Hyperpolarisierung des Neurons hatten keinen Effekt auf die expiratorische Aktivität des N2. Artefakte bei der Fixierung des Ganglions erschweren die genaue Lokalisierung des Neurons. Das Soma lag wohl relativ median.

Abbildung 27 zeigt ein morphologisch sehr auffälliges Interneuron (VentlN-9). Es ist ein intersegmentales, vermutlich zur Ventilation korreliertes Interneuron im Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria* (Lucifer Yellow-Färbung). Es ziehen jeweils ipsilateral zum ventralen Soma im 1. Neuomer Axone sowohl ins Mesothorakalganglion als auch hinab ins Abdominalganglion. Nach kontralateral sind dendritische Verzweigungen erkennbar, die im oberen dorsal-medianen Bereich des Ganglions durch eine starke Aufzweigung mit synaptischen Endigungen gekennzeichnet sind. In diesem Bereich befinden sich auch Neurone der Flugaktivität. Erkennbar ist auch eine Abzweigung kontralateral, die in den Bereich des gegenüberliegenden 1. Neuomers reicht. Das Neuron feuerte tonisch mit kurzen rhythmischen Abschnitten (A). In B ist zu sehen, daß Depolarisierung (weiße Pfeile) auf das Neuron excitatorisch wirkte. Bei einer Rücknahme der Depolarisierung wurde die Spikefrequenz wieder sichtbar langsamer (s. schwarze Pfeile) um dann bei erneuter Depolarisierung wieder schneller zu feuern. Die dargestellte Aufnahme mit einer Digitalkamera ist eine Ventralansicht auf das Metathorakalganglion.

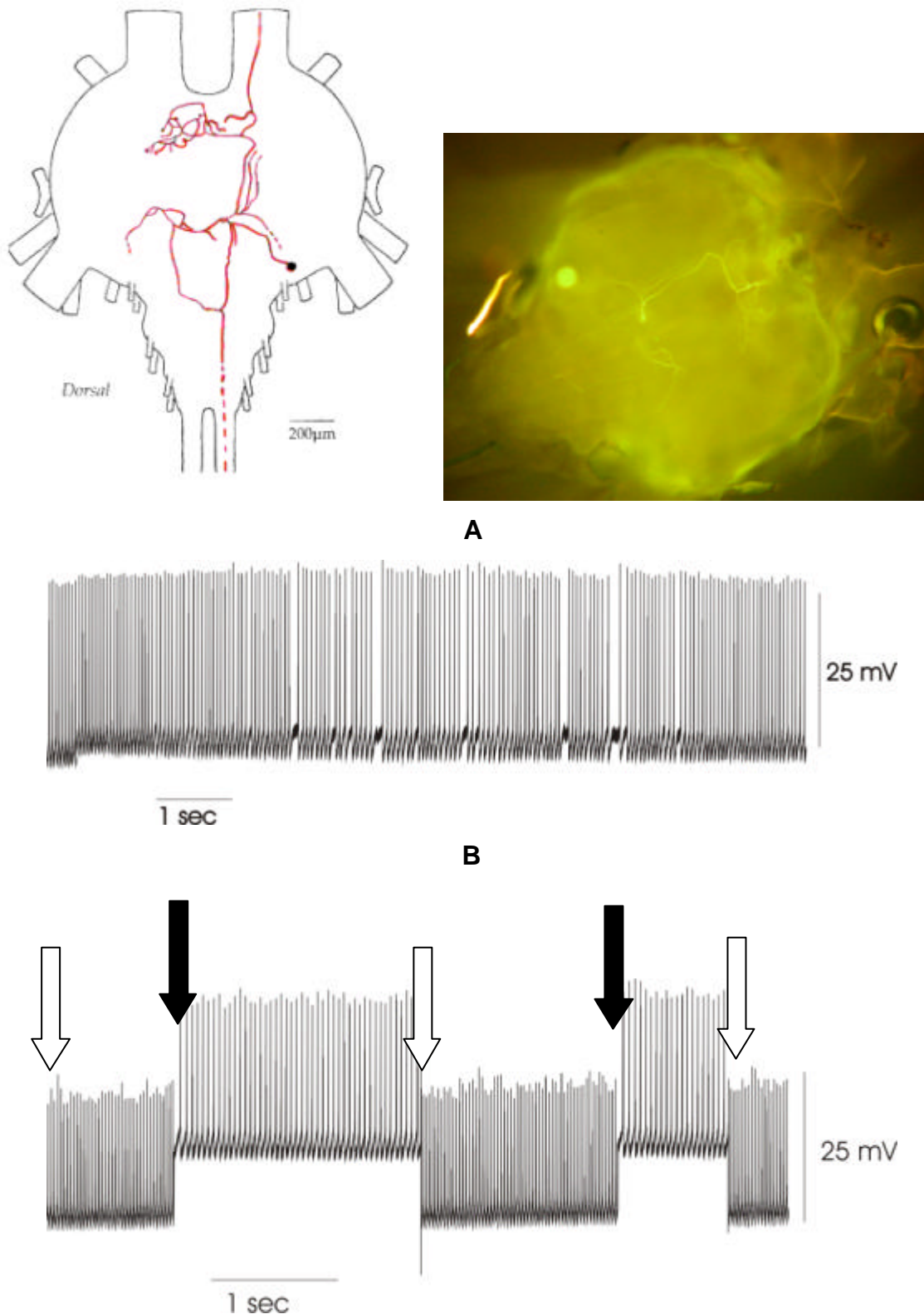


Abbildung 27 (VentIN-9):

Intersegmentales, zur Ventilation schwach korreliertes Interneuron im Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria* (Lucifer Yellow-Färbung). **A:** intrazelluläre tonische Aktivität unterbrochen von kurzen Bursts. **B** Depolarisierung (weiße Pfeile) wirkte excitatorisch. Rücksetzung der Depolarisierung führte zu langsamerer Frequenz (schwarze Pfeile) Die Brückenkompensation des DC-Verstärkers war nicht richtig kalibriert, wodurch bei Depolarisierung die Aufnahmespur nach unten verrutschte.

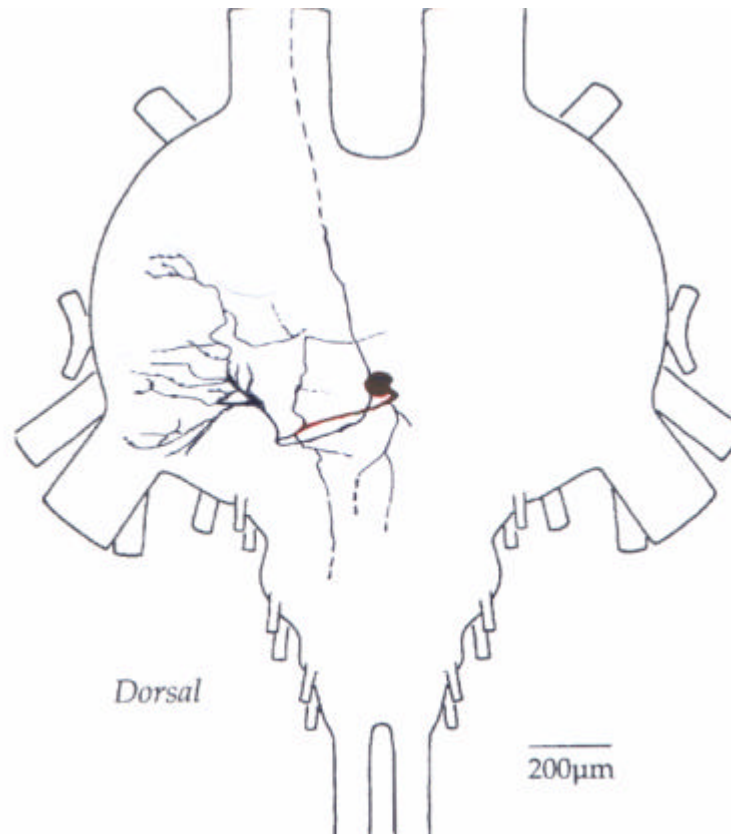


Abbildung 28 (VentIN-10)

Intersegmentales ascendierendes Interneuron im Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria* .
Foto (Ventralansicht) und Zeichnung.

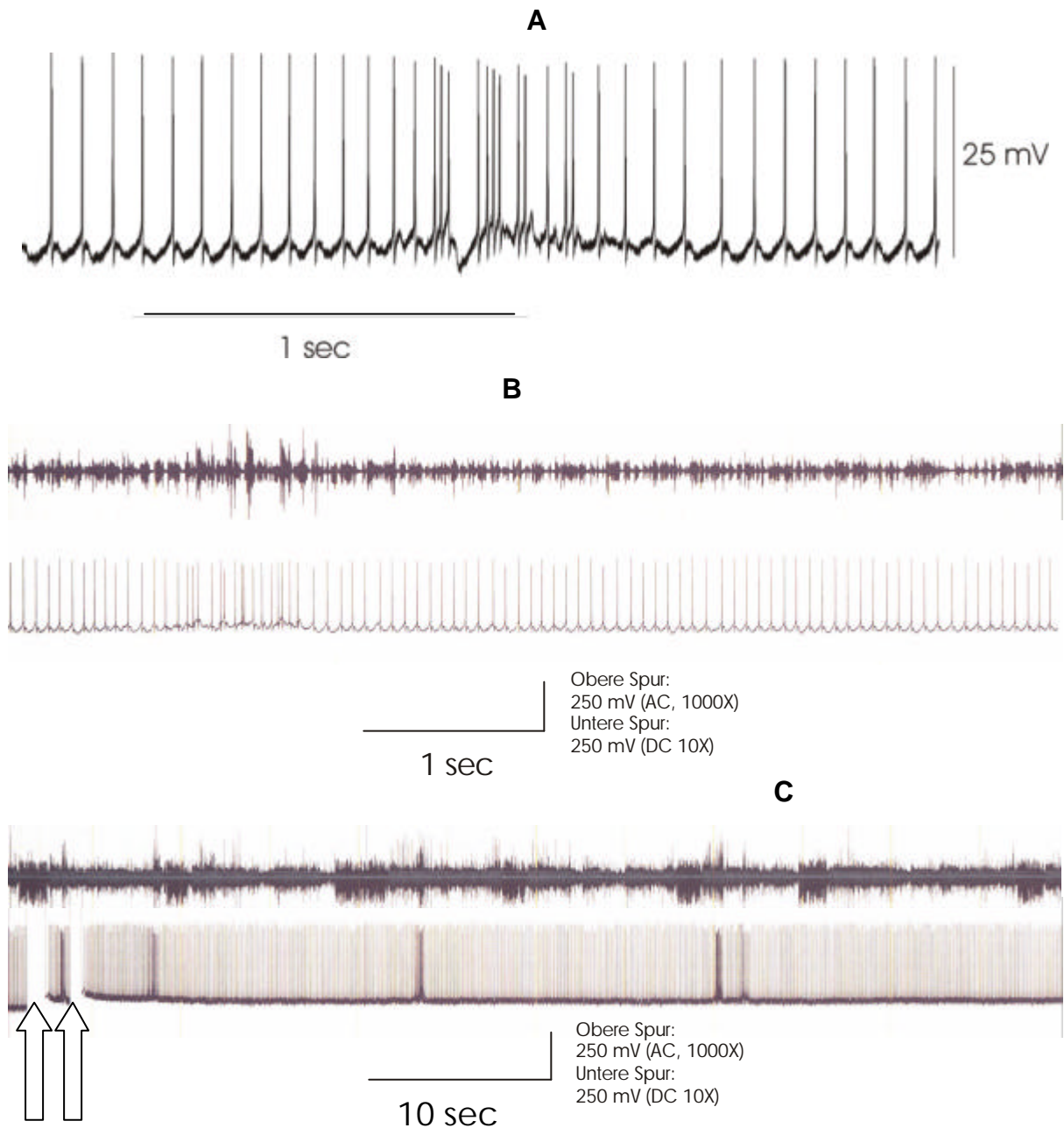


Abbildung 28-I

Intersegmentales ascendierendes Interneuron im Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria* **A** intrazelluläre Aktivität Dauertonus mit phasischen Entladungen. **B** Interneuron (untere Spur) feuert simultan mit inspiratorischer Aktivität (hohe Aps) des Monitors. **C**: Depolarisierung (weiße Pfeile) bewirkte keinen Effekt auf extrazelluläre Aktivität. Die Brückenkompensation des DC-Verstärkers war nicht richtig kalibriert, wodurch bei Depolarisierung ein Offset der Aufnahmespur resultierte.

Das in der Abbildung 28 illustrierte Neuron ist ein intersegmentales ascendierendes Interneuron im Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria*. In Abbildung 28-I-A ist die Aktivität des Neurons dargestellt. Neben einem heftigen Dauertonus sind phasische Entladungen sichtbar, die wie in Abbildung 28-I-B erkennbar ist, simultan mit verstärkter inspiratorischer Aktivität erfolgen. C zeigt den Monitor mit

inspiratorischer Aktivität und darunter die kurz vorher erfolgende Entladung des Interneurons. Sehr deutlich erkennbar ist, die Korrelation zu den "großen" inspiratorischen Einheiten, bei denen es sich wahrscheinlich um Einheiten der inspiratorischen Longitudinalmuskulatur des Abdomens innervieren. Depolarisierung (Pfeile in C) bewirkte keine deutliche Veränderung der extrazellulären registrierten Aktivität. Das Soma liegt ventral relativ median mit einem dorsal aufsteigenden, wahrscheinlich nach kontralateral ziehenden primären Neuriten, der sich lateral stark im Bereich des eigentlichen Metathorakalganglions und im Bereich des 1. Neuromers stark aufzweigt mit deutlich sichtbaren synaptischen Endigungen.

3.3.3 Klassifizierung der Interneurone

Um einen Überblick über die gefundenen Interneurone zu erhalten, sind diese in der Tabelle 2 nach Physiologie, Anatomie und der möglichen Funktion für den Zentralen Rhythmusgenerator klassifiziert. Mehrfachnennungen für eine Kategorie sind möglich. Generell galt für alle hier vorgestellten Neurone, daß das Soma relativ ventral lokalisiert war und der primäre Neurit nach dorsal aufstieg, um dort weitere Verzweigungen zu vollziehen. Daher wird hierauf in der Tabelle nicht mehr näher eingegangen. (weitere Details s. Tabelle 2).

3.3.4 Intrazellulärer Nachweis von Sauerstoffsensitivität

Zusätzlich zu der Experimentserie zur Atemgassensitivität, die im Kapitel 3.2.2 beschrieben ist, wurde versucht auch auf der Ebene einzelner identifizierbarer ventilatorischer Neurone, einen Effekt von Sauerstoff auf die Aktivität nachzuweisen. In einem Einzelexperiment gelang dies sehr deutlich. In Abbildung 29 sind die Ableitungen dieses Neurons dargestellt. Das Bad mit dem isolierten ZNS, dessen Tracheen entfernt waren, wurde mit 100%igem Sauerstoff aus einer Druckluftflasche begast, um seine Vitalität sicherzustellen. Kurz vor Beginn (ca. 10 Minuten) des eigentlichen Experiments wurde die O₂-Begasung unterbrochen. Der extrazelluläre Monitor zeigte einen regelmäßigen (aber nicht gestressten) ventilatorischen Rhythmus. Anschließend wurde mit der intrazellulären Ableitung begonnen. Es gelang das in Abbildung 29 dargestellte Neuron abzuleiten. Durch die vorgenommene Lucifer Yellow-Färbung konnte lediglich das Soma dargestellt werden. Es liegt relativ lateral im Bereich des eigentlichen Metathorakalganglions (s. Abb. 29).

Das Neuron zeigte zu Beginn einen heftigen Dauertonus, dessen Frequenz durch Hyperpolarisierung gehemmt werden konnte (Abb. 29 B). Dann wurde die O₂-Begasung wieder gestartet. Das Neuron begann innerhalb weniger Sekunden mit rhythmischem Feuern (Abb. 29 B u. B 1), denn es wurde excitatorisch angesteuert (s. EPSPs in Abb. 29 B 1, gestreifter Pfeil). Nachdem der Rhythmus des Neurons zu Anfang "stotternd" begonnen hatte, setzte er nach einer Weile korreliert zum extrazellulären Monitor (Mediannerv des 3. Abdominalneuromers) ein.

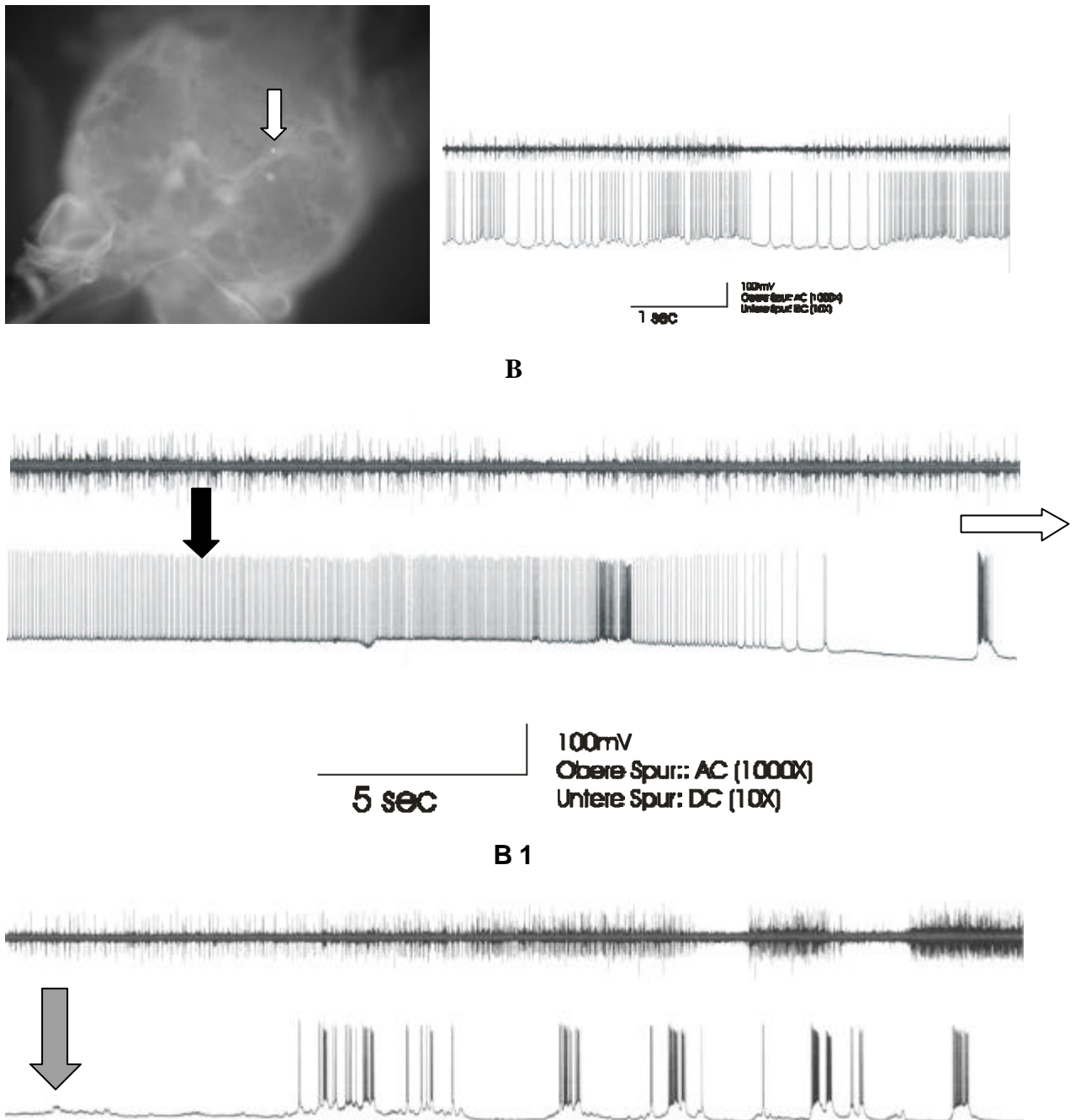


Abbildung 29:

Nachweis der Sauerstoffsensitivität eines ventilatorisch korrelierten Neurons im Metathorakalganglion von *Schistocerca gregaria*. **Foto:** Somafärbung, Ventralansicht (Lucifer Yellow), Lage des Somas durch weißen Pfeil angezeigt. **A:** Aktivität des Neurons (untere Spur) korreliert zum extrazellulären Monitor nach Beginn der O_2 -Begasung (Mediannerv 3. Abdominalneuomer des Metathorakalganglions, obere Spur). **B:** tonische Aktivität des Neurons während Hyperpolarisierung (untere Spur) und extrazellulärer Monitor (obere Spur). Nach Beginn der O_2 -Begasung des Ganglions (schwarzer Pfeil) hörte innerhalb weniger Sekunden der Dauertonus auf, excitatorische Ansteuerung des Neurons begann (s. EPSPs in B 1, schraffierter Pfeil) und es fing rhythmisch zu feuern an (**B** und **B1**).

Tabelle 2:

Klassifizierung der ventilatorischen Interneurone nach Anatomie, Physiologie und möglicher Bedeutung für die ventilatorische Rhythmogenese. + = trifft zu, k.A.m. = keine Angabe möglich.

| Kategorie | Einstufung | VentIN1 (Abb. 19) | VentIN2 (Abb. 20) | VentIN3 (Abb. 21) | VentIN4 (Abb.22) | VentIN5 (Abb. 23) | VentIN6 (Abb. 24) | VentIN7 (Abb. 25) | VentIN8 (Abb. 26) | VentIN9 (Abb. 27) | VentIN10 (Abb. 28) |
|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Anatomie | Soma mehr lateral | + | + | + | + | | + | | | + | |
| | Soma mehr median | | | | | + | | + | + | | + |
| | Axon zieht nach kontralateral | + | + | k. A. m. | + | + | + | + | k. A. m. | | + |
| | Axon zieht nach ipsilateral | | | | | | | | | | + |
| | Axon aszendiert | | | k. A. m. | | + | + | k. A. m. | k. A. m. | + | + |
| | Axon deszendiert | | + | | + | | | | | + | |
| | Axon lokal | + | | | | | | | | | |
| Physiologie | vorwiegend tonisch | | | | | | + | + | + | + | + |
| | vorwiegend phasisch | + | + | + | + | + | | | | | |
| | inspiratorisch | | | | + | + | | | k. A. m. | + | + |
| | expiratorisch | + | + | | | | | | | | |
| | unklar | | | + | | | + | + | | | |
| Bedeutung f. Rhythmogenese | Komponente des CPG | | + | | + | + | + | | | | |
| | Korreliert zum CPG | + | + | + | | | | + | + | + | + |
| | verschaltend zu anderen Netzwerken | | | | | | + | | | + | + |

4. Diskussion

4.1 Neuroanatomische Vorarbeiten

Die in Abbildung 4 und 5 gezeigte Struktur ist eine für ventilatorische Kommandoneurone, die evtl. auf sekundäre und tertiäre nachgeschaltete IN aufschalten, typische anatomische Struktur. Diese Anatomie - mit absteigendem Axon im Konnektiv bis hinter das 2. freie Abdominalganglion - kann auch für die intrazellulär (s. Kap. 3.3) gefundenen IN angenommen werden, deren Konnektivverlauf mittels der Lucifer Yellow Färbungen zumeist nur über eine kürzere Distanz verfolgbar ist.

4.2 Langzeitaufnahmen ventilatorischer Aktivität

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, daß - wie es in intakten Tieren der Fall ist - in einem isolierten Nervensystem eine große Bandbreite neuraler ventilatorischer Muster erzeugt wird. Es können zwei grundlegende Typen unterschieden werden: kontinuierliche und diskontinuierliche Atmung. Diese Definitionen beschreiben die beiden Enden einer Skala mit allen Übergangsformen ventilatorischer Muster, wie sie in beiden, dem intakten Tier und dem isolierten ZNS vorkommen.

Alle Muster fiktiver Atmung, die bei *Locusta migratoria* gefunden werden können (s. Kapitel 3.2.1.2), sind vergleichbar mit den Mustern, welche bei *Taeniopoda eques* auch auftraten (s. Kapitel 3.2.1.1). Dies läßt eine Rhythmogenese der Ventilation bei Heuschrecken im allgemeinen vermuten, welche von intrinsischen Faktoren primär angetrieben wird (basaler CPG, "internal clock"). Es ist hierdurch nun möglich geworden, auf intrazellulärer Ebene integrale Elemente des CPGs abzuleiten und dadurch die basale Rhythmogenese des ventilatorischen Systems zu untersuchen. Dies geschieht unter Ausschluß von sensorischem Einfluß aus der Peripherie des Tieres und ermöglicht einen Vergleich mit dem ventilatorischen Netzwerk, das für die Entstehung hochfrequenter Atmungsmuster verantwortlich ist (Ramirez & Pearson, 1989), sowie mit den Ergebnissen aus Studien mit intakten Tieren und auch mit anderen Insekten.

Neuere Untersuchungen zur Ventilation bei einer Reihe von Insektengruppen betrachteten spezifische Aspekte der Insektenatmung. Sauerstoffverbrauch und

Atmung in Ruhephasen und während Bewegungsphasen bei der Schabe *Blaberus giganteus* (Bartholomew & Lighton 1985) zeigen ventilatorische Muster ähnlichen im isolierten Präparat bei Heuschrecken. Diskontinuierliche Ventilationsmuster von emittierten CO₂-Volumina konnten bei *Taeniopoda eques* (Harrison et al. 1995) gezeigt werden. Bei der Libelle *Erythemis simplicicollis* fanden Harrison & Lighton (1998) verschiedene Muster von CO₂-Abgabe, die von dem Sauerstoffgehalt der Luft beeinflusst wurden. Sehr früh beschrieb Tonner (1936) für Libellenlarven drei grundlegende ventilatorische Muster: normale Ventilation, "Schluckatmung", "Kauatmung". Diese Atmungstypen werden durch die Untersuchungen von Hughes & Mill (1966) bestätigt. Hughes und Mill stellen heraus, daß zwischen diesen drei Typen eine große Bandbreite von Übergangsformen herrscht. Diese Muster zeigen wiederum Ähnlichkeiten zu den Mustern, die im isolierten ZNS in dieser Untersuchung gefunden wurden.

Die Ergebnisse von Williams (1997) für Drosophila, Lighton bei Ameisen (1990), Lighton & Lovegrove für Honigbienen (1990) (u.a.) beleuchten verschiedene Aspekte der Ventilation und wurden unter völlig verschiedenen Bedingungen erhalten. Jedoch zeigen diese Ergebnisse Gemeinsamkeiten bezüglich der ventilatorischen Muster und Gasaustauschmuster und sich auch vergleichbar mit denen im isolierten ZNS. Sie können auch in die zwei basalen Muster geteilt werden, wie sie für diese Studie für fiktive ventilatorische Muster definiert wurden.

Oszillierende Atemfrequenzen sind eine typische Struktur während des Gasaustauschs oder bei ventilatorischen Bewegungen vieler Insekten, wie dies auch Daten von Feldheuschrecken in Frequenzhistogrammen als ventilatorische Aktivität gegen aufgenommene Zeit zeigen. Im isolierten ZNS unserer Versuchstiere (*Locusta migratoria* und *Taeniopoda eques*) für diese Studie sind die verschiedenen ventilatorischen Muster (Abbildung 7, z.B. bei *Taeniopoda eques*) sehr ähnlich, aber offensichtlich unterscheiden sich die Frequenzen von denen des intakten Tieres. Die Ventilationsraten im isolierten ZNS von *Taeniopoda eques* sind ohne tracheale Versorgung (Abb. 7) zu Beginn ähnlich denen von Tieren im Alarmzustand. Die nachfolgenden Pausenlängen sind deutlich kürzer als bei intakten Individuen von ruhenden *Taeniopoda eques*. Bei diesen erstrecken sich die Längen der Atmungspausen von 20 Minuten bis zu über 60 Minuten (Harrison, persönliche Mitteilung). In Langzeitaufnahmen von *Taeniopoda eques* mit beibehaltener trachealer Versorgung (s. Kapitel 3.2.1.1) wurden ähnliche Pausenlängen gefunden

wie für intakte Tiere (Harrison, persönliche Mitt.) beschrieben. Zum Vergleich: Bei *Drosophila melanogaster* fand Lehmann (2000) DV mit Pausenlängen von bis zu 30 Minuten.

So ist es wahrscheinlich, daß im Ganglion ohne tracheale Versorgung schlechtere Sauerstoffversorgung und Hypoxieeffekte den Rhythmus beeinflussen. Zum Vergleich: Louw et al. (1986) fanden beim Tenebrioniden *Onymacris unguicularis* Pausenlängen zwischen zwei Atemzyklen (Messung von CO₂-Abgabe) - in Abhängigkeit von Temperatur - von 9-26 Minuten. Diese z.T. extrem niedrigen metabolischen Raten erklären Louw et al. (1986) mit möglichen adaptiven Vorteilen an aride und heiße Standorte.

Die spezifischen Muster diskontinuierlicher Atmung oder unregelmäßiger Oszillationen innerhalb einer Burstperiode wurden in früheren Untersuchungen als "Gruppenatmung" bezeichnet (Hustert, 1974). Insbesondere die Langzeitaufnahme, welche in Abbildung 9 gezeigt ist, war sehr stark geprägt von diesem Phänomen der Gruppenatmung, lange Burstperioden gefolgt von minutenlangen Atempausen (s. Abbildung 2). Diese Muster finden sich auch in anderen Insekten. So konnte z. B. Lighton (1990) bei der Wüstenameise *Camponotus detritus* den Übergang von reiner DV hin zu schneller kontinuierlicher Atmung zeigen, der durch Aktivität ausgelöst wurde. Es gibt Übergangsformen, welche sich mit den Mustern, die in dieser Untersuchung gefunden wurden vergleichen lassen (z.B. Abbildung 7, bei *Taeniopoda eques*). Frühe Untersuchungen zu efferenten ventilatorischen Mustern von Insekten zeigten lediglich regelmäßige neurale Entladungen (Case 1961, Miller 1960, Komatsu 1982) in Kurzaufnahmen ohne diskontinuierliche Atmung. Eine nähere Betrachtung von Millers Daten (1961) in ruhenden Wüstenheuschrecken (*Schistocerca gregaria*) zeigen jedoch auch diskontinuierliche Atmungsmuster bei seinen Aufnahmen von abdominalen Pumpbewegungen. In neueren Untersuchungen konnten sogar an Schnitten (slices) von Insektenganglionen (*Schistocerca gregaria*) die Erhaltung von Atemrhythmen in isolierten Präparaten gezeigt werden (Ramirez et al., 1999).

Bei Säugern ist seit längerer Zeit bekannt, daß im isolierten Hirnstamm in vitro neuronale Entladungen ventilatorischer Art für viele Stunden erzeugt werden. Aber generell zeigen Vertebraten nur kontinuierliche ventilatorische Atmungsaktivitäten, mit Ausnahme während des Tauchens bei z. B. Meeressäugern oder in

pathologischen Fällen (Zigmond et al. 1999). Diskontinuierliche Atmung ist nicht als normaler Mechanismus des Gasaustausches bei Vertebraten bekannt.

Die Ventilationsrate steigt auch im isolierten ZNS, wenn simultan Temperaturerhöhung des Ringers erfolgt (Abbildung 7 B). Dies erinnert an die Änderungen von ventilatorischen Mustern und Frequenzen an, wie sie Lighton & Lovegrove (1990) bei Honigbienen durch einen Temperaturanstieg hervorrufen konnten. Vergleichbar ist auch der Anstieg ventilatorischer Aktivität beim Grashüpfer *Tmethis pulchripennis*, welcher durch einen Anstieg der Temperatur verursacht wurde (Prange, 1990). Vanselow et al. (2000) fanden bei Temperaturen unterhalb von 15° C eindeutige diskontinuierliche CO₂-Abgabemuster bei der Wüstenameise *Cataglyphis bicolor*. Mit steigender Temperatur änderten sich auch die CO₂-Abgabemuster. Bei der Larve des Riesenmehlwurms *Zophobas rugipes* (Wobschall et al., 2000) traten bei Temperaturen unterhalb von 20° C DV-Muster auf. Offensichtlich beeinflussen Temperaturänderungen die Ventilationsmuster im isolierten ZNS, ähnlich wie im intakten Tier. Zur Klärung dieser Fragen wären weitere Untersuchungen für eine verlässliche Datenbasis nötig.

Ausgeprägte kontinuierliche ventilatorische Muster finden sich in verschiedenen Insekten - wie auch im isolierten Heuschrecken-ZNS. Bei intakten Tieren, die zwei Minuten lang zu Sprung-Serien veranlaßt wurden (in Anlehnung an Krolikowski & Harrison (1996)) fanden sich ähnlich hochfrequente Atmungsmuster, wie sie auch im isolierten ZNS auftreten (s. Abbildungen 8 und 9 und Anhang). Die wiederholten Sprungbewegungen steigern offensichtlich die metabolische Aktivität und somit auch die abdominale Pumprate.

Lighton (1988) fand bei *Psammodes striatus* (Tok-Tok-Käfer) diskontinuierlichen Gasaustausch und eine Korrelation zwischen Sauerstoffaufnahme und der Kontraktion des Abdomens. Dieser diskontinuierliche Gasaustausch basiert auf diskontinuierlichen Pumpbewegungen der Abdominalsegmente, deren neuronale Versorgung im ZNS lokalisiert ist. Die Muster der Sauerstoffaufnahme bei *Psammodes striatus* zeigen Ähnlichkeiten mit denen fiktiver ventilatorischer Muster in dieser Studie (vergl. Abbildung 9).

Der Vergleich zwischen bisherigen Untersuchungen an Insekten und den eigenen Daten wirft die Frage nach den zugrundeliegenden Prinzipien der Rhythmogenese der Atmung auf - abgesehen von vielen externen Faktoren, wie sie von den hier zitierten Autoren beschrieben und untersucht wurden. Krolikowski und Harrison

(1996) schlugen Partialdrücke von CO₂ und O₂ in den Tracheen als wichtige Parameter für die Regulation der Atmung bei verschiedenen Insekten vor (vergl. Kapitel 4.3). Die Veränderung des intratrachealen Partialdrucks durch Gasaustausch oder Speicherung hat - so die Vermutung - eine Triggerfunktion für die Ausübung von Ventilation für momentane Erfordernisse, so z.B. in Situationen, in welchen DV auftritt. Im isolierten Nervenstrang existiert jedoch keine ventilatorisch bedingte Änderung von Partialdrücken, da ja lediglich efferente ventilatorische Muster generiert werden. Daher kann im isolierten ZNS dieser Parameter nicht der Hauptfaktor für die Regulation der ventilatorischen Rhythmogenese sein. Die vorliegende Untersuchung deutet auf einen intrinsischen Regulations- oder Triggermechanismus auf der Ebene des CPG hin, der weitgehend unabhängig von sensorischen Einflüssen und daher wohl auf der Ebene des Zellmetabolismus des ZNS oder innerhalb ventilatorischer Interneurone zu lokalisieren ist. Die intrazellulären Daten von einem spezifischen ventilatorischen Interneuron (VentIN4) im isolierten Nervenstrang (s. Abbildung 22) untermauern diese Vermutung (s. Kapitel 3.3.2 und s. Kapitel 4.4).

Die Resultate der Langzeitaufnahme in Abbildung 9 weisen am deutlichsten auf ZNS-generierte ventilatorische Rhythmussteuerung hin. Frühere Untersuchungen (Harrison, 1996) schlugen eine Rhythmogenese der Atmung in Heuschrecken in Abhängigkeit von Partialdrücken, insbesondere von CO₂, vor. Wenn ein bestimmtes Triggerniveau von CO₂ innerhalb der Tracheen erreicht ist, startet das ventilatorische Netzwerk, um überschüssiges CO₂ abzugeben. Mögliche zentralnervöse Chemorezeptoren, die auf O₂ oder CO₂ reagieren und im Ganglion - oder den Tracheen innerhalb der Ganglien lokalisiert sind - wurden früher und auch in jüngster Zeit postuliert (Miller, 1966; Kinnamon et al., 1982; Harrison, 1997; Bustami & Harrison, unveröffentlichte Erg., siehe auch Kapitel 4.3). Dies könnte die Rhythmik des CPG beeinflussen, bedingt durch ein Ungleichgewicht eines der beiden Gase (z. B. Hypoxie/Hyperoxie oder Hyperkapnia (=CO₂-Überschuß)) im umgebenden Ringer oder im Gewebe.

Die Daten dieser Arbeit weisen weiterhin auf eine möglich Zellatmungsabhängigkeit des ventilatorischen Netzwerkes - durch Koppelung mit dem Bikarbonatsystem - hin. Wenn in einer Zelle ein bestimmtes Niveau von CO₂ erreicht ist (oder im Interstitium), könnte dies zu einer Veränderung des Gleichgewichts des Puffersystems H₂O + CO₂ → HCO₃⁻ + H⁺ führen. Dies würde wiederum zu einer Änderung des ionalen

Gleichgewichts an den neuronalen Membranen führen. Von bestimmten Molluskenneuronen oder auch Vertebratenherzen ist bekannt, daß Schrittmacherpotentiale (also rhythmusgenerierende Aktivitäten) durch einen langsamen Calciumstrom in die Zellen erzeugt werden, einhergehend mit einer Aktivierung calciumabhängiger Kaliumkanäle (Eckart, 1986). Möglicherweise führt eine Erhöhung des CO₂-Gehaltes innerhalb der Zelle (durch Zellatmung) zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zu negativen HCO₃⁻-Ionen hin. Eine erhöhte negative Ladung innerhalb der Zelle hätte dann einen Einstrom positiver Ladungen (Ca²⁺?) zur Folge. Daraus könnten Aktionspotentiale bei überschwelliger Depolarisierung resultierenden. Zusätzlich wäre es auch möglich, daß durch den Ca²⁺-Einstrom die Auslösung von Aktionspotentialen durch eintreffende EPSPs aus anderen Zellen erleichtert wird. Im intakten Tier würde die einsetzende Ventilation zu einem verstärkten Abtransport von CO₂ führen. Im isolierten ZNS wäre vorstellbar, daß durch den Ca²⁺-Einstrom ein Gegenstrom negativer Ladung aus der Zelle erfolgt, also z.B. HCO₃⁻-Ionen, was dann auch zu CO₂-Abbau in der Zelle führen würde. Jedenfalls ist zu vermuten, daß die intrinsische Rhythmizität (CPG) des isolierten ZNS von CO₂-Empfindlichkeit beeinflusst wird, die auch mit dem Bikarbonatsystem gekoppelt sein kann. Auch Frisch (1993) fand beim zentralen Rhythmusgenerator des Ovipositor-Herzens der Grille *Acheta domestica* einen deutlichen Effekt von CO₂. Generell spielt aber auch Sauerstoffempfindlichkeit eine Rolle (s. Kapitel 3.2.2.1 u. vergl. Kapitel 4.3).

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß sich - unter Berücksichtigung Untersuchungen anderer Autoren an intakten Tieren (s. oben) - mehrere plausible Hypothesen über die Faktoren möglicher neuronaler (z.B. CO₂- oder O₂-sensitive Neurone, s.u.) oder metabolischer Mechanismen (Zellatmungseinflüsse) ergeben, die den endogenen Rhythmusgenerator im Ganglion von Insekten beeinflussen könnten. Weitere Untersuchungen hierzu sind erforderlich.

4.3 Wirkungen verschiedener Partialdrücke von O₂ und CO₂

Nachweis eines Sauerstoffrezeptors

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Sauerstoffsensitivität des isolierten ZNS weisen erstmals klar auf zentrale Chemorezeption hin, die verschiedene Konzentrationen von Sauerstoff wahrnehmen kann. Dies zeigten hochsignifikante Effekte durch

Partialdruckänderungen von Sauerstoff auf die ventilatorische Rate. Der spezifische Einfluß von Sauerstoff auf die Ventilation im isolierten Nervensystem war bisher nicht klar gezeigt worden (vergl.: Miller, 1960; Kinnamon et al.; 1984). Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten auf eine ähnliche Bedeutung der Sauerstoffrezeption, wie sie bereits bisher für CO₂ angenommen wurde (s. unten). Kinnamon et al. (1984) konnten einige Hinweise auf mögliche Sauerstoffrezeptoren im ZNS der aquatischen Larve von *Corydalus cornutus* (Schlammfliege) erbringen. Hypoxie führte zur Erhöhung der ventilatorischen Frequenz. Gleichzeitig unterstreichen die Autoren, daß nur wenige Informationen über evtl. Sauerstoffrezeptoren bei Insekten bekannt seien und vermuten eine zentrale Lokalisierung im ZNS. Die Frage nach einer respiratorischen Chemorezeption für Sauerstoff im Insektennervensystem ist also in der Vergangenheit eher vernachlässigt worden. Im Allgemeinen sind nur wenige Daten über Sauerstoffrezeptoren bei Arthropodennervensystemen erhältlich. Taylor (1980) erwähnte Sauerstoffrezeptoren im ZNS von Krustaceen. Im Gegensatz zu diesem bislang relativ geringen Wissen über die Situation bei Arthropoden ist die Existenz von CO₂- und Sauerstoffsensitivität bei Vertebraten gut erforscht und bekannt (Zigmond et al., 1999). Einige Untersuchungen an intakten Insekten zeigten hingegen die Bedeutung von divergierenden Konzentrationen des Atemgases Sauerstoff: Greenlee und Harrison (1998) konnten für intakte *Schistocerca americana* einen klaren Abfall der ventilatorischen Aktivität mit steigenden Sauerstoffpartialdrücken zeigen. Dieser Befund korrespondiert gut mit den Ergebnissen, die für *Taeniopoda eques*, sowohl im intakten Tier als auch im isolierten ZNS gefunden werden konnten und untermauert die Annahme eines Rezeptors, der Sauerstoff detektiert. Erst kürzlich konnten Chappell et al. (2000) bei zwei Cerambycidenkäfern (*Phorcantha recurva* und *P. semipunctata*) einen Wechsel von diskontinuierlicher hin zu kontinuierlicher Ventilation zeigen, der durch schwere Hypoxie (PO₂ < 5-6%) hervorgerufen wurde. Die Autoren konnten außerdem zeigen, daß sich mit fallendem Sauerstoffpartialdruck (PO₂=20,95%, 15,7% und 10,4%) die Dauer des diskontinuierlichen Gasaustauschzyklus' verkürzte: die Käfer atmeten schneller durch Hypoxie. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen die im intakten Tier und im isolierten ZNS von *Taeniopoda eques* gefunden wurde (s. Tabelle 1), scheint nicht markant zu sein. Im Zusammenhang mit den oben angeführten Beispielen anderer Autoren ist dies ein weiterer Hinweis auf den Sauerstoffrezeptor.

Nachweis eines Kohlendioxidrezeptors

Der ANOVA-Test auf eine Chemorezeption auch für CO₂ ergab signifikante Resultate - obwohl die Datenbasis mit N=4 relativ niedrig war. Die Daten dieser Arbeit und die Annahme eines CO₂-Rezeptors werden durch die Resultate anderer Autoren (Case, 1957; Miller, 1960; Mill & Hughes, 1966) gestützt. In intakten Individuen der Heuschrecke *Schistocerca americana* zeigten Krolkowski & Harrison (1996) einen Anstieg ventilatorischer Frequenzen, die durch hyperkapnische Bedingungen verursacht wurden. Dies ist mit den Daten vergleichbar, die in der vorliegenden Arbeit für isolierte ZNS von *Schistocerca americana* erhalten wurden: hierbei führten hohe Partialdrücke von CO₂ im Gasgemisch zu einem statistisch signifikanten Anstieg der ventilatorischen Frequenzen des neuralen Outputs. Auch Hustert (1975) konnte dies für intakte Tiere zeigen. Eventuelle Einflüsse des pH-Wertes (der während der Aufzeichnungen nicht kontrolliert wurde) sind zwar nicht ganz auszuschließen, aber eher unwahrscheinlich, da auch Gulinson & Harrison (1996) herausstellen, daß CO₂ und nicht der pH-Wert für die Ventilation Bedeutung hat.

Zelluläre Rezeptoren und ihre mögliche Lokalisierung im Nervensystem von Insekten

Die Frage nach der Struktur von zentralen O₂- und CO₂-Rezeptoren muß gegenwärtig theoretisch bleiben. Die rezeptiven Fähigkeiten könnten direkt durch verteilte metabolische Prozesse aber auch über einzelne Zellen (Neurone oder auch Gliazellen), die direkt auf O₂ oder CO₂ reagieren, bedingt sein. Die Schnelligkeit, mit der jedoch Frequenzänderungen im isolierten ZNS (ohne tracheale Versorgung) nach Veränderung der Atemgaskonzentrationen jedoch beobachtet wurden (s. z.B. Anhang II: Abb. cE), lassen eher einen zellulären Rezeptor vermuten. Ein deutlicher und unmittelbarer Einfluß von Sauerstoff auf die Aktivität einzelner Nervenzellen konnte auch auf intrazellulärer Ebene nachgewiesen werden (s. Kapitel 3.3.4). Dieser Einfluß könnte durch an der Ganglienoberfläche lokalisierte Zellen vermittelt sein. Mögliche "Kandidaten" sind Gliazellen, die in Insektenganglien schon Gegenstand von solchen Untersuchungen waren (Treherne, 1972). Hierbei wurden der morphologische Aufbau des Neurilemms und ionale Ströme untersucht. Eigene Dextranfärbungen der Ganglienoberfläche (s. Abbildung 6) zeigten von dort ausgehende astrozytenförmige Zellen an, die möglicherweise in der Lage sind, externe Partialdruckänderungen von Sauerstoff (und CO₂) wahrzunehmen. Gliazellen bei Insekten werden als möglicher Teil der Signaltransduktion angesehen,

u. a. weil sie sich ins eigentliche Neuropil der Ganglien erstrecken (Dettner & Peters, 1999). Hier könnten in späteren Arbeiten z.B. den Färbungen folgende histologische Schnitte des Ganglions Klarheit verschaffen.

Zelluläre Chemorezeption für CO₂ ist bei einer Reihe von Insekten - wie z. B. Schmetterlingen, parasitische Dipteren, Honigbienen u.a. (Dettner & Peters) - nachgewiesen. Im Allgemeinen befinden sich diese Rezeptoren auf der Oberfläche des Insekts und ähneln in ihrer Morphologie der von Geschmacksrezeptoren. Die Lokalisierung von Rezeptoren für Sauerstoff und CO₂ ist nicht eindeutig geklärt. Vermutlich befinden sie sich zentral im Ganglion, wie es schon früher für CO₂ angenommen worden war (Miller, 1960). Auch Case (1957) erachtete eine verstärkte Fokussierung auf das Innere des Nervensystems als notwendig zur Untersuchung von respiratorischer Chemorezeption bei Insekten. Miller (1960) vermutete CO₂-Rezeptoren im Kopfganglion und in den Thorakalganglien von *Schistocerca gregaria*. In der vorliegenden Arbeit wurden vom ZNS nur das Mesothorakalganglion bis zum 1. freie Abdominalganglion entnommen. Eine über das ganze ZNS verteilte Chemorezeption ist aber wahrscheinlicher als Konzentration auf eine bestimmte Region im Nervensystem, an dem sich respiratorische Chemorezeptoren befinden könnten. Harrison et al. (1991) und Harrison (persönl. Mitt.) vermuteten sensitive Mechanismen für Partialdruckänderungen innerhalb der Tracheen. Die Daten aus den hier vorliegenden Ergebnissen - insbesondere die Versuche zur O₂-Sensivität im isolierten ZNS (s. Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2, Anhang Ic, A-G) - deuten nun eher auf eine Lokalisierung direkt innerhalb des Neuropils des Ganglions hin. Es kann jedoch auch weiterhin nicht ausgeschlossen werden, daß auch innerhalb der feinen Tracheenäste, welche das Ganglion versorgen, sich die eigentlichen Rezeptoren für Partialdruckänderungen befinden.

Interaktion zwischen Sauerstoff- und CO₂-Rezeptoren?

Die Ergebnisse aus einigen Versuchen (s. Abb. 17 und 18 und Anhang II, d, D-F) lassen eine gewisse Interaktion zwischen den Einflüssen der Partialdrücke von Sauerstoff und Kohlendioxid auf das ZNS vermuten: in diesen Experimenten zum Einfluß des Kohlendioxidpartialdrucks auf die Ventilation wurde N₂ stabil gehalten während Sauerstoff variiert wurde. Dies bedeutete einen sinkenden Sauerstoffpartialdruck bei gleichzeitig steigendem CO₂-Partialdruck. Die Effekte von steigendem CO₂-Partialdruck (Frequenzänderungen) waren sehr viel deutlicher als

bei den Experimenten, in welchen O_2 bei 50% konstant gehalten wurde (s. Abb. 15 und Anhang II, d, A-C). Dies scheint auf eine unterdrückende Wirkung von hohen O_2 -Partialdrücken auf die Ventilation zurückzuführen zu sein, welche stärker ist, als die Wirkung frequenzsteigernder hoher CO_2 -Partialdrücke. Interessanterweise war die ventilatorische Frequenz im isolierten ZNS in 21% Sauerstoff (also Atmosphärenluft) leicht erhöht gegenüber der reinen 20%igen Sauerstoffatmosphäre. Dies könnte auf das fehlende CO_2 in 20% zurückzuführen sein, was als ein weiteres Indiz für die vermutete Interaktion angesehen werden kann.

Hypoxieeffekte im Insektennervensystem im Vergleich mit dem ZNS von Säugern

In Abbildung 12 (12-I) ist deutlich eine Erholung des ZNS nach erfolgter totaler Hypoxie und daraus resultierender totaler ventilatorischer Inaktivität zu erkennen. Dieser "Recovery"-Effekt scheint auch bei Vertebraten aufzutreten (nachgewiesen in Brainslices von Mäusen) und wurde als "biphasische Antwort" bezeichnet (Bureau et al., 1984; Richter et al., 1991; Haddad & Jiang, 1993). Sie ist gekennzeichnet durch einen anfänglichen Anstieg der ventilatorischen Frequenz als Antwort auf Hypoxie, gefolgt von einem Abfall der Ventilation, die bis zum völligen Stillstand der Ventilation führen kann. Genau dieser Ablauf ist in Abbildung 12 erkennbar bei Herabsetzung des Sauerstoffpartialdrucks. Eventuell liegen hier ähnliche Mechanismen bei Insekten vor, wie sie bislang für Säugetiere bekannt waren.

Verhaltensbeobachtungen im intakten Tier zu Formen der abdominalen Atmung

Es konnte beobachtet werden, daß die verwendeten Versuchstiere bei Hypoxie, Hyperkapnie und auch Hyperoxie auf zweierlei Weise reagierten: zum einen mit einer Frequenzerhöhung, zum anderen aber auch mit Volumenerweiterung oder Intensivierung der einzelnen Atemzüge. Dies zeigte sich besonders deutlich bei Hyperoxie. Auch im isolierten ZNS konnte dies beobachtet werden.

In Begleitversuchen konnte auch bei Flugverhalten beobachtet werden, daß physiologische Anstrengung nicht nur zu einer Frequenzerhöhung führten, sondern auch vertiefte Atemzüge erfolgten. Krolkowski und Harrison (1996) zeigten Frequenzerhöhungen als charakteristische Antwort von Heuschrecken auf Anstrengung.

4.4 Identifizierte Interneurone

Im semiintakten Präparat

Die im semiintakten Präparat gefundenen Interneurone spiken korreliert zur rhythmischen Atmungsaktivität.

Die wichtigste Charakteristik ventilatorischer Interneurone, die zum CPG gehören, ist nach Ramirez & Pearson (1989) seine sog. Reset-Eigenschaft (s. Kapitel 2.5). Für die gezeigten IN, die im semiintakten Präparat (mit intakten Afferenzen) abgeleitet wurden, konnte diese Eigenschaft hier nicht nachgewiesen werden.

Die Identifizierung einer möglichst großen Anzahl von Interneuronen des ventilatorischen Netzwerkes ist für eine tiefergehende Beschreibung des sehr komplexen CPG der Heuschreckenatmung dringend erforderlich. Die bisherigen Untersuchungen (Ramirez & Pearson 1989) deuten auf eine Vielzahl von Interneuronen hin, die direkt oder indirekt an der ventilatorischen Rhythmogenese im ZNS von Heuschrecken beteiligt sind. Für diese Vielzahl existiert wahrscheinlich ein primäres verschaltendes Zentrum ventilatorischer Aktivität - im medianen, kommissuralen Bereich des "echten" Metathorakalganglions und des 1. Abdominalneuromers. Dies ergibt sich u. a. aus visueller Beobachtung der abdominalen Pumpbewegungen ventilatorischer Muskeln während der Intrazellulärexperimente im semiintakten Präparat (bei Einstich in dieser Region manchmal erhöhte Atemfrequenzen), der charakteristischen Morphologie von identifizierten Interneuronen in dieser Arbeit (typische Anatomie deszendierender Interneurone des Metathorakalganglions, vergl. Ramirez & Pearson (1989)) und der gelegentlichen Steigerung der Atemfrequenzen des Monitors bei Ableitungen im isolierten ZNS (s.u.). Die meisten der identifizierten intersegmentalen IN, die von Pearson (1982) sowie von Ramirez & Pearson (1989) gefunden wurden, zeigen eine weitläufige Verästelung der Axone und Dendriten in dieser relativ dorsal-medianen Neuropilregion. Oftmals zeigen die deszendierenden Bereiche der in das kontralaterale Konnektiv ziehenden Axone sichtbare synaptische Endigungen in den homologen Bereichen der anderen Neuromere. Dies zeigte sich auch für VentIN2 (s. Abbildung 20) deutlich. Beim VentIN1 (s. Abbildung 19) handelt es sich um ein lokales Interneuron. Bisher ist kein lokales Interneuron beschrieben worden, welches zum ventilatorischen Netzwerk korreliert werden konnte.

Im isolierten ZNS mit intakter trachealer Versorgung

Die im isolierten ZNS mit beibehaltener trachealer Versorgung nachgewiesenen Interneurone (s. Abbildungen 21-28) der Ventilation müssen in verschiedene Kategorien unterteilt werden (s. Tabelle 2). Einige können als zum Netzwerk gehörend bezeichnet werden, im Gegensatz zu den im semiintakten Präparat (s.o.) nachgewiesenen, bei denen ja ein sensorischer Einfluß nicht ausgeschlossen werden kann. Daher wurden diese Interneurone als "korreliert" zum Netzwerk bezeichnet. Auch bei den in früheren Untersuchungen zur ventilatorischen Rhythmogenese (Pearson 1982, Ramirez & Pearson 1989) identifizierten Interneuronen ist nicht auszuschließen, daß deren "resetting properties" nicht unbedingt bedeuten, daß sie zum essentiellen Netzwerk gehören. Schon Pearson (1980) betonte, daß bei den zwei von ihm beschriebenen ventilatorischen Interneuronen nicht ausgeschlossen werden kann, daß diese bei langsamer Atmung nicht rekrutiert werden. Sie könnten evtl. auch modulierende oder vermittelnde Funktionen zu anderen Netzwerken haben (Hustert, pers. Mitteilung), oder auch sensorisch beeinflusst sein. Bei den hier im isolierten ZNS gezeigten Interneuronen kann afferenter Einfluß weitgehend verneint werden. Einflüsse von atemgassensitiven Rezeptoren (für Sauerstoff oder Kohlendioxid) können jedoch angenommen werden. Daher gehören diese Neurone zum ventilatorischen Netzwerk bzw. sind Teil des Netzwerks, welches intrinsisch tätig ist.

Komponenten des Zentralen Rhythmusgenerators (CPG)

Einen völlig neuen Einblick in die zugrundeliegenden Mechanismen der ventilatorischen Rhythmogenese geben die Ergebnisse, welche im Zusammenhang mit dem VentIN-4 (Abbildung 22) gefunden wurden. Das Interneuron, dessen Axon in die Abdominalganglien deszendiert, zeigte im "ungestörten" Zustand eine Autorhythmizität, die ventilatorische Bursts in kleinen diskontinuierlichen "Burstgrüppchen" hervorbringt mit einem unterlagerten kontinuierlichen PSP-Rhythmus (s. Abb. 22-I-A). Diese Muster kleiner Burstgruppen fanden sich auch in Ableitungen von efferenten ventilatorischen Nerven wieder, welche Motoneurone enthalten, die die abdominalen Muskeln ansteuern. Hier traten diese Muster charakteristisch beim Übergang von kontinuierlicher zu diskontinuierlicher Atmung auf. Das Interneuron konnte hyperpolarisiert werden, so daß die EPSPs deutlicher sichtbar wurden (s. Abb. 22-I-B und 22-II), welche von anderen auf dieses

Interneuron aufgeschalteten Interneuronen stammen müssen. Immer wenn die sich summierenden EPSPs überschwellig wurden, kam es zu Bursts. Das bedeutet, daß hinter diesem Kommandoneuron ein Netzwerk weiterer Interneurone steht, das als "inneres Uhrwerk" feuert und nur fakultativ überschwellige Reaktionen des VentIN-4 hervorufen. Eine mögliche Erklärung wäre variable An- und Abkopplung von aufgeschalteten Neuronen. Gleichzeitig zeigte sich eine heftige Reaktion des Interneurons auf die Rücksetzung der Hyperpolarisierung ("Rebound"). Es kam zu einer immer schneller werdenden Burstserie. Dies deutet auf eine positive Rückkopplung des Kommandoneurons auf das antreibende Netzwerk und somit auch auf sich selbst hin, d.h. neben seiner Funktion als auf Motoneurone und andere Interneurone aufgeschaltetes Neuron, kommt diesem identifizierten Neuron modulierende Wirkung auf das basale "innere Uhrwerk" zu. Dieses "Autofeedback", das das Neuron über das Netzwerk ausübt, wird wahrscheinlich im intakten Tier durch eine sensorische oder metabolische Triggerung (vermehrte Atmung und damit einhergehend z. B. sinkende CO₂-Konzentration im Gewebe) wieder gehemmt, wenn ein neuer Sollzustand hergestellt ist. Im isolierten ZNS ist diese sensorische (metabolische) Rückmeldung ausgeschaltet und kann nicht mehr ausbalancierend auf Kommandoneurone wirken (wie z.B. im Fall des gefundenen Interneurons) und die positive Rückkopplung hemmen. Die im intakten Tier vorgefundene Gruppenatmung, die auch extrazellulär in den Ableitungen efferenter Nerven im isolierten Metathorakalganglion nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 2), könnte hiermit erklärt werden. Daß mechano-sensorische Reize auf die Ebene der Kommandoneurone einwirken können, konnte in früheren Untersuchungen (Consoulas & Hustert, unveröffentlichte Daten) gezeigt werden.

Robertson (1986) beschrieb eine solche gegenseitige Rückkopplung von Interneuronen des Flugrhythmusgenerators, welche auch im deafferentierten Präparat ihre Funktion als koordinierendes Netzwerk der Motoneurone der Elevator- und Depressoraktivität erfüllten. Ein ähnlicher Befund ergab sich auch für das VentIN-5 (s. Abbildung 23). Diese Neuron entlädt fast simultan mit inspiratorischen Einheiten des N2 (intrazelluläre Aktivität setzt etwas früher als die korrelierte extrazelluläre Aktivität ein). Auch bei VentIN-5 führte eine Rücksetzung der Inhibition ("Rebound") zu immer schnellerer Burstfolge (s. Abbildung 23 C). Also wirkt auch dieses Neuron über das Netzwerk auf sich selbst zurück. Deutlich erkennbar war auch, daß die motoneuronale Aktivität während Dauerhyperpolarisierung gehemmt

wurde. VentlN-5 treibt und hemmt die die Inspiration also. Diese Neurone könnten sowohl eine weitere essentielle Komponente des Netzwerkes sein als auch ein integraler Bestandteil des originären "pacemakers", da es zwar die physiologischen Eigenschaften eines Kommandoneurons hat, aber gleichzeitig eine untypische Anatomie im Vergleich z.B. zu den VentlN-2 und 4 bzw. im Vergleich zu einer Reihe von anderen Autoren identifizierten Interneuronen (Ramirez & Pearson, 1989). Die Tatsache, daß es sich bei VentlN-5 um ein im isolierten ZNS aktives Interneuron handelt, untermauert diese Vermutung ebenso, wie die auffälligen Verzweigungen des Axons in Richtung der lateralen Neuromerbereiche, also dem Sitz der Somata ventilatorischer Kommandoneurone.

Verschaltende (antreibende?) und korrelierte Interneurone des CPG

Die in Tabelle 2 vorgenommene Klassifizierung (s. Kapitel 3.3.3) basiert bei den als "verschaltend" bezeichneten Interneuronen überwiegend auf indirekten Hinweisen bzw. Analogschlüssen, da eine Korrelation zum extrazellulären Monitor nur bei den VentlN-8 und 10 gelang. Gleichzeitig sind diese Neurone in ihrer wahrscheinlichen Funktion getrennt zu betrachten von denen, die in dieser Arbeit als "Kommandoneurone" oder "Komponenten des CPG" kategorisiert sind. Die letztgenannten erfüllen wichtige Eigenschaften, um sie für die Rhythmogenese als essentiell zu betrachten (vergl. Ramirez & Pearson, 1989). Diese Zuordnung kann man den verschaltenden bzw. korrelierten Interneuronen nicht zubilligen (z.T. aufgrund nicht genügender Informationen zur Physiologie). Die VentlN6-10 gehören in diese Kategorie.

Das VentlN6 (s. Abbildung 24) hat ein lateral im 1. Neuomer liegendes Soma. Der festgestellte Dauertonus - mit gelegentlichen kurzen phasischen Abschnitten - und der in das Mesothorakalganglion ascendierende Ast könnten auf eine Funktion zur Stigmenkoordination im Mesothorax hindeuten. Bei Burrows (1996) ist angeführt, daß die mesothorakalen Stigmen durch einen Schließermuskel verschlossen gehalten werden. Eine Ansteuerung durch ein tonisch angesteuertes Motonneuron könnte die Grundlage für den Stigmenverschluß sein. Gleichzeitig zeigt das Neuron Aufzweigungen im medianen Bereich, dort wo sich das vermutlich verschaltende Neuropilareal des primären Oszillators des CPGs befindet. Deutlich zu erkennen ist bei VentlN-6 auch, daß es synaptische Inputs von anderen aufgeschalteten Neuronen erhält (EPSPs, s. Abbildung 24 B und C) und durch Depolarisierung

getrieben wird. Eine verschaltende Funktion zu anderen Netzwerken kann daher nicht ausgeschlossen werden. Zu den wahrscheinlich verschaltenden Interneuronen gehören auch die VentIN9 und 10. Hervorstechend sind diese beiden Interneurone schon aufgrund der guten anatomischen Beschreibbarkeit anhand der detailgenauen Färbungen, aber insbesondere anhand ihrer insgesamt für ventilatorisch gekoppelte Neurone ungewöhnlichen Anatomie. Das VentIN9 mit seinen ipsilateral deszendierenden und aszendierenden Axonen, sowie den auffälligen Verzweigungen mit den deutlich synaptischen Endigungen im Bereich von Neuronen des Flugrhythmusgenerators (Hedwig & Pearson, 1984; Burrows 1996), weisen auf ein möglicherweise zum Flugrhythmus verschaltendes Neuron hin. Da auch auffällige Verzweigungen zu beiden lateralen Neuronenbereichen vorhanden sind, scheint eine Verbindung zu ventilatorischen Neuronen wahrscheinlich. Bei Pearson et al. (1989) fand sich ein Interneuron mit einer verblüffend ähnlichen Anatomie: ipsilateral aszendierendes und deszendierendes Axon, laterales Soma im 1. Neuromer, starke dendritische Verzweigungen mit synaptischen Endigungen in der gleichen Region wie VentIN9, aber keine auffälligen Abzweige in beide Ganglienhälften in den Bereich ventilatorischer Neurone. Dieses Neuron sprach auf sensorische Eingänge vom Chordotonalorgan der Hinterflügel an. Es hatte also eine sensorisch-verschaltende Funktion. Dies kann als weiterer Hinweis auf die verschaltende Funktion von VentIN9 zwischen ventilatorischem Netzwerk und Flug gewertet werden. Der Dauertonus mit kurzen phasischen Unterbrechungen, den das VentIN9 zeigt, erlaubt auch eine Rolle für die Stigmenkoordination zu postulieren, wie auch für das VentIN6 (s.o.) Das VentIN9, dessen heftiger Dauertonus durch Depolarisierung beschleunigt werden konnte, wird während seiner rhythmischen Phasen evtl. inhibitorisch angesteuert. Prinzipiell kann ein solch komplexes Neuron Bestandteil mehrerer Funktionen sein (Burrows, 1996). Die enge Verzahnung von ventilatorischem Rhythmus und Fluggenerator wurde dementsprechend auch schon mehrfach nachgewiesen (Burrows 1975, Ramirez 1998). Abschließend müsste dies für das VentIN9 in weiteren Untersuchungen in Relation zum extrazellulären Monitor geklärt werden.

Für das VentIN-10 läßt sich die Korrelation zum ventilatorischen Netzwerk deutlich demonstrieren. Auf der unterlagerten starken tonischen Aktivität sind die rhythmischen, an die Inspiration gekoppelten, Entladungen des Interneurons zu sehen (Abbildung 29 C). Die starken dendritischen Verzweigungen, mit klaren

synaptischen Endigungen, sind lateral im Bereich des 1. Neuromers und des eigentlichen Metathorakalganglions lokalisiert. Dort befinden sich u.a. Motoneurone des Laufrhythmus (Burrows, 1996). Es könnte sich daher um eine zum Laufrhythmus verschaltendes Interneuron handeln. Das ascendierende Axon macht auch hier eine Funktion bei der Stigmenkoordinierung möglich.

Für die VentIN7 und 8 lassen sich nur relativ geringfügige Interpretationen hinsichtlich möglicher Funktionen anstellen. Eine Korrelation zum ventilatorischen Netzwerk ist für das VentIN-8 eindeutig zu erkennen. Es wird inhibitorisch angesteuert, wenn der extrazelluläre Monitor expiratorisch feuert, aufgelagert auf einen Dauertonus. Da die Anatomie beider Neurone unklar ist, kann lediglich vermutet werden, daß es sich um Interneurone mit einer ähnlichen Struktur handelt, wie man sie beim VentIN 10 findet. Die mediane Lage des Somas unterstützt diese Annahme. Bei VentIN-8 handelt es sich u.U. um ein Stigmen koordinierendes Interneuron oder um eines, das inspiratorische Neurone hemmt (bzw. tonisch antreibt) und bei Expiration entsprechend gehemmt wird (s. Abbildung 26).

Mehrebenen-Modell ventilatorischer Rhythmogenese

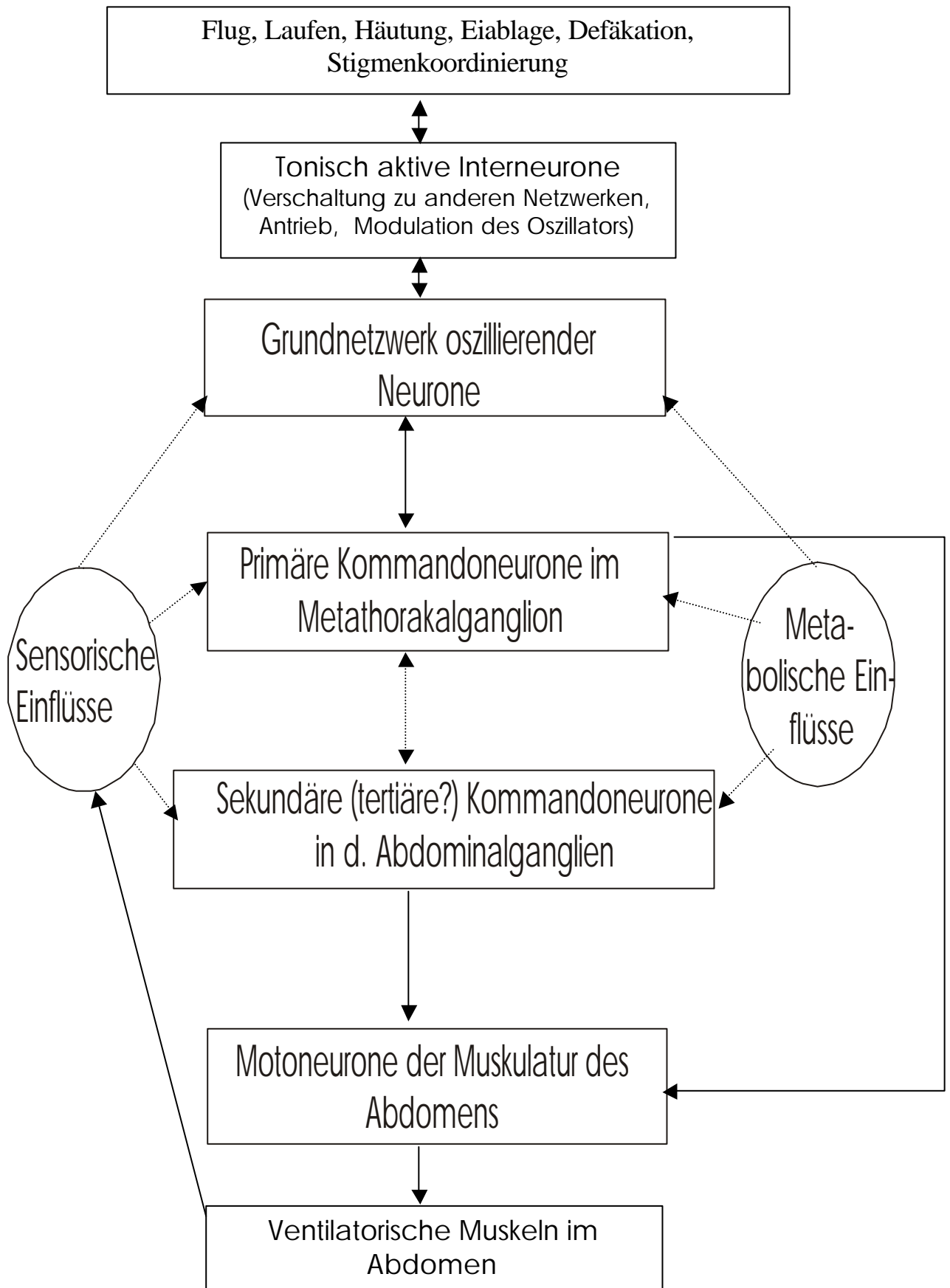
Untersuchungen zu neuronalen Mechanismen der Rhythmogenese bei Insekten (insbesondere an Orthopteren) fanden beispielsweise am Rhythmusgenerator des Laufens bei Stabheuschrecken (Fischer et al., 2000; Schmidt et al., 2000), am Flugrhythmusgenerator der Heuschrecken (Robertson, 1986) und nicht zuletzt am CPG der Atmung verschiedener Heuschreckenarten und bei Grillen statt (Burrows 1975 und 1981; Pearson, 1980; Ramirez & Pearson, 1989; Otto & Janiszewski, 1989; Ramirez, 1998). Kinnamon & Kammer (1983) untersuchten die neuronale Kontrolle ventilatorischer Bewegungen bei der aquatischen Schlammfliegenlarve *Corydalis cornutus*. Diese Autoren schlugen ein Modell vor, das eine direkte inhibitorische und excitatorische Aufschaltung von speziellen identifizierten Interneuronen auf zwei Motoneurone postuliert, welche die antagonistischen Muskeln ansteuern, die die Atembewegungen bei *Corydalis cornutus*-Larven antreiben.

Robertson (1986) entwickelte ein komplexes Modell der synaptischen Verschaltungen von einer Reihe von Interneuronen, die untereinander inhibitorisch und excitatorisch verschaltet sind, um die Depressor- bzw. Levator-Motoneuronenaktivität zu koordinieren. Auch die bisherigen Untersuchungen zu ventilatorischen Interneuronen bei Heuschrecken der o.g. Autoren, ergaben Einblicke

in die Funktion dieser Interneurone im ventilatorischen Netzwerk (vergl: entsprechende Stellen der Diskussion).

Es zeigt sich, daß die zugrundeliegenden neuronalen Mechanismen auf der Ebene der Zellen und synaptischen Verschaltungen zwar teilweise schon recht gut verstanden wurden, daß aber das Zusammenspiel der verschiedenen Netzwerkebenen im Insektennervensystem bisher nur wenig erklärt werden konnte. Die Komplexität neuronaler Netze, selbst bei so "einfachen" Organismen wie es Insekten (respektive Arthropden) scheinbar sind, verhinderte bislang eine umfassende und vollständige Analyse von neuronalen Netzen. Nur bei Krustaceen gelang es, das neuronale Netzwerk des stomatogastrischen System vollständig zu "entschlüsseln" (Selverston & Moulin, 1986).

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen dieser Untersuchung und den früheren Resultaten verschiedener Autoren (Burrows 1975, Pearson 1980, Ramirez & Pearson 1989) wird daher die Hypothese eines essentiellen CPG im Metathorakalganglion von Heuschrecken (und evtl. anderen Insekten) gestellt, der als "inneres Uhrwerk" den Grundrhythmus der Ventilation vorgibt und auf nachgeschaltete deszendierende (aszendierende?) Kommandoneurone - wie z.B. VentIN 4 und 5 - mittels EPSPs aufschaltet. Erst vor kurzem konnte der wahrscheinliche Mechanismus, mit dem die respiratorische Rhythmogenese bei Vertebraten (Nager) erfolgt, beschrieben werden (Koshiya and Smith, 1999). In Slices vom Prä-Bötzinger-Komplex im Hirnstamm konnten die Autoren eine autonome Rhythmizität von inspiratorisch aktiven Neuronen nachweisen, die ein Grundnetzwerk von Schrittmacherneuronen bilden durch synaptische Verschaltung und die durch glutamaterge Synapsen desynchronisiert werden können. Eine vergleichbarer Mechanismus ist nun aufgrund der vorliegenden Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit für Heuschrecken bzw. Insekten zu vermuten. Gleichzeitig scheint es die Theorie vom Rhythmusgenerator mit variabel überschwelliger Wirkung (Koppelung) auf andere verhaltenssteuernde Netzwerke (Burrows 1975) zu unterstützen. Der Vorteil eines solchen Neuronennetzes wäre nicht nur ein beständiger Output auf autorhythmische und modulierende ventilatorische Interneurone (welche die Motoneurone versorgen), sondern könnte auch dem kontinuierlichen synaptischen Ausgang auf verschiedene ankoppelbare motorische Systeme dienen (Laufen, Fliegen, Eiablage, Defäkation, Häutung), die aber postsynaptisch nur dann überschwellig reagieren, wenn Bedarf besteht.



In dem dargestellten Modell ist die mögliche Vernetzung der verschiedenen Ebenen von oszillierendem ventilatorischen Netzwerk, Kommandoneuronen, sowie nachgeschalteten (parallelverschalteten?) sekundären (tertiären) Interneuronen in den Abdominalganglien, Motoneuronen sowie sensorischen Einflüssen illustriert. Interaktionen sind durch Pfeile angezeigt.

Solche Interaktionen können sein: PSPs und elektrische Koppelung (Selverson & Moulin, 1986) und humorale Wirkungen (Hustert, pers. Mitteilung).

Schlußfolgerung und Ausblick:

Das isolierte Nervensystem kann eine große Bandbreite von ventilatorischen Mustern selbst erzeugen. Die Muster bewegen sich zwischen den Extremen diskontinuierliche und kontinuierliche "gestresste" Atmungsmuster. Untersuchungen an intakten Tieren (Hustert, 1974; Herreid & Full, 1984; Bartholomew & Lighton, 1985; Lighton, 1990; Lighton & Lovegrove, 1990; Slama & Coquillaud, 1992; Lighton & Berrigan, 1995; Krolikowski & Harrison, 1996; Williams et al., 1998) zeigen Ähnlichkeiten mit den Mustern, wie sie im isolierten Heuschrecken-ZNS auftreten.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die ventilatorischen Muster neuronalen oder physiologischen Ursprungs sind. Weiterhin kann man ein "allgemeines Prinzip" ventilatorischer Muster postulieren, das sich in verschiedenen Insektenfamilien ausgebildet hat, z. B. Ameisen (Lighton, 1990), Libellen (Hughes & Mills, 1966), Heuschrecken (Harrison, 1997), Schaben (Herreid & Full, 1984; Bartholomew & Lighton, 1985) und Käfer (Chown & Holter, 2000). So findet man kontinuierliche wie auch diskontinuierliche Atmungsmuster - mit Übergangsformen - über die ganze Insektengruppe verteilt. Genetische Unterschiede, wie man sie bei *Drosophila melanogaster* durch künstliche Selektion mittels verschiedener Luftfeuchtbedingungen hervorrufen konnte (Williams & Bradley, 1998), könnten auch bei anderen Insekten vorkommen. Dies könnte der langfristigen Anpassung von Insektenpopulationen an sich verändernde Umweltbedingungen dienen.

Die zellulären Mechanismen der ventilatorischen Rhythmogenese könnten u. a. auf ionalen Veränderungen an der Zellmembran basieren, die im Zusammenhang mit dem Bicarbonatsystem stehen. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Die vorliegenden Daten zur Atemgassensivität ergaben deutliche Beweise für respiratorische Chemorezeption in Insektennervensystemen - insbesondere neue Belege für eine Sauerrezeption - und unterstützen die Ergebnisse früherer Studien

zu CO₂-Rezeptoren (Case, 1957; Miller, 1960; Kinnamon et al., 1984). Während bei Vertebraten (besonders in Säugern) die Forschung beeindruckende Fortschritte auf diesem Gebiet gemacht hat, ist die Frage nach Atemgasrezeptoren von der Insektenneurophysiologie eher vernachlässigt worden. Der Fokus muß nun zukünftig auf die zellulären (oder molekularen/ionalen) Mechanismen gelegt werden. Ein erster Schritt in diese Richtung gelang mit der Ableitung eines Neurons, das durch Sauerstoffeinwirkung excitatorisch angesteuert wurde und von tonischer zu phasischer ventilatorischer Aktivität überging.

In der vorliegenden Arbeit, gelang es, weitere ventilatorische Interneurone zu finden, die in ihrer Morphologie und Physiologie z.T. denen ähneln, die in früheren Arbeiten identifiziert wurden (Burrows, 1975 u. 1982; Pearson, 1980; Ramirez & Pearson, 1989), z. T. aber auch von der typischen Erscheinungsform abweichen z. B. war bislang kein lokales ventilatorisches Interneuron bekannt.

Die Arbeiten am isolierten ZNS erlaubten es nun auch anhand der intrazellulären physiologischen Daten eine "innere Uhr" zu postulieren (wie es sich ja schon durch die gewonnenen extrazellulären Daten abzeichnete, s.o.), die Grundelement im CPG der Ventilation im Insekten-ZNS ist. Diese "innere Uhr" feuert immer rhythmisch, auch wenn dies nicht immer efferent sichtbar wird. Einzelne identifizierte Interneurone (z.B. VentIN4) sind auf dieses innere Netzwerk rückgekoppelt und sind daher nicht nur getrieben von diesem, sondern auch Teil davon.

Als neuer Ansatz für die ventilatorische Rhythmogenese kann auch die Postulierung eines Antriebs des Basisnetzwerks durch tonisch aktive Neurone gelten, welche möglicherweise eine Doppelfunktion erfüllen, weil sie auch als verschaltende Elemente zu anderen Netzwerken fungieren könnten.

Der Bereich des Metathorakalganglions, der vornehmlich für die intrazellulären Ableitungen abgesucht wurde (kommissural-medianer Bereich, s.o.), führte zu einer gewissen Selektivität bezüglich der gefundenen Interneurone. So wurden vornehmlich intersegmentale Interneurone mit kontralateralem Axon gefunden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die koordinierte motorische Aktivität der Ventilation im Zusammenspiel der Interneurone, nicht nur des Metathorakalganglions, sondern auch mit Interneuronen nachgeschalteter abdominaler Ganglien, erfolgt. Es ist aber ebenfalls nicht auszuschließen, daß auch ipsilateral liegende Neuronengruppen vorkommen, die in der Lage sind, die nötigen ventilatorischen Muster zu erzeugen. Ronacher et al.(1988) konnten zeigen, daß auch bei longitudinaler Sektion thorakaler

Ganglien (als Durchtrennung des kommissuralen Bereichs) jede Ganglienhälfte trotzdem Flugrhythmen erzeugen konnte. Gleichwohl ergaben sich in den früheren Untersuchungen zur ventilatorischen Rhythmogenese bei Heuschrecken (Burrows, 1975 u. 1982; Pearson, 1980; Ramirez & Pearson, 1989; Ramirez, 1998) keine Befunde, die auf etwas Ähnliches hinweisen. Eine Klärung dieser Frage wäre für zukünftige Arbeiten am ventilatorischen Netzwerk von Insekten sicher sinnvoll.

Allerdings zeigen die gegenwärtigen elektrophysiologischen Methoden, die z. Z. in der Insektenneurobiologie in Verwendung sind, einige Grenzen. Neuere experimentelle Ansätze wären in der Lage sind, das Zusammenspiel von verschiedenen Neuronengruppen des ventilatorischen Netzwerks in verschiedenen Bereichen des Insekten-ZNS zu beleuchten. Möglicherweise ist die Anwendung von etablierten Methoden der Human- und Vertebratenneurobiologie (z. B. computertomographische Techniken oder Ca^{2+} -Imaging) ein Weg, tiefere Erkenntnisse zu gewinnen, als es de auf zellulärer Ebene in den letzten 25 Jahren gewonnenen möglich machten.

5. Literaturliste:

Bartholomew, G. A., Lighton, J. R. B. (1985): Short communication – Ventilation and oxygen consumption during rest and locomotion in a tropical cockroach, *Blaberus giganteus*. J. exp. Biol. 118, 449-454.

Bacon, J. P.; Altman, J. S.: A silver intensification method for cobalt-filled neurones in whole mount preparations. Brain research 138, 359-363.

Bureau, M. A.; Zinman, R.; Foulon, P.; Begin, R. (1984): Biphasic ventilatory response to hypoxia in newborn lambs. J. Appl. Physiol. 56, 84-90.

Burrows, M. (1975): Co-ordinating interneurones of the locust which convey two patterns of motor commands: their connexions with ventilatory motoneurones. J. exp. Biol. 63, 735-753.

Burrows M. (1982): Interneurones co-ordinating the ventilatory movements of the thoracic spiracles in the locust. J. exp. Biol. 97, 385-400.

Burrows M. (1996): The Neurobiology of an insect brain; Oxford university press, Oxford, New York, Tokyo, 682 S.

Bustami, H. P., Harrison, J. F., Hustert R. (1999): Hints to an oxygen receptor in the CNS of insects which influences ventilation; Talk and abstract at: Reporting seminar at Reinhausen of the "Graduiertenkolleg: Organisation and Dynamics of Neuronal Networks" at the University of Göttingen, Germany.

Bustami, H. P., Hustert R. (2000): Typical ventilatory pattern of the intact locust is produced by the isolated CNS; J. Insect. Physiol. 46, 1285-1293.

Case J. F. (1957a): The median nerves and cockroach spiracular function; J. Insect. Physiol. 1, 85-94.

Case J. 1961. Organisation of the cockroach respiratory centre and effects of acids on an isolated insect respiratory centre. *Biological Bulletin*. 121:385.

Chapman, R. F. (1998): *The insects – Structure and function*. 4th edition; Cambridge University Press, 770 S.

Chappell, M. A.; Rogowitz, G. L. (2000): Mass, temperature and metabolic effects on discontinuous gas exchange cycles in eucalyptic-boring beetles (coleoptera: cerambycidae). *J. exp. Biol.* 203, 3809-3820.

Chown, S. L.; Holter, P. (2000): Discontinuous gas exchange cycles in *Aphodius fossor* (Scarabaeidae): a test of hypotheses concerning origins and mechanisms. *J. exp. Biol.* 203(2), 397-403.

Consoulas, C.; Hustert, R.: Effect of sensory stimulation on ventilation in the locust. Manuscript (unpublished data). University of Göttingen, Germany.

Dettner, K.; Peters, W. (1999): *Lehrbuch der Entomologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. 921 S.

Eckart, R. (1986): *Tierphysiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 697 S.

Fischer, H.; Schmidt, J.; Haas, R.; Büschges A. (2001): Pattern generation for walking and searching movements of a stick insect leg. I. Coordination of motor activity. *J. Neurophysiol.* 85, 341-353.

Frisch, M. (1993): *Modulation und Elemente des Rhythmusgenerators der Genitalkammer-Motorik im Terminalganglion der Grille Acheta domesticus*. Diplomarbeit am Institut f. Zoologie und Anthropologie der Universität Göttingen, AG Prof. Dr. R. Hustert.

Greenlee, K. J.; Harrison J. F. (1998): Acid-base and respiratory response to hypoxia in the grasshopper *Schistocerca americana*. *J. exp. Biol.* 201, 2843-2855.

Gulinson, S. L.; Harrison J. F. (1996): Control of resting ventilation rate in grasshoppers. *J. exp. Biol.* 199, 379-389.

Haddad, G. G.; Mellins, R. B. (1984): Hypoxia and respiratory control in early life. *Annu. Rev. Physiol.* 46, 629-643.

Harrison, J. F.; Phillips, J. E.; Gleeson, T. T. (1991): Activity physiology of the two striped grasshopper, *Melanoplus bivittatus*: gasexchange, hemolymph acid-base status, lactate production, and the effect of temperature. *Physiological Zoology* 64(2), 451-472.

Harrison, J. F. (1997): Ventilatory mechanism and Control in grasshoppers. *Amer. Zool.* 37, 73-81.

Harrison, J. F.; Hadley, Neil F.; Quinlan, M. C. (1995): Acid-base status and spiracular control during discontinuous ventilation in grasshoppers. *J. exp. Biol.* 198, 1755-1763.

Harrison, J. F.; Lighton, J. R. B. (1998): Oxygen-sensitive flight metabolism in the dragonfly *Erythemis simplicicollis*. *J. exp. Biol.* 201, 1739-1744.

Hazelhoff, E. H. (1927): Die Regulierung der Atmung bei Insekten und Spinnen. *Z. vergl. Physiol.* 5, 179-190.

Hedwig, B.; Pearson, K. G. (1984): Patterns of synaptic input to identified flight motoneurons in the locust. *J. Comp. Physiol.* 154 A, 745-760.

Henderson, D. R.; Johnson, S. M.; Prange, H. D. (1998): CO₂ and heat have different effects on directed ventilation behaviour of grasshoppers *Melanoplus differentialis*. *Respir. Physiol.* 114(3), 297-307.

Herreid, C. F.; Full, R. J. (1984): Cockroaches on a treadmill: aerobic running. *J. Insect. Physiol.* 30(5), 395-403.

Hughes G. M., Mill, P. J.: Patterns of ventilation in dragonfly larvae. J. exp. Biol. 52, 167-175.

Hustert, R. (1974): Morphologie und Atmungsbewegungen des 5. Abdominalsegments von *Locusta migratoria migratorioides*. Zool. Jb. Physiol. 78, 157-174.

Hustert, R. (1975): Neuromuscular Co-ordination and Proprioceptive Control of Rhythmical Abdominal Ventilation in intact *Locusta migratoria migratorioides*. J. Comp. Physiol. 97, 159-179.

Kestler, P. (1984): Respiration and respiratory water loss. Chap. 6. In: Environmental Physiology and Biochemistry of Insects. 1st ed. (Ed: Hoffmann, K. H.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 169-183.

Kestler, P.; Persijn, S. T.; Harren F. J. M. (2000): Simultaneous video microscopy and laserphotoacoustic measurements of H₂O loss and CO₂ release reveal the control strategies of spiracular gas exchange in resting insects. Talk and Abstract at the meeting of the German Zoological Society in Bonn (Germany). Symposium breathing and locomotion, Abstract band S. 30.

Kinnamon, S. C; Kammer, A. E.; Kiorpes, A. L. (1984): Control of ventilatory movements in the aquatic insect *Corydalis cornutus*: central effect of hypoxia. Physiological Entomology 9, 19-28.

Kinnamon, S. C; Kammer, A. E. (1983): Neural control of ventilatory movements in the aquatic insect *Corydalis cornutus*: the motor pattern. J. Comp. Physiol. 153, 543-555.

Komatsu, A. (1982): Respiratory nervous activity in the isolated nerve cord of the larval dragonfly, and location of the respiratory oscillator. Physiological Entomology 7, 183-191.

- Komatsu, A. (1984): Ascending interneurons that convey a respiratory signal in the central nervous system of the dragonfly larva. *J. Comp. Physiol.* 154, 331-340.
- Koshiya, N.; Smith, Jeffrey C. (1999): Neuronal pacemaker for breathing in vitro. *Nature* 400, 360-363.
- Krolikowski, K.; Harrison, J. F. (1996): Haemolymph acid-base status, tracheal gas levels and the control of postexercise ventilation rate in grasshoppers. *J. exp. Biol.* 199, 391-399.
- Lange, S.; Persijn, S. T.; Harren F. J. M.; Kestler, P. (2000): Spiracular control of CO₂ release in *Romalea guttata* (Acrididae) as a function of ambient temperature and dehydration. Talk and Abstract at the meeting of the German Zoological Society in Bonn (Germany). Symposium breathing and locomotion, Abstract band S. 36.
- Lehmann, F. O. (2000): The control of spiracle opening in flying insects. Talk and Abstract at the meeting of the German Zoological Society in Bonn (Germany). Symposium breathing and locomotion, Abstract band S. 37.
- Lewis, G. W., Miller, P. L., Mills, P. S. (1973): Neuro-muscular mechanisms of abdominal pumping movements in the locust. *J. exp. Biol.* 59, 149-168.
- Lighton, J. R. B. (1988): Simultaneous measurement of oxygen uptake and carbon dioxide emission during discontinuous ventilation in the tok-tok beetle *Psammodes striatus*. *The J. Insect. Physiol.* 34, 361-367
- Lighton, J. R. B. (1990): Slow discontinuous ventilation in the namib dune-sea ant *Camponotus detritus* (Hymenoptera, Formicidae). *J. exp. Biol.* 151, 71-82.
- Lighton, J. R. B.; Lovegrove, B. G. (1990): A temperature-induced switch from diffusive to connective ventilation in the honeybee. *J. exp. Biol.* 154, 509-516.
- Lighton, J. R. B.; Berrigan, D. (1995): Questioning paradigms: caste-specific ventilation in harvester ants, *Messor pergandei* and *M. julianus* (Hymenoptera: Formicidae). *J. exp. Biol.* 198, 521-530.

Louw, G. N.; Nicolson, S. W.; Seely, M. B. (1986): Short Communication: Respiration beneath desert sand: Carbon dioxide diffusion and respiratory patterns in a tenebrionid beetle, *J. exp. Biol.* 120, 443-447.

Miller, P. L (1960a): Respiration in the desert locust; I. The control of ventilation. *J. exp. Biol.* , 224-236.

Miller, P. L (1964): Factors altering spiracle control in adult dragonflies: hypoxia and temperature. *J. exp. Biol.* 41, 345-357.

Otto, D.; Janiszewski, J. (1989): Interneurones originating in the suboesophageal ganglion that control ventilation in two cricket species: effects of the interneurones (sd-ae) on the motor output. *J. Insect. Physiol.* 35(6), 483-491.

Pearson, K. G. (1980): Burst generation in coordinating interneurons of the ventilatory system of the locust. *J. Comp. Physiology* 137, 305-313.

Pearson, K. G. ; Hedwig, B. ; Wolf H. (1989): Are the hindwing chordotonal organs elements of the locust flight pattern generator? *J. exp. Biol.* 144, 235-255.

Pitmann, R. M. (1972): Branching of central neurones: Intracellular cobalt injection for light and electron microscopy. *Science* 172, 412-414

Prange, Henry D. (1990): Temperature regulation by respiratory evaporation in grasshoppers. *J. exp. Biol.* 154, 463-474.

Punt, A.; Parser, W. J.; Kuchlein, J. (1957): Oxygen uptake in insects with cyclic CO₂-release. *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole* 112, 108-119.

Quinlan, M. C., Hadley , N. F. (1993): Gas exchange, ventilatory patterns and water loss in two lubber Grasshoppers: quantifying cuticular and respiratory transpiration. *Physiological Zoology* 66, 628-642.

Quinlan, M. C., Lighton, John R.B. (1999): Respiratory physiology and water relations of three species of *Pogonomyrmex* harvester ants (Hymenoptera: Formicidae). *Physiological entomology* 24-4, 293-302.

Ramirez, J. M.; Pearson, K. G. (1989): Distribution of intersegmental interneurons that can reset the respiratory rhythm of the locust. *J. exp. Biol.* 141, 151-176.

Ramirez, J. M.; Quellmalz, U.J.A.; Wilken B. (1997): Developmental changes in the hypoxic response of the hypoglossus respiratory motor output in vitro. *J. Neurophysiol.* 78: 383-392.

Ramirez, J. M. (1998): Reconfiguration of the respiratory network at the onset of locust flight. *J. Neurophysiol* 80, 3137-3147.

Ramirez, J. M.; Elsen, F. P., Robertson, R. M. (1999): Long-term effects of prior heat on neuronal potassium currents recorded in a novel insect ganglion slice preparation. *J. Neurophysiol.* 81:795-802, 1999.

Richter, D. W.; Bischof, A., Anders, K.; Bellingham, M.; Windhorst, U.: Response of the medullary respiratory network of the cat to hypoxia. *J. Physiol. (Lond.)* 443, 231-256.

Robertson, M. (1986): Neuronal circuits controlling flight in the locust: central generation of the rhythm. *Trends in Neuroscience*, June 1986, 278-280.

Ronacher, B.; Wolf, H.; Reichert, H. (1988): Locust flight behavior after hemisection of individual thoracic ganglia: evidence for hemiganglionic premotor centers. *J. Comp. Physiol.*, 163A:749-759.

Rose, U.; Seeböhm, G.; Hustert, R. (2000): The role of internal pressure and muscle activation during locust oviposition. *J. Insect. Physiol.* 46, 69-80.

Schmidt, J.; Fischer, H.; Büschges, A. (2001): Pattern generation for walking and searching movements of a stick insect leg. II. Control of motoneuronal activity. *J. Neurophysiology* 85, 354-361.

Schneidermann, H. A. (1956): Spiracular control of discontinuous respiration in insects. *Nature* 177, 1169-1171.

Selverston, A. I.; Moulin, M. (1986): *The Crustacean Stomatogastric System*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. 338 S.

Slama, K.; Coquillaud, M.-S. (1992): Homeostatic control of respiratory metabolism in beetles. *J. Insect. Physiol.* 38(10), 783-791.

Snodgrass R. E. (1935): *Principles of Insect morphology*. Mc-Graw-Hill. New York.

Taylor, E. W. (1982): Control and co-ordination of ventilation and circulation in crustaceans: responses to hypoxia and exercise. *J. exp. Biol.* 100, 289-319.

Tonner, F. (1936): Mechanik und Koordination der Atem- Schwimmbewegung bei Libellenlarven. *Z. wiss. Zool.* 147, 433-54.

Treherne, J. E.; Schofield, P. K. (1981): Mechanisms of ionic homeostasis in the central nervous system of an insect. *J. exp. Biol.* 95, 61-73.

Vanselow, J.; Wobschall A.; Persijn, S., Harren, F.; Hetz, S. K.; Wehner, R. (2000): The effect of temperature and activity on respiration and water loss in free running desert ants (*Cataglyphis bicolor*). Talk and Abstract at the meeting of the German Zoological Society in Bonn (Germany). Symposium breathing and locomotion, Abstract Band S. 56.

Weis-Fogh, T. (1967): Respiration and tracheal ventilation in locusts and other flying insects. *J. exp. Biol.* 47, 561-587.

Wilkinson. L. (1989): *SYSTAT: The system for statistics*. Evanston, IL: Systat, Inc.

Williams, A. E.; Rose, M. R.; Bradley, T. J. (1998): CO₂ release patterns in *Drosophila melanogaster*: the effect of selection for desiccation resistance. *J. exp. Biol.* 200, 615-624.

Williams, A. E.; Bradley, T. J. (1998): The effect of respiratory pattern on water loss in desiccation-resistant *Drosophila melanogaster*. *J. exp. Biol.* 201, 2953-2959.

Wobschall, A.; Persijn, S.; Heisler, N.; Hetz, S. K. (2000): Respiration and respiratory water loss in pupae of the giant mealworm (*Zophobas rugipes*). Talk and Abstract at the meeting of the German Zoological Society in Bonn (Germany). Symposium breathing and locomotion, Abstract Band S. 62.

Zigmond, M. J.; Bloom, F. E.; Landis, S. C.; Roberts, J. L.; Squire, L. R. (1999): *Fundamental neuroscience - Chapter 40: Neural control of breathing*; Academic press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto; 1600 S.

6. Zusammenfassung

Ventilation und zugrundeliegende neuronale Rhythmogenese bei Insekten wurden am Beispiel verschiedener Heuschreckenarten (*Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Schistocerca americana* und *Taeniopoda eques*) auf der Verhaltensebene, auf extrazellulärer und intrazellulärer Ebene sowie durch neuroanatomische Arbeiten untersucht.

Färbungen mit CoCl₂ zeigten Verlauf und Lage von potentiellen ventilatorischen Interneuronen im Metathorakalganglion auf. Genauer konnte ein vermutliches ventilatorisches intersegmentales Interneuron aufgrund seiner Lage und anatomischen Struktur dargestellt werden.

Zur Lokalisierung möglicher Rezeptoren auf der Ganglienoberfläche, die Atemgaskonzentration in der Hämolymphe messen, wurden Färbungen des Neurilemms mittels Farbstoff gekoppeltem Dextran durchgeführt. Angefärbte Zellen zeigten einen neuritenähnlichen Fortsatz, der in das Ganglion hineinführt. Potentiell sind dies Rezeptoren, die sich ändernde Partialdrücke im umgebenden Medium wahrnehmen könnten (s.u.).

Um von sensorischen und metabolischen Einflüssen ungestörte ventilatorische Muster zu finden, wurde ein isoliertes Präparat eines „atemaktiven“ Heuschrecken-ZNS (Mesothorakalganglion- 1. freies Abdominalganglion) entwickelt. In Langzeitableitungen wurden die auftretenden efferenten ventilatorischen Muster registriert, wie in intakten Tieren. Es zeigte sich eine hohe Bandbreite ventilatorischer Muster in Abhängigkeit von Temperatur, vorherigem Erregungszustand der Tiere, sowie der Sauerstoffversorgung des Ganglions. Zwei Extremformen (mit Übergangsformen) traten auf: kontinuierliche, oft hochfrequente Stressatmung und diskontinuierliche niederfrequente Ruheatmung (oft in Form insektentypischer Gruppenatmung) mit langen Pausen zwischen zwei Burstgruppen. Deutlich konnten charakteristische diskontinuierliche Atmungsmuster beobachtet werden, wenn am isolierten ZNS die ventrale tracheale Versorgung beibehalten wurde, indem Kontakt zur Atmosphäre bestand. Im Vergleich zur Atmung in verschiedensten Insektenpezies, konnte gezeigt werden, daß typische ventilatorische Verhaltensweisen offensichtlich intrinsisch im ZNS von Insekten erzeugt werden.

Experimente zu Atemgassensivität des isolierten ZNS zeigten, daß für Partialdrücke von CO₂ und Sauerstoff *Taeniopoda eques* und *Schistocerca americana* sowohl im intakten Tier als auch im isolierten Präparat (mit und auch ohne tracheale Versorgung) ein signifikanter Zusammenhang zwischen sinkenden Partialdrücken und steigenden ventilatorischen Frequenzen besteht. Dies weist deutlich auf eine Art von Sauerstoffrezeptor im Ganglion hin, der erstmals direkt im ZNS terrestrischer Insekten nachgewiesen werden konnte. Dabei könnte es sich um einen Chemorezeptor aber auch um eine sauerstoffsensitive Sinneszelle handeln (s.o.). Sauerstoffbegasung des isolierten ZNS führte in einem spezifischen Neuron zur Entstehung ventilatorischer Rhythmen.

Intrazelluläre Ableitungen und Färbungen mit Lucifer Yellow wurden von ventilatorischen Interneuronen im Bereich der Neuomere (insbesondere im Bereich des 1. Neuomers) des Metathorakalganglions durchgeführt. Gearbeitet wurde im semiintakten Präparat und im isolierten ZNS mit intakter trachealer Versorgung. Im

semiintakten Präparat konnten zwei bisher nicht bekannte Interneurone identifiziert werden, eines davon ein lokales Interneuron, für Heuschrecken erstmals nachgewiesen. Im isolierten ZNS erfolgte die Ableitung und Färbung von weiteren insgesamt 8 Interneuronen, zusammen die ventilatorischen Interneurone 1-10 (VentIN1-10). Es wurden folgende Kategorien von Interneuronen unterschieden: "zum CPG korrelierte", "Komponenten (Teile) des CPG" und "verschaltend zu anderen Netzwerken". Besonders VentIN4 und VentIN5 erbrachten neue Erkenntnisse zur ventilatorischen Rhythmogenese im Insektennervensystem.

Ein Mehrebenenmodell ventilatorischer Rhythmogenese wird vorgeschlagen:

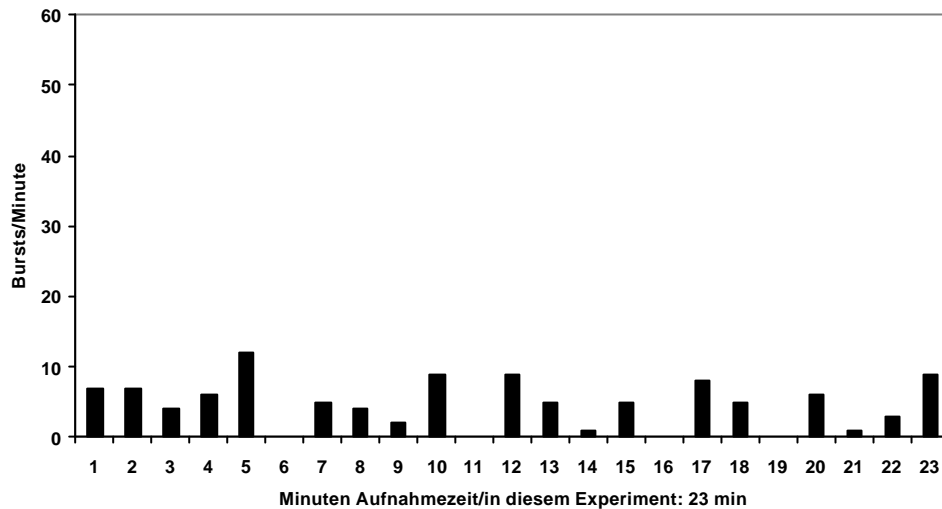
Ein Kernnetzwerk von Interneuronen im Metathorakalganglion erzeugt einen kontinuierlichen synaptischen Ausgang in Form von EPSPs auf nachgeschaltete Interneurone, die variabel überschwellig aktiviert werden können und ihrerseits inhibitorisch oder excitatorisch rückgekoppelt wirken auf das Kernnetzwerk. Diese Interneurone wiederum könnten auf sekundäre (tertiäre) Interneurone in den Abdominalganglien aufschalten, welche dann die ventilatorischen Motoneurone synaptisch versorgen. Sensorische und metabolische Einflüsse, die im isolierten ZNS weitestgehend ausgeschaltet sind, sollten im intakten Tier „von außen“ dieses Netzwerk modulieren. Tonisch aktive Interneurone verschalten auf andere ankoppelbare rhythmische Systeme (Häutung, Defäkation oder auch Flug, Laufen, Stridulieren) und treiben zusätzlich das Kernnetzwerk.

7. Anhang

- I. Frequenzhistogramme der Daueraufzeichnungen efferenter ventilatorischer Aktivität von *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Taeniopoda eques* u. *Anacridium aegypticum*

A

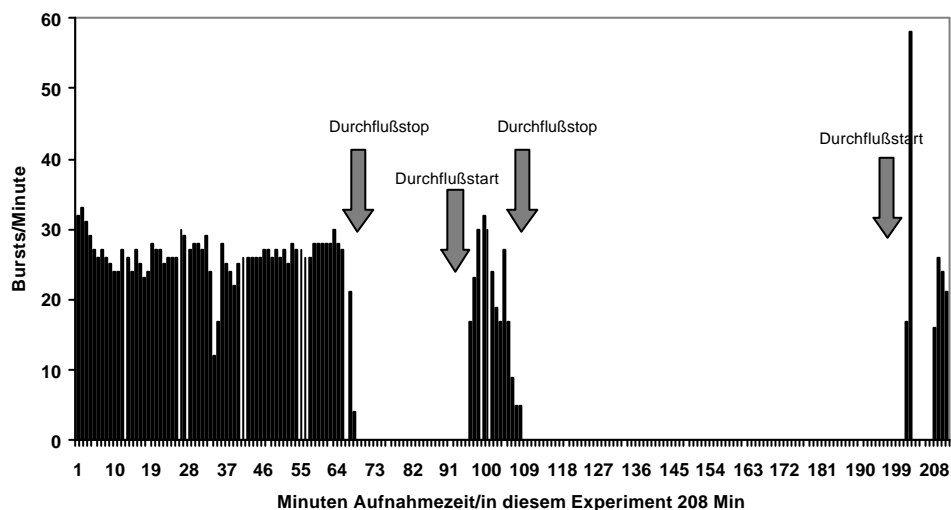
Locusta migratoria



Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Locusta migratoria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. In der Aufnahme tritt diskontinuierliche Atmung auf, bei niedrigen Burstfrequenzen. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

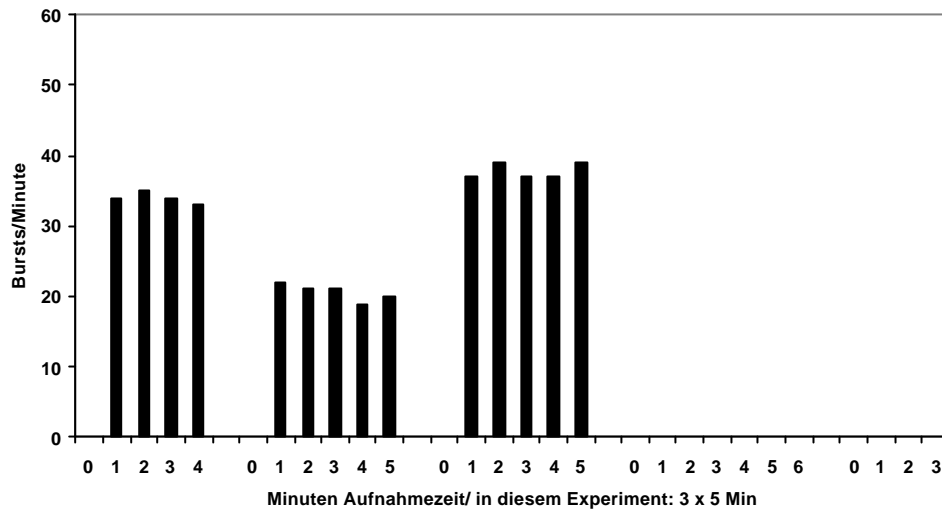
B

Locusta migratoria



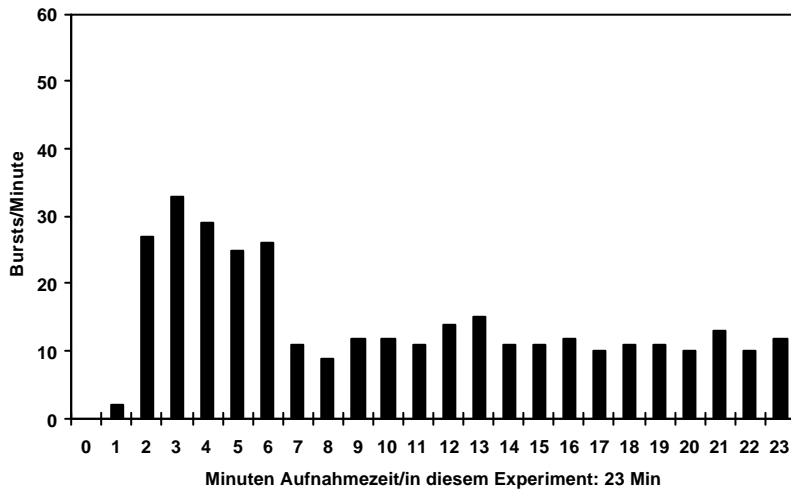
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Locusta migratoria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. Die gepunkteten Pfeile zeigen an, wenn am Durchfluß des oxygenierten Ringers Änderungen vorgenommen wurden. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

C

Locusta migratoria

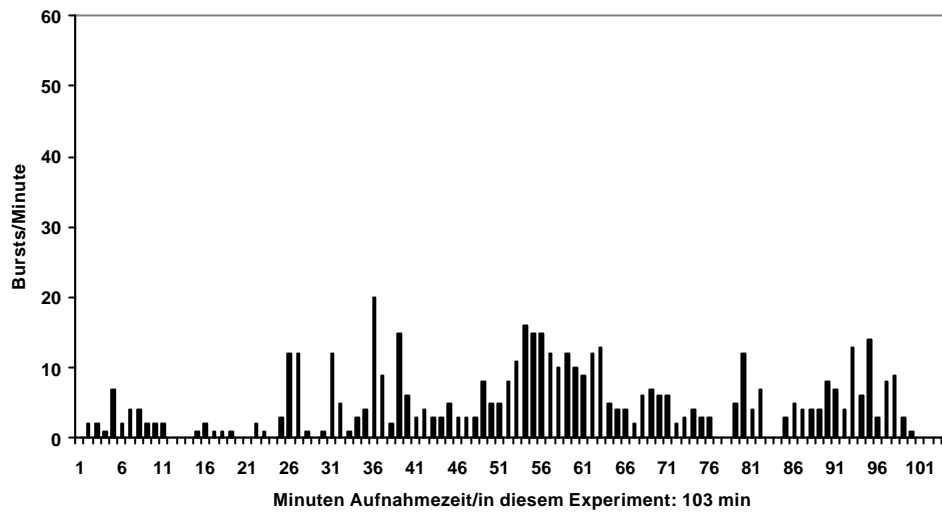
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median-oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Locusta migratoria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. Hier erfolgten drei mal fünf Minutenaufnahmen, mit Pausen von jeweils 10 Minuten dazwischen. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

D

Locusta migratoria

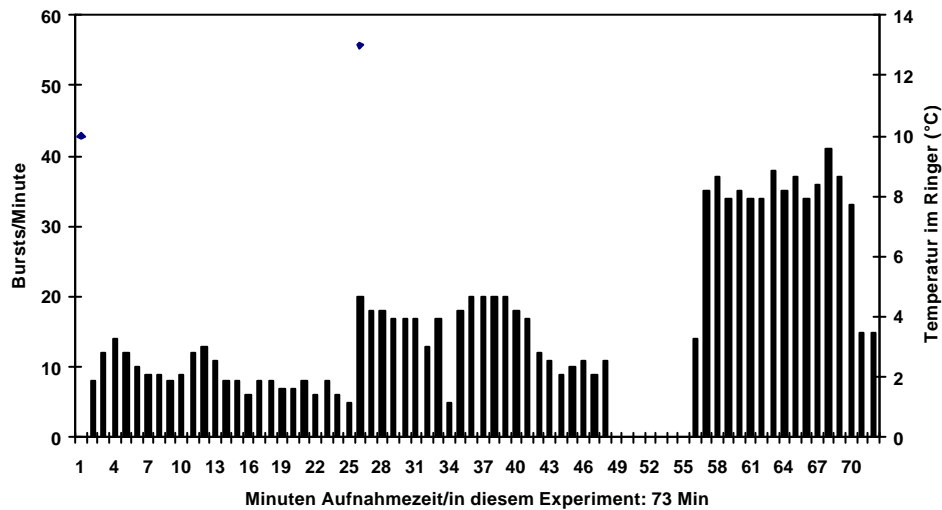
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median-oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Locusta migratoria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

E

Locusta migratoria

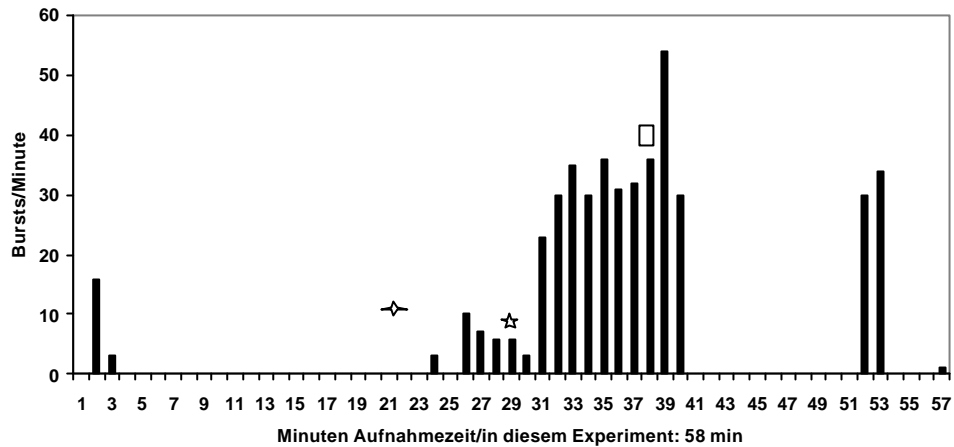
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Locusta migratoria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. In der Aufnahme tritt diskontinuierliche Atmung auf, bei niedrigen Burstfrequenzen. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

F

Locusta migratoria

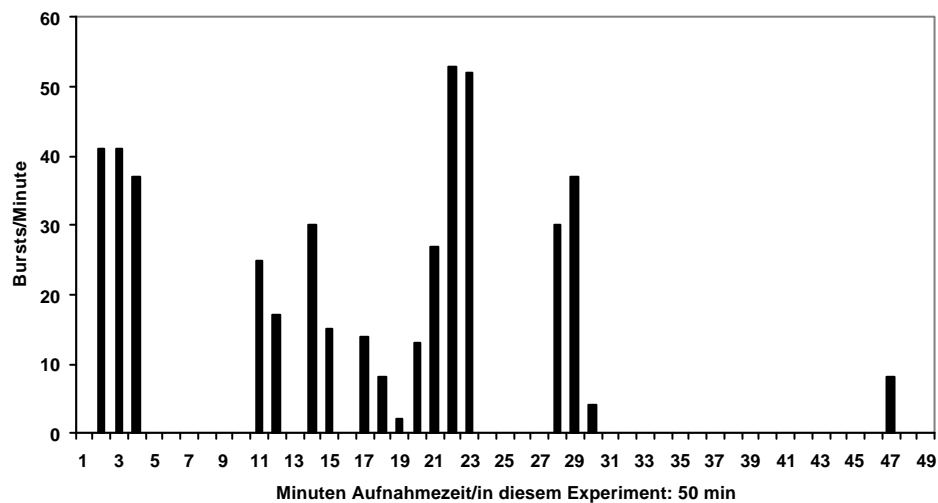
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Locusta migratoria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt. Rechte Ordinate: Temperatur, Diamantensymbol.

G

Locusta migratoria

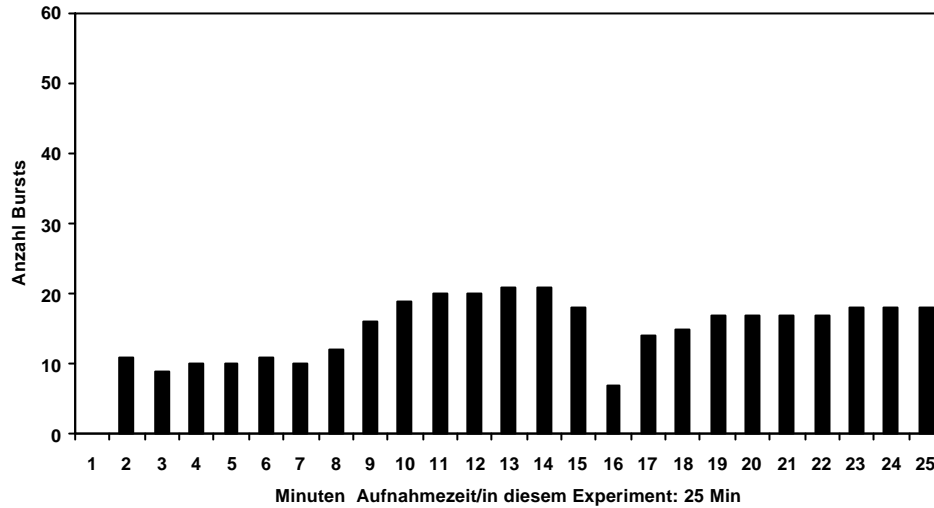
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median-oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Locusta migratoria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt. Rechte Ordinate: Temperatur, Diamantensymbol. Vierzackenstern: CO₂-Zugabe zum Ringer, Fünzfackenstern: Absenkung Ringerspiegel, dadurch mehr CO₂-Kontakt, Rechteck: Austausch Ringer durch O₂-reichen Ringer.

H

Locusta migratoria

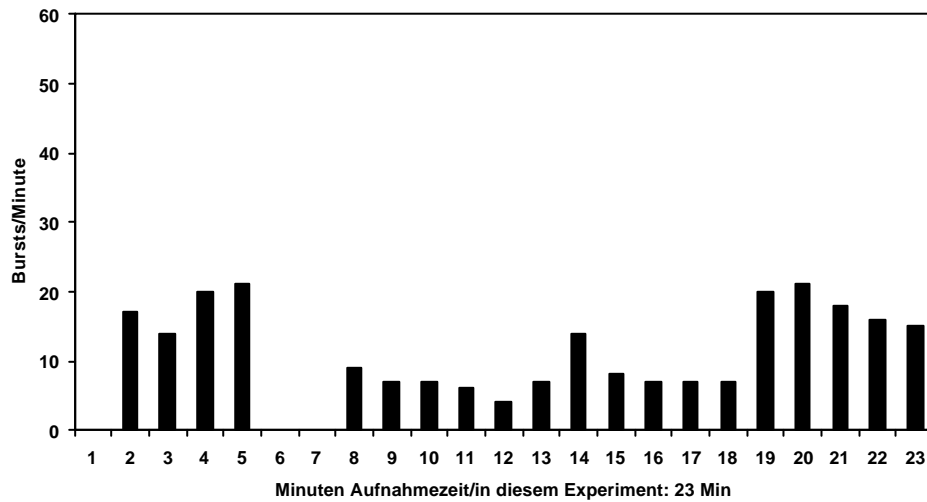
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median-oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Locusta migratoria*. In der Aufnahme tritt diskontinuierliche Atmung auf, bei z.T. hohen Burstfrequenzen. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

I

Locusta migratoria

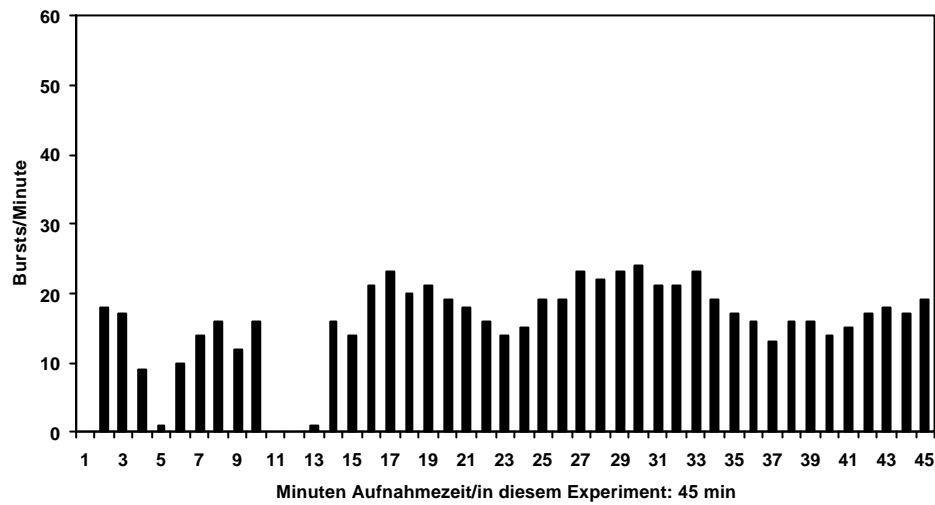
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median-oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Locusta migratoria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

J

Schistocerca gregaria

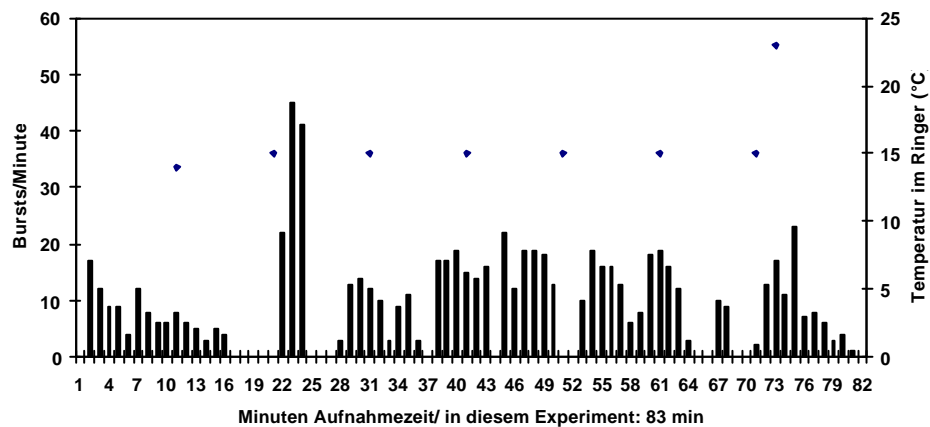
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median-oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Schistocerca gregaria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

K

Schistocerca gregaria

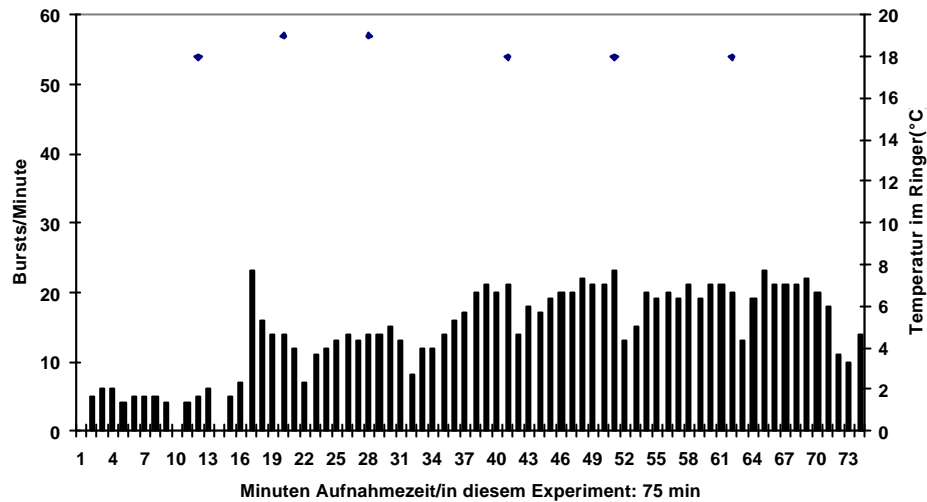
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken-ZNS von *Schistocerca gregaria*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

L

Taeniopoda eques

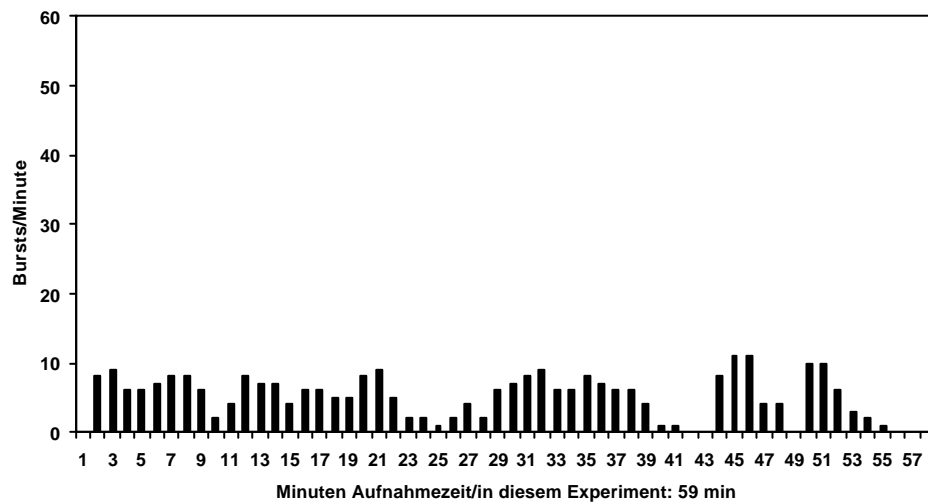
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im Heuschrecken-ZNS von *Taeniopoda eques*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. In der Aufnahme tritt diskontinuierliche Atmung auf. Die kontinuierlichen Abschnitte zeigen unregelmäßige Oszillationen von hohen zu niedrigen und wieder zu hohen Frequenzen. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt. Diamantensymbol: Temperatur, Skala = rechte y Achse.

M

Taeniopoda eques

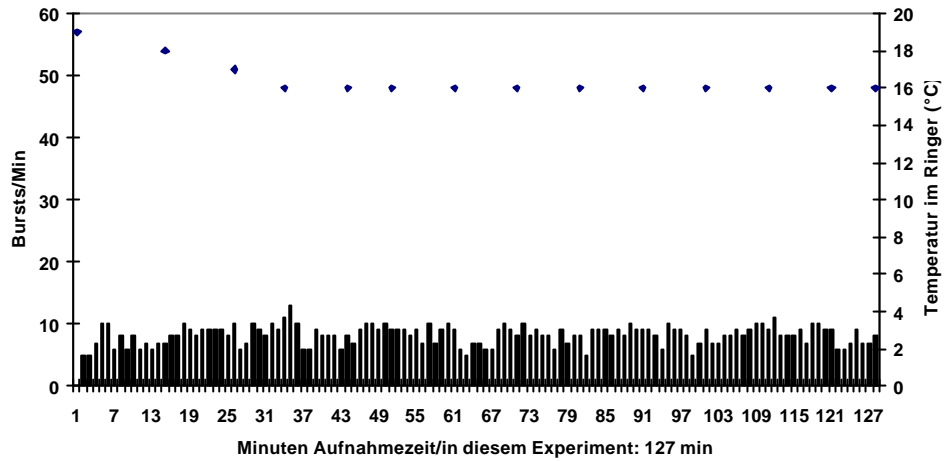
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im Heuschrecken-ZNS von *Taeniopoda eques*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. In der Aufnahme tritt zu Beginn diskontinuierliche Atmung auf. Die kontinuierlichen Abschnitte zeigen unregelmäßige Oszillationen von hohen zu niedrigen und wieder zu hohen Frequenzen. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt. Diamantensymbol: Temperatur, Skala = rechte y-Achse.

N

Taeniopoda eques

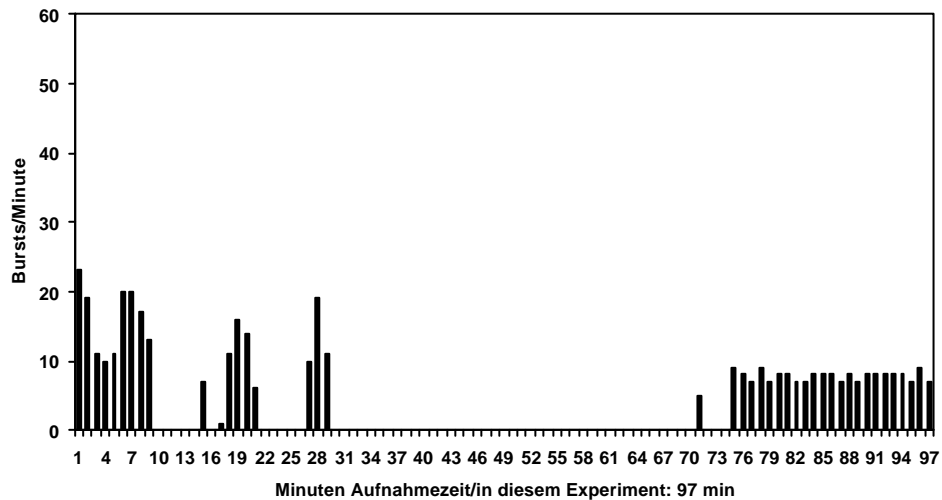
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im Heuschrecken-ZNS von *Taeniopoda eques*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. In der Aufnahme tritt zum Ende diskontinuierliche Atmung auf. Die kontinuierlichen Abschnitte zeigen unregelmäßige Oszillationen von hohen zu niedrigen und wieder zu hohen Frequenzen. Die Frequenzen sind sehr niedrig insgesamt. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

O

Taeniopoda eques

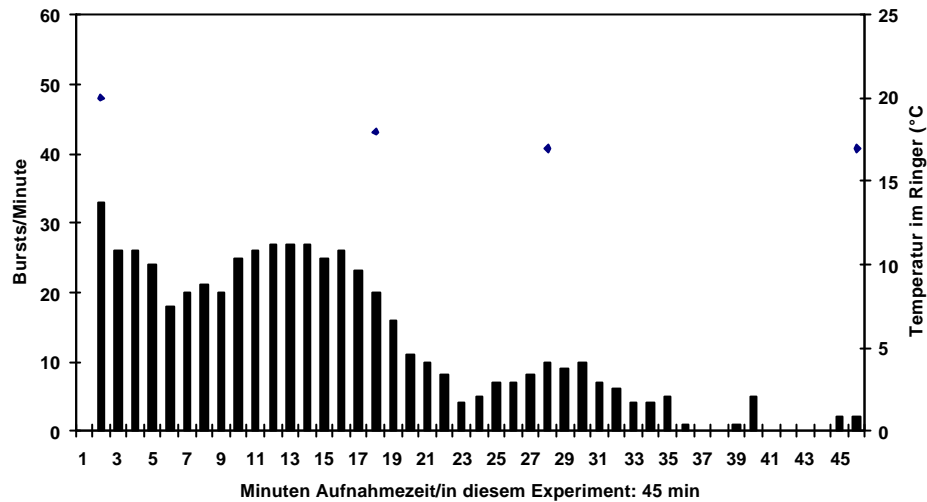
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median-oder Ventralnerv) im Heuschrecken-ZNS von *Taeniopoda eques*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. In der Aufnahme tritt keine diskontinuierliche Atmung auf. Die kontinuierlichen Abschnitte zeigen unregelmäßige Oszillationen von hohen zu niedrigen und wieder zu hohen Frequenzen. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt. Diamantensymbol: Temperatur, Skala = rechte y-Achse.

P

Taeniopoda eques

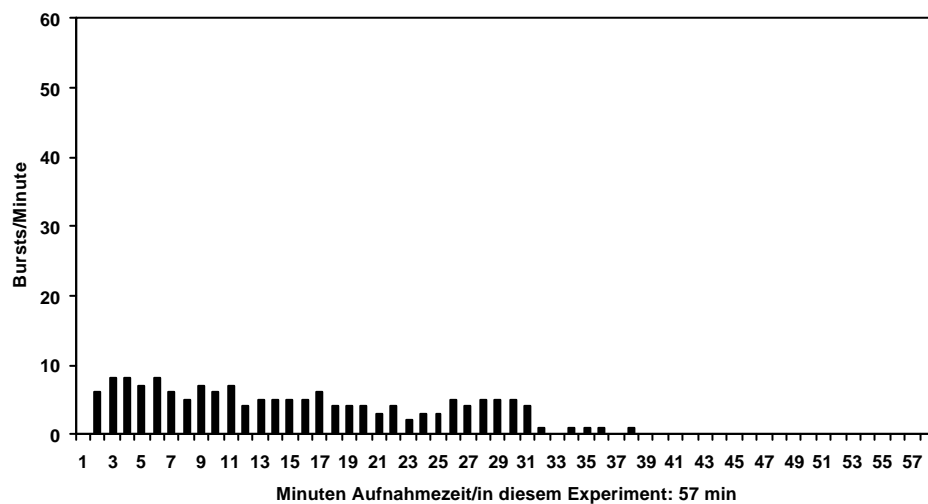
Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median-oder Ventralnerv) im Heuschrecken-ZNS von *Taeniopoda eques*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. In der Aufnahme tritt diskontinuierliche Atmung auf. Auffällig ist die lange Pause ohne ventilatorische Aktivität. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt.

Q

Taeniopoda eques

Ventilatorische Aktivität einer Langzeitaufnahme efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im Heuschrecken-ZNS von *Taeniopoda eques*. Sequentielles Frequenzhistogramm von Bursts/Minute. In der Aufnahme tritt nur zum Ende diskontinuierliche Atmung auf. Die kontinuierlichen Abschnitte zeigen unregelmäßige Oszillationen von hohen zu niedrigen und wieder zu hohen Frequenzen, werden aber immer niedriger. Die Experimente fanden bei Raumtemperatur statt. Diamantensymbol: Temperatur, Skala = rechte y-Achse.

R

Anacridium ägypticum

Ventilatorische Aktivität von Langzeitaufnahmen efferenter Nerven (metathorakaler Median- oder Ventralnerv) im isolierten Heuschrecken ZNS von *Anacridium ägypticum* (Wildfang aus dem Libanon). Sequentielles Frequenzhistogramm (Bursts/Minute).

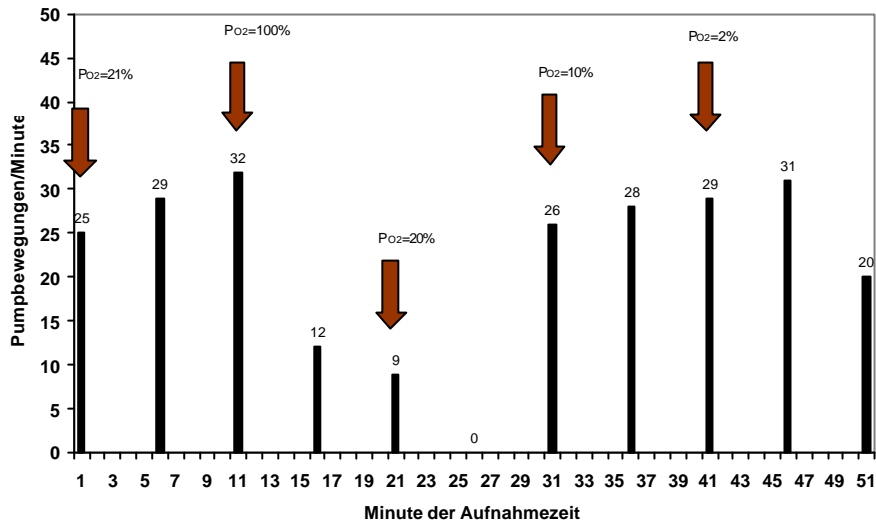
II. Frequenzhistogramme* der Daueraufzeichnungen efferenter ventilatorischer Aktivität im isolierten ZNS (mit und ohne tracheale Versorgung) unter dem Einfluß verschiedener Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke bei *Taeniopoda eques* und *Schistocerca americana*

*Jeder Großbuchstabe kennzeichnet jeweils den Verlauf eines Experiments. Zur besseren Übersichtlichkeit sind je 2 Experimente in einer Legende kombiniert

a. Einfluß von Sauerstoffpartialdrücken im intakten Tier

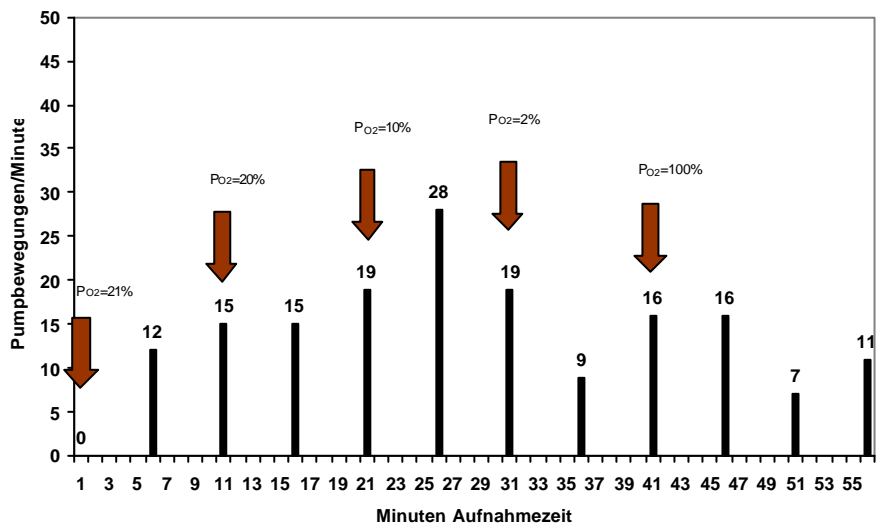
A

Intaktes Tier (*Taeniopoda eques*)



B

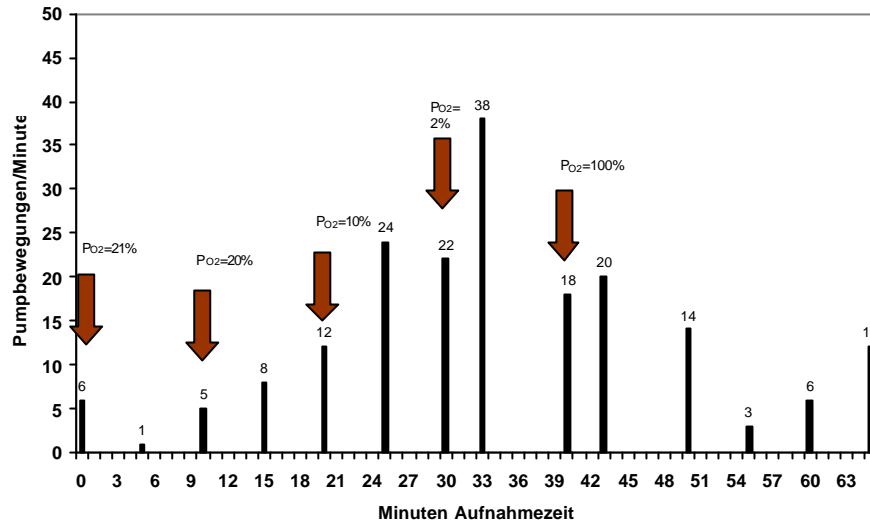
Intaktes Tier (*Taeniopoda eques*)



Ventilatorische Aktivität des "Pferdefaulpelzgrahüpfers" *Taeniopoda eques*. Sequentielles Frequenzhistogramm von abdominalen Pumpbewegungen/Minute (Säulen) unter variierenden Partialdrücken (in %) von Sauerstoff (PO₂). Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - die die Kammer mit dem Tier durchströmen - ist durch die senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke steigern die Ventilation und hohe senken die ventilatorische Aktivität. Basis des Gasgemisches war N₂.

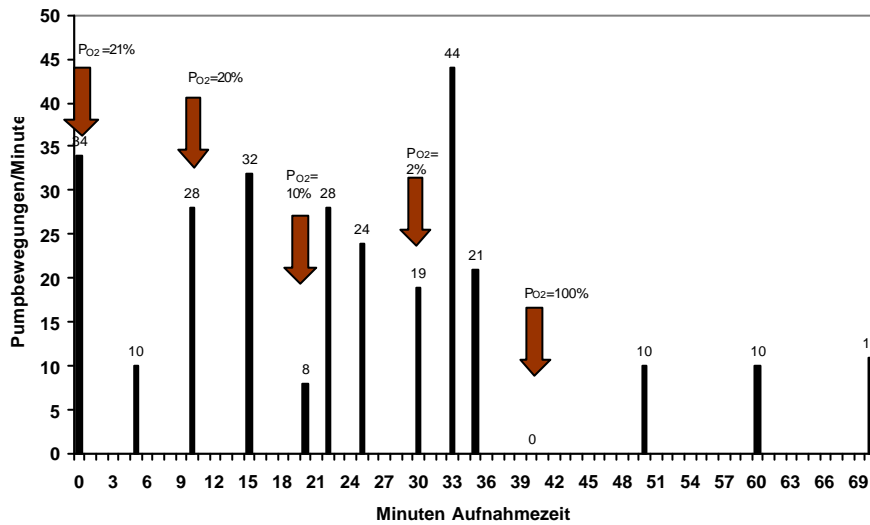
C

Intaktes Tier (*Taeniopoda eques*)



D

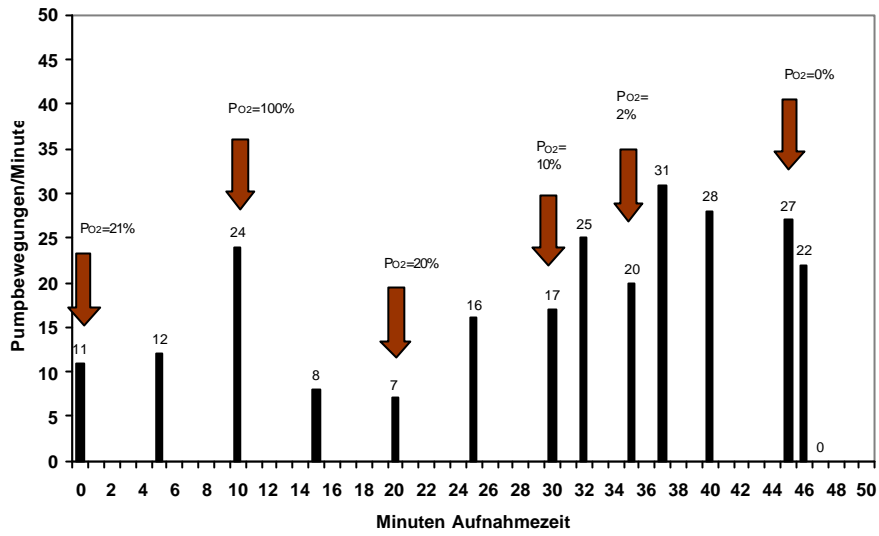
Intaktes Tier (*Taeniopoda eques*)



Ventilatorische Aktivität des "Pferdefaulpelzgrahüpfers" *Taeniopoda eques*. Sequentielles Frequenzhistogramm von abdominalen Pumpbewegungen/Minute (Säulen) unter variierenden Partialdrücken (in %) von Sauerstoff (PO₂). Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - die die Kammer mit dem Tier durchströmen - ist durch die senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke steigern die Ventilation und hohe senken die ventilatorische Aktivität. Basis des Gasgemisches war N₂.

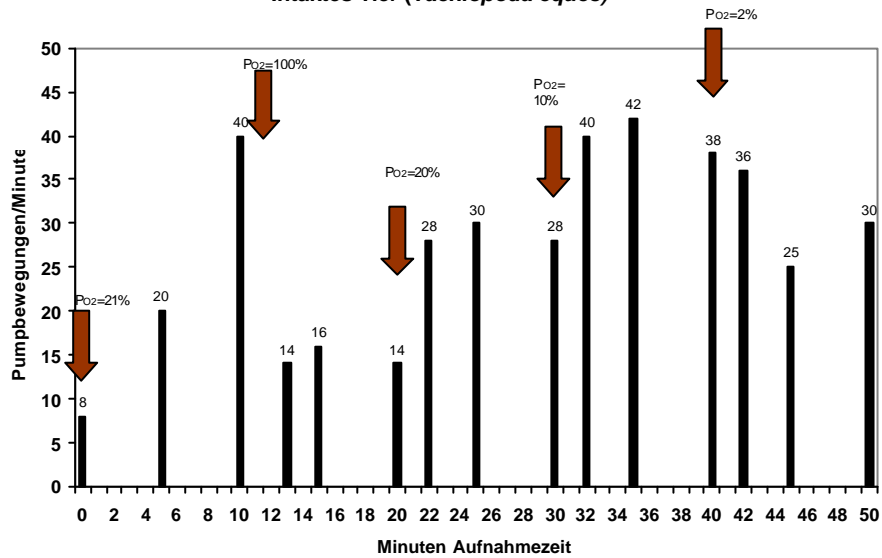
E

Intaktes Tier (*Taeniopoda eques*)



F

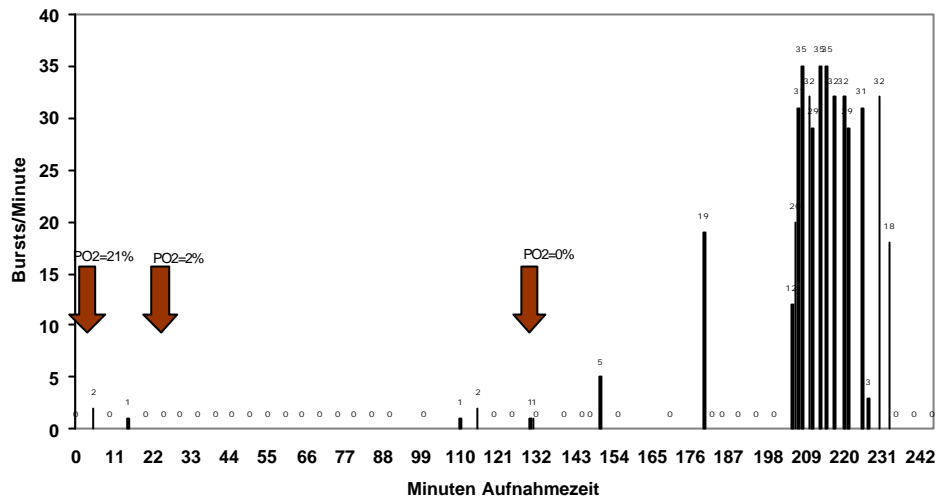
Intaktes Tier (*Taeniopoda eques*)



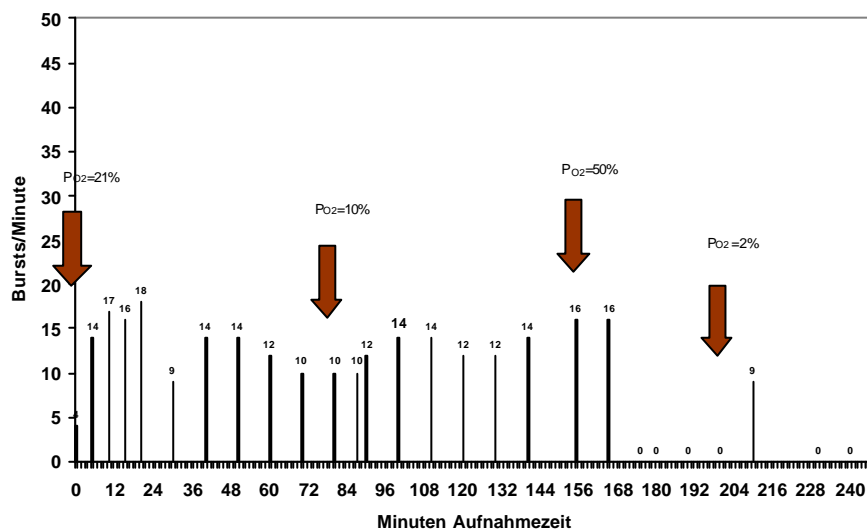
Ventilatorische Aktivität des "Pferdefaulpelzgrahüpfers" *Taeniopoda eques*. Sequentielles Frequenzhistogramm von abdominalen Pumpbewegungen/Minute (Säulen) unter variierenden Partialdrücken (in %) von Sauerstoff (PO₂). Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - die die Kammer mit dem Tier durchströmen - ist durch die senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke steigern die Ventilation und hohe senken die ventilatorische Aktivität. Basis des Gasgemisches war N₂.

b. Einfluß von Sauerstoffpartialdrücken im isolierten ZNS mit trachealer Versorgung

A

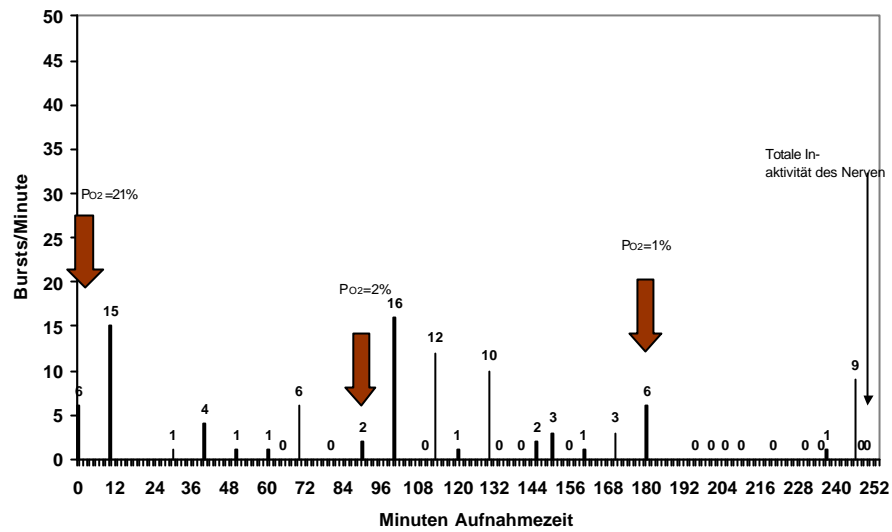
Isoliertes ZNS mit trachealer Versorgung (*Taeniopoda eques*)

B

Isoliertes ZNS mit intakter trachealer Versorgung (*Taeniopoda eques*)

Efferente ventilatorische Aktivität in isolierten ZNS mit intakter trachealer Versorgung - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - des "Pferdefaulpelzgrashüpfers" *Taeniopoda eques*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Sauerstoffpartialdrücken. Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - die Petrischale mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke steigern die Ventilation bis auf z. T. stundenlange Inaktivität. In **A** bewirkte erst die Herabsetzung des Sauerstoffpartialdrucks auf 0% (mit langer Verzögerung) einen deutlichen Effekt. Dies könnte auf die in den Tracheen gespeicherte Luft zurückzuführen sein und deutet gleichzeitig auf hohe Hypoxietoleranz des ZNS hin. In **B** zeigt sich bei 50% ein deutlicher frequenzmindernder Effekt, wohingegen niedrige Partialdrücke keinen deutlichen Effekt bewirken. Basis des Gasgemisches war N₂.

C

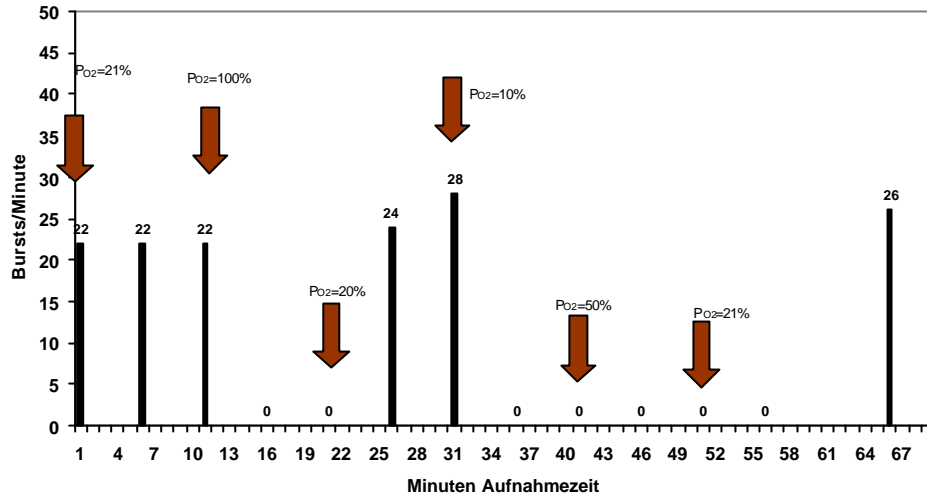
Isoliertes ZNS mit intakter trachealer Versorgung (*Taeniopoda eques*)

Efferente ventilatorische Aktivität in einem isolierten ZNS mit intakter trachealer Versorgung - aufgenommen von einem Median-oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - des "Pferdefaulpelzgrashüpfers *Taeniopoda eques*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Sauerstoffpartialdrücken. Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - die Petrischale mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Basis des Gasgemischs war N_2 .

c. Einfluß von Sauerstoffpartialdrücken im isolierten ZNS ohne tracheale Versorgung

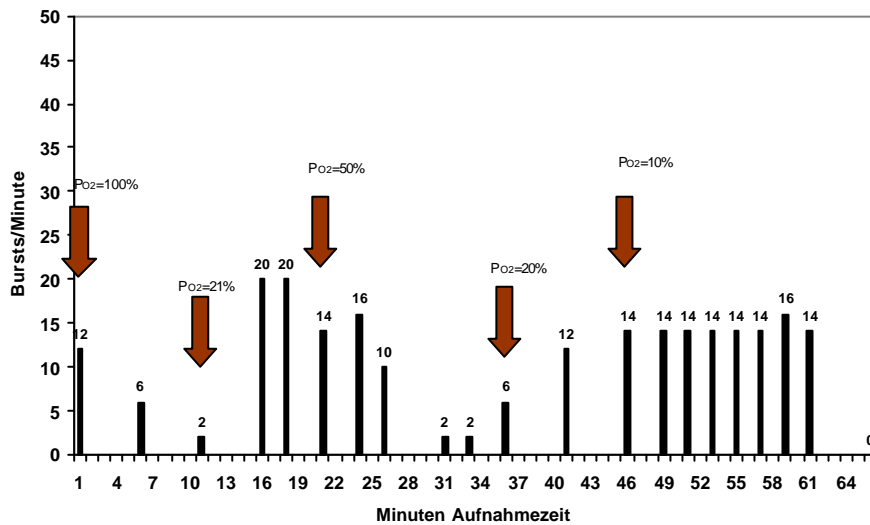
A

Isoliertes ZNS (*Taeniopoda eques*)



B

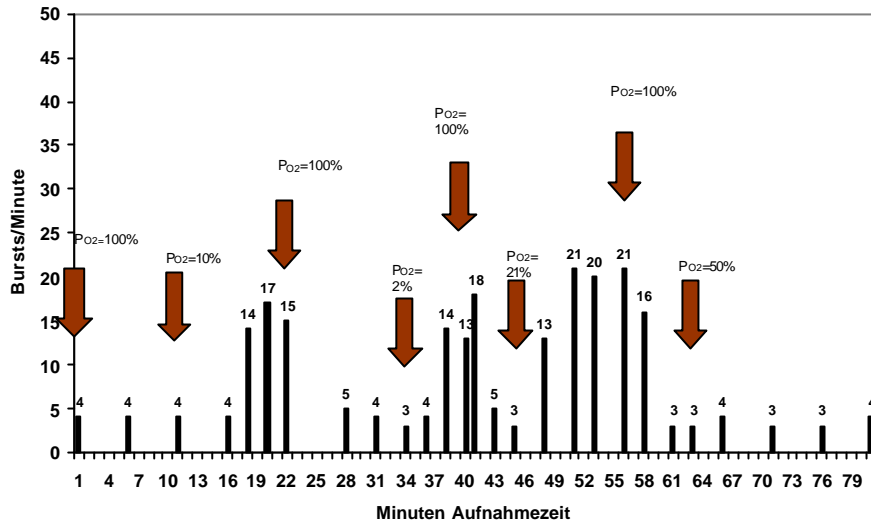
Isoliertes ZNS (*Taeniopoda eques*)



Efferente ventilatorische Aktivität in isolierten ZNS - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - des "Pferdefaulpelzgrashüpfers" *Taeniopoda eques*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Sauerstoffpartialdrücken. Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - die Petrischale mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke steigern die Ventilation und hohe senken die ventilatorische Aktivität. Basis des Gasgemisches war N_2 .

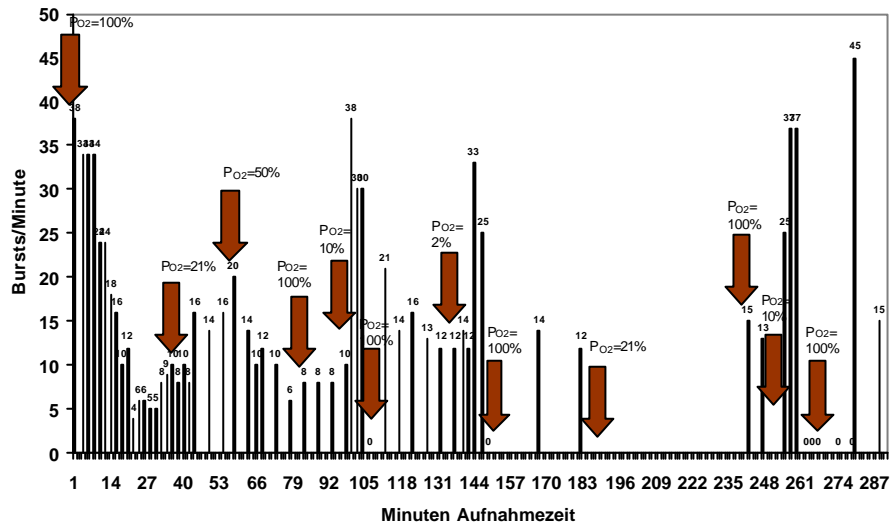
C

Isoliertes ZNS (*Taeniopoda eques*)



D

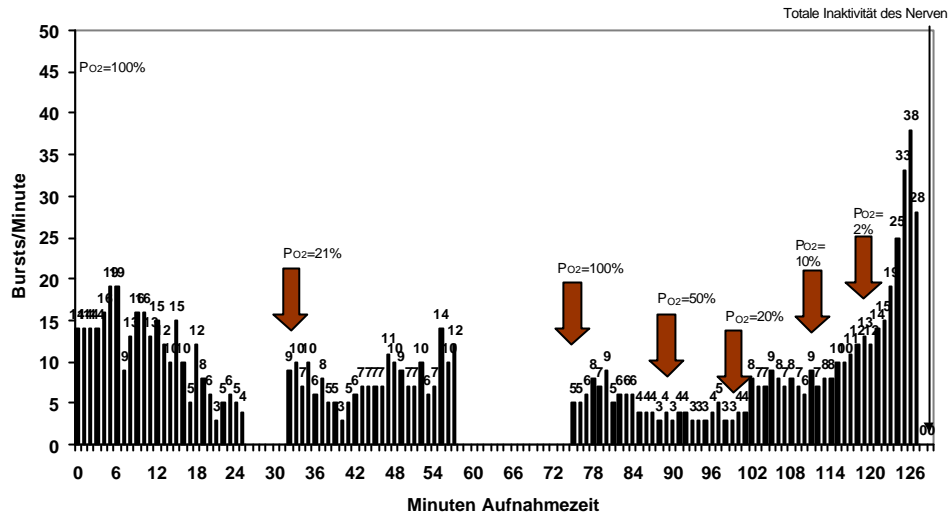
Isoliertes ZNS (*Taeniopoda eques*)



Efferente ventilatorische Aktivität in isolierten ZNS - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - des "Pferdefaulpelzgrashüpfers" *Taeniopoda eques*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Sauerstoffpartialdrücken. Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - die Petrischale mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke steigern die Ventilation und hohe senken die ventilatorische Aktivität. Insbesondere in C zeigt sich deutlich ein Effekt, nachdem wiederholt der Partialdruck auf 100% angehoben wurde und dann abgesenkt. Basis des Gasgemisches war N₂.

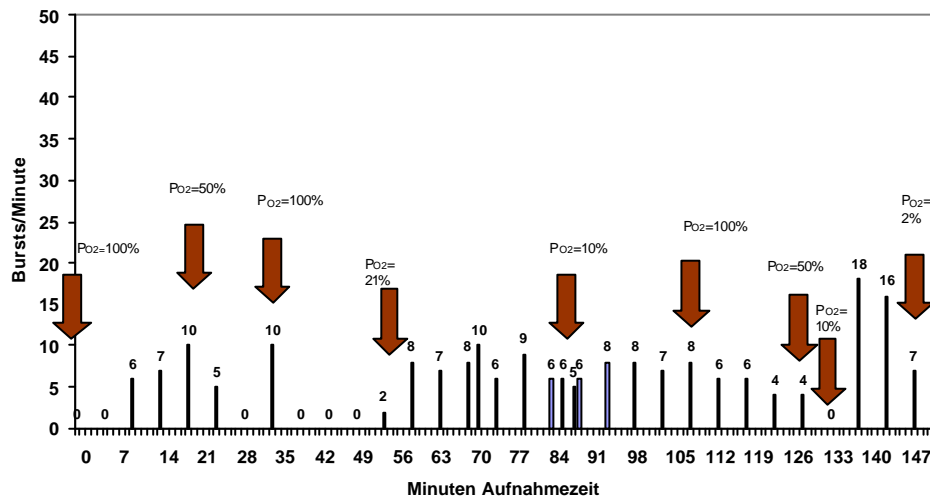
E

Isoliertes ZNS (*Taeniopoda eques*)



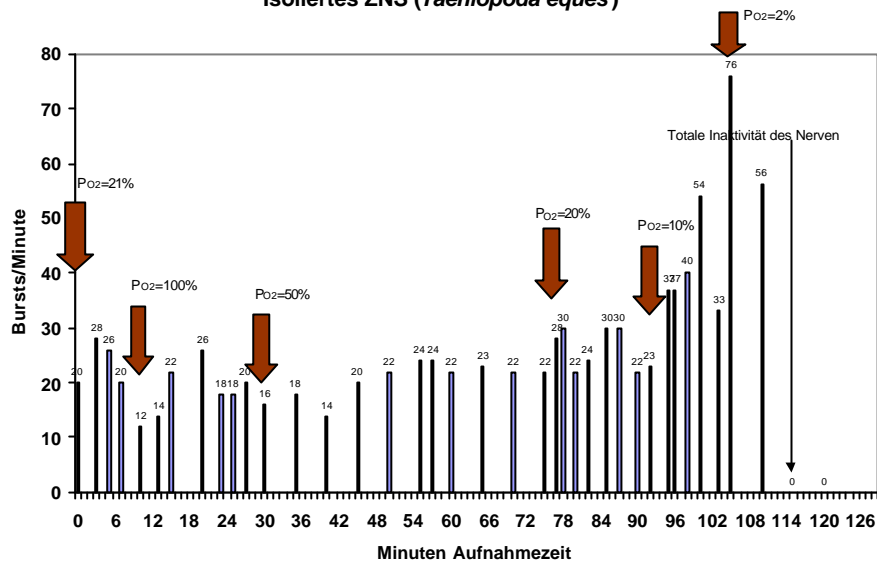
F

Isoliertes ZNS (*Taeniopoda eques*)



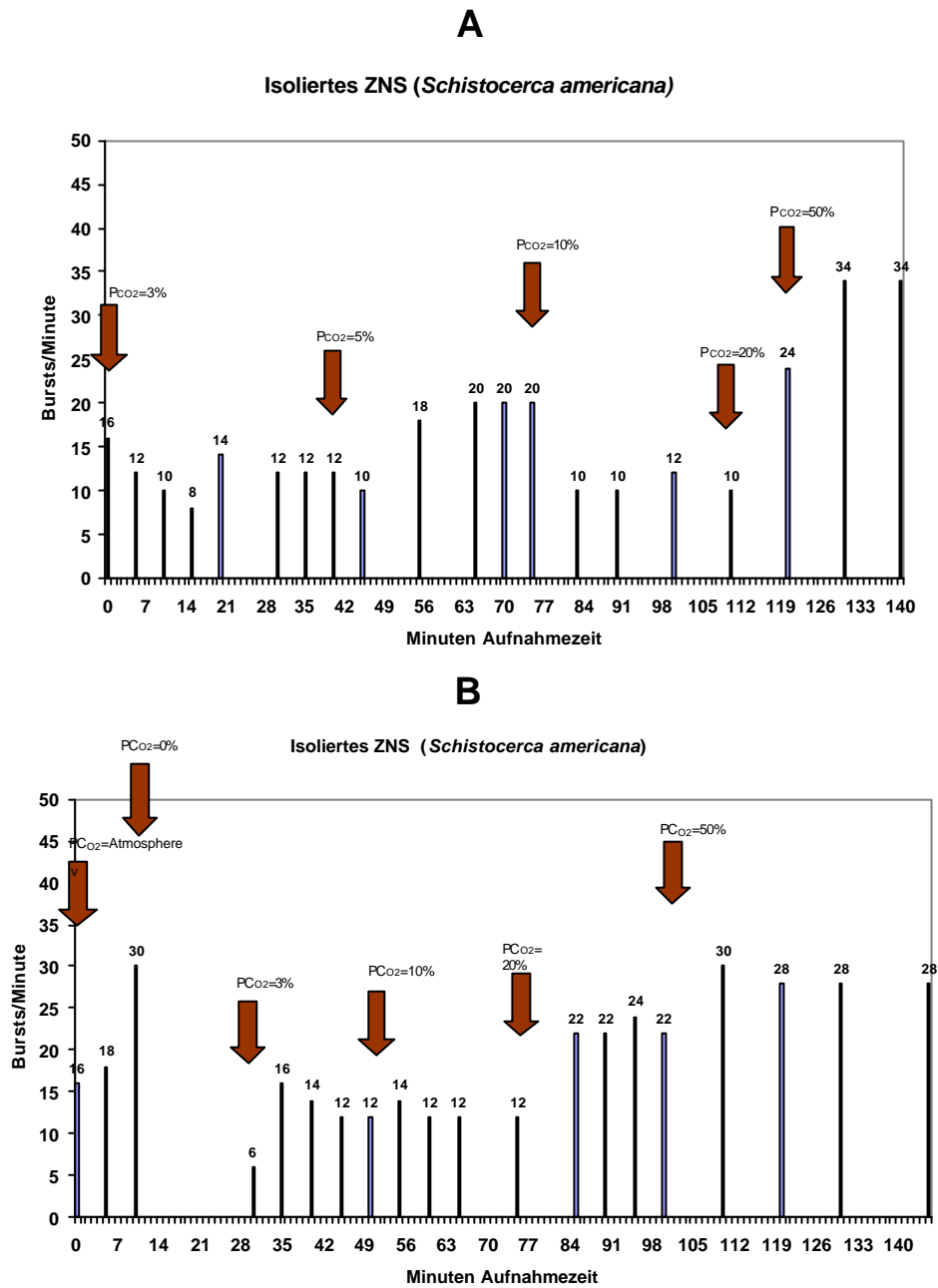
Efferente ventilatorische Aktivität in einem isolierten ZNS - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - des "Pferdefaulpelzgrashüpfers" *Taeniopoda eques*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Sauerstoffpartialdrücken. Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - die Petrischale mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Insbesondere der letzte Abschnitt in **E** zeigt wegen der durchgehenden Aufnahme den abgestuften Anstieg bei zunehmender Hypoxie. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke steigern die Ventilation und hohe senken die ventilatorische Aktivität. Basis des Gasgemisches war N_2 .

G

Isoliertes ZNS (*Taeniopoda eques*)

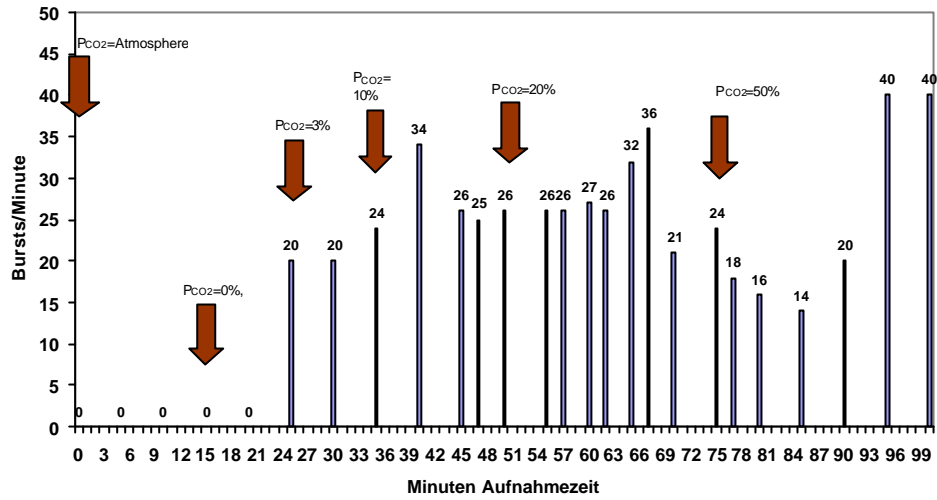
Efferente ventilatorische Aktivität in einem isolierten ZNS - aufgenommen von einem Median-oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - des "Pferdefaulpelzgrashüpfers *Taeniopoda eques*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Sauerstoffpartialdrücken. Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken - die Petrischale mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Sauerstoffpartialdrücke steigern die Ventilation und hohe senken die ventilatorische Aktivität. Besonders hervorzuheben ist in der in **G** gezeigten Aufnahme, daß bei einem Partialdruck von 10% die Ventilationsrate auf 76 bursts/min steigt, die höchste überhaupt gemessene Frequenz und nach 2% ein eindeutiger Hypoxieeffekt zu erkennen ist. Die Skalierung geht in dieser Abbildung bis 80 Bursts/Min. Basis des Gasgemisches war N₂.

d. Einfluß von Kohlendioxidpartialdrücken im ZNS ohne tracheale Versorgung

Bei variiertem O_2 -Gehalt des Gasgemischs:

Efferente ventilatorische Aktivität in einem isolierten ZNS - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - der amerikanischen Wüstenheuschrecke *Schistocerca americana*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Kohlendioxidpartialdrücken. Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Kohlendioxidpartialdrücken - welche die Petrischale mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Kohlendioxidpartialdrücke senken die Ventilationsrate und hohe steigern die ventilatorische Aktivität. Basis des Gasgemisches waren N_2 und Sauerstoff. In diesen Experimenten wurde N_2 stabil gehalten, während O_2 und CO_2 variierten. In Anpassung an den CO_2 -Gehalt wurde O_2 verringert (von 50% am Gesamtgemisch=0% CO_2).

C

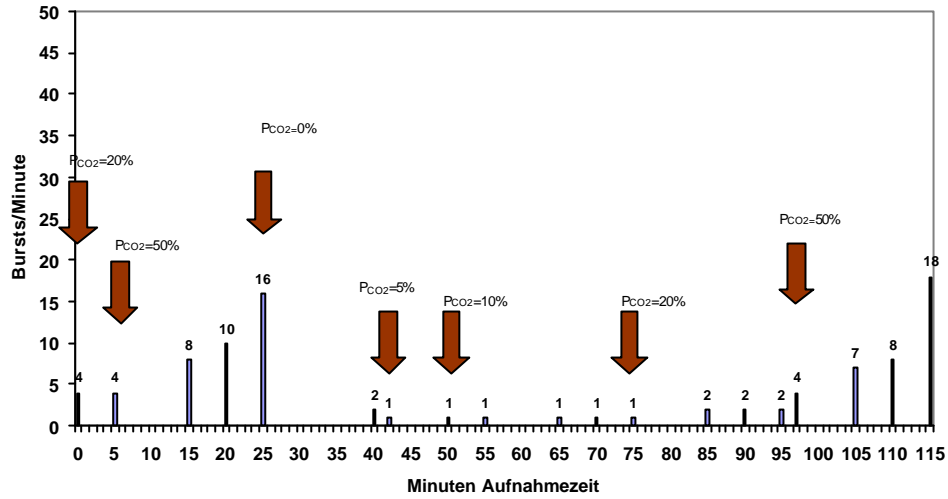
Isoliertes ZNS (*Taeniopoda eques*)

Efferente ventilatorische Aktivität in einem isolierten ZNS - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - des "Pferdefaulpelzgrashüpfer" *Taeniopoda eques*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Kohlendioxidpartialdrücken. Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Kohlendioxidpartialdrücken - welche die Petrischale mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Kohlendioxidpartialdrücke senken die Ventilationsrate und hohe steigern die ventilatorische Aktivität. Basis des Gasgemisches waren N₂ und Sauerstoff. In diesem Experiment wurde N₂ stabil gehalten, während O₂ und CO₂ variierten. In Anpassung an den CO₂-Gehalt wurde O₂ verringert (von 50% am Gesamtgemisch=0% CO₂).

Bei konstantem O₂-Gehalt des Gasgemischs:

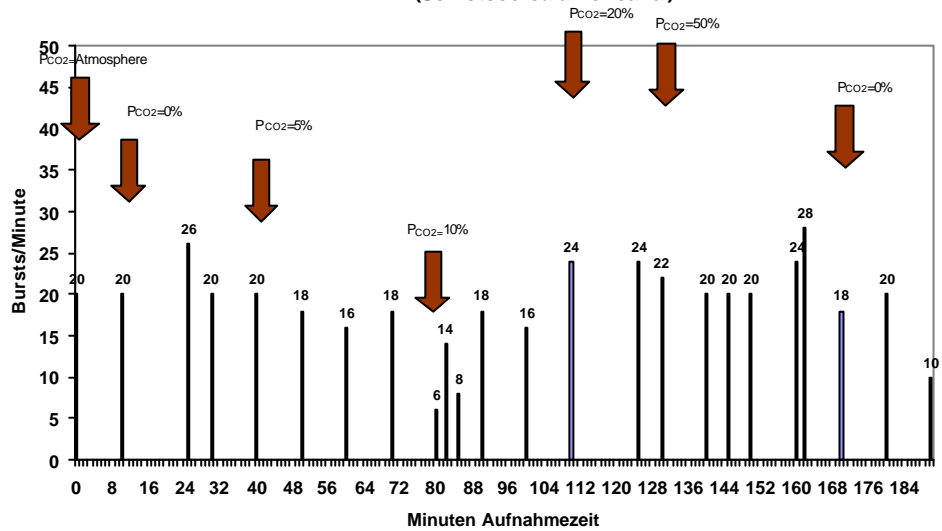
D

Isoliertes ZNS (*Schistocerca americana*)



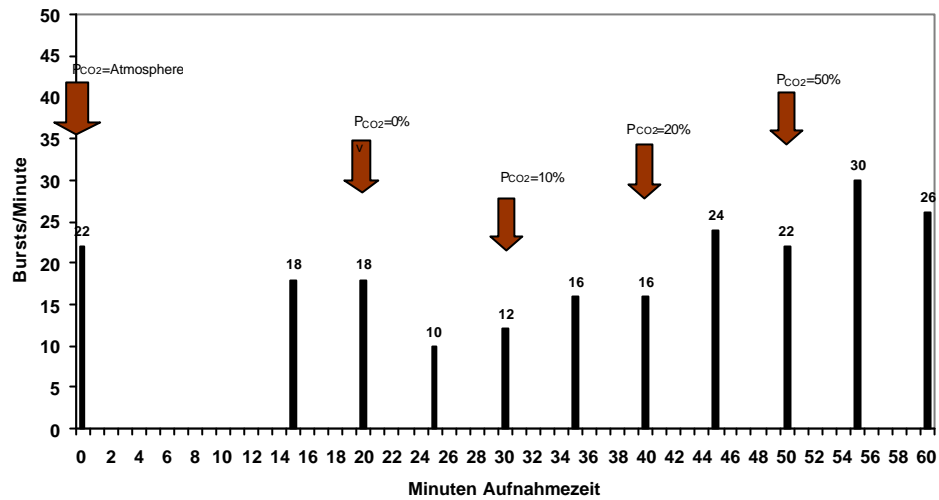
E

Isoliertes ZNS (*Schistocerca americana*)



Efferente ventilatorische Aktivität in einem isolierten ZNS - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - der amerikanischen Wüstenheuschrecke *Schistocerca americana*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Kohlendioxidpartialdrücken. Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Kohlendioxidpartialdrücken - welche die Petrischale mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Kohlendioxidpartialdrücke senken die Ventilationsrate und hohe steigern die ventilatorische Aktivität. In D ist erst ab einer CO₂-Konzentration von 50% ein deutlicher Effekt zu sehen. Basis des Gasgemisches waren N₂ und Sauerstoff, das stabil gehalten wurde bei 50 %; in E ist kein drastischer Effekt zu erkennen. Evtl. bewirkt der hohe O₂-Gehalt eine Unterdrückung einer Frequenzsteigerung; bei Änderung des CO₂-Gehaltes wurde N₂ entsprechend angepasst.

F

Isoliertes ZNS (*Schistocerca americana*)

Efferente ventilatorische Aktivität in einem isolierten ZNS - aufgenommen von einem Median- oder Ventralnerv des dritten fusionierten Abdominalganglions - der amerikanischen Wüstenheuschrecke *Schistocerca americana*. Frequenzhistogramm der Bursts/Minute (Säulen) unter variierenden Kohlendioxidpartialdrücken. Die Minuten zwischen zwei Säulen ist die Zeitspanne ohne Messungen. Der Wechsel zwischen den Gasgemischen mit verschiedenen Kohlendioxidpartialdrücken - welche die Petrischale mit dem isolierten ZNS durchströmen - ist durch die dicken senkrechten Pfeile markiert. Niedrige Kohlendioxidpartialdrücke senken die Ventilationsrate und hohe steigern die ventilatorische Aktivität. Basis des Gasgemisches waren N_2 und Sauerstoff, das stabil gehalten wurde bei 50 %; bei Änderung des CO_2 -Gehaltes wurde N_2 entsprechend.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas danke ich Herrn Prof. Dr. R. Hustert. Ebenso gilt ihm mein Dank für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, sowie seine stetige Bereitschaft mit Rat, Kritik und Anregungen zur Verfügung zu stehen. Für die Übernahme des Korreferats danke ich Herrn Dr. Reinhard Lakes-Harlan.

Den Kollegen der AG Sensomotorik gilt mein Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich für die finanzielle und organisatorische Unterstützung durch das Graduiertenkolleg "Dynamik und Organisation neuronaler Netzwerke", dessen Leiter, Herr Prof. Dr. Wolff (im Ruhestand), sein Möglichstes tat, den Stipendiaten bestmögliche Ausbildung zukommen zu lassen, und ohne den insbesondere mein Forschungsaufenthalt in den USA nicht möglich geworden wäre. In diesem Zusammenhang sei auch Dr. J. F. Harrison, ASU, Tempe, AZ, USA, für die Kooperation gedankt und dafür, daß ich so herzlich in seinem Labor aufgenommen wurde. Ebenso danke ich der DFG für zusätzliche finanzielle Förderung des Projektes.

Frau Claudia Schulz danke ich für zusätzliches Korrekturlesen der Arbeit. Den Mitarbeitern der GWDG danke ich für die kompetente Hilfe beim Ausdruck der Arbeit.

Meiner Familie und meinem Freundeskreis danke ich für die Geduld und die moralische Unterstützung, die ich durch sie in den Jahren meiner Promotion erfahren habe.

Lebenslauf

Name: Hussam Peter Bustami

Geburtsdatum: 18. April 1969

Geburtsort: Göttingen

Eltern: Vater: Dr. med. H. Bustami
Mutter: Mathilde Bustami, geb. Muth

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1975-1977 Grundschule Holzminden
1977-1979 Grundschule Brome
1979-1981 Orientierungsstufe Rühren
1981-1988 Theodor Heuss- Gymnasium Wolfsburg
Mai 1988 Abitur

Wehrdienst: Oktober 1988-Dezember 1989 in Wesendorf

Studium: Studium Biologie: seit WS 1989/90
Vordiplomsprüfung: Oktober 1992
Hauptdiplomsprüfung: Mai 1994
Diplomarbeit am Institut f. Pflanzenpathologie u.
Pflanzenschutz der Universität Göttingen zum
Dispersionsverhalten von Laufkäfern (Coleoptera,
Carabidae) in zwischen Ackerrandstreifen u. Weizenfeld
Diplomarbeit eingereicht: Februar 1996
Erhalt des Diploms: 19. März 1996
Seit SS 1997 Promotion in Biologie bei Prof. Dr.
Reinhold Hustert, Inst. f. Zoologie u. Anthropologie, Uni
Göttingen

Sonstige berufl. Aktivitäten: 1996: faunistische Gutachtertätigkeit im
Ingenieurbüro Jäger & Partner KG, Erfurt
1997-2000: Mitarbeit in der Lehre beim Praktikum
„Biologie für Mediziner“ am Institut f. Zoologie und
Anthropologie, Göttingen
seit 1995: freiberufliche Mitarbeit im Redaktionsbüro
Radio und Fernsehen, Göttingen.

Forschungsaufenthalte: Juli-Oktober 1992, ERASMUS-Aufenthalt an der
Universidad Complutense de Madrid; Mitarbeit im Team
von Dr. Javier Alonso bei Projekt zur Erforschung der
Biologie der Großtrappe (Otis tarda) im Freiland.
Oktober u. November 1999: Aufenthalt im Labor von Dr.
J. F. Harrison, Arizona State University, Tempe, AZ,
USA, zur Durchführung einer messtechnischen
Kooperation.