Sammendrag

Nevroners morfologi har vært et sentralt tema innen nevrovitenskapelig forskning siden slutten av 1800-tallet. I den senere tid har digitalisering av anatomiske elementer inkludert nevroner og hjerneområdene de innerverer, bidratt til å visualiser strukturene i 3D og å kartlegge nevronenes koblinger. Hovedmålet med denne masteroppgaven var å bidra til ny kunnskap innen generell nevrovitenskap ved å visualisere individuelle nevroner i et velegnet hjernepreparat. I denne studien er det utført fullstendige rekonstruksjoner av fem nevroner, fire bilaterale og ett unilateralt, fra hjernen til nattsvermeren *Helicoverpa armigera.* Modelleringen er utført på bakgrunn av høyoppløselige konfokale bildestakker. En betydelig fordel ved å benytte en liten insekthjerne for denne typen arbeid, er at den muliggjør konfokal avbildning av et helpreparat og ikke snitt. Nevronene ble rekonstruert ved bruk av det digitale visualiseringsprogrammet Amira. Ved å benytte denne programvaren, ble det laget 3D modeller av nevronene som deretter ble plassert sammen med nevropil-områder de innerverte, enten i form av nevropil-områder rekonstruert i det aktuelle preparatet eller i form av et tidligere etablert representativt hjerneatlas av den aktuelle arten. Alle de presenterte nevronene demonstrerer en tydelig morfologi og viser innerveringene innad i ulike områder av nattsvermerhjernen. Ved å innta en komparativ tilnærming og reflektere over resultatene fra andre insektarter, var det mulig å gjøre antagelser om funksjon basert på de morfologiske særtrekkene til de rekonstruerte nevronene. For eksempel innerverte nevron 5 lateral accessory lobe (LAL) og projiserte i retning av ventralstrengen. Dette mønsteret ligner på morfologien til et utgående nevron tidligere rapportert i silkespinneren, *Bombyx mori*. Dessuten, Nevron 3 som innerverte den optiske lobe, ventrolateral nevropil (VLNP), superior medial protocerebrum (SMP) og LAL i begge hemisfærer, har lignende morfologiske særtrekk med et upublisert nevron i den såkalte 'Bogong moth', *Agrotis infusa,* som migrerer over lange avstander. Dette indikerer at nevron 3 kan ha en rolle i nattsvermerens orientering i henhold til lyssignaler fra himmellegemer. Til sammen bidrar resultatene som presenteres her til ytterligere oppdatering av samlingen nevroner fra hjernen til *H. armigera,* og den betydelige graden av anatomisk variasjon blant de individuelle nevronene, demonstrerer kompleksiteten i de nevrale elementer som danner den lille insekthjernen.

Abstract

Neural morphology has been a central issue within neuroscientific research since the late 19th century. At present, digitalization of anatomical elements including neurons and the brain areas they innervate, contributes to 3D visualization and mapping of neuronal elements and their connections. The main goal of the master's thesis was to obtain new knowledge within general neuroscience by performing digital reconstructions for visualization of individual neurons. In the present study, five neurons, one unilateral and four bilateral, were completely reconstructed from confocal images of brains of the noctuid moth, *Helicoverpa armigera*. A significant advantage of utilizing the insect brain for this kind of work is the opportunity of scanning of the whole preparation without slicing it. The neurons were reconstructed using the digital visualization program, Amira. In the software program, 3D neuron models were created and assembled with relevant reconstructed neuropils as well as inserted into a representative brain atlas of the current species. All the presented neurons demonstrated a distinct morphology showing innervations within different areas of the moth brain. By adopting a comparative approach and reflecting upon the results obtained from other insect species, it was possible to make some assumptions regarding possible functional characteristics of the reconstructed neurons. For instance, Neuron 5, innervating the lateral accessory lobe (LAL) and projecting in the direction of the ventral nerve cord, showed similar morphology with a descending neuron previously obtained in the silk moth, *Bombyx mori*. Furthermore, Neuron 3, innervating the optic lobe, ventro-lateral neuropils (VLNP), LAL, and superior medial protocerebrum (SMP) in both hemispheres, and having similar morphological features with an unpublished neuron in the long-distance migrating bogong moth, *Agrotis infusa*, indicates that Neuron 5 may play a role in the moth's orientation according to light signals from celestial bodies. Altogether, the results presented here contribute to replenishment of the brain neuron collection in the moth *H. armigera* and reinforce previous knowledge on the anatomical diversity of individual neurons forming the tiny insect brain.

Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven, og rekonstruksjonsarbeidet som er presentert inni, har blitt utført på kjemosensorisk lab ved psykologisk institutt (Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet, NTNU). Prosessen og erfaringene jeg har gjort meg underveis har gitt meg innsyn i et spennende fagfelt jeg visste lite om på forhånd.

For dette vil jeg først og fremst takke min hovedveileder, Elena Ian, som har brukt mye av sin tid og kunnskap på å veilede meg som masterstudent og svare på utallige spørsmål. Det har vært til uvurderlig hjelp og for det er jeg evig takknemlig.

Jeg ønsker også gi en stor takk til min biveileder, lederen av kjemosensorisk lab, Bente Gunnveig Berg. Bentes ypperlige formidlingsevne og smittende engasjement var avgjørende da jeg skulle velge meg fordypningsområde for masterprogrammet innen psykologi. Uten Bente hadde det ikke vært mulig, for meg som masterstudent i psykologi, å jobbe direkte med sentralnervesystemet, noe jeg er svært takknemlig for.

I tillegg vil jeg takke Xi Chu som har bistått med nyttige faglige innspill underveis i studieåret.

Jeg vil også takke Jonas Hansen Kyrre og Pramod KC, som har tilbydd sin hjelp ved mange anledninger. Til mine medstudenter på laben, Marte Schjetne og Sara Holm, vil jeg takke for alle diskusjoner, deres innspill og vennskapet.

Som student er jeg også takknemlig for at jeg har fått vært en del av engasjerende, latterfylte og lærerike samtaler ved lunsjbordet (med to meters avstand), noe som har viktig for meg i en krevende pandemihverdag, slik det nok har vært for flere.

Takk til mamma og pappa som sørget for at jeg fikk låne bil hele perioden og, noe som gjorde at transportetappen til og fra laboratoriet nærmest foregikk uten sosial kontakt. Det gjorde det lettere å fokusere på studiene, fremfor potensiell smitte av både de andre på laben og meg selv.

Takk til Sigrid Elise, Marita og Ida for heiarop og støtte.

Line Moen Aune

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon 7

1.1 Konfokalmikroskopi 8

1.2 Amira 8

1.3 Morfologiske beskrivelser av relevante nevropil-områder 10

1.3.1 Antenneloben (AL) 11

1.3.2 Mushroom body (MB) 11

1.3.3 Lateralt Horn (LH) 12

1.3.4 Superiore nevropiler (SNP) 12

1.3.5 Ventrolaterale nevropiler (VLNP) 13

1.3.6 Lateral Accessory Lobe (LAL) 13

1.3.7 Optiske lober (OL) 14

1.4 Målet med studien 15

2. Materiale og metode 16

2.1 Insekter 16

2.2 Preparater, farging og registreringer 16

2.3 Konvertering og oppretting av filer 16

2.4 Rekonstruksjon av nevropiler 17

2.5 Rekonstruksjon av individuelle nevroner 17

2.6 Plassering av nevroner i representativ hjerne 18

2.7 Nomenklatur 18

2.8 Figurer 18

2.9 Etiske vurderinger 18

3. Resultater 19

3.1 *Nevron 1* 21

3.2 *Nevron 2* 23

3.3 *Nevron 3* 25

3.4 *Nevron 4* 27

3.5 *Nevron 5* 29

4. Diskusjon 31

4.1 Insekter som modellorganisme 31

4.2 Digitale rekonstruksjoner av nevrale elementer 32

4.3 Forslag til mulige funksjonelle beskrivelser av de rekonstruerte nevronene 32

4.3.1 Nevron 3 ligner et tidligere beskrevet nevron som responderer på lys fra himmellegemer 33

4.3.2 Nevron 5 ligner tidligere beskrevne utgående hjernenevroner involvert i duftprosessering 35

4.3.3 Nevron 1 innerverer hjerneområder som er involvert i behandling av luktsignaler 37

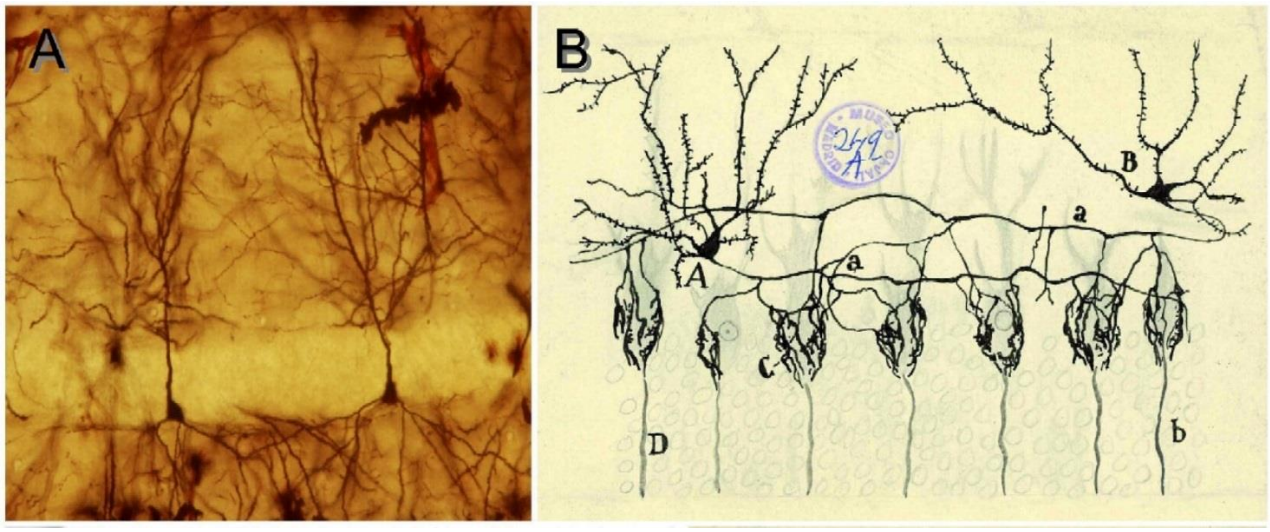
5. Konklusjon 38

Forkortelser 39

Referanser 40

1. Introduksjon

Kunnskap om nevronenes morfologi har alltid utgjort en viktig del av nevrovitenskapens forskningshistorie. Å belyse de funksjonelle rollene til aksonale og dendrittiske forgreninger i synaptisk integrasjon, signaloverføring, nettverkskoblinger og kretsdynamikk, krever kvantitative analyser av digitale rekonstruksjoner (Halavi et al., 2012). Den italienske forskeren Camillo Golgi utviklet i 1873 en metode som farget nervecellene med sølvkromat, slik at de svartfargede nevronene fremstod i sterk kontrast til den transparente, guloransje bakgrunnen. I gode preparater kunne de nevrale forgreningene følges over store avstander slik at impregnerte celler ble sett i sin helhet. Metoden fasiliterte muligheten for systematiske studier av nervevev. Den spanske legen, Santiago Ramón y Cajal, adopterte Golgis fargeteknikk som i sin tur resulterte i en oppsiktsvekkende serie med tegninger av dendritter og aksoner. Samlingen med skisser la grunnlaget for å kunne undersøke struktur-funksjon relasjonen i nervesystemet (gjennomgått av De Carlos & Borrell, 2007). Illustrasjonene er fantastiske også i dag, både i form av detaljnivået og i omfang (Fig. 1).



Figur 1: Visualisering av nervestrukturer. **A)** Et eksempel på Golgimetoden: preparat med fargede nevroner i hippocampus i mus; **B)** Reproduksjon av en av Cajals originale tegninger fra «Cajal Legacy» (Instituto Cajal, Madrid). Transvers seksjon av cerebellar lamella (De Carlos & Borrell, 2007).

Cajals samling av morfologiske data inneholder tre karakteristiske hovedbestanddeler: 1) histologiske preparater, 2) visualisering ved hjelp av lysmikroskop og 3) presise rekonstruksjoner/sporinger, **(**gjennomgått av Parekh & Ascoli, 2013). Tegningene til Cajal blir ofte forbundet med nevrovitenskapens oppinnelse og er fremdeles relevant i

forskningsartikler og lærebøker. En naturlig videreutvikling fra de håndlagde tegningene er vår tids digitale rekonstruksjoner. Dataprogrammer gjør det nå mulig å kvantifisere de intrikate relasjonene mellom nevral morfologi (struktur) og nevral fysiologi (aktivitet, funksjon). Råmaterialet for digitale rekonstruksjoner er imidlertid det samme som ved 'penn- og papir sporing' - nemlig histologiske preparater med avbildninger av farget nervevev.

Glaser og Van der Loos (1965) utviklet i 1965 et '*computing light microscope'* ved å koble en analog regnemaskin til et lysmikroskop. Fra å bruke 24 timer på å tegne et individuelt nevron for hånd, tok det nå 45 minutter. Med inspirasjon fra denne typen 'computing light microscopy', lagde Wann et at. (1973) et digitalt datasystem (lysmikroskop + digitalt data) som kunne gjøre semiautomatiske analyser av impregnerte nevroner. Digitaliseringen ga mer detaljert informasjon om nevrale særtrekk som treets/forgreningens opprinnelse, bifurkasjon og terminale punkter, i tillegg til cellekroppen og dendrittenes posisjon. Begge nyvinninger bidro til å loggføre nevrale karakteristikker hurtigere og mer nøyaktig enn tidligere. I dag blir digitale rekonstruksjoner skapt gjennom å spore nevrale trær i 3D koblet til dedikerte datamikroskop eller med spesialiserte programvarer i kombinasjon med tidligere tilegnede bildeserier. I denne studien brukes høyoppløselig bildemateriale fra konfokalmikroskop og programvaren Amira for å gjenskape nevral form.

Nevrale forgreninger kan være betydelige i utstrekning, og fylle alle romlige retninger. Derfor er det fordelaktig å reprodusere de i tre dimensjoner heller enn to, slik Golgi og Cajals tegninger gjorde. Det er en åpenbar fordel å kunne se et nevron fra ulike synsvinkler.

1.1 Konfokalmikroskopi

Konfokal laser scanning mikroskopi (CLSM) er en optisk bildeteknikk det det benyttes et avansert mikroskop for å gjenskape biologiske strukturer i sin tredimensjonale form. Konfokalmikrsopet lager høyoppløselige bilder via bruk av laser og en innretning som filtrerer bort lys som ikke er i fokus (Inoué, 2006). Dermed kan en scanne flere optiske snitt, dvs. multiple veldig tynne 'todimensjonale' bilder fra en tykk fluorescent spesimen, en prosess som kalles optisk seksjonering. Resultatet blir en tredimensjonal bildestakk med høy oppløsning. På denne måten gjør konfokalmikroskopet det mulig å rekonstruere tredimensjonale strukturer.

1.2 Amira

I reviewartikkelen til Donohue & Ascoli (2011), nevnes sju ulike dataverktøy som blir brukt for å rekonstruere nevroner digitalt: Amira, Arbor, Automorph, Custom, Eutectic,

Neurolucida, NeuronMorpho, NeuroZoom. Amira er det eneste av programmene som rapporterter om semiautomatisk rekonstruksjon av nerveceller (gjennomgått av Donohue & Ascoli, 2011)Donohue & Ascoli, 2011), og per nå involverer alle rapporterte rekonstruksjoner av nevroner en menneskelig komponent (Parekh & Ascoli, 2013).

Amira er en programvareplattform for 3D-, 4D- og 5D- datavisualisering, prosessering og analyse (Stalling et al., 2005). Visualiseringsprogrammet blir kontinuerlig utviklet av Thermo Fisher Scientific i samarbeid med Zuse Institute Berlin og kommersielt distribuert av Thermo Fisher Scientific. Programvaren utgjør en anerkjent og velegnet plattform for å visualisere, manipulere og forstå *life science.* Med *life science* menes forskning på levende organismer, alt fra mikroorganismer, planter og dyr som for eksempel insekter og pattedyr. Programmet egner seg for analysering av forskningsdata oppnådd via ulike avbildningsmodaliteter som konfokal mikroskopi, 'computertomografi' (CT) og 'magnetresonanstomografi (MRI).

Formålet med Amira var å lage en spisset, fleksibel, kraftfull og brukervennlig programvare, som kunne dekke hele visualiseringfeltet. Hovedfokuset til programvaren er visualisering og analyse av volumetriske data som er vanlig i medisin, biologi og mikroskopi. Disse volumene kan vises på skjerm og segmenteres slik at 3D polygonale modeller kan rekonstrueres, både av nevroner og nevropilområder.

Det generelle designkonseptet bak AMIRA-systemet er 3D visualisering og geometrisk rekonstruksjon. En kombinasjon av mange ulike teknikker og algoritmer implementert i dette systemet gir en velegnet programvare som kan bidra til å løse mange ulike problemer i medisin, biologi og andre forskningsdisipliner. Ulike typer datasett og moduler blir definert som objekter, og relasjonen mellom dem vises i form av ikoner i en *objectpool*. Brukergrensesnittet er ment å være enkelt og velstrukturert. S*egmentation editor*-funksjonen gir for eksempel store muligheter for brukerinteraksjon. *Orthoslice*-modulen, på sin side, er en inituitiv interaksjonsteknikk som brukes på 3D-bilder. Videre gjør *scripting interface*-funksjonen det mulig å gi spesifikke kommandoer i en kommandopool. Denne representerer en avansert og innoativ algoritme.

Digitale rekonstruksjoner kan i prinsipp erverves fra hver eneste nevrontype, i hver eneste hjerneregion, i hver eneste dyreart og fra ulike typer eksperimentelle protokoller. I denne studien ble det utført digitale rekonstruksjoner av individuelle nerveceller fra nattsvermerhjernen.

1.3 Morfologiske beskrivelser av relevante nevropil-områder

Det fins over en million navngitte insektarter, og det er naturligvis stor variasjon blant dem etter 400 millioner år med divergerende evolusjon. For eksempel varierer insektshjernens størrelse fra å bestå av 50 000 nerveceller i fjærvingebiller (Polilov, 2011) til over 1.2 millioner nerveceller i hanner av honningbier , (Witthöft, 1967). Til sammenligning består menneskehjernen av 86 milliarder nerveceller (Herculano-Houzel, 2009). Til tross for stor diversitet blant insektsartene, er det også mye som er ensartet. I tråd med denne felles malen, har Ito et al. (2014) etablert en nomenklatur som navngir ulike hjerneområder hos bananflue. Disse korresponderer med tilsvarende hjerneområder hos gresshoppe, kakerlakker, honningbie og nattsvermere. Den kartlagte insektshjernen inkluderer 12 kategorier av strukturer: 1) optiske lober, 2) mushroom bodies, 3) central complex, 4) lateral complex, 5) ventrolateral nevropil, 6) lateralt horn, 7) superior nevropil, 8) inferior nevropiler, 9) antennelobene, 10) ventromedial nevropil, 11) periesophageal nevropil og 12) gnathal ganglion. Mange av de 12 ulike strukturene består av ulike underkategorier av nevropilstrukturer som igjen er delt inn i bestemte sub-regioner. I tillegg til disse områdene, består insektshjernen av kommissurer og trakter som kobler de ulike nevropilstrukturene sammen.

Insektarten som er benyttet i denne studien, *Helicoverpa armigera*, en av verdens mest alvorlige pestinsekter. Den polyfage nattsvermeren forårsaker store tap innen jordbruk både i Asia, Europa, Afrika og Australia. Skapningen tilhører den nest største insektsordenen, Lepidoptera, og larvene ødelegger gigantiske avlinger med tomater, bomull, kikerter, ris, soyabønner, tobakksplanter, poteter, mais, frukt, trær og grønnsaker (MacLeod, 2007). I likhet med andre insektarter, er *H. armigera* vel tilpasset sine økologiske omgivelser der kartlegging av kjemosensorisk informasjon er av fundamental betydning for overlevelse. Det faktum at hann-nattsvermere kan søke opp en potensiell make fra distanser på 1 km ved å gjenkjenne hennes artsspesifikke duftsignaler (Priesner et al., 1986), gjør denne gruppen av insekter spesielt interessant. Nattsvermerhjernen består så langt av 32 kartlagte nevropilstrukturer (Chu et al., 2020), der 30 av dem er parete, mens to er uparete. I denne oppgaven kommer jeg til å beskrive de nevropilstrukturene som er relevant for resultatene som blir presentert. Ettersom denne nattsvermerarten baserer mye av sin interaksjon med omgivelsene på kjemosensorisk informasjon, vil nevropilstrukturer involvert i luktprosessering vies spesiell oppmerksomhet i den påfølgende teksten.

1.3.1 Antenneloben (AL)

Generelt mottar det primære prosesserings-senteret for luktinformasjon i insekthjernen, antenneloben (AL), kjemosensorisk input fra omgivelsene via luktsensoriske nevroner lokalisert på antennene. Insektets AL er analog med pattedyrs/menneskets luktelapp (gjennomgått av Hildebrand & Shepherd, 1997). Her synes de samme kodemekanismene å være konservert på tvers av ulike arter. Både hos insekter og pattedyr består det primære luktsenter av en samling kuleformede nevropil-strukturer, kalt glomeruli, og hos aller organismer danner de inngående luktsensoriske nevronene et bestemt mønster som innebærer at alle nevroner som uttrykker de samme odorantreseptorene sender aksonene sine til ett bestemt glomerulus (Klenoff & Greer, 1998; Vosshall et al., 2000). Nattsvermeren *H. armigera* har cirka 80 glomeruli i hver AL (Zhao et al., 2016), men antallet varierer betydelig mellom ulike ordener. Samlingen av glomeruli hos arten som studeres her, er blitt klassifisert i flere grupper, heriblant ordinære glomeruli (OG) og feromonspesifikke glomeruli, kalt macroglumeruale complex (MGC) (Zhao et al., 2016). Dette innebærer en segresjon i to parallelle systemer som formidler ulike typer av biologisk informasjon fra henholdsvis plantekomponenter og feromoner (Galizia & Rossler, 2010; Hildebrand & Shepherd, 1997). Som hos andre insekter, frakter andreordens projeksjonsnevroner (PN) luktinformasjonen fra AL til høyere hjernesentre via parallelle trakter i form av medialtrakten, mediolateraltrakten og lateraltrakten. De høyere hjernesentra som mottar luktsignaler, inkluderer i hovedsak tre områder i protocerebrum: 1) calyces of the mushroom body (Ca), 2) lateral horn (LH) og 3) superior intermediate protocerebrum (SIP) (Chu et al., 2020).

1.3.2 Mushroom body (MB)

Både hos pattedyr og insekter projiserer andreordens luktnevroner til ulike hjerneområder som inngår i etablering av hukommelse og læring (Masse et al., 2009). Hos insekter er området som kalles mushroom body calyces (Ca) et senter for duft-basert hukommelse. Dette høyere-ordens senteret har i lang tid vært interessant for forskere både på grunn av dets viktige rolle i luktdiskriminering og for dets betydning for læring og hukommelse (Strausfeld et al., 2009).

Mushroom bodies består av flere substrukturer. Den koppformede strukturen, Ca, er lokalisert i den posteriore del av protocerebrum, mens de såkalte lobene, heriblant medial- og vertikalloben befinner seg i anteriore deler av protocerebrum. For *H. armigera* brukes termene alfa- og betalobene i stedet for medial- og vertikallobene, og de sistnevnte navnene vil brukes videre i denne studien. Den stavformede pendunculus forbinder Ca med lobene. I nattsvermere spesielt er Ca mindre enn i sommerfugler og hawkmoth, men består av lignende innfløkte subdivisjoner (Chu et al., 2020).

Hos de fleste insekter er Ca en multimodal struktur som mottar lukt-input og visuell informasjon (Menzel, 2001; Strausfeld et al., 1998). Selve Ca, den koppformede strukturen, er den eneste substrukturen i MB som mottar input fra AL PNs, mens lobene på sin side, er output-områder for såkalte Kenyon-celler som danner synapser med Ca utgående nevroner.

1.3.3 Lateralt Horn (LH)

Et annet høyere-ordens senter som mottar luktinformasjon fra AL, er det laterale horn (LH). Denne regionen som utgjør en del av det laterale protocerebrum, innerveres av output terminaler fra en majoritet av projeksjonsnevroner fra AL. Tidligere har det laterale horn blitt beskrevet som en ustrukturert nevropilstruktur hos insekter (Ito et al., 2014). Hos den nært beslektede arten, *Heliothis virescens*, har det imidlertid blitt rapportert om et spesifikt område i LH, der terminalene til et betydelig antall AL projeksjonenevroner former en dobbel toroid struktur (Ian, Berg, et al., 2016). Den funksjonelle rollen til dette nettverket er ikke avklart, men generelt er dette området antatt å være ansvarlig for medfødt odorant-fremkalt atferd, i motsetning til Ca som er knyttet til lært atferd. Hos insekter der Ca har blitt fjernet, er det vist at de ikke kan tilegne seg informasjon om nye odoranter, mens medfødt atferd fremdeles er i til stede (Kido & Ito, 2002)

1.3.4 Superiore nevropiler (SNP)

Superiore nevropiler dekker store områder i hjernens dorsale del, superior for central body. Dette nevropilområdet deles inn i tre substrukturer fra lateral til medial del: 1) superior medial protocerebrum (SLP), superior intermedial protocerebrum (SIP) og superior medial

protocerebrum (SMP) (Ito et al., 2014). Sub-regionen kalt SIP består blant annet av et lite stavformet område kalt column (Ian, Berg, et al., 2016). Column-området som er lokalisert mellom MB alfa-loben og en viktig visuell nevropil kalt anterior optisk tuberkel (AOTU), er et eget målområde for feromonsensitive projeksjonsnevroner i hann-nattsvermere (Chu et al., 2020). De resterende sub-områdene, SMP og SLP, har koblinger med andre nevropiler, og er rapportert som et knutepunkt for hele hjernenettverket i *Drosophila* (Ito et al., 2013). For eksempel er SMP rapportert å være mellom-stasjon for en feromonprosesserende nervebane fra lateral protocerebrum/LH til LAL hos silkespinneren, *Bombyx mori* (Namiki et al., 2014).

1.3.5 Ventrolaterale nevropiler (VLNP)

Ventrolaterale nevropiler (VLNP) inkluderer også flere sub-områder, heriblant anterior ventrolateral protocerebrum (AVLP), posterior ventrolateral protocerebrum (PVLP) og posterior lateral protocerebrum (PLP). Generelt synes VLNP å inneha en viktig rolle som output område for projeksjonsnevroner fra AL (Ian, Zhao, et al., 2016). I tillegg er det verdt å merke seg at subområdet PLP huser en samling med såkalte optiske glomeruli (Ito et al., 2013). Optiske glomeruli kan sammenlignes med glomeruli i AL, men i de førstnevnte er det visuelle nevroner fra lobula som ender i diskrete kuleformede områder (Mu et al., 2012). Videre er subregionen PVLP sammen med AOTU, rapportert å være sekundære sentra for visuell informasjon i protocerebrum hos blant annet *Drosophil*a (Ito et al., 2013).

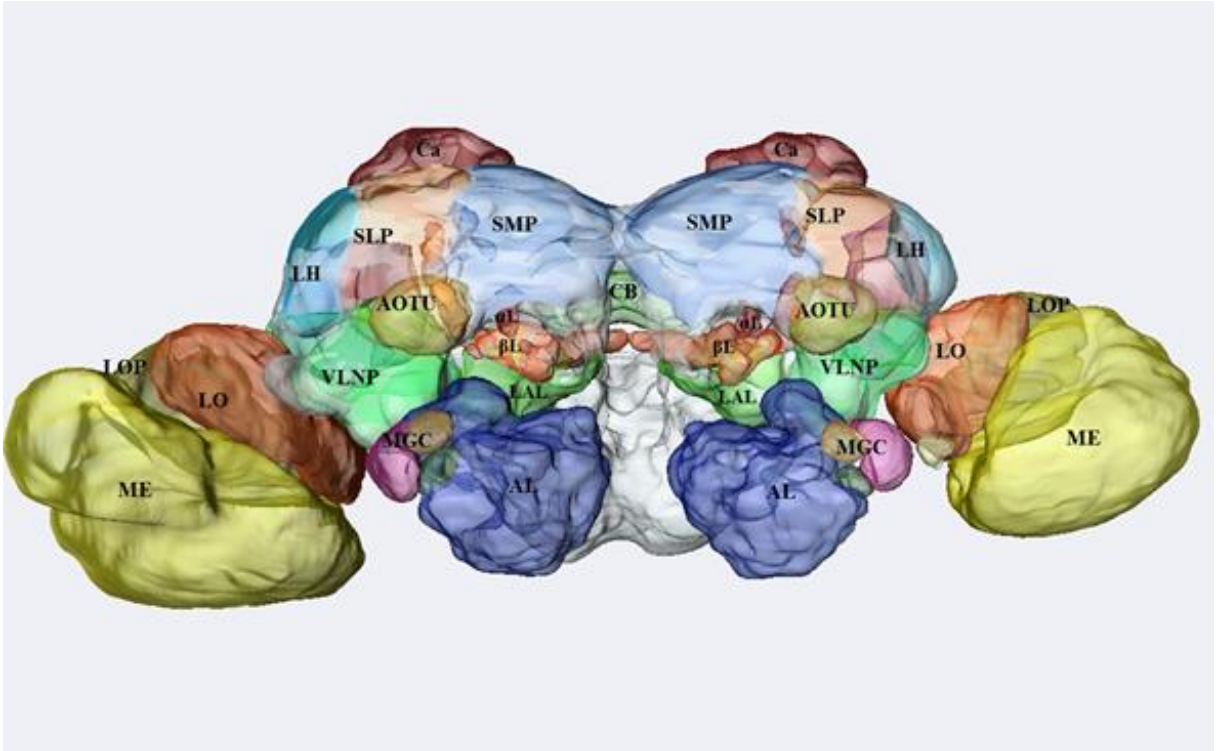
1.3.6 Lateral Accessory Lobe (LAL)

Lateral accessory lobe (LAL) er representert hos alle insektarter studert til nå og virker å ha et korresponderende sett av subdomener, som i sin tur tyder på en felles anatomisk organisering. Men det er ikke klart om de individuelle nevronene er homologe på tvers av arter. I insekter generelt er LAL lokalisert dypt inne i hjernen, på lateral side av central complex (CX). Lateral accessory lobe tilsvarer majoritetsandelen av lateral complex (Ito et al., 2014), men er tidligere blitt beskrevet som en del av det nærliggende nevropilområdet, CX (Richter et al., 2010) og som en del av ‘the sunpass neuropils’, sammen med CX og AOTU (Heinze & Reppert, 2012). I tillegg til CX, er LAL koblet til diverse regioner i protocerebrum, som

lateral protocerebrum, AOTU, SMP, lobula, posterior slope, VLNP, og noen få nevroner linker også LAL til MB (Kanzaki et al., 1991; Namiki & Kanzaki, 2016). I tillegg, inneholder LAL utgående nevroner som projiserer til ventralstrengen, der de danner kontakt med motoriske nevroner (Namiki & Kanzaki, 2016). Det trengs fremdeles mer forskning for fullstendig forståelse av funksjonen til LAL. Namiki og Kanzaki (2016) nevner områdets betydning for blant annet feromonorientering, flygeatferd og fonotaktisk styring (gjennomgått av Namiki & Kanzaki, 2016).

1.3.7 Optiske lober (OL)

De to optiske lobene er plassert på hver sin side av den såkalte 'central brain'. Hver lobe er koblet til 'central brain' via 'the optic stalk'. Størrelsen på de optiske lobene varierer betydelig mellom ulike insektsarter. Hos monarksommerfugl, for eksempel, som i høy grad er avhengig av visuelle stimuli, utgjør de to optiske lobene til sammen 74 % av det totale hjernevolumet (Heinze & Reppert, 2012). Hos nattsvermere, derimot, som i større grad baserer seg på kjemosensorisk sansing, er de optiske lobene mye mindre (Chu et al., 2020). Som hos andre insektarter, består de optiske lobene hos nattsvermeren *H. armigera* av fem substrukturer: lamina (LA), medulla (ME), lobula plate (LOP), lobula (LO) og accessory medulla (AME). Organiseringen av disse substrukturene er som følger fra distal til medial del: Lamina ligger ytterst, ved siden av retina. Deretter kommer medulla og lobula. Til sammen danner disse strukturene en samling med konvekse nevropilstrukturer der de ytre omsluker de indre. Mellom lamina og medulla finner man den første optiske chiasma, en massiv fiberbunt som krysser i anterior-posterior retning. Der kobles projeksjonsnevroner fra lamina med målområdet i medulla. Mellom medulla, lobula og lobula plate, er den andre optiske chiasmaen plassert. Lobula plate er en tynn og konveks platelignende nevropil, lokalisert posterodorsalt for lobula. Accessory medulla er en relativt liten nevropilstruktur, lokalisert anterior for lobula, på den mediale kanten av medulla. I Ito et al (2014) er organiseringen av optiske sub-områder litt annerledes; her er for eksempel lobula plate og lobula slått sammen og kalt lobula kompleks. De optiske lobene prosesserer visuell informasjon fra retina. Et eksempel er lyssignaler fra himmellegemer som detekteres av monark-sommerfugler i deres navigering over store avstander (Heinze & Reppert, 2012).



Figur 2: Navngitte hjerneområder hos *Helicoverpa armigera*. Forkortelsene forklares i en oversikt senere.

1.4 Målet med studien

Hovedmålet med masteroppgaven var å bidra til ny kunnskap innen generell nevrovitenskap ved å visualisere individuelle nevroner i et velegnet hjerneapperat. Ved å benytte et lite modellpreparat, dvs. en nattsvermerhjerne ble prefargede nevroner fullstendig rekonstruert ved bruk av et avansert data visualiseringsprogram. Den lille nattsvermerhjernen er særdeles godt egnet for denne typen modellering ettersom hele hjernen, og ikke kun snitt, kan avbildes via konfokal mikroskopi. Spesifikke mål omfattet: 1) Å karakterisere enkeltnevronene morfologiske særtrekk, 2) Å demonstrere hensiktsmessigheten ved å digitalisere biologiske data, 3) Å lage 3D-modeller som kan inkluderes i den nye internett-plattformen 'Insectbraindatabase', 4) Å demonstrere kompleksiteten i en liten hjerne.

2. Materiale og metode

2.1 Insekter

I denne studien ble konfokalt datamateriale fra hjernepreparater av nattsvermerarten *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae; Heliothinae) brukt. Insektene ble levert Kjemosensorisk lab som pupper fra Keyun Bio-pesticides i Henan, China. Alle insektene ble oppbevart i klimaskap der temperaturen var 25 °C med 67 % luftfuktighet og med en 10 % sukroseløsning tilgjengelig *ad libitum.* Ifølge norsk lov om dyrevelferd, er det ingen restriksjoner angående eksperimentell bruk av Lepidoptera.

2.2 Preparater, farging og registreringer

Prosedyren med å klargjøre insektpreparatene, farge nevronene via intracellulære registreringer og scanne vellykket fargede preparater i konfokalmikroskop, ble utført her ved Kjemosensorisk lab av Xi Chu og Jonas Hansen Kymre. Disse metodene er beskrevet i detalj i Chu et al., (2020).

2.3 Konvertering og oppretting av filer

Høyoppløselige konfokalbilder bestående av er serie optiske snitt ble benyttet for å lage 3D-rekonstruksjoner av et utvalg av individuelt fargede hjernenevroner. Konfokalbildene som opprinnelig var scannet i czi-filformat, ble først konvertert til ZEN 2.3 (blue edition, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jana, Germany) der de ble redigert. Redigeringen omfattet eksportering av filene til LSM5-format, der de ble lagret som «AIMApplication Document»-filformat slik at bildene kunne brukes i Amira. Transform Editor-funksjonen i Amira 5.5 ble brukt for å lage skalerte bilder. Dette ble gjort for å justere for lysets brytning i henholdsvis vann: 1.16, olje: 1, og luft: 1.54.

2.4 Rekonstruksjon av nevropiler

Først ble de opprinnelige konfokale bildestakkene *resamplet* til voxelstørrelse 4 x 4 x 2 µm i Amira (Amira 5.3; Thermo fisher, Visualisation Science Group). Konfokalscannene inneholder avbildning både av 1) nevronene som altså er farget med et fluorescerende fargestoff og 2) nevropilområdene som er synlig på grunn av autofluorescens fra selve hjernevevet.

For å identifisere og rekonstruere ulike nevropiler fra konfokalstakken, ble det gjort en bildesegmentering ved bruk av funksjonen *segmentation editor* i Amira 5.3. Hvert optisk snitt i den tredimensjonale bildestakken fra konfokalmikroskopet ble grundig inspisert slik at hvert relevant nevropilområde kunne rekonstrueres på en detaljert og nøyaktig måte, i hvert todimensjonale segment. De rekonstruerte nevropilområdene ble gitt navn og definisjon som ulike objekter: AL_right, AL_left, CB, Ca_right, Ca_left, LAL_right, LAL_left, α-lobe_left, α-lobe_right, β-lobe_right, β_lobe_left. Hvert objekt ble markert i nøkkelsegmenter fra tre spatiale plan ved hjelp av manuelle og semi-automatiske verktøy som *brush*, *lasso* og *interpolation*, før 3D *wrapping*-verktøyet formet objektene i full volum-størrelse. Prosessen resulterte i en serie med bilder som korresponderte med den underliggende konfokalstakken, der en gruppe med voxler tilhører et objekt som representerer en bestemt nevropil.

Etter at segmenteringen var fullført og hver nevropilstruktur var representert av den relevante gruppen med voxler, ble det laget en polygonal *surface* modell med *smooth surface*.

2.5 Rekonstruksjon av individuelle nevroner

For å lage 3D-modeller av individuelle nevroner, ble det benyttet en egen modul; en SkeletonTree-modul (Evers et al., 2005; Schmitt et al., 2004) ble implementert i Amira 5.3. Med denne datavaren, kan det bli lagd en surface-modell bygd opp av sylindere i ulike lengder og tykkelse. Valg av forgreiningsmønstret og stegstørrelsen blir foretatt manuelt, mens en algortime sikrer en automatisk bestemmelse av midtlinje og diameter for de sammenkoblete segmentene. Med *skeletontree*-funksjonen var det mulig å beskrive nevronet med sentrum, radius og den topologiske strukturen inkludert forgreninger og punkter. Det semiautomtiske verktøyet sørget for å redusere brukeraktiviteten betraktelig, samtidig som

nødvendig kvantitet og kvalitet ble ivaretatt. Med automatisk rekonstruksjon av *surface* blir selv de tynneste grenene presist rekonstruert.

2.6 Plassering av nevroner i representativ hjerne

For å illustrere nevronets plassering i det aktuelle hjernepreparatet, ble det benyttet en representativ hjernemodell av den aktuelle (Chu et al., 2020). TransformEditor-funksjonen ble brukt for å plassere nevronet riktig.

2.7 Nomenklatur

For å navngi de relevante nevropilene, ble nomenklaturen etablert av Ito et al. (2014) brukt, med unntak for noen substrukturer i mushroom body. Her benyttes termene α-loben og β-loben i stedet for vertikal- og medialloben, slik de er angitt i Chu et al. (2020).

2.8 Figurer

Det ble tatt snapshots av rekonstruksjonene i Amira. En kombinasjon av Photoshop (CS6) og powerpoint ble brukt for å ferdigstille figurene.

2.9 Etiske vurderinger

Forsøk med levende organismer inngikk ikke i dette masterprosjektet. Ettersom datamaterialet imidlertid stammer fra denne typen eksperimenter, vil jeg kommentere følgende: I forskriften om hvilke dyr som kan brukes i forsøk, er det ingen reguleringer knyttet til gruppen Lepidopteran. Likevel er det sørget for god behandling og respekt for insektene i laben, slik at de ikke utsettes for unødige belastninger. Romslige glassylindere delvis dekket med papir ga insektene stor bevegelsesfrihet og et behagelig underlag. Insektene fikk sukrosenæring hver dag og fuktige papir ble byttet hver gang det var nødvendig.

3. Resultater

Resultatene som presenteres her omfatter tredimensjonale rekonstruksjoner av fem utvalgte nevroner. Serier med høyoppløselige konfokalbilder av hvert nevron forelå og dannet basis for rekonstruksjonene. Disse nevronene var altså tidligere identifisert i hjernen til nattsvermerarten, *Helicoverpa amirgera*, ved hjelp av intracellulære registreringer og farging. En oversikt over de rekonstruerte nevronenes morfologiske særtrekk er presentert i tabell 1. Ettersom alle nevroner var testet for et utvalg av biologisk relevante duftstimuli, samt en mekanosensorisk stimulus, er eventuelle responser på disse også angitt i tabellen.

For å visualisere nevronenes morfologi, ble hvert enkelt nevron rekonstruert ved bruk av skeletontree-funksjonen i Amira 5.3.3. I tillegg ble de relevante nevropiler rekonstruert for ett av nevronene, nevron 1 (N1), ved å bruke «segmentation editor»-modulen i Amira 5.3.3. For de resterende nevronene, nevron 2, 3, 4 og 5 (N2-N5), ble nevronene transformert og plassert inn i en representativ hjerne (Chu et al., 2020).

Kriteriene for å velge ut de nevronene som presenteres i resultatene, er som følger: 1) konfokale bildestakker av god kvalitet (høy oppløsning), 2) tydelig avbildede forgreninger og 3) nevrale innerveringer i veldefinerte nevropiler.

Tabell 1. De rekonstruerte nevronenes morfologiske særtrekk

Id.	Nevrontype	Bilateral/ unilateral	Cellekropp lokasjon	Innerverte hjerneregioner	Trakt/kommisur	Funksjonell signifikans
1	Protocerebral	Bilateral	Dorsalt i høyre hemisfære	Rundt αL_left Rundt βL_left LAL_left Rundt αL_right Rundt βL_right LAL_right	Superior Arch Commisure (SAC) Lateral Accessory Lobe Commisure (LALC)	Ingen respons
2	Protocerebral med innerveringer i optisk lobe	Bilateral	Frontalt i venstre hemisfære	ME_left LOP_left LO_left AVLP_left PLP_left SPS_left IPS_right PVLP_right	Great Commisure (GC)	Mekano-responsiv
3	Protocerebral med innerveringer i optiske lober	Bilateral	Lateral protocerebrum, nært LH i høyre hemisfære	ME_left LOP_left LO_left VLNP_left LAL_left SMP_left ME_right LOP_right LO_right VLNP_right LAL_right SMP_right	Superior PLP Commisure (sPLPC)	Atferdsantagonist Z9-14: AL
4	Protocerebral	Bilateral	Lateral protocerebrum i høyre hemisfære	SLP_left SIP_left SLP_left VLNP_left SLP_right SIP_right SLP_left VLNP_left	Superior Arch Commisure (SAC)	Ingen respons
5	Protocerebral	Unilateral	Dorsoposterior i hjernen, Ventromedial for Calyses i venstre hemisfære	LAL_left VLNP_left PENP_left GNG_left	Ingen	Feromonmiks Z11-16:AL + Z9-16:AL

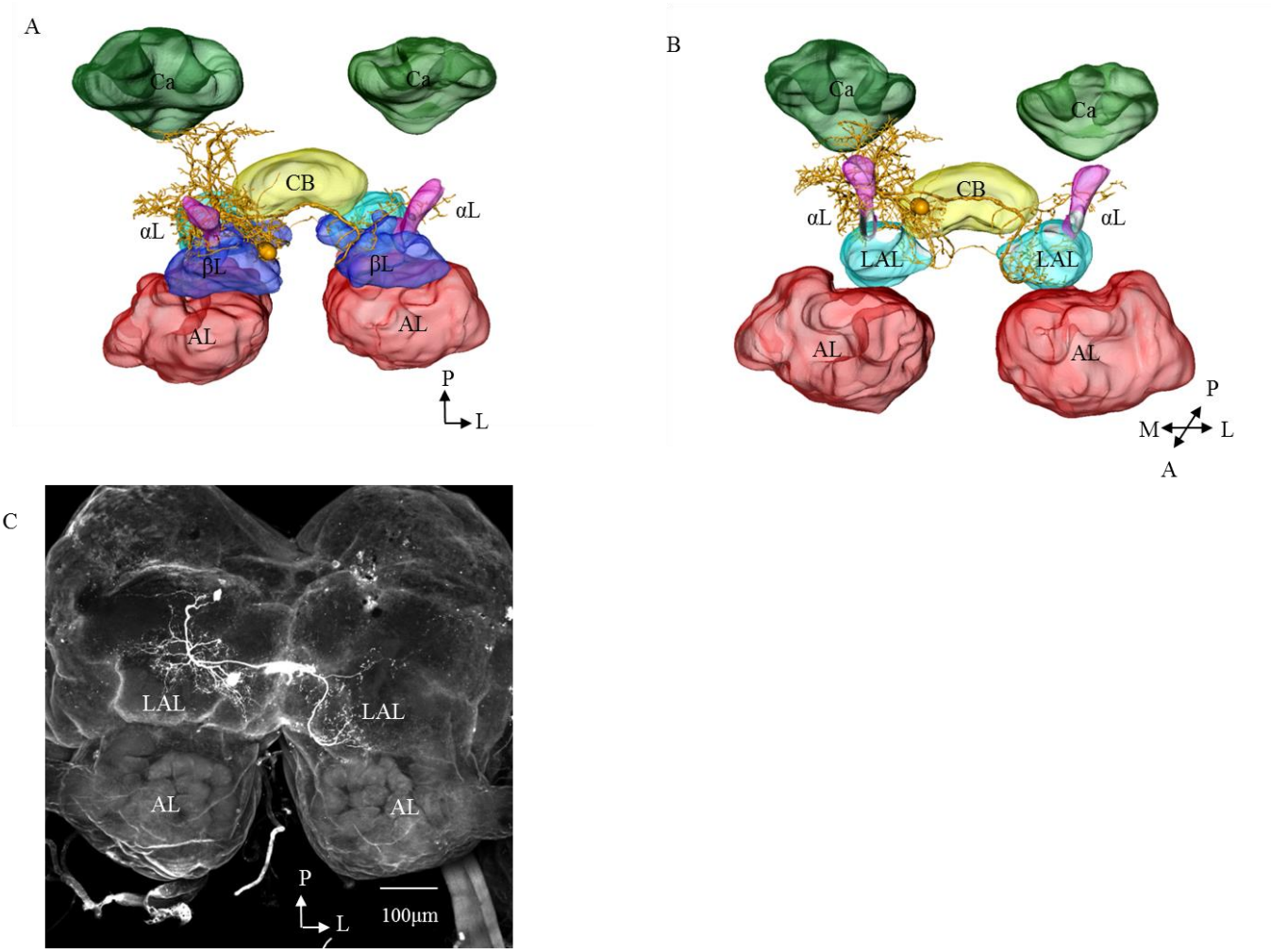
3.1 *Nevron 1*

Nevron 1 er et bilateralt protocerebralt nevron med asymmetriske forgreninger i de to hemisfærene. Nevronet har imidlertid bilaterale innerveringer i og rundt tre identiske nevropiler plassert ved hjernens midtlinje – lateral accessoy loben (LAL), β-loben og α-loben. Som vist i figur 3, forgrener nevronet seg ytterligere i andre hjerneregioner på ipsilateral side, dvs. der soma er lokalisert. Ettersom soma vanligvis er plassert i nærheten av et nevrons dendrittområde, kan vi anta at i det minste noen av disse ipsilaterale forgreningene utgjør nevronets inputområde.

Hovedgrenen av nevronet krysser midtlinjen via superior arch commisure (SAC), og på kontralateral side deler hovedgrenen seg i to der en subgren innerverer LAL, mens den andre subgrenen forgrener seg i områdene rundt β-loben og α-loben. På ipsilateral side projiserer hovedgrenen i posterior retning der den deler seg i to mindre subgrener, med en forgrening i nærheten av mushroom body calyces (Ca) og en i nærheten av protocerebral bridge (PB). På ipsilateral side er det også subgrener rund β-loben og α-loben, og en som innerverer column. Videre viser figur 3B at nevronet innerverer LAL på kontralateral side med en tykkere forgrening enn på ipsilateral side. Det er to «veier» mellom to LAL. Den andre, i tillegg til hovedgrenen, er en tynnere nevral forgrening som krysser midtlinjen i lateral accessory lobe commisure (LALC).

De rekonstruerte nevropilene i dette preparatet omfatter substrukterene som inngår i MB (calyses, β-loben og α-loben), LAL og CB. Figur 3A-B demonstrerer at nevronets innerveringer i de ovenfor nevnte nevropilomåder.

Nevron 1



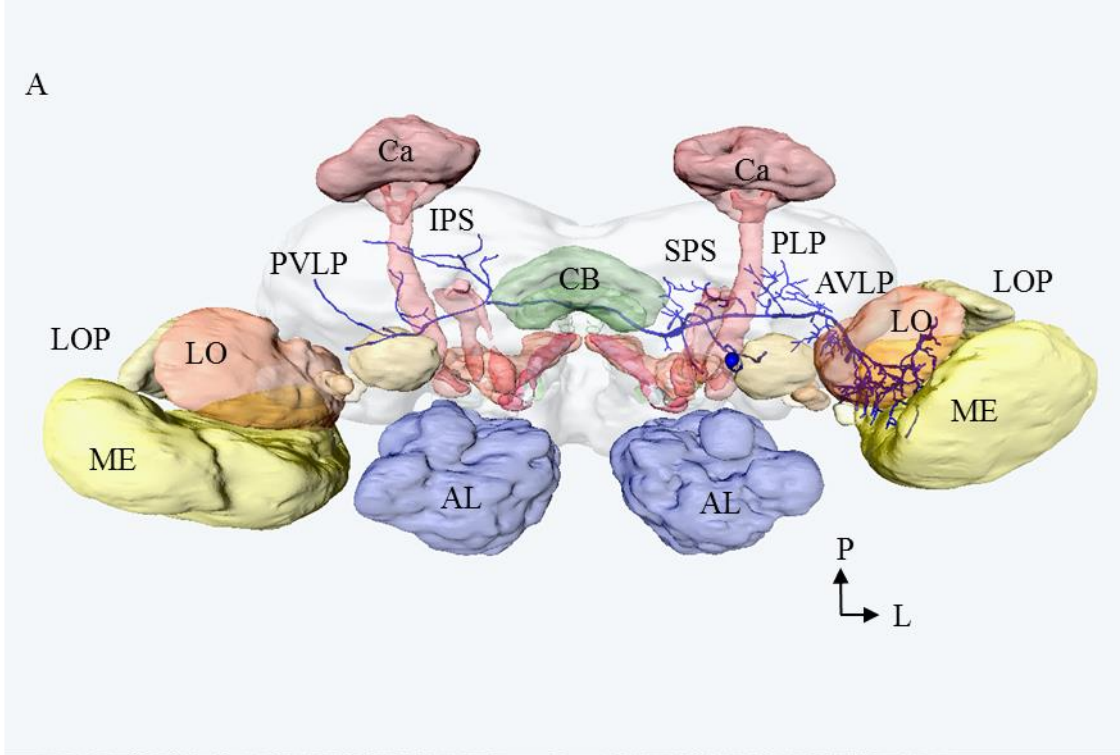
Figur 3| **Morfologi av nevron 1. A)** Dorsal orientering: Tredimensjonal rekonstruksjon av nevronet og relevante nevropiler. Soma er plassert dorsalt i høyre hjernehalvdel. Nevronet forgrener seg i områdene rundt tre substrukturer av mushroom body: Calyx, β-loben og α-loben. **B)** Dorsofrontal orientering: Nevronet innerverer lateral accessory lobe (LAL) på begge sider. **C)** Konfokalbilde i dorsofrontal orientering: maksimal avbildning av konfokalstakken. P= posterior; L = lateral; A = anterior; M = medial.

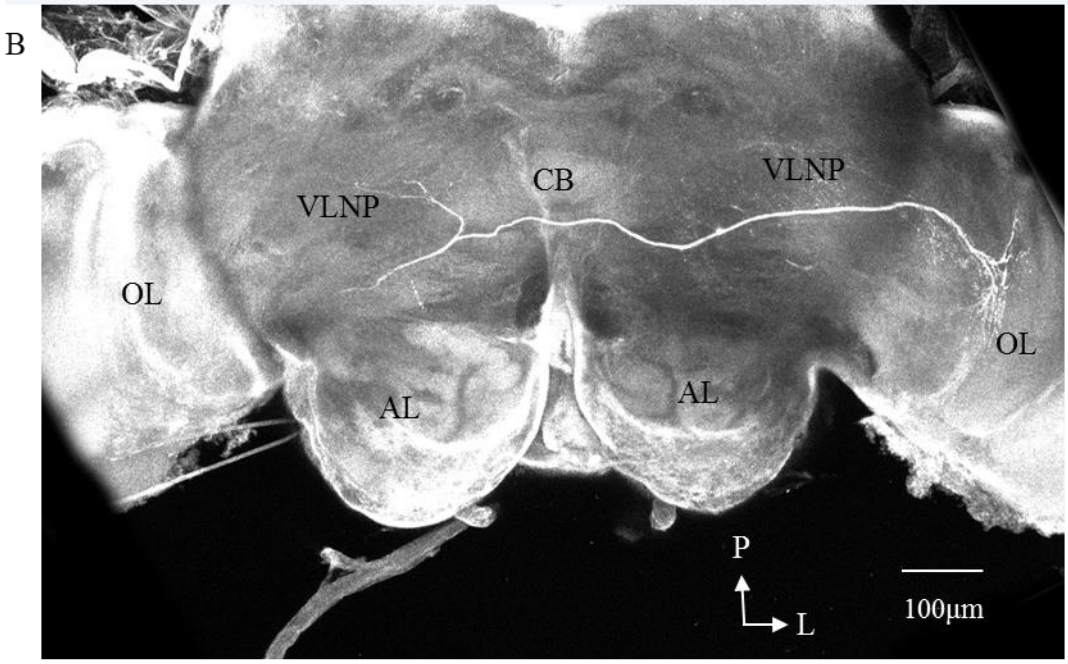
3.2 *Nevron 2*

Nevron 2 er et bilateralt protocerebralt nevron med forgreninger i den ene øyeloben. I figur 4A er det rekonstruerte nevronet transformert og plassert i en representativ hjerne (Chu et al., 2020). Kun relevante nevropiler er inkludert i referansehjernen for å vise de viktigste outputområdene for nevronet.

Som vist i rekonstruksjonen, innerverer nevronet tre substrukturer i en av de optisk lober, nemlig ME, LO og LOP. Cellekroppen er lokalisert frontalt i den mediale del av superiore nevropil, dvs. SMP. I samme hemisfære har nevronet forgreninger i superior posterior slope (SPS), posterior lateral protocerebrum (PLP) og anterior ventrolateral protocerebrum (AVLP). Nevronet projiserer kontralateralt via Great Commisure (GC) og krysser midtlinjen under CB. På kontralateral side fortsetter nevronet å følge kommisuren (GC) gjennom VMNP der den deler seg i to subgrener. Den ene grenen følger kommissuren til posterior ventrolateral protocerebrum (PVLP), mens den andre går i posterior retning og forgrener seg i inferior posterior slope (IPS).

Nevron 2



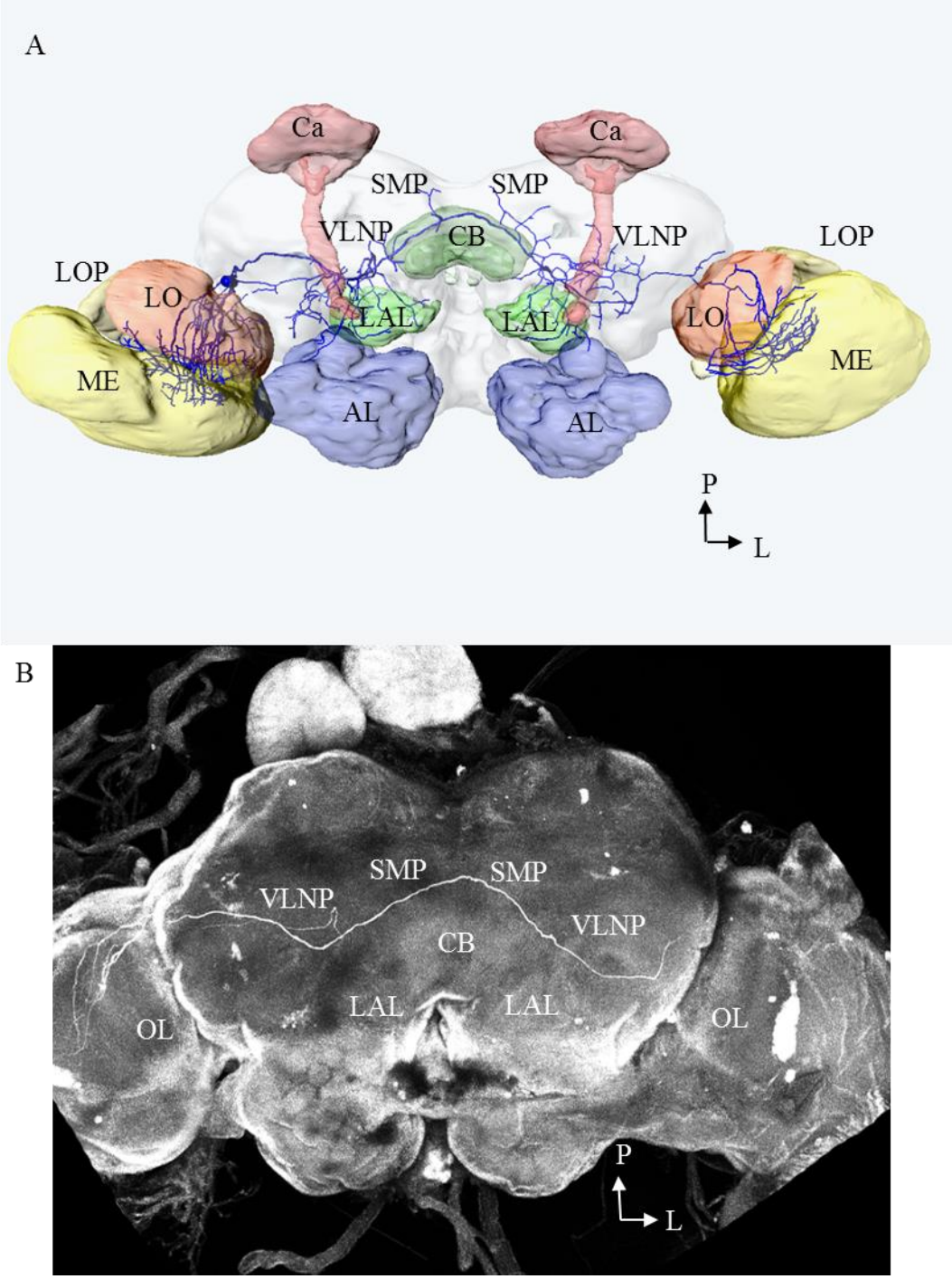


Figur 4| **Morfologi av nevron 2. A)** Dorsal orientering: tredimensjonal rekonstruksjon av nevronet satt inn i en representativ hjerne. Protocerebralt asymmetrisk nevron med cellekropp lokalisert frontalt i SMP. Nevronet krysser midtlinjen under CB i GC og går kontralateralt.. På kontralateral side deler nevronet seg i to subgreiner, der en forgrening projiserer lateralt til IPS mens den andre forgrener i PVLP. På ipsilateral side innerverer nevronet ME, LO og LOP i OL og har forgreninger i SPS, PLP og AVLP. **B)** dorsofrontal orientering: maksimal avbildning av konfokalstakken. P = posterior; L = lateral.

3.3 *Nevron 3*

Nevron 3 (N3) er et protocerebralt bilateralt nevron med forgreninger i begge optiske lober. I figur 5A er det rekonstruerte nevronet transformert og plassert inn i den representative hjernen (Chu et al., 2020). Figur 3A viser at nevronet er til dels bilateralt symmetrisk ved at det forgreiner seg i noen av de samme områder innen hver hemisfære, herunder medulla (ME), lobula (LO) og lobula plate (LOP) i optisk lobe, samt ventrlateral nevropil (VLNP) og lateral accessory lobe (LAL). I tillegg, er det mindre forgreininger i superior medial nevropil (SMP) i begge hemisfærer. Nevronet innerverer ikke antenneloben (AL), men har forgreininger posterior for AL. Nevronet krysser midtlinjen i superior posterior lateral protocerebrum commisure (sPLPC). Cellekroppen ligger i lateral protocerebrum i nærheten av lateral horn (LH).

Nevron 3

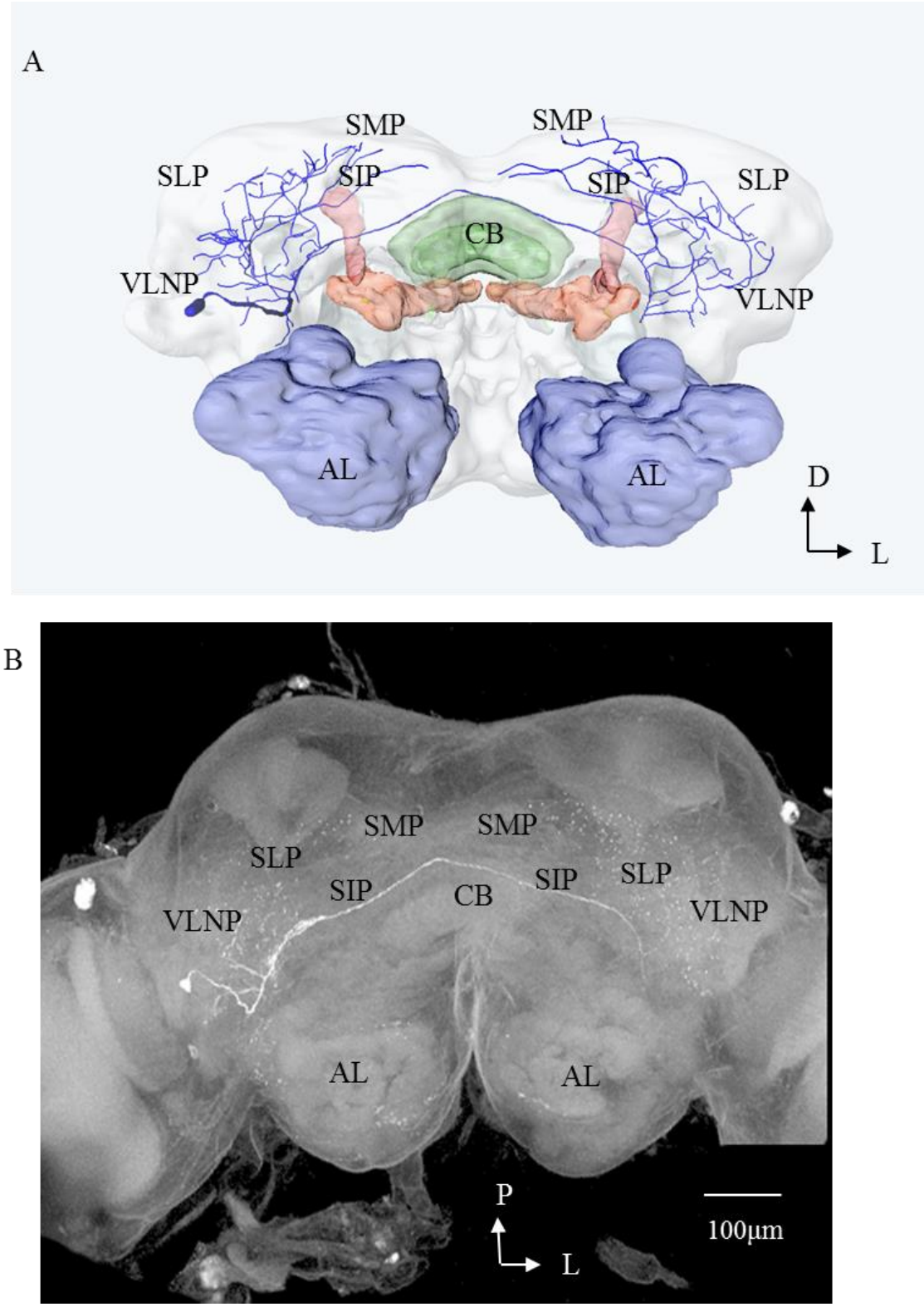


Figur 5| **Morfologi av nevron 3**. **A)** Dorsal orientering: tredimensjonal rekonstruksjon av nevronet satt inn i en representativ hjerne. Nevronet er ganske symmetrisk og innerverer medulla (ME), lobula (LO) og lobula plate (LOP), ventrolateral nevropil (VLNP), lateral accessory lobe (LAL), og med mindre forgreninger i superior medial protocerebrum (SMP) i begge hemisfærer. Soma er lokalisert lateralt i protocerebrum, på grensen til den optiske loben i høyre hemisfære. **B)** Dorsofrontal orientering: maksimal avbildning av konfokalstakken. P = posterior; L = lateral.

3.4 *Nevron 4*

Nevron 4 (N4) er et protocerbralt bilateralt nevron med forgreninger i begge hjernehalvdeler. I figur 6A er det rekonstruerte nevronet transformert og plassert i den representative hjernen(Chu et al., 2020). Figur 6A viser at nevronet er til dels bilateralt symmetrisk ved at det forgrener seg i noen av de samme områder innen hver hemisfære, herunder ventrolateral nevropil (VLNP) og alle de tre subregionene i superior nevropil: superior lateral protocerebrum (SLP), superior intermediate (SIP) og superior medial protocerebrum (SMP). Nevronet krysser midtlinjen i superior arch commisure (SAC), en kommissur over central body (CB). Fra den noe tykkere hovedgrenen er det sju tynnere subgrener som forgrener seg i SLP, SIP og SMP. Soma ligger i lateral protocerebrum i høyre hemisfære.

Nevron 4

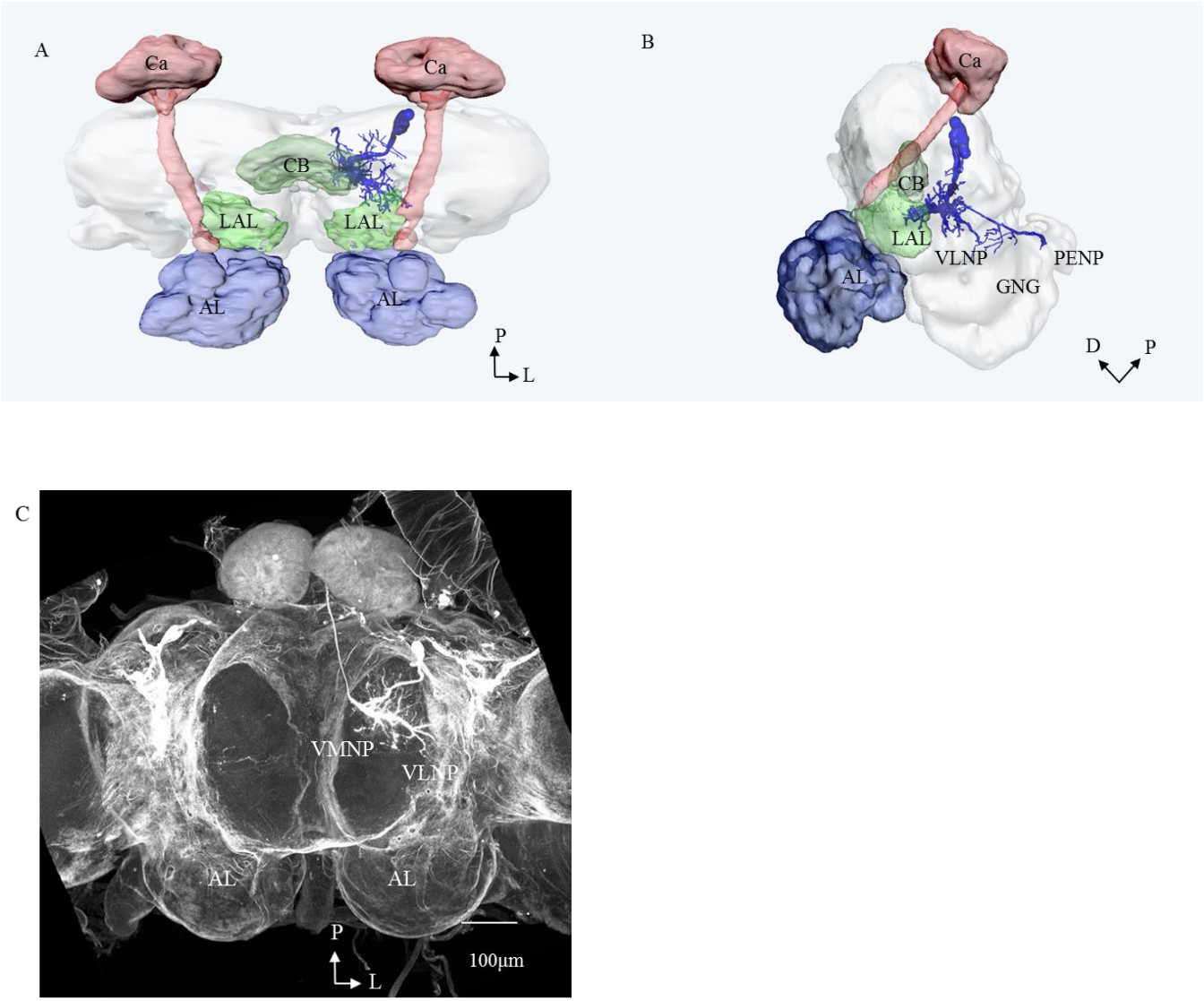


Figur 6| **Morfologi av nevron 4**. **A)** Frontal orientering: tredimensjonal rekonstruksjon av nevronet satt inn i en representativ hjerne. Nevronet er ganske symmetrisk med soma plassert i lateral protocerebrum på grensen til den optiske loben (OL) i høyre hemisfære. Nevronet krysser midtlinjen i superior arch commisure (SAC) og innerverer ventrolateral nevropiler (VLNP), superior lateral protocerebrum (SLP), superior intermediate protocerebrum (SIP) og superior medial protocerebrum (SMP) med 7 tynne subgrener i hver hjernehalvdel. **B)** Dorsofrontal orientering: maksimal avbildning av konfokalstakken. P = posterior; L = lateral.

3.5 *Nevron 5*

Nevron 5 (N5) er et unilateralt nevron, med forgreninger kun i venstre hjernehalvdel. I figur 7A-B er det rekonstruerte nevronet transformert og plassert inn i den representative hjernen (Chu et al., 2020). Figur 7A viser at nevronet forgrener seg i posteriore deler av den laterale accessory loben (LAL), cellekroppens plassering dorsoposterior i hjernen, ventromedialt for mushroom body calyses (Ca). Figur 7B viser at nevronet har en markant subgren som skiller seg fra hovedgrenen i ventrolateral nevropil, og som forgrener seg ventralt i retning ventralstrengen, via periesophageal nevropil (PENP) og gnathal ganglion (GNG). I figur 7C, en maksimal avbildning av konfokalstakken, viser at hovedgrenen av nevronet er sentralisert i ventrolaterale nevropil (VLNP) og ventromedial nevropil (VMNP). Siden preparatet kun inkluderer hjernen kan det ikke sies noe om nevronets videre ferd til ventralstrengen. Men konfokalscannen viser at nevronet går ganske dybt i GNG og dermed antas det at det projiserer videre til ventralstrengen.

Nevron 5



Figur 7| **Morfologi av nevron 5**. **A)** Dorsal orientering: cellekroppen er plassert dorsoposterior i hjernen, ventromedialt for mushroom body calyses (Ca) i venstre hjernehalvdel. **B)** Segital orientering: konfokalstakken inkluderer kun hjernen og viser at en tykk subgren forgrener seg via periesophageal (PENP) og ganske dypt i gnathal ganglion (GNG). Antar derfor at denne grenen går til ventral cord. Hovedgrenen av nevronet er lokalisert i ventromedial nevropil (VMNP) og ventrolateral nevropil (VLNP). En tykk subgren innerverer posterior deler av lateral accessory lobe (LAL). **C)** Dorsofrontal orientering: maksimal avbildning av konfokalstakken. P = posterior; L = lateral; D = dorsal.

4. Diskusjon

Hovedmålet med masteroppgaven var å bidra til ny kunnskap innen generell nevrovitenskap gjennom å visualisere individuelle nevroner i et velegnet hjernepreparat. Ved å benytte et lite modellpreparat, dvs. en nattsvermerhjerne, ble prefargede nevroner fullstendig rekonstruert ved bruk av et avansert data visualiseringsprogram. Den lille nattsvermerhjernen er særdeles godt egnet for denne typen modellering ettersom hele hjernen, og ikke kun snitt, kan avbildes via konfokal mikroskopi.

Ved bruk av konfokale bildestakker med fargede nevroner, ble fem rekonstruksjoner utført og presentert enten sammen med rekonstruerte nevropil-områder eller i en representativ hjerne. Alle de presenterte nevronene demonstrerer en distinkt morfologi som viser innerveringer av ulike områder i nattsvermerhjernen. Dataene fra denne studien bidrar med ny kunnskap om anatomisk organisering av hjernepreparatet og viser en stor grad av morfologisk variasjon blant nevronene i den lille insekthjernen.

I den påfølgende diskusjonen, vil jeg først rette fokus mot hvorfor insektmodeller egnet seg særdeles godt i nevrovitenskapelig forskning. I tillegg, vil jeg belyse hvordan digitalisering av bildedata blir til. Til slutt vil jeg inkludere noen antagelser om de funksjonelle egenskapene til de rekonstruerte nevronene som presenteres her, basert på deres morfologiske egenskaper.

4.1 Insekter som modellorganisme

I denne studien brukes en nattsvermerhjerne som modellorganisme for å visualisere individuelle nevroners morfologiske særtrekk. En modellorganisme er en art som er hyppig brukt i forskning for å forstå generelle biologiske fenomen, der hensikten er å gjøre oppdagelser i modellen som kan gi kunnskap om andre organismer, mennesket inkludert. Den lille insekthjernen er en ypperlig som modell for å forklare basale nevroanatomiske prinsipper, fordi hele hjernepreparatet kan avbildes via konfokalmikroskopi, i motsetning til i større organismer, hvor slike avbildninger kun kan dekke et snitt av hjernen. Selv om insekthjernen er mye mindre enn menneskehjernen, er nervesystemet hos de to organismene i høyeste grad sammenlignbart. Generelt er det velkjent at vertebrater og invertebrater innehar mange lignende sett med nevrale prinsipper (Ache & Young, 2005; Hildebrand & Shepherd, 1997). I luktesystemet, for eksempel, er den lignende strukturelle og funksjonelle organiseringen observert på flere synaptiske nivåer hos ulike arter innen de to rekkene

(phyla). Eksempelvis er mekanismene for deteksjonen av odoranter i perifere områder, signalprosessering i hjernens primære luktsenter og høyere-ordens luktprosessering svært lik hos vertebrater og invertebrater (Ache & Young, 2005; Hildebrand & Shepherd, 1997). Ved å innta en komparativ tilnærming, er det mulig å undersøke morfologiske trekk på tvers av både nært beslektede og fjernt beslektede arter.

4.2 Digitale rekonstruksjoner av nevrale elementer

Nevrovitenskaplig forskning har gjennom historien bidratt med en betydelig mengde rapporter der nevroner fra hjernen til ulike organismer er synliggjort. Faktisk er de moderne visualiseringsmetodene som brukes i dagens nevrovitenskaplige forskning, både når det gjelder søken etter og presentasjon av nevronenes morfologiske særtrekk, en fortsettelse av Camillio Golgi's og Santiago Ramón y Cajal's pionerarbeid. Digitale verktøy for rekonstruksjon av nevrale elementer katalyserte fremveksten av et forskningsfelt på tvers av subdisipliner, teknikker og forskningsspørsmål. Digitale rekonstruksjoner av nevrale elementer forenklet arbeidet med å kartlegge milliarder av koblinger i intrikate hjernenettverk (Halavi et al., 2012). Nevronene som presenteres i denne studien vil bli inkludert i den nyetablerte databasen, *Insect brain data base* (Heinze et al., 2020). Databasen er en åpen plattform, der nevrovitenskapelige data ulike insekthjerner, inkludert både anatomiske og fysiologiskefunn, kan lagres, deles og administreres. Denne typen 'big data', som er åpent tilgjengelig, fasiliterer ny kunnskap og innsikt ved å muliggjøre effektive sammenligninger på tvers av ulike insektarter, og i tillegg fungere som et knutepunkt for ny informasjon om nevroetologiske særtrekk hos insekter.

4.3 Forslag til mulige funksjonelle beskrivelser av de rekonstruerte nevronene

De fem nevronene som ble presentert i resultatene var morfologisk ulike. Først kommer jeg til å diskutere mulig funksjonell signifikans i Nevron 3 (N3) og Nevron 5 (N5), siden det morfologiske mønsteret hos disse nevronene ligner et det tidligere rapportert i to nevroner hos henholdsvis silkespinneren, *Bombyx mori*, og 'Bogong moth', *Agrotis infusa*. Nevron 1 (N1) er også funksjonelt interessant fordi det innerverer områder som prosesserer luktinformasjon. Derfor har jeg valgt å inkludere det i diskusjonen, selv om det ikke er rapportert om

strukturelt lignende nevroner i andre insektarter. For de to gjenværende nevronene, Nevron 2 (N2) og Nevron 4 (N4), er det så vidt meg bekjent, ikke rapportert om morfologisk tilsvarende nevroner. Ettersom det også er vanskelig å antyde noe om funksjonell betydning av disse nevronene, blir de derfor ikke diskutert.

4.3.1 Nevron 3 ligner et tidligere beskrevet nevron som responderer på lys fra himmellegemer

Ifølge upublisert data fra 'Bogong moth' (Heinze. S, Lund Universitet, Sverige), er det funnet et nevron med morfologisk særtrekk som ligner de som kjennetegner nevronet, N3, i dette arbeidet. Likheten i projiseringsmønster indikerer at nevronet kan være involvert i nattsvermerens orientering i henhold til lyssignaler fra himmellegemer som for eksempel stjerner.

Som kjent, migrerer en rekke insekter (for eksempel: sommerfugler, nattsvermere, gresshopper og øyenstikkere) over betydelige geografiske avstander for å overleve i miljø der årstidene skifter (Merlin et al., 2012). For å finne frem til fordelaktige miljøer på landjorda, har insekter og andre dyr utviklet sofistikerte navigasjonsmekanismer som tilsvarer (og ofte overgår) menneskenes bruk av kart og kompass. Kartet benyttes for å finne posisjon kompasset for å bestemme retning. Mens kartsansen er lite forstått for migrerende insekter, har ny forskning gitt innsikt i ulike typer biologiske kompass som brukes under langdistanseflygning. Den mest studerte mekanismen, omfatter strategier for retningsbestemmelse der benyttelse av et tidskompenserende solkompass inngår. Denne formen for navigasjon benyttes av dagaktive insekter, der de underliggende nevrale kretsene er beskrevet tidligere.

Mange insekter bruker polarisert lys på himmelen for å orientere/navigere i omgivelsene. Polarisert lys blir detektert av retningsorienterte sanseceller i dorsal rim area (DRA)-området i insektets fasett-øye. Som all visuell informasjon detektert av øyet, blir også polarisert lys prosessert først i øyelobene. For eksempel har det blitt rapportert en nevrontype som fanger opp polariserte lyssignaler både hos sirisser og gresshopper. Disse nevronene kalles POL1 nevron (sirisser) og MeMe1 nevron (gresshopper) og er begge involvert i prosessering av polarisert lys i insekthjernen (El Jundi et al., 2011). Gresshoppens MeMe1 nevronet er et såkalt intermedulla nevron, der termen medulla-medulla nevron (MeMe) refererer til

sammenkoblingen av medulla i høyre hemisfære og venstre hemisfære. Nevron 3 i dette masterarbeidet, innerverer i likhet med MeMe- og POL1-nevronet, også tre av substrukturene i hver av de to optiske lobene: medulla, lobula complex og lobula, som alle er involvert i prosessering av polarisert lys (Heinze, 2014). Her har altså N3 og nevroner involvert i prosessering av polarisert lys, lignende morfologiske særtrekk.

I tillegg til de morfologiske likhetene påpekt i forrige avsnitt, er det også anatomiske særegenheter som skiller N3 fra de tidligere identifiserte nevronene dedikert til prosessering av polarisert lys. Likhetene omfatter forgreningene i øyelobene, mens forskjellene omfatter forgreningene i midthjernen. Mens N3 har forgreninger i lateral accessory lobene (LAL), superior medial protocerebrum (SMP), og ventrolaterale nevropiler (VLNP), innerverer de tidligere identifiserte nevronene anterior optisk tuberkel (AOTU) og central complex (CX). Her utgjør de anatomisk definerte nevroner og de nevrale responsene under stimulering med polarisertlys, et solid fundament for å karakterisere det aktuelle nettverket som et visuelt nettverk knyttet spesifikt til prosessering av input fra polarisert lys.

Central complex blir sammen med AOTU og LAL, ofte karakterisert som solkompass-nevropilene. De tre nevropil-strukturene er sterkt forbundet og prosesserer kompass-relaterte former for stimuli (Heinze et al., 2013). Nevronet som presenteres her, N3, innerverer altså verken CX eller AOTU, men det innerverer LAL.

Kort oppsummert, har altså N3 noen fellestrekk med nevroner som prosesserer solkompass-relaterte stimuli, samtidig er det også flere morfologiske særtrekk som ikke er like. Det faktum at N3 innerverer LAL, men ikke CX og AOTU, innebærer en vesentlig forskjell fra de nevronene som er involvert i prosessering i polarisert lys. Med såpass store ulikheter i morfologisk karakteristikk, er det mye som tyder på at N3 ikke er spesialisert i prosessering av polarisert lys. Det er imidlertid relevant å anta at nevronet er involvert i synsprosessering, og muligens i en annen type signalbehandling knyttet til navigering.

En økende mengde med bevis for at migrerende insekter også bruker andre typer kompass, som lyssignaler fra nattehimmelen (månelys, stjernelys) eller jordas magnetiske felt. Som navnet antyder, er nattsvermeren nattaktiv, og det er sannsynlig at den bruker relevante signaler for å navigere og migrere. Eksempler på denne typen signaler er månen og dens assosierende polariserende mønstre, så vel som stjernene og da spesielt stjernene i melkeveien

(Merlin et al., 2012). Evnen til å orientere etter stjerne- og månelys har lenge vært kjent hos fugler, mennesker og sel (Dacke et al., 2013), men for insekter ble det første beviset for navigering etter himmellys-legemer rapportert i billearten, *Scarabaeus satyrus* (Dacke et al., 2013).

4.3.2 Nevron 5 ligner tidligere beskrevne utgående hjernenevroner involvert i duftprosessering

Nattsvermer-hanner orienterer etter feromoner sendt ut fra konspesifikke hunner. De fysiologiske data som forelå, viste at Nevron 5 (N5) responderte på den artsspesifikke feromonblandingen for *H. armigera.* Denne består av to feromonkomponenter i et spesifikt blandingsforhold som tilsvarer den naturlige duften sendt ut fra hunnen. Nevron 5 innerverte lateral accessory lobe (LAL), ventrolateral nevropil (VLNP) og ventromedial nevropil (VMNP) før det projiserte ut av hjernen, i retning av ventralstrengen. Siden N5 responderte på feromonblandingen, tyder det på at nevronet er en del av nevrale kretser som prosesserer feromoninformasjon i nattsvermerhjernen. Et velbeskrevet output-område fra insekthjernen, som til og med er spesifikt knyttet til feromonprosessering, er LAL (Namiki & Kanzaki, 2016). Dette nevropil-området blir ikke direkte innervert av projeksjonsnevroner fra antennelobene (AL) (Homberg et al., 1988; Kanzaki et al., 1989), men LAL er vist å inngå i høyere-ordens prosessering av ulike kategorier av luktinformasjon (Kanzaki et al., 1991).

Ifølge Namiki et al. (2016), er LAL, delt inn i øvre og nedre del. Øvre del blir beskrevet som det protocerebrale knutepunktet der informasjon fra ulike områder integreres, mens den nedre del er involvert i å generere langvarige nervesignaler knyttet til lokomotoriske kommandoer, ofte karakterisert som et premotorisk senter for 'gå'-kommandoer hos den ikke-flygende silkespinneren, *B. mori* (Namiki & Kanzaki, 2016).

Ettersom N5 innerverer ventro-posteriore deler av LAL, som kan korrespondere med den nedre del, nevnt i Namiki et al. (2016), og i tillegg sender informasjon videre til ventralstrengen, minner dette nevronet om et utgående nevron rapportert i den ovenfor nevnte silkespinneren. Såkalte utgående nevroner (descending neurons – DN) er altså nevroner som projiserer ut av hjernen og ned i ventral nervestrengen (analog til vertebraters ryggmarg). Her, i ventralstrengen, danner disse nevronene kontakt med motoriske nevroner. Outputinformasjonen er på forhånd integrert i hjernen, der input fra ulike sensorisk systemer blir prosessert og koblet sammen slik at hensiktsmessig initiering av motorisk kontroll kan

skje. Utgående nevroner frakter altså den integrerte informasjonen til motoriske nerveceller i perifere deler av nervesystemet. Med andre ord, kontrollerer hjernen atferd gjennom de utgående nevronene.

I tillegg til de utgående nevronene, inneholder også ventralstrengen inngående nevroner (ascending neurons, ANs) som altså bærer signalinformasjon fra ventralstrengen og inn i hjernen. Morfologisk kan man skille utadgående inngående nevroner i ventralstrengen fra hverandre ved å se på plassering av cellekropp. Mens DNs vanligvis har soma i protocerebrum, har ANs soma i thorax, (analog til brystkassen) (Hsu & Bhandawat, 2016).

Cellekroppen til N5 var lokalisert dorsoposterior i hjernen, ventromedialt for mushroom body calyces. I en mer omfattende studie av bananflue (Hsu & Bhandawat, 2016), hvor de kartla over 1000 DNs, var gruppene av soma plassert i seks ulike cellekluster, hvorav ett var lokalisert posterior i SMP. Dette samsvarer med plasseringen av soma til nevronet, i N5. I bananfluestudien henviste forfatterne til tidligere studier av henholdsvis kakerlakker (Okada et al., 2003) og sirisser (Staudacher, 1998), der et cellekluster for utgående nevnoner var lokalisert i SMP.

Tidligere studier på silkespinneren har vist at nevrale kretser innad i LAL vanligvis genererer vedvarende fyringsaktivitet(Kanzaki et al., 1994; Namiki et al., 2014). Feromoninput endrer dette ved å initiere en annen type nevralt fyringsmønster, kalt *flip-flop* aktivitet. Denne flip-flop aktiviteten antas å mediere gå-kommandoer som sørger for å orientere hannen etter feromonsporet. Tre typer DNs som viser flip-flop nevrale signaler har blitt identifisert så langt (Mishima & Kanzaki, 1999; Wada & Kanzaki, 2005). Alle disse nevrontypene innerverer LAL. Interessant nok, innerverer såkalte Group-IIA og group-IID DNs i ipsilateral del av LAL og følger ipsilateral del av *neck connective* ut av hjernen (Wada & Kanzaki, 2005), noe som er sammenlignbart med morfologien til N5 nevronet presentert her.

Generelt er feromoninformasjon prosessert av nevrale kretser på ulike synaptiske nivå. Feromon-fremkalt vedvarende fyringsaktivitet er imidlertid observert kun i nevroner som innerverer LAL, noe som indikerer at LAL er området hvor flip-flop signalet blir produsert. Individuelle DNs hos insekter kan være involvert i ulike atferds-responser som for eksempel baklengs gange, sangproduksjon i forbindelse med frieri, og evasive/unnvikende take-off. Men en omfattende beskrivelse av ‘descending’ motorkontroll mangler. Den nevrale output-kretsen for kontroll og igangsetting av bevegelse er ennå ikke fullstendig klarlagt.

4.3.3 Nevron 1 innerverer hjerneområder som er involvert i behandling av luktsignaler

Så vidt meg bekjent, er det ikke blitt rapportert om et nevron med lignende morfologiske særtrekk som Nevron 1 (N1). Likevel velger jeg å inkludere det i diskusjonen fordi nevronet innerverer hjerneområder involvert i luktprosessering. Dette nevronet innerverer column og lateral accessory lobe (LAL) i begge hjernehalvdelene. Column er et lite område i superior intermediate nevropil (SIP), som opptar en plass mellom alfa-loben og anterior optisk tuberkel (AOTU). Denne søyleformede strukturen er et fremtredende terminalområde for projeksjonsnevroner fra antenneloben (AL) (Ian et al., 2016), og både projeksjonsnevroner som frakter feromon- og planteduft-informasjon terminerer i dette området (Chu et al., 2020). I likhet med mange andre protocerebrale duft-nevroner, innerverer også N1 LAL (Kanzaki et al., 1991). Det bilaterale, N1 nevronet har to forgreninger som krysser midtlinjen, en i kommissuren som forbinder LAL i hver hjernehalvdel, kalt 'lateral accessory lobe commisure' (LALC), og en i kommissuren kalt 'superior arch commisure' (SAC). Det er mulig at dette nevronet mottar informasjon direkte fra antenneloben via projeksjonsnevroner som ender opp i column. Siden nevronet ikke responderte på noen av odorantene som ble testet, er det mulig at nevronet er avhengig av en mer spesifikt sammensatt duftstimulus eller eventuelt mer kompleks sensorisk input inkludert signaler fra andre modaliteter – muligens formidlet via noen av andre innerverte hjerneområdene.

5. Konklusjon

De fem høyere-ordens nevronene rekonstruert fra konfokale avbildninger av en nattsvermerhjerne, demonstrerte stor morfologisk diversitet. Denne studien bidrar derfor til ny kunnskap innen generell nevrovitenskap ved å visualisere i detalj individuelle nevroner med avansert projiseringsmønster. Ved å benytte den forholdsvis lille nattsvermerhjernen som modellpreparat, kunne hele hjernevolumet, ikke kun snitt, avbildes via konfokal mikroskopi. Dette muliggjorde, ved bruk av det avanserte visualiseringsprogrammet, Amira, etablering av digitale 3D modeller av komplette individuelle nerveceller, et unilateralt og fire bilaterale. AMIRA-programmet gjorde det videre mulig å visualisere nevronenes innerveringsområder i selve hjernen, enten ved at de rekonstruerte nevronene ble vist sammen med de rekonstruerte nevropil-områder fra samme preparat eller ved at nevronmodellen ble manuelt satt inn i en referansehjerne Visualiseringen av de nevrale strukturene dannet, sammen med komparative sammenligninger av nevroner fra andre arter, grunnlag for å antyde noen av nevronenes funksjon. Generelt er høyere-ordens nevroner relativt lite beskrevet hos insekter. Alle nevronene som presenteres her, skal inkluderes i 'Insectbraindatabase' og vil dermed være et viktig bidrag i denne nyetablerte databasen som er åpent tilgjengelig for alle.

Forkortelser

hjerneområder

1)	**optiske lober**	**OL**
	lamina	LA
	medulla	ME
	lobula plate	LOP
	lobula	LO
	accessory medulla	AME
2)	**mushroom body**	**MB**
	calyx	Ca
	pedunculus	PED
	alfaloben	αL
	betaloben	βL
3)	**central complex**	**CX**
	central body	CB
	fan-shaped body	FB
	ellipsoid body	EB
	protocerebral bridge	PB
4)	**lateral accessory lobe**	**LAL**
5)	**ventrolaterale nevropiler**	**VLNP**
	anterior optic tubercle	AOTU
	ventrolateral protocerebrum	VLP
	anterior VLP	AVLP
	posterior VLP	PVLP
	posteriorlateral protocerebrum	PLP
6)	**lateral horn**	**LH**
7)	**superior nevropiler**	**SNP**
	superior lateral protocerebrum	SLP
	superior intermediate protocerebrum	SIP
	superior medial protocerebrum	SMP
8)	**antennelober**	**AL**
	ordinære glomeruli	OL
	macroglomerual complex	MGC
9)	**ventromedial nevropiler**	**VMNP**
	posterior slope	PS
	superior posterior slope	SPS
	inferior posterior slope	IPS
10)	**periosophageal nevropiler**	**PENP**
11)	**gnathal ganglia**	**GNG**

kommissurer

1.	**lateral accessory lobe commissure**	**LALC**
2.	**superior arch commissure**	**SAC**
3.	**great commisure**	**GC**
4.	**superior PLP commisure**	**sPLPC**

Referanser

Chu, X., Heinze, S., Ian, E., & Berg, B. G. (2020). A Novel Major Output Target for Pheromone-Sensitive Projection Neurons in Male Moths. *Front Cell Neurosci*, *14*, 147. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00147

Dacke, M., Baird, E., Byrne, M., Scholtz, C. H., & Warrant, E. J. (2013). Dung beetles use the Milky Way for orientation. *Current Biology*, *23*(4), 298-300. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.12.034

De Carlos, J. A., & Borrell, J. (2007). A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience. *Brain Res Rev*, *55*(1), 8-16. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.03.010

Donohue, D. E., & Ascoli, G. A. (2011). Automated reconstruction of neuronal morphology: an overview. *Brain Res Rev*, *67*(1-2), 94-102. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.11.003

El Jundi, B., Pfeiffer, K., & Homberg, U. (2011). A distinct layer of the medulla integrates sky compass signals in the brain of an insect. *PLoS One*, *6*(11), e27855. https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027855

Evers, J. F., Schmitt, S., Sibila, M., & Duch, C. (2005). Progress in functional neuroanatomy: precise automatic geometric reconstruction of neuronal morphology from confocal image stacks. *J Neurophysiol*, *93*(4), 2331-2342. https://doi.org/10.1152/jn.00761.2004

Galizia, C. G., & Rossler, W. (2010). Parallel olfactory systems in insects: anatomy and function. *Annu Rev Entomol*, *55*, 399-420. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085442

Halavi, M., Hamilton, K. A., Parekh, R., & Ascoli, G. A. (2012). Digital reconstructions of neuronal morphology: three decades of research trends. *Front Neurosci*, *6*, 49. https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00049

Heinze, S. (2014). Polarized-light processing in insect brains: recent insights from the desert locust, the monarch butterfly, the cricket, and the fruit fly. In *Polarized light and polarization vision in animal sciences* (pp. 61-111). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54718-8_4

Heinze, S., el Jundi, B., Berg, B. G., Homberg, U., Menzel, R., Pfeiffer, K., Dacke, M., Warrant, E. J., Pfuhl, G., & Rybak, J. (2020). InsectBrainDatabase-A unified platform to manage, share, and archive morphological and functional data. *bioRxiv*. https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.11.30.397489

Heinze, S., & Reppert, S. M. (2012). Anatomical basis of sun compass navigation I: the general layout of the monarch butterfly brain. *J Comp Neurol*, *520*(8), 1599-1628. https://doi.org/10.1002/cne.23054

Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci*, *3*, 31. https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009

Hildebrand, J. G., & Shepherd, G. M. (1997). Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annu Rev Neurosci*, *20*(1), 595-631. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.20.1.595

Homberg, U., Montague, R. A., & Hildebrand, J. G. (1988). Anatomy of antenno-cerebral pathways in the brain of the sphinx moth Manduca sexta. *Cell Tissue Res*, *254*(2), 255-281. https://doi.org/10.1007/BF00225800

Hsu, C. T., & Bhandawat, V. (2016). Organization of descending neurons in Drosophila melanogaster. *Sci Rep*, *6*(1), 20259. https://doi.org/10.1038/srep20259

Ian, E., Berg, A., Lillevoll, S. C., & Berg, B. G. (2016). Antennal-lobe tracts in the noctuid moth, Heliothis virescens: new anatomical findings. *Cell Tissue Res*, *366*(1), 23-35. https://doi.org/10.1007/s00441-016-2448-0

Ian, E., Zhao, X. C., Lande, A., & Berg, B. G. (2016). Individual Neurons Confined to Distinct Antennal-Lobe Tracts in the Heliothine Moth: Morphological Characteristics and Global Projection Patterns. *Front Neuroanat*, *10*, 101. https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00101

Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J. D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L. L., Rossler, W., Simpson, J. H., Strausfeld, N. J., Strauss, R., Vosshall, L. B., & Insect Brain Name Working, G. (2014). A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, *81*(4), 755-765. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.017

Ito, M., Masuda, N., Shinomiya, K., Endo, K., & Ito, K. (2013). Systematic analysis of neural projections reveals clonal composition of the Drosophila brain. *Curr Biol*, *23*(8), 644-655. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.015

Kanzaki, R., Arbas, E. A., & Hildebrand, J. G. (1991). Physiology and morphology of protocerebral olfactory neurons in the male moth Manduca sexta. *J Comp Physiol A*, *168*(3), 281-298. https://doi.org/10.1007/BF00198348

Kanzaki, R., Arbas, E. A., Strausfeld, N. J., & Hildebrand, J. G. (1989). Physiology and morphology of projection neurons in the antennal lobe of the male mothManduca sexta. *Journal of comparative physiology A*, *165*(4), 427-453. https://doi.org/10.1007/BF00611233

Kanzaki, R., Ikeda, A., & Shibuya, T. (1994). Morphological and physiological properties of pheromone-triggered flipflopping descending interneurons of the male silkworm moth, Bombyx mori. *Journal of comparative physiology A*, *175*(1), 1-14. https://doi.org/10.1007/BF00217431

Kido, A., & Ito, K. (2002). Mushroom bodies are not required for courtship behavior by normal and sexually mosaic Drosophila. *Journal of neurobiology*, *52*(4), 302-311. https://doi.org/10.1002/neu.10100

Klenoff, J. R., & Greer, C. A. (1998). Postnatal development of olfactory receptor cell axonal arbors. *Journal of Comparative Neurology*, *390*(2), 256-267. https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19980112)390:2%3c256::aid-cne8%3e3.0.co;2-0

MacLeod, A. (2007). Report of a Pest Risk Analysis.

Masse, N. Y., Turner, G. C., & Jefferis, G. S. (2009). Olfactory information processing in Drosophila. *Curr Biol*, *19*(16), R700-713. https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.026

Menzel, R. (2001). Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem*, *8*(2), 53-62. https://doi.org/10.1101/lm.38801

Merlin, C., Heinze, S., & Reppert, S. M. (2012). Unraveling navigational strategies in migratory insects. *Current opinion in neurobiology*, *22*(2), 353-361. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.11.009

Mishima, T., & Kanzaki, R. (1999). Physiological and morphological characterization of olfactory descending interneurons of the male silkworm moth, Bombyx mori. *Journal of comparative physiology A*, *184*(2), 143-160. https://doi.org/10.1007/s003590050314

Mu, L. Y., Ito, K., Bacon, J. P., & Strausfeld, N. J. (2012). Optic Glomeruli and Their Inputs in Drosophila Share an Organizational Ground Pattern with the Antennal Lobes. *Journal of Neuroscience*, *32*(18), 6061-6071. https://doi.org/10.1523/Jneurosci.0221-12.2012

Namiki, S., Iwabuchi, S., Pansopha Kono, P., & Kanzaki, R. (2014). Information flow through neural circuits for pheromone orientation. *Nat Commun*, *5*(1), 5919. https://doi.org/10.1038/ncomms6919

Namiki, S., & Kanzaki, R. (2016). Comparative Neuroanatomy of the Lateral Accessory Lobe in the Insect Brain. *Front Physiol*, *7*, 244. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00244

Okada, R., Sakura, M., & Mizunami, M. (2003). Distribution of dendrites of descending neurons and its implications for the basic organization of the cockroach brain. *Journal of Comparative Neurology*, *458*(2), 158-174. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.10580

Parekh, R., & Ascoli, G. A. (2013). Neuronal morphology goes digital: a research hub for cellular and system neuroscience. *Neuron*, *77*(6), 1017-1038. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.008

Polilov, A. A. (2011). Anatomy of the smallest coleoptera, featherwing beetles of the tribe nanosellini (Coleoptera, Ptiliidae), and limits of insect miniaturization. *Entomological review*, *88*(1), 26-33. https://doi.org/10.1134/s0013873808010041

Priesner, E., Witzgall, P., & Voerman, S. (1986). Field Attraction Response of Raspberry Clearwing Moths, Pennisetia-Hylaeiformis Lasp (Lepidoptera, Sesiidae), to Candidate Pheromone Chemicals. *Journal of Applied Entomology*, *102*(2), 195-210. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1986.tb00910.x

Richter, S., Loesel, R., Purschke, G., Schmidt-Rhaesa, A., Scholtz, G., Stach, T., Vogt, L., Wanninger, A., Brenneis, G., Doring, C., Faller, S., Fritsch, M., Grobe, P., Heuer, C. M., Kaul, S., Moller, O. S., Muller, C. H., Rieger, V., Rothe, B. H., Stegner, M. E., & Harzsch, S. (2010).

Invertebrate neurophylogeny: suggested terms and definitions for a neuroanatomical glossary. *Front Zool*, *7*(1), 29. https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-29

Schmitt, S., Evers, J. F., Duch, C., Scholz, M., & Obermayer, K. (2004). New methods for the computer-assisted 3-D reconstruction of neurons from confocal image stacks. *Neuroimage*, *23*(4), 1283-1298. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.06.047

Stalling, D., Westerhoff, M., & Hege, H.-C. (2005). Amira: A highly interactive system for visual data analysis. *The visualization handbook*, *38*, 749-767.

Staudacher, E. (1998). Distribution and morphology of descending brain neurons in the cricket gryllus bimaculatus. *Cell Tissue Res*, *294*(1), 187-202. https://doi.org/10.1007/s004410051169

Strausfeld, N. J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R. S., & Ito, K. (1998). Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learning & memory*, *5*(1), 11-37. https://doi.org/http://doi.org/10.1101/lm.38801

Strausfeld, N. J., Sinakevitch, I., Brown, S. M., & Farris, S. M. (2009). Ground plan of the insect mushroom body: functional and evolutionary implications. *J Comp Neurol*, *513*(3), 265-291. https://doi.org/10.1002/cne.21948

Vosshall, L. B., Wong, A. M., & Axel, R. (2000). An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, *102*(2), 147-159. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00021-0

Wada, S., & Kanzaki, R. (2005). Neural control mechanisms of the pheromone-triggered programmed behavior in male silkmoths revealed by double-labeling of descending interneurons and a motor neuron. *J Comp Neurol*, *484*(2), 168-182. https://doi.org/10.1002/cne.20452

Witthöft, W. (1967). Absolute anzahl und verteilung der zellen im him der honigbiene. *Zeitschrift für Morphologie der Tiere*, *61*(1), 160-184. https://doi.org/10.1007/bf00298776

Zhao, X. C., Chen, Q. Y., Guo, P., Xie, G. Y., Tang, Q. B., Guo, X. R., & Berg, B. G. (2016). Glomerular identification in the antennal lobe of the male moth Helicoverpa armigera. *J Comp Neurol*, *524*(15), 2993-3013. https://doi.org/10.1002/cne.24003