

2 Abhandlung

Das Gehirn eines Menschen besteht aus etwa 10^{11} - 10^{12} Neuronen (Müller und Reinhardt, 1990; Johnston und Miao-Sin 1995) und ermöglicht sehr vielfältiges und komplexes Verhalten. Die einzelnen Nervenzellen bilden jeweils zahlreiche Verknüpfungen (insgesamt etwa 10^{15}) untereinander aus, so dass häufig vom menschlichen Gehirn als von der komplexesten Struktur im Universum gesprochen wird.

Aber auch das Gehirn eines sehr kleinen Tieres stellt bereits ein sehr komplexes System dar, und das Gehirn eines Insektes enthält etwa 10^5 - 10^6 Nervenzellen (*Drosophila*: 250000, Honigbiene: 950000 (Menzel und Giurfa 2001)). Um die Funktionsweise eines solchen Systems zu ergründen, ist es ein Ansatz, dieses nicht in seiner Gesamtheit zu erforschen, sondern in Untereinheiten abnehmender Komplexität zu unterteilen. Auf zellulärer Ebene kann die Synapse als kleinste funktionale Einheit der Informationsverarbeitung zwischen Neuronen betrachtet werden. Mit einer sogenannten Black-Box-Analyse (siehe Exkurs 3) kann eine Kennlinie ermittelt werden, die die Beziehung von präsynaptischem Signal (‚Eingang‘) und postsynaptischer Reaktion (‚Ausgang‘) beschreibt.

Den Schwerpunkt meiner Arbeit bildet die systematische Untersuchung der Beziehung zwischen Eingangs- und Ausgangssignal an einer identifizierten synaptischen Verbindung im visuellen System der *blauen Fleischfliege* (*Calliphora vicina*) (Kapitel 3 und 4). Die postsynaptische Zelle (das Ausgangselement) bekommt direkten Eingang von mehreren Zellen, die in ihren physiologischen Eigenschaften weitgehend ähnlich sind, sich jedoch in der Lage ihres rezeptiven Feldes unterscheiden. Die Signalstruktur der Eingangselemente ist komplex und setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: zum einen aus langsamen, gradierten Membranpotenzialänderungen und zum anderen aus Aktionspotenzialen mit variabler Amplitude, die den langsamen Signalen aufgelagert sind. Durch intra- und extrazelluläre Ableitungen wurde *in vivo* das neuronale Signal prä- und postsynaptisch erfasst. Das Eingangssignal, das heißt das präsynaptische Membranpotenzial, wurde im Versuch entweder mittels Anwendung der Voltage-Clamp-Technik (siehe Exkurs 3) vollständig vorgegeben, oder es fand eine gezielte Manipulation der durch visuelle Reizung erzeugten oder spontan auftretenden Membranpotenzialänderungen statt. Ausgehend von dieser Analyse wurden Rückschlüsse auf die physiologischen Mechanismen der Übertragung gezogen.

In einem neuronalen System wird Information nicht nur statisch verarbeitet, sondern die Antworteigenschaften der Neurone auf Reize und die synaptische Übertragung können sich mit der Zeit ändern. Daher wurden in einer weiteren Studie (Kapitel 5) Aspekte einer reizinduzierten neuronalen Plastizität untersucht. Neurone wurden konstant gereizt und mit Hilfe der Voltage-Clamp-Technik intrinsische Mechanismen der Plastizität dieser

reizinduzierten Antworteigenschaften in einzelnen Neuronen untersucht.

Das Modellsystem Fliege bietet den Vorteil, dass das Gehirn trotz eines reichen Verhaltensrepertoires morphologisch nicht zu komplex ist. Das visuelle System der Fliege stellt mit einer begrenzten Zahl von Nervenzellen, die teilweise individuell charakterisiert werden können, ein exzellentes Modellsystem dar: Intrazellulärableitungen, Doppelableitungen von Zellpaaren sowie Voltage-Clamp-Untersuchungen können statt an isolierten Zellen oder Gehirnschnitten am weitgehend intakten Tier durchgeführt werden. Das von nur einer geringen Anzahl Zellen kodierte Signal muss zu großen Teilen die benötigte Information beinhalten, um die komplexen Flugmanöver der Fliege zu kontrollieren. Eingebettet in den Forschungskontext der Untersuchung visuell gesteuerten Verhaltens bei Fliegen tragen die in dieser Doktorarbeit gewonnenen Erkenntnisse dazu bei, das Verständnis der neuronalen Informationsverarbeitung im Allgemeinen zu erweitern und sind überwiegend als Grundlagenforschung anzusehen.

2.1 Die Fliege als Modellsystem

Fliegen (Brachycera) sind evolutionär sehr erfolgreich und ubiquitär vorkommend. Fluginsekten (Pterygota) treten in der Entwicklungsgeschichte der Gewebetiere (Eumetazoa) recht früh auf und sind bereits für das Unterkarbon vor etwa 320 Millionen Jahren durch fossile Funde dokumentiert (Brauckmann und Schneider 1996). Vorkommen der Ordnung der Diptera (Zweiflügler), zu der die Brachycera gehören, sind für das obere Trias vor 210 Millionen Jahren dokumentiert (Rohdendorf 1964; Shcherbakov 1995).

Das Vermögen zu fliegen sichert Fluginsekten evolutionäre Vorteile und kann als Schlüsseleigenschaft dieser Unterklasse der Insekten angesehen werden¹. Durch das Fliegen eröffnen sich diesen Tieren sowohl neue und größere Habitate als auch neue Strategien zur Ernährung und zur Flucht vor Fressfeinden. Bei vielen Arten entwickelte sich ein sehr virtuoses Flugverhalten. So können Fliegen bei Fluggeschwindigkeiten von mehr als 1m/s mit Rotationsgeschwindigkeiten von einigen tausend Grad pro Sekunde sehr schnell manövrieren und die Flugrichtung mehrmals pro Sekunde drastisch wechseln (Schilstra und van Hateren 1999; van Hateren und Schilstra 1999; Boeddeker et al. 2005). Die Kontrolle dieses komplexen Verhaltens erfordert die zuverlässige Aufnahme geeigneter Umweltreize durch entsprechende Sensoren, sowie die schnelle und zuverlässige Verarbeitung der sensorischen Information in den nachgeschalteten Neuronen. Die Kontrolle des Flugverhaltens hängt sehr stark von der erfolgreichen Auswertung visueller Information während des Fluges ab.

¹ Zahlreiche Pterygota (z.B. viele Parasiten) sind sekundär flügellos geworden.

Das visuelle System der Fliege

Das visuelle System der Fliege hat hervorragende Eigenschaften als Modellssystem zur Erforschung grundlegender zellulärer Mechanismen der sensorischen Informationsverarbeitung am intakten Tier (Übersichtsartikel: Egelhaaf 2006).

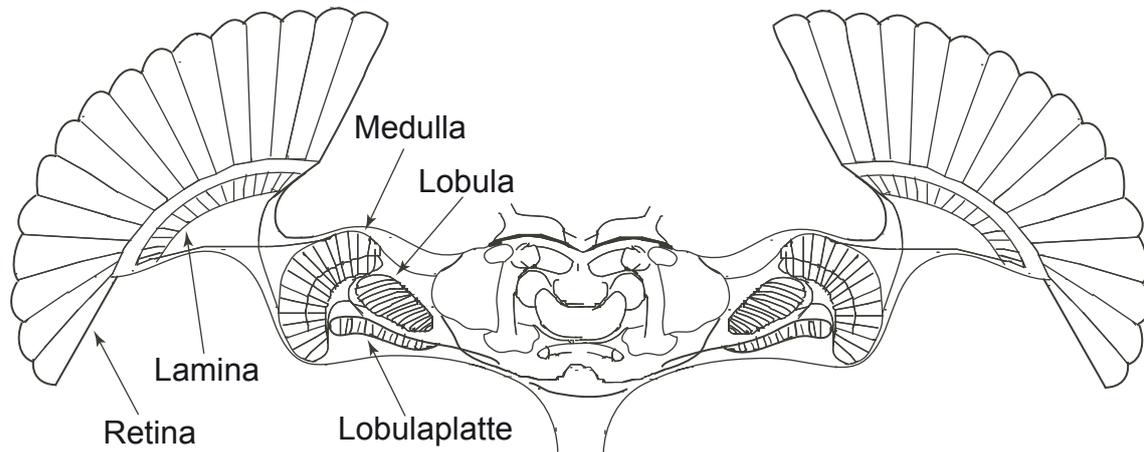


Abbildung 1: *Schema des visuellen Systems der Fliege. In der Retina wird Lichtsinnesinformation von Photorezeptorzellen einzelner Ommatidien des Komplexauges aufgenommen. In der Lamina und Medulla werden die visuellen Signale zeitlich gefiltert und Bewegung auf Ebene der Signale von Photorezeptorzellen detektiert. In der Lobula und Lobulaplatte wird das bis in diese Verarbeitungsschicht retinotop konservierte Signal von wenigen Zellen integriert und verarbeitet (Abbildung modifiziert nach Hausen 1976).*

Es ist in mehreren anatomisch und funktional unterscheidbaren Schichten aufgebaut (siehe Abbildung 1). In der Retina werden in den Photorezeptoren lichtintensitätsabhängige graduierte Membranpotenziale erzeugt (Juusola 1994). Diese werden in das erste Neuropil, die Lamina, weitergeleitet und dort zeitlich gefiltert (Uusitalo et al. 1995). In der nachgeschalteten Medulla (zweites Neuropil) wird u.a. Bewegungsinformation auf lokaler Ebene detektiert (Douglass und Strausfeld 1995). Bei der Signalverarbeitung in der Medulla und Lamina wird die Retinotopie aufrechterhalten, das heißt, jedem kolumnären Element der Retina sind dedizierte Neurone in der Lamina und Medulla nachgeschaltet. Im dritten Neuropil, dem aus Lobula und Lobulaplatte bestehenden Lobula-Komplex, wird die Retinotopie aufgehoben und räumliche Bewegungsinformation zahlreicher Eingangselemente von einigen Neuronen integriert. Die Lobulaplatte ist in einer abdominalwärts und oberflächlich gelegenen transversalen Schicht des Gehirns lokalisiert und präparativ-experimentell leicht zugänglich. In der Lobulaplatte finden sich etwa 60 individuell identifizierbare bewegungssensitive Neurone, die als Tangentialzellen bezeichnet werden. Einige der Tangentialzellen können in Gruppen ähnlicher Morphologie und Funktion klassifiziert werden (Übersichtsartikel:

Egelhaaf et al. 2002; Borst und Haag 2002; Egelhaaf et al. 2004), zum Beispiel das VS-Ensemble („Vertikales System“), dessen Zellen vornehmlich für vertikale Bewegungsreize sensitiv sind (Hengstenberg et al. 1982; Krapp et al. 1998), oder das drei Zellen umfassende, vornehmlich für horizontale Bewegungsreize sensitive HS-Ensemble („Horizontales System“) (Hausen 1982). Tangentialzellen leiten das synaptisch integrierte Signal ihrer Eingangselemente entweder in Form graduiertes Membranpotenzialfluktuationen (z.B. CH-Zellen, „Centrifugal Horizontal“), oder als Aktionspotenziale (z.B. die V1- oder H1-Zelle) oder als kombiniertes Signal aus graduierten Potenzialänderungen und überlagerten Aktionspotenzialen variabler Amplitude weiter (z.B. VS- oder HS-Zellen).

Exkurs 1: Neuronale Signalkodierung

Die ersten Aufnahmen neuronaler Signale aus der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts zeigten eine binäre Struktur (siehe z.B. du Bois-Reymond 1848). Neuronale Signale werden durch Aktionspotenziale kodiert, es gilt das „Alles oder Nichts-Prinzip“. Die dem Aktionspotenzial zu Grunde liegende Physiologie wurde letztlich von Hodgkin and Huxley (1952) beschrieben. Etwa zur gleichen Zeit wurde gezeigt (Fatt and Katz 1951; Eccles 1953), dass bei einigen Neuronen auch elektrische Signale graduiertes Struktur zu registrieren sind. Vor allem bei Invertebraten, aber im

geringeren Maß auch im Nervensystem von Vertebraten, finden sich Neurone bei denen auf ein graduiertes Membranpotenzial aktionspotenzialartige Signale aufgelagert sind. Die aufgelagerten Aktionspotenziale haben häufig eine variable Amplitude. Vermehrt konnte gezeigt werden, dass die Übergänge der Kodierungsart fließend sind und auch bei aktionspotenzialvermittelter Kodierung die Form und Amplitude eines Aktionspotenzials nicht immer konstant ist und von spezifischer Information abhängig sein kann (siehe z.B. Marder 2006).

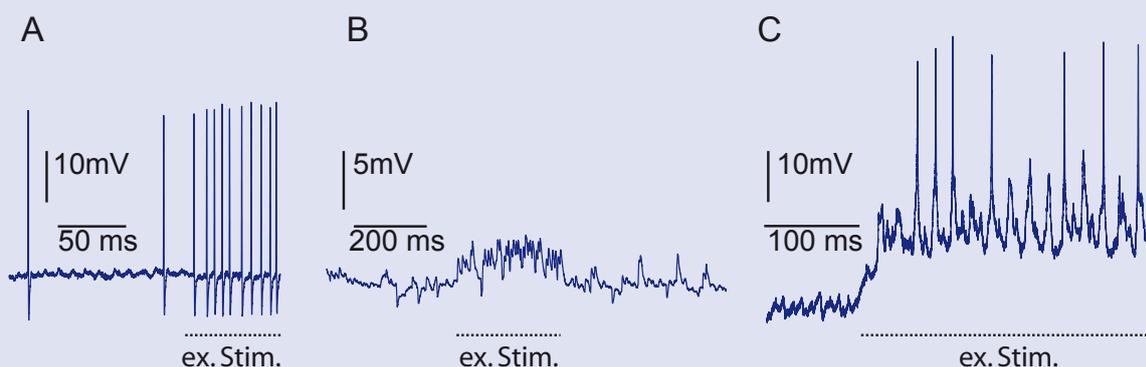


Abbildung 2: Membranpotenzialverläufe der verschiedenen neuronalen Kodierungsarten. Die Beispiele wurden von Zellen in der Fliegenlobulaplatte aufgenommen, die gepunktete Linie zeigt die Präsentation eines exzitatorischen Stimulus an. A: Aktionspotenziale einer H1-Zelle, $RP = -38\text{ mV}$. B: Graduiertes Signal einer VCH-Zelle, $RP = -45\text{ mV}$. C: Mischpotenzial aus graduierten Signalen und aufgelagerten aktionspotenzialartigen Transienten, $RP = -55\text{ mV}$.

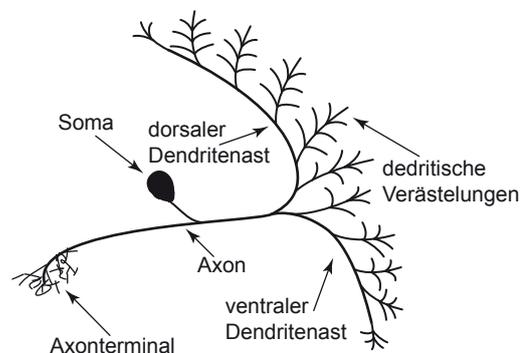
2. ABHANDLUNG

Die Tangentialzellen der Fliegenlobulaplatte sind etablierter Gegenstand im Rahmen der Erforschung der Prinzipien der Verarbeitung von visuellen Bewegungsreizen (siehe z. B. Krapp et al. 1998; Egelhaaf et al. 2002) sowie der Zuverlässigkeit und Effizienz der Informationskodierung neuronaler Antworten (z.B. de Ruyter van Steveninck und Laughlin 1996; Haag und Borst 1997; Juusola und French 1997; Warzecha and Egelhaaf 2001).

Das VS-V1-Zellensemble

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Experimentalarbeit wurde *in vivo* an Zellen des VS-V1-Zellensembles der Lobulaplatte durchgeführt². Das VS-V1-Zellensemble findet sich in allen untersuchten Dipteren und besteht aus mehreren VS-Zellen und, postsynaptisch zu diesen, der V1-Zelle. In der Lobulaplatte von *Calliphora vicina* finden sich zehn VS-Zellen; diese integrieren großflächig retinotopie Eingangssignale zahlreicher bewegungsempfindlicher und richtungsselektiver medullärer Kleinfeldneuronen (Übersichtsartikel: Hausen und Egelhaaf 1989). VS-Zellen sind richtungsabhängig reizbar, wobei vertikal bewegte Stimuli im Zentrum des visuellen Feldes der jeweiligen VS-Zelle die stärksten Reaktionen hervorrufen. Die Sensitivitätsmaxima der VS-Zellen verteilen sich entlang des visuellen Feldes des jeweiligen Komplexauges von frontal nach okzipetal. Das Sensitivitätsmaximum der VS1-Zelle liegt mit einem Azimuth von -15° bis 15° am weitesten frontal und das der VS10-Zelle mit einem Azimuth von 150° bis 180° am weitesten okzipetal (Hengstenberg et al. 1982; Krapp et al., 1998). In Vorzugsrichtung (abwärts) bewegte Stimuli im Bereich des Sensitivitätsmaximums führen zu einer Exzitation: Das Membranpotenzial wird tonisch depolarisiert und aufgelagerte Aktionspotenziale variabler Größe werden mit hoher Frequenz ausgelöst. Bewegung in Nullrichtung (aufwärts) inhibiert die Zellen: das Membranpotenzial wird hyperpolarisiert und Aktionspotenziale treten gar nicht oder sehr selten auf.

Abbildung 3: Schematische Zeichnung eines VS-Neurons. In der Transversalebene entspricht die Grundmorphologie einer VS-Zelle etwa der Form eines auf der Seite liegenden „T“. Distal findet sich ein reich verzweigter Dendrit (entspricht dem Vertikalstrich des T), die Verästelungen erhalten Eingang vieler retinotoper Elemente. Die Ausgangsregion liegt medial, ist kleiner und weniger verzweigt.



2 Für das dritte Teilprojekt (Kapitel 5) wurden auch Experimente an HS- und CH-Zellen ausgewertet. Diese wurden von Benjamin Hundsödörfer und Dr. Rafael Kurtz durchgeführt.

In Abbildung 3 ist schematisch ein typisches VS-Neuron skizziert; es zeigt die Morphologie mit dem sehr großen und, auch für die anderen Tangentialzellen charakteristischen, stark verzweigten dendritischen Eingangsbereich. Die einzelnen VS-Zellen liegen dicht nebeneinander angeordnet, die Dendriten besitzen eine große Ausdehnung in dorsal-ventraler Richtung. In medial-lateraler Richtung ist die Ausdehnung des Dendriten geringer und stark mit den Dendritenbereichen der Nachbarzellen überlappend (Hengstenberg et al. 1982). VS-Zellen weisen untereinander zu den jeweiligen Nachbar-VS-Zellen eine schwache, axonale elektrische Koppelung auf (Haag und Borst 2004), die das rezeptive Feld der Einzelneurone vergrößert (Farrow et al. 2005; Elyada et al 2009).

Die V1-Zelle liegt postsynaptisch zum VS-Zellensemble. Sie kodiert Signale, anders als die VS-Zellen, einzig durch Aktionspotenziale und erhält starken Eingang von VS1-3 sowie schwächeren, und wahrscheinlich indirekten, Eingang von weiter lateral gelegenen VS-Zellen (Warzecha et al. 2003; Kalb et al. 2006; Beckers et al. 2007, Haag und Borst 2008). Die Ausgangsregion von V1 liegt weit verzweigt im Bereich der kontralateralen Lobulaplatte und innerviert nachgeschaltete Motoneurone (Kurtz et al. 2001; Warzecha et al. 2003).

Exkurs 2: Chemische Synapsen, elektrische Synapsen

Informationsweiterleitung zwischen Neuronen findet an spezialisierten Kontaktstellen statt, den Synapsen. Prinzipiell wird zwischen zwei Typen unterschieden: elektrischen und chemischen Synapsen.

Elektrische Synapsen sind Bereiche mit zahlreichen Einzelkontaktstellen (Gap Junctions), die eine cytoplasmatische Verbindung zwischen zwei Zellen darstellen. Die Entfernung zwischen prä- und postsynaptischer Zellmembran ist mit ca. 3-4 nm deutlich geringer als der normale Extrazellulärraum zwischen zwei Neuronen, der gewöhnlich eine Ausdehnung von etwa 20 nm besitzt. Das synaptische Signal wird durch einen Ionenstrom weitergeleitet. Bei den meisten elektrischen Synapsen findet eine praktisch verzögerungsfreie und bidirektionale Signalweiterleitung statt. Gap Junctions bestehen aus ca. 15

nm langen membrandurchspannenden Kanalproteinen, die aus zwei jeweils eine Membran durchspannenden Hemikanälen aufgebaut sind. Der Kanaldurchmesser einer Gap Junction beträgt etwa 1,5 nm (Fliege: Ribi 1978) und ist damit groß genug, dass mittelgroße organische Verbindungen passieren können.

Bei chemischen Synapsen ist die prä- von der postsynaptischen Zelle durch einen 20-40 nm breiten synaptischen Spalt getrennt, es besteht keine cytoplasmatische Kontinuität. In der aktiven Zone (präsynaptische Synapsenendigung) löst Ca^{2+} Einstrom die Freisetzung von Transmitter aus, der in den synaptischen Spalt eintritt, durch diesen diffundiert und an postsynaptische Rezeptoren bindet. Postsynaptisch bewirkt die Bindung des Transmitters entweder das Öffnen oder Schließen von Ionenkanälen und kann

2. ABHANDLUNG

somit zu einer De- oder Hyperpolarisation des postsynaptischen Membranpotenzials führen. Die Signalübertragung an einer chemischen Synapse benötigt etwa 0,3-5 ms.

Eine Signalverarbeitung an einer elektrischen Synapse wird durch die Anzahl und das Öffnen und Schließen der Gap Junctions bestimmt. Die Signalweiterleitung ist energetisch günstig, der Signalübertragungsbereich ist praktisch nicht begrenzt und erfolgt weitgehend linear und in den meisten Fällen bidirektional. Bei chemischen Synapsen kann das Signal vielfältiger verarbeitet werden. Neben einer Invertierung des Signals sind auch Signalverstärkungen einfach realisierbar. Die Signalweiterleitung erfolgt meist

unidirektional. Die Transmitterfreisetzung erfolgt nicht kontinuierlich, sondern quantisiert. Vesikel verschmelzen mit der präsynaptischen Membran und setzen eine Menge Transmitter in den synaptischen Spalt frei. Der Arbeitsbereich chemischer Synapsen ist durch die maximale Transmitterverfügbarkeit und die postsynaptische Rezeptorzahl begrenzt. Die Synthese des Transmitters ist energieaufwändig. Chemische Synapsen sind insgesamt verbreiteter als elektrische Synapsen. Sowohl elektrische als auch chemische Synapsen treten im gleichen Tier auf. Bei einigen Neuronen wurden chemische und elektrische Synapsen in räumlich überlagerten Bereichen nachgewiesen (Fliege: Straussfeld und Bassemir 1985).

In morphologischen und physiologischen Untersuchungen wurden Evidenzen für chemische Synapsen (Hausen 1980) im Ausgangsterminal von VS-Zellen, sowie für chemisch-elektrisch gemischte Synapsen zwischen VS 4-9 und DNOVS (einem absteigenden Prämotoneuron) (Straussfeld und Bassemir, 1985) gefunden. In einer Studie von Kalb et al. (2006) wurden elektrische Synapsen zwischen VS1 und V1 und chemische Synapsen zwischen VS2/3 und V1 als plausibelste Verschaltungsmöglichkeit vorgeschlagen. Bidirektionale elektrische Synapsen für die Verbindung von VS1 und V1 wurden durch gleichzeitige intrazelluläre prä- und postsynaptische Ableitung gezeigt (Haag und Borst 2008). Trotz dieser Studien ist die genaue Rolle der chemischen und der elektrischen Synapsen zwischen den einzelnen VS-Zellen und V1 nicht geklärt.

2.2 Synaptische Übertragung

Information wird von Nervenzellen elektrisch kodiert. Hierbei kann das Signal grundsätzlich entweder in analoger Form als graduierte Membranpotenzialänderungen oder binär in Form von Aktionspotenzialen („Spikes“) repräsentiert werden (siehe Exkurs 1).

Bei der Signalkodierung in Form von Aktionspotenzialen muss bei der Signalübertragung an den Synapsen prinzipiell nur zwischen zwei Zuständen unterschieden werden: Aktionspotenzial oder Rauschen (bzw. kein Aktionspotenzial). Die Signaltransmissionskapazität ist durch die maximale Aktionspotenzialrate begrenzt. Diese wird zum einen durch die minimale Integrationszeit für ein Aktionspotenzial (Zuverlässigkeit der Transmitterfreisetzung), und zum anderen durch die physiologischen Begrenzungen bei der Generierung von Aktionspotenzialen (z.B. absolute Refraktärzeit) bestimmt. Man kann die aktionspotenzialkodierte Übertragung als primär durch zeitliche Faktoren bei der Übertragung limitiert betrachten. Werden jedoch graduierte Signale übertragen, hängt die Leistungsfähigkeit der Übertragung in erster Linie vom Rauschverhalten der Synapse in der Amplitudendomäne ab. Der Arbeitsbereich der über die Synapsen vermittelten Amplituden ist begrenzt, und eine rauschfreie Übertragung ist auf Grund von physiologischen Gegebenheiten (z.B. die statistische Verteilung des Öffnungszustandes der Ionenkanäle, nicht konstante Ionenkonzentration, Temperaturvariabilität) nicht möglich. Es ergibt sich also bei beiden Kodierungsarten eine durch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Synapse begrenzte Signalkapazität. Es ist vorteilhaft, wenn dieser begrenzte synaptische Arbeitsbereich die natürlich auftretenden Signale ideal abdeckt (Laughlin 1981).

Im visuellen System der Fliege konnte gezeigt werden, dass durch graduierte Potenzialänderungen kodierte Signale eine größere Informationskapazität besitzen als durch Aktionspotenziale kodierte Signale (de Ruyter van Steveninck und Laughlin 1996; Haag und Borst 1997; Juusola und French 1997; Warzecha und Egelhaaf 2001).

Die synaptische Übertragung zwischen spikenden Neuronen ist gut dokumentiert und analysiert (z. B. Redman 1990; Wadiche und Jahr 2001). Die Übertragung von einer graduiert kodierenden Zelle auf eine andere graduiert kodierende Zelle wurde ebenfalls untersucht (Field und Rieke 2002; Simmons 2002; Simmons und de Ruyter van Steveninck 2005).

In dieser Arbeit wurde im visuellen System von *Calliphora vicina* die Übertragung an einer Synapse untersucht, bei der die Eingangssignale aus graduierten Potenzialänderungen mit überlagerten Spikes variabler Amplitude bestehen³, während das Ausgangssignal einzig durch Aktionspotenziale kodiert wird. Bei dieser kombinierten Signalkodierung könnte die

3 Diese aufgelagerten Aktionspotenziale wurden in einer Vielzahl von Veröffentlichungen auch „Spikelets“ genannt, dieser Begriff wird in dieser Arbeit jedoch nicht verwendet.

2. ABHANDLUNG

Informationskapazität größer sein als bei der Kodierung nur durch Aktionspotenziale oder nur durch graduierte Signale. (Haag und Borst 1998; de Polavieja et al. 2005; Juusola et al.

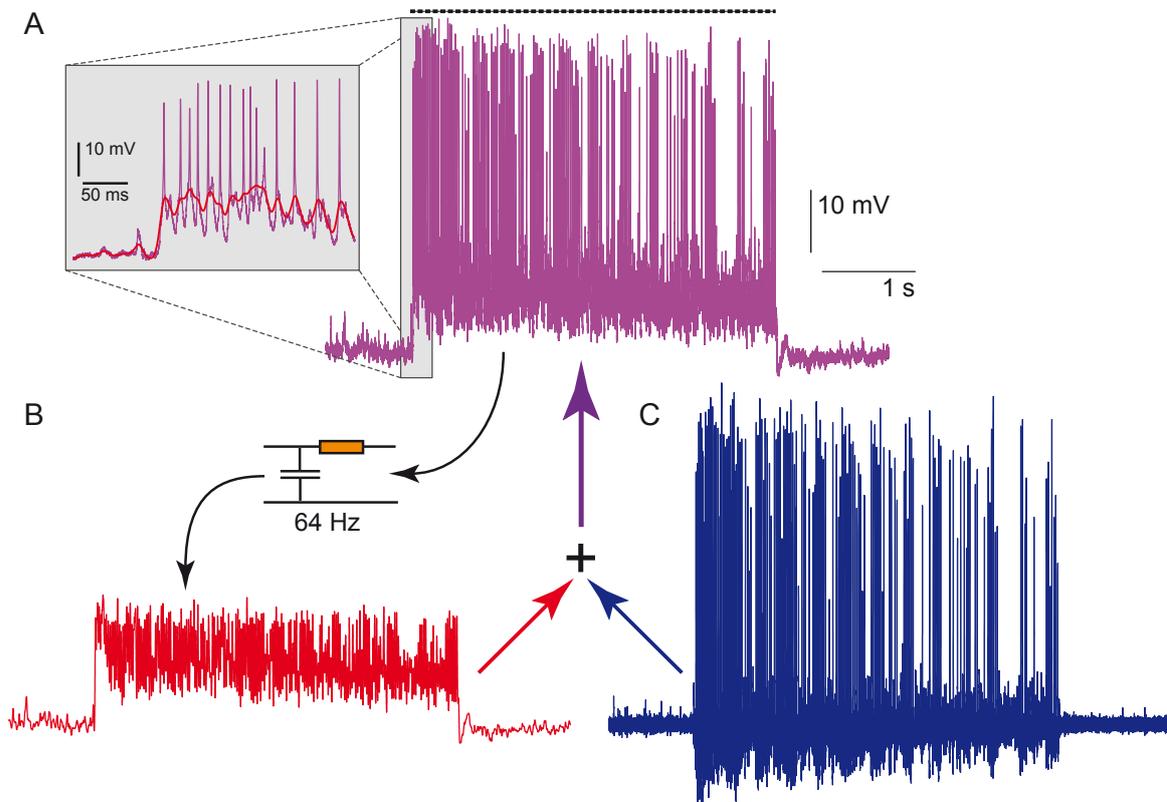


Abbildung 4: *Niederfrequenter und hochfrequenter Signalanteil eines gemischten Membranpotenzials. A: Membranpotenzial einer VS1-Zelle. Die gestrichelte Horizontallinie zeigt die Präsentation eines starken Bewegungsreizes in Vorzugsrichtung an. B: Tiefpassgefiltertes (Butterworth 2. Ordnung, 64 Hz) Signal des Membranpotenzialverlaufs aus A. C: Differenz des ungefilterten und tiefpassgefilterten Signals. D: Ausschnitt des ungefilterten Signals aus A (magenta) überlagert mit dem tiefpassgefilterten Signal aus B (rot). Der dargestellte Bereich ist in A und B grau unterlegt.*

2007). In Abbildung 4A ist ein Beispiel des Verlaufs eines gemischten Membranpotenzials einer VS1-Zelle auf einen Bewegungsreiz in Vorzugsrichtung wiedergegeben. Das Mischsignal kann in zwei Komponenten aufgeteilt werden. Durch eine Tiefpassfilterung kann die niederfrequente Signalkomponente (entspricht näherungsweise dem graduierten Signal) in vereinfachter Form⁴ isoliert betrachtet werden (Abbildung 4B). Die Differenz

4 Das tiefpassgefilterte Signal entspricht eigentlich nicht dem niederfrequenten Anteil des Mischsignals, sondern stellt lediglich eine Näherung des Ausgangssignals im Niederfrequenzbereich dar. Um das Signal präzise zu trennen, müssten an Hand eines Steigungskriteriums die hochfrequenten Signaltanteile abgeschnitten und zwischen den Schnittstellen interpoliert werden. Aus praktischen Gründen und für eine grobe Abschätzung wurde hier jedoch ein Butterworth-Tiefpassfilter 2. Ordnung mit einer Cut-Off-Frequenz von 64Hz verwendet.

des tiefpassgefilterten Signals vom Ausgangsmembranpotenzial zeigt die hochfrequente Signalkomponente (aktionspotenzialartiges Signal) des Potenzials an (Abbildung 4C).

Die in Abbildung 4 gezeigte Komponententrennung zeigt, dass sich die graduierte Signalkomponente bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen in zwei Aspekten von der Aktionspotenzialkomponente unterscheidet: Zum einen besitzt sie eine geringere mittlere Amplitude (-10 mV bis 15 mV relativ zum RP) als die aufgelagerten Aktionspotenziale (Depolarisationen mit Spitzen von 30-50 mV relativ zum RP). Zum anderen ist die Dynamik der graduierten Signalkomponente im Frequenzbereich oberhalb etwa 5 - 10 Hz nur sehr gering, die Amplituden erreichen in diesem Frequenzbereich nur wenige Millivolt.

Bei der synaptischen Übertragung eines in dieser Weise kombinierten Signals auf eine nur durch Aktionspotenziale kodierende Zelle muss eine Signaltransformation stattfinden. Auch stellt sich die Übertragung physiologisch als problematisch dar: langsame Signaländerungen geringer Amplitude müssen zuverlässig übertragen werden und der Arbeitsbereich der Synapse muss hinreichend groß sein, um ebenfalls die großen Amplituden der Aktionspotenziale vermitteln zu können.

Verläuft die Übertragung linear-proportional zur Amplitude des präsynaptischen Signals, wird – aus physiologischer Sicht – wertvoller Arbeitsbereich wenig genutzt. Zwischen den mittleren Spitzenamplituden der aufgelagerten Aktionspotenziale und der graduierten Signalkomponente liegt ein Bereich von ca. 20 mV, in dem nur wenige Signale liegen. Eine präzise Übertragung von Signalen geringer Amplitude wurde für graduiert kodierende Synapsen in Vertebraten (Thoreson et al. 2004; Witkovsky et al. 1997) und Invertebraten gezeigt (Ivanov und Calabrese 2000). Da die Amplitude der Aktionspotenzialkomponente deutlich über den Amplitudenbereich der graduierten Komponente hinaus geht, kann angenommen werden, dass zur Optimierung der Auflösung der graduierten Signale die synaptische Übertragung nicht über den ganzen Arbeitsbereich linear verläuft. So ist ein nicht über den ganzen Arbeitsbereich linearer Übertragungsmechanismus plausibel, der geringere Amplituden der Größenordnung der graduierten Komponente (etwa +10 mV bis -15 mV relativ zum Ruhepotenzial) in hoher Auflösung linear-proportional überträgt. Bei Depolarisationen, die größer als die graduierte Komponente sind, treten nicht lineare Effekte wie z.B. Sättigung auf. Dieses stellt dann ein Problem dar, wenn in der Größe und Form der präsynaptischen Aktionspotenziale ebenfalls Information kodiert wird. Eine Diskriminierung unterschiedlicher Amplituden der aufgelagerten Aktionspotenziale ist dann kaum mehr möglich. Eine solche, kleine Signale bevorzugende Übertragung stünde auch im Widerspruch zu dem Befund, dass bei anderen Synapsen Mechanismen gefunden wurden, die große Signale verstärkt übertragen. So hängt z.B. an der motorischen Endplatte im Frosch (Dodge und Rahamimoff 1967) oder bei Synapsen der Riesenneurone im Tintenfisch (Smith et al. 1985) die Transmitterfreisetzung exponentiell von der präsynaptischen Ca^{2+} -Verfügbarkeit ab. Ein weiterer große Signale bevorzugender Übertragungsmechanismus

wurde im Rattenhirnstamm gezeigt (Borst und Sakmann 1998): dort wurden erhöhte Potenzialschwellwerte bei präsynaptischen Ca^{2+} -Kanälen gefunden die im Zusammenhang mit einer verbesserten zeitlichen Präzision der Übertragung gesehen werden.

Da Evidenzen sowohl für chemische Synapsen (Hausen 1980), als auch für kombiniert chemische und elektrische Synapsen (Strausfeld und Bassemir 1985), sowie für elektrische Synapsen zwischen VS-Zellen und V1 (Haag und Borst 2008) gefunden wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die Signalübertragung auch physiologisch in zwei Komponenten getrennt sein könnte: durch elektrische Synapsen könnte vornehmlich die gradierte Signalkomponente übertragen werden, während chemische Synapsen durch die Aktionspotenzialkomponente erst bei Erreichen eines größeren Potenzialwertes oder durch eine größere Steigung des Signals aktiviert werden und Transmitter freisetzen. Der Befund, dass die präsynaptische Calciumkonzentration linear vom präsynaptischen Potenzial abhängt (Kurtz et al. 2001), ist jedoch als Indiz einer, mindestens teilweisen, chemischen Übertragung der gradierten Signale an der VS-V1-Synapse zu betrachten.

Für chemisch-elektrisch gemischte Synapsen wurde gezeigt, dass die chemisch übertragene Signalkomponente eine stärkere Plastizität bei aktivitätsabhängiger Adaptation aufweist als die elektrisch übertragene Komponente (Galarreta und Hestrin 1999; Galarreta und Hestrin 2001; Gibson et al. 1999; Tamas et al. 2000).

2.3 Analyse des neuronalen Signals auf Basis elektrophysiologischer Methoden

An der VS-V1-Synapse findet eine Signalverarbeitung statt. Der komplexe Eingang von mindestens drei VS-Zellen wird integriert und in ein aktionspotenzialkodiertes Signal transformiert (Warzecha et al. 2003; Kalb et al 2006). Bei dieser Signalübertragung wird das kodierte Signal in seiner Komplexität reduziert. Der zu Grunde liegende Algorithmus ist weitgehend unbekannt. Da die Tangentialzellen die Verarbeitungsschicht für komplexe visuelle Bewegungsreize im Fliegenhirn darstellen und zur Kontrolle des äußerst virtuosen Flugverhaltens beitragen, ist anzunehmen, dass die Signalverarbeitung in den Tangentialzellen hocheffektiv ist.

Analyse der Beziehung zwischen Eingangssignal und Ausgangssignal

Um die Signalübertragung zu charakterisieren, wurde in Kapitel 3 und 4 wie bei einer Black-Box-Analyse (siehe Exkurs 3) das Ausgangssignal in Abhängigkeit des Eingangssignals betrachtet. Die VS-V1-Synapse wird hier als eine Art Black-Box unbekannter Funktion

angesehen und mit geeigneten Eingangssignalen zur Systemanalyse beschickt. Die VS-Zellen stellen hierbei die Eingangselemente dar, die V1-Zelle das Ausgangselement.

Exkurs 3: Black Box-Analyse – Ermittlung einer Kennlinie

Man kann ein beliebiges System vereinfacht auf drei Komponenten reduzieren: Einen Eingang E, einen Ausgang A und, zwischen Eingang und Ausgang liegend, eine Funktion F. Ist der Aufbau und die Funktion von F unbekannt, kann F aus der Beobachtung von E und A rekonstruiert werden. So lange F nicht charakterisiert ist, wird F in einem Ersatzschaltbild als schwarz gefülltes Schaltzeichen, einer *Black Box*, dargestellt.

jedoch meist nur näherungsweise linear, insbesondere biologische Systeme sind häufig hochgradig nicht-linear. In einem nicht-linearen System ist die Ermittlung von F nicht ohne weiteres möglich. Es gilt hier zwar ebenfalls $F_x = A_x / E_x$, jedoch ist F_x nicht über den gesamten Wertebereich von E konstant, sondern vom Eingangswert E_x abhängig. Die F beschreibende Funktion wird *characteristic* oder *Kennlinie* genannt. Eine vollständige Ermittlung der Kennlinie würde die Messung aller theoretischen Eingangswerte und der zugehörigen Ausgangswerte erfordern, was nicht durchführbar ist. Um die Funktion F zu approximieren werden einige geeignete Eingangswerte gewählt und aus den zugehörigen Ausgangswerten kann eine Kennlinie rekonstruiert werden.

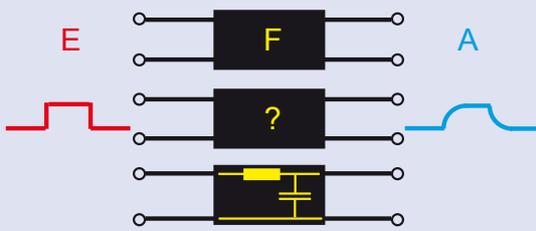


Abbildung 5: Rekonstruktion eines unbekanntes Systems (F) mit zwei Eingangspolen (E) und zwei Ausgangspolen (A).

Das Ausgangssignal A ist vom Eingangssignal E und der Funktion F abhängig. Für ein beliebiges Eingangssignal E_x gilt $A_x = E_x \cdot F_x$. In einem linearen System kann prinzipiell die Funktion F durch Bestimmung eines einzigen Eingangssignals E_x und des zugehörigen Ausgangssignals A_x ermittelt werden: $F = F_x = A_x / E_x$. Reale Systeme sind

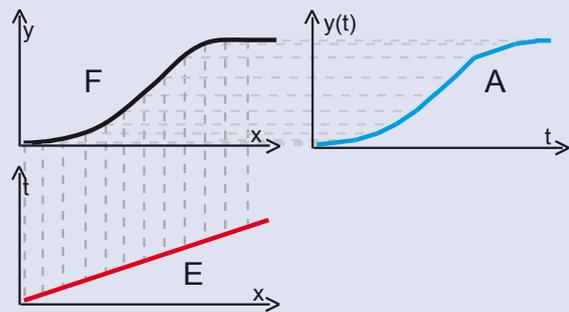


Abbildung 6: Rekonstruktion einer Kennlinie

Obschon bekannt ist, dass das VS-V1-Ensemble für bewegte Großfeldreize sensitiv ist, ermöglicht eine visuelle Stimulation keine genaue Kontrolle des VS-Membranpotenzials und ein definiertes Membranpotenzial kann durch visuelle Reizpräsentation nicht von Versuch zu Versuch identisch reproduziert werden (Übersichtsartikel: Warzecha und Egelhaaf 2001).

2. ABHANDLUNG

Die genaue Kontrolle des Membranpotenzials eines Neurons in einem intakten biologischen System stellt aufgrund der neuronalen Variabilität eine besondere Herausforderung dar. Das Eingangssignal von VS ist nicht linear an den visuellen Eingang gekoppelt und enthält zudem eine Rauschkomponente der stromaufwärts liegenden Zellen der aktivierten neuronalen Bahn. Des Weiteren erschweren Adaptationseffekte (siehe Exkurs 5) die Reproduzierbarkeit des V1-Membranpotenzials von Versuch zu Versuch.

Da VS-Zellen das neuronale Signal über ein gemischtes Membranpotenzial (siehe Abschnitte 2.1 und 2.2) kodieren, ist es ein Ansatz, das Eingangssignal in zwei Hauptkomponenten aufzutrennen (langsam und graduiert, schnell und aktionspotenzialartig; vgl. Abbildung 4) und den jeweiligen Einfluss beider Komponenten zu betrachten.

Exkurs 4: Voltage-Clamp

Die Voltage-Clamp-Technik ist ein Verfahren, um das Membranpotenzial (V_m) einer Zelle auf ein beliebiges Sollpotenzial (V_s) einzustellen. Dabei werden zwei Prozesse miteinander rückgekoppelt: Zum einen wird das tatsächliche Membranpotenzial (V_m) gemessen. Zum anderen wird ein Klemmstrom (C_i) in die Zelle injiziert, um V_m an V_s anzunähern. Eine Näherung des Klemmstroms C_i ergibt sich nach dem ohmschen Gesetz aus der Differenz von V_m und V_s geteilt durch den Membranwiderstand.

Die beiden Prozesse (Messen und Injizieren) werden bei großen und gut zugänglichen Zellen über zwei dedizierte Elektroden ausgeführt und als *two electrode voltage clamp* (TEVC) bezeichnet. Bei kleinen Zellen, insbesondere unter *in vivo*-Bedingungen, ist das Platzieren von zwei Elektroden jedoch nicht praktikabel. Daher werden die Messung und die Strominjektion zeitlich getrennt und über nur eine Elektrode ausgeführt. Diese Technik wird als *discontinuous single electrode voltage clamp* (dSEVC) bezeichnet. Hierbei wird

der Umstand genutzt, dass die Zellmembran einen kapazitiven und ohmschen Widerstand besitzt und somit einen Tiefpass darstellt. Das Membranpotenzial kann Strompulsen höherer Frequenz als der Grenzfrequenz des Tiefpasses nicht linear folgen. Je höher die Schaltfrequenz des Voltage-Clamps ist, desto präziser kann das Membranpotenzial eingestellt werden.

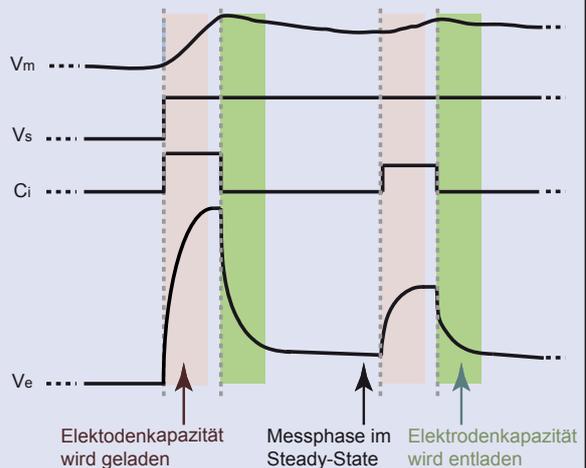


Abbildung 7: Spannungsverlauf während des SEVC Strominjektions/Messzyklus an der Membran (V_m , obere Spur) und der Elektrode (V_e , untere Spur).

Die Voltage-Clamp-Technik ist ein Standardverfahren, um spannungsabhängige Eigenschaften des Membranwiderstands zu charakterisieren. Prinzipiell ist es möglich, das Potenzial einer (präsynaptischen) Zelle beliebig zu kontrollieren und durch postsynaptische Ableitungen die spannungsabhängige Signalübertragung zu charakterisieren.

Für den erfolgreichen Einsatz der Voltage-Clamp-Technik müssen die ohmschen und kapazitiven Eigenschaften sowohl der Elektrode, als auch der Zellmembran berücksichtigt werden. Diese bestimmen die maximale Frequenz, mit der zwischen Messphase und Strominjektionsphase umgeschaltet werden kann, sowie den maximalen Strom, den man über die Elektrode in die Zelle injizieren kann. Vereinfacht betrachtet ist eine Elektrode für den dSEVC-Einsatz um so besser geeignet, je geringer der ohmsche

Widerstand und je geringer die kapazitiven Eigenschaften sind. In der Praxis ergibt sich ein Mindestwiderstand der Elektrode, der von der Größe der Zelle abhängt, d.h. die Elektrodenspitze darf nicht zu groß sein, um die Zelle nicht zu sehr zu beschädigen. Kapazitive Eigenschaften der Elektrode sind nicht vermeidbar, da das Elektrodenmaterial aus einem nicht leitenden Material bestehen muss. Durch die Wahl einer günstigen Elektrodenform und eines Materials mit einem geringen dielektrischen Koeffizienten wie z.B. Quarzglas (dielektrische Konstante von $\sim 3,7$ (Heraeus)) können die kapazitiven Eigenschaften der Elektrode minimiert werden. Spezielle Verstärkerschaltungen können die kapazitiven Eigenschaften aktiv reduzieren, so sind Schaltfrequenzen von 50 kHz realisierbar, die die Grenzfrequenz der Zellmembran um ein vielfaches übertreffen.

Mit der Voltage-Clamp-Technik (siehe Exkurs 4) steht eine Technik zur Verfügung, die es ermöglicht, das Membranpotenzial einer Zelle vollständig zu kontrollieren. So kann im Experiment unter *in vivo*-Bedingungen das Membranpotenzial eines präsynaptischen Elements festgelegt werden. Der dynamische Arbeitsbereich der Voltage-Clamp-Technik ist jedoch begrenzt: Dem Neuron können nicht beliebig schnelle Signale auferlegt werden. Die Voltage-Clamp-Technik ist jedoch ideal, um den Einfluss der langsamen Signalkomponente isoliert zu betrachten. Durch Anlegen rechteckförmiger und sinusförmiger Signale können die Aspekte der natürlich vorkommenden graduierten Signalkomponenten erfasst werden. Das Spektrum der Eingangssignale kann zudem über einen den natürlichen Arbeitsbereich der Zelle deutlich überschreitenden Bereich analysiert werden. Durch die Analyse des Klemmstroms lassen sich darüber hinaus Erkenntnisse gewinnen, inwieweit sich die elektrischen Eigenschaften der Zelle potenzialabhängig ändern.

Neben der Vorgabe eines beliebigen Membranpotenzials ermöglicht die Voltage-Clamp-Technik auch, die Funktion einer Zelle des Zellensembles während sensorischer Reizung einzuschätzen. Auch während visueller Reizung der VS-Zellen kann mittels der Voltage-

2. ABHANDLUNG

Clamp-Technik eine Zelle des VS-Zellensembles auf dem Ruhemembranpotenzial gehalten werden. Diese Zelle wird praktisch funktional ausgeschaltet. Somit lässt sich der Beitrag einer Zelle zur Ensembleantwort analysieren.

Die Dynamik von Aktionspotenzialen ist mit der Voltage-Clamp-Technik kaum zu erzielen. Daher wird die Analyse der schnellen Signalkomponente nicht im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt, sondern einzelne Aktionspotenziale werden durch kurze Strompulse induziert. Dieses Verfahren bedingt eine gewisse Variabilität des Eingangssignals. Durch eine große Zahl von Pulsinjektionen kann diese Variabilität statistisch erfasst werden und so überprüft werden, ob und wie sich die Größe und Struktur der präsynaptischen Aktionspotenziale im postsynaptischen Signal auswirken.

Bewegungsrichtungsabhängige Adaptation

Sensorische Zellen und Neurone müssen häufig einen großen Bereich möglicher Eingangsintensitäten kodieren. Der Arbeitsbereich der Signalkodierung ist jedoch eng begrenzt durch die physiologisch maximal erreichbaren Potenzialwerte und einen Rauschfaktor, der eine beliebig genaue Signalunterscheidung limitiert. Eine Möglichkeit, die Signalkodierung unter diesen limitierten Umständen zu optimieren, besteht darin, den Arbeitsbereich eines Neurons den jeweiligen Eingangswerten anzupassen. Die Zellen adaptieren ihr aktuelles Antwortverhalten basierend auf der Stimulushistorie (siehe Exkurs 5).

Exkurs 5: Adaptation

Adaptation ist ein weit verbreitetes Phänomen bei biologischen Systemen unterschiedlichster Art und Organisationsstufe. Die wesentliche Eigenschaft der Adaptation ist, dass ein System abhängig von der jeweiligen Historie unterschiedlich, bzw. entsprechend angepasst auf den aktuellen Reiz reagiert. Das Eingangssignal E_{konst} führt nach Eingangssignalhistorie X_a zum Ausgangssignal A_x , während das Eingangssignal E_{konst} nach Historie Y_a zum Ausgangssignal A_y führt. Das heißt, die Kennlinie eines Systems ändert sich abhängig von der Historie des Eingangssignals. Die Kennlinie

wird dabei meist verschoben, gestaucht oder gestreckt um die mittlere Dynamik des vergangenen Eingangssignals ideal abzudecken. Die Fähigkeit eines Systems zur Adaptation bewirkt verschiedene Reaktionen auf identische Gegebenheiten deren Historie sich jedoch unterscheidet. Adaptation wird durch aktive Änderung der Antworteigenschaften bedingt. Die Antworteigenschaften eines Systems können auch durch nicht adaptive Effekte wie z.B. Ermüdung (Fatigue) modifiziert werden, wenn z. B. an einer Synapse bei einem anhaltend starken Reiz die Transmitterverfügbarkeit sinkt und es

daher zu einer Abnahme der Reizantwort über die Zeit kommt. In diesem Fall wird jedoch der Arbeitsbereich des Systems nicht verschoben, sondern die Dynamik der Reizantwort reduziert – das System wird leistungsschwächer. Auch zeitliche Filtereigenschaften wie z.B. ausgeprägte Tiefpasseigenschaften verändern das Antwortverhalten eines Systems bei anhaltender konstanter Reizung. Jedoch wird hier der Arbeitsbereich ebenfalls nicht aktiv verschoben, sondern es handelt sich um konstante zeitliche Filtereigenschaften

des Systems.

In sensorischen Systemen spielt Adaptation eine sehr große Rolle. Der Wertebereich der Stimuli ist oftmals sehr groß. So erreicht z. B. Mittagssonnenlicht eine viel größere Lichtintensität als dämmeriges Abendlicht im Wald. Dennoch können ähnliche relative Kontraste in der Umgebungslichtintensität aufgrund von Adaptation sowohl bei schwachem als auch bei starkem Licht ähnlich gut unterschieden werden, obwohl sich die absoluten Kontrastunterschiede um Größenordnungen unterscheiden.

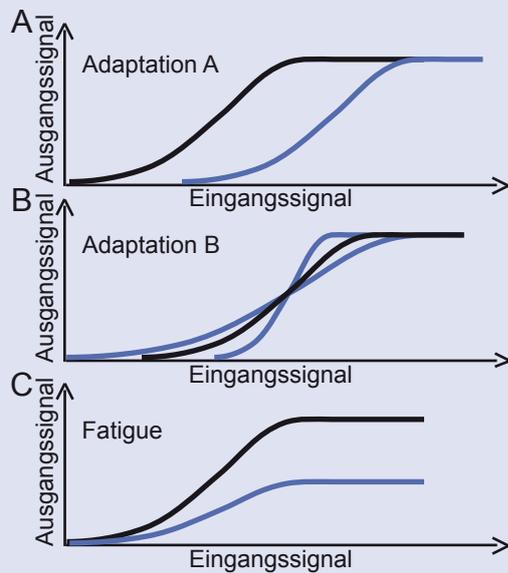


Abbildung 8: Veränderung der Kennlinie eines Systems bei Adaptation (A, B) und Ermüdung (C) eines Systems. Schwarz dargestellt ist die Kennlinie F_x des Systems zum Zeitpunkt nach der Stimulushistorie X_a . Die Kennlinie F_y nach Stimulushistorie Y_a ist blau dargestellt. Adaptation tritt als Verschiebung (A), Stauchung oder Schrumpfung (B) der Kennlinie in der Horizontalrichtung auf. Die in A und B dargestellten Veränderungen der Kennlinie treten häufig auch in kombinierter Weise auf. Nicht adaptive Prozesse verändern

die Kennlinie nicht horizontal, sondern es findet eine vertikale Modifikation statt. Bei Fatigue-Effekten wird die Kennlinie vertikal gestaucht (C), die Leistung des Systems nimmt ab, die Auflösung des Ausgangssignals des System wird geringer.

Für VS-Zellen und verschiedene weitere Tangentialzellen wurden unterschiedliche Adaptationseffekte beschrieben (Maddess and Laughlin 1985, Brenner et al. 2000, Harris et al. 2000, Kurtz et al. 2000). Diese unterscheiden sich sowohl in ihren zeitlichen Eigenschaften als auch in der Art der Stimuli, durch die sie ausgelöst werden.

Während einige Adaptationseffekte auch durch unspezifische, jedoch gleichförmige und anhaltende Reize induzierbar sind (z.B. Borst und Egelhaaf 1987; Harris et al. 1999), wird bei bewegungsrichtungsselektiven Neuronen ein Adaptationseffekt beschrieben,

der ausschließlich durch anhaltende exzitatorische Stimuli hervorgerufen wird (Harris et al. 2000; Kurtz et al. 2000) und „richtungsabhängige Adaptation“ genannt wird. Dieser Adaptationseffekt äußert sich in einer über einige Sekunden anhaltenden, leichten Hyperpolarisation und einem verminderten Eingangswiderstand der Membran nach Ende des Bewegungsreizes (Kurtz 2007). Auf zellulärer Ebene konnte die Ursache für diesen Adaptationsprozess bislang nicht geklärt werden. Die Verminderung des Eingangswiderstandes könnte durch eine durch Transmitterfreisetzung aktivierte Signalkaskade in den Eingangselementen bedingt sein. Alternativ dazu könnte die anhaltende mittlere Depolarisation des Membranpotenzials zur Senkung des Eingangswiderstandes führen, etwa durch vermehrte Öffnung langsamer spannungsgesteuerter Ionenkanäle. In Kapitel 5 wird mit Hilfe der Voltage-Clamp-Technik die Veränderung der elektrischen Eigenschaften von VS-Zellen unter kontrollierten Bedingungen untersucht, wenn durch verschiedene Reizung (elektrisch und visuell) diese Form der Adaptation ausgelöst wird.

2.4 Darstellung der Veröffentlichungen

In meiner Arbeit habe ich die Übertragungseigenschaften der VS-V1-Synapse systematisch untersucht. Bisherige Annahmen über die Signalübertragung an dieser Synapse basierten auf Versuchen, bei denen die Zellen entweder visuell oder durch Injektion von Strömen stimuliert wurden. Bei diesen Versuchen war es nicht möglich, das präsynaptische Signal reproduzierbar zu kontrollieren. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte diese Begrenzung durch Anwendung der Voltage-Clamp-Technik überwunden und der Arbeitsbereich der synaptischen Übertragung systematisch analysiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit (*Bestimmung des synaptischen Arbeitsbereichs präsynaptischer gradierter Signale im visuellen System der Fliege*) wurde von einer VS-Zelle und der V1-Zelle gleichzeitig abgeleitet. Das VS-Membranpotenzial wurde mit der Voltage-Clamp-Technik kontrolliert und das Ausgangssignal in Abhängigkeit zum Eingangssignal analysiert. Ich konnte zeigen, dass Depolarisation einer einzigen VS-Zelle zu einer erhöhten Spikerate in V1 führt. Die Spikerate ist hierbei über einen großen Bereich linear vom präsynaptischen Membranpotenzial abhängig.

Der zweite Teil der Arbeit (*Die zeitliche Präzision in bewegungsempfindlichen Neuronen der Fliege wird durch aufgelagerte Aktionspotenziale eines graduierten Signals vermittelt*) betrachtet vornehmlich den Einfluss der schnellen, aktionspotenzialartigen Komponente des präsynaptischen Mischpotenzials. Anhand der Signalübertragung und der Wechselwirkung zwischen prä- und postsynaptischem Signal wurden Rückschlüsse auf den Einfluss chemischer und elektrischer Synapsen gezogen.

Im dritten Teil der Arbeit (*Adaptation in bewegungsempfindlichen Neuronen der Fliege wird durch Depolarisierung bewirkt*) konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen von Adaptationsprozessen beobachtete Nachhyperpolarisierung nicht auf Veränderung der synaptischen Übertragung beruht, sondern von intrinsischen, potenzialabhängigen Prozessen auf Ebene der Tangentialzellen abhängt.

2.4.1 Bestimmung des synaptischen Arbeitsbereichs präsynaptischer graduierter Signale im visuellen System der Fliege

Synapses in the Fly Motion–Vision Pathway: Evidence for a Broad Range of Signal Amplitudes and Dynamics

Biologische Systeme arbeiten meist hoch effizient. Bei der synaptischen Übertragung ist die Effizienz hoch, wenn der Arbeitsbereich der Synapse sowohl dem Dynamik- als auch dem Amplitudenspektrum des präsynaptischen Signals möglichst genau entspricht. Die Anforderungen an die Synapse variieren dabei abhängig von der Struktur des präsynaptischen Signals (siehe Abschnitt 2.2). In dieser Arbeit habe ich den Arbeitsbereich der VS-V1-Synapse der Schmeißfliege *Calliphora vicina* systematisch *in vivo* charakterisiert. Die V1-Zelle ist synaptisch direkt mit mindestens drei VS-Zellen gekoppelt. Das präsynaptische Signal besteht aus graduierten Membranpotenzialänderungen mit aufgelagerten aktionspotenzialartigen Depolarisationen, während das postsynaptische Signal nur durch Aktionspotenziale kodiert wird (siehe Abschnitt 2.1 und 2.2). In bisherigen Versuchen wurden die präsynaptischen Zellen durch visuelle Stimuli gereizt, es konnte so aber weder eine zuverlässige Reproduzierbarkeit des präsynaptischen Membranpotenzials erreicht werden, noch konnte die graduierte oder die schnelle Signalkomponente isoliert betrachtet werden. Einflüsse von weiteren unbekanntem durch visuelle Stimuli beeinflussten Eingangselementen auf die postsynaptische Zelle konnten nicht ausgeschlossen werden, und die präsynaptischen Zellen waren aufgrund der überlappenden rezeptiven Felder bislang nicht einzeln stimulierbar. Um diese Begrenzungen zu überwinden, wurde das Membranpotenzial einzelner präsynaptischer Zellen durch Anwendung der Voltage-Clamp-Technik (siehe Exkurs 4) im Experiment vollständig vorgegeben und die postsynaptische Aktionspotenzialfolge analysiert.

Es wurden primär drei Parameter des präsynaptischen Signals betrachtet:

1. der Einfluss des Signals eines einzigen Neurons auf die Gesamtübertragung
2. die Übertragung der Amplitudengröße des präsynaptischen Signals
3. die zeitlichen Filtereigenschaften der graduierten Signalkomponente.

Um die Übertragung der Amplitudengröße zu analysieren, wurde das Membranpotenzial

2. ABHANDLUNG

einzelner VS-Zellen für 600 ms oder 1200 ms auf verschiedenen Potenzialwerten konstant de- und hyperpolarisierend geklemmt. Die De- und Hyperpolarisation erreichten dabei Werte von bis zu ± 50 mV relativ zum Ruhemembranpotenzial. Es konnte gezeigt werden, dass De- und Hyperpolarisation eines einzigen Eingangselements hinreichend ist, um die Aktionspotenzialrate von V1 zu beeinflussen. Weiterhin wurde gezeigt, dass V1 die Potenzialänderung der Eingangselemente linear kodiert, bis etwa die Aktionspotenzialrate erreicht ist, die auch durch starke visuelle Reizung erzielbar ist. Die linear übertragenen Potenzialamplituden erreichen dabei größere Werte als die durch visuelle Stimuli erreichbaren graduierten De- oder Hyperpolarisationen. Die postsynaptische Spikerate bleibt bei konstanter Depolarisation nicht konstant, sondern fällt über die Zeit (analysierte Zeitspanne 600 ms und 1200 ms) geringfügig ab.

Wird das VS-Ensemble durch einen großflächigen visuellen Bewegungsreiz in Vorzugsrichtung (abwärts) gereizt und eine VS-Zelle währenddessen auf ihrem Ruhemembranpotenzial geklemmt, so ist eine Minderung der V1-Aktionspotenzialrate detektierbar. Die Minderung der postsynaptischen Aktionspotenzialrate ist im Mittel gering, dennoch stützt dieser Versuch die Hypothese, dass postsynaptisch das Signal der einzelnen Eingangselemente additiv verrechnet wird.

Die dynamischen Eigenschaften einer Synapse ermöglichen eine spezielle Anpassung des zu übertragenden Signals an den postsynaptisch relevanten Frequenzbereich (siehe z.B. Field und Rieke 2002; Juusola et al. 1995; Luksch et al. 2004; Rose und Fortune 1999). Der leichte Rückgang der postsynaptischen Aktionspotenzialrate während tonischer Depolarisation lässt auf eine geringe Hochpasseigenschaft der Synapse schließen. Die upstream gelegenen und lokale Bewegungsinformation detektierenden Schichten limitieren die durch visuelle Bewegungsreize induzierten graduierten Signale in VS-Zellen auf einen Frequenzbereich unter 20 Hz (Warzecha et al. 1998). Durch das Klemmen sinusförmiger Membranpotenziale verschiedener Frequenzen (1-64 Hz) wurde eine frequenzabhängige Übertragungscharakteristik der VS-V1-Synapse ermittelt. Es wurde gezeigt, dass die postsynaptische Aktionspotenzialrate bei Frequenzen zwischen 8 und 16 Hz maximal ist. Die Kopplung an die präsynaptische Phase ist auch bei der maximal angelegten Frequenz (64 Hz) noch deutlich erhalten. Mit zunehmender Frequenz weist diese Kopplung einen zunehmenden relativen Offset auf die Phase des präsynaptischen Signals auf.

Mit dieser Studie konnte ich zum einen zeigen, dass das präsynaptische Signal einer einzigen Zelle hinreichend ist, um das postsynaptische Signal zu modulieren. Weiterhin zeigte diese Arbeit, dass die VS-V1-Synapse größere und höherfrequente Signale übertragen kann, als die durch visuelle Bewegungsreize induzierbare graduierte Signalkomponente der VS-Zellen aufweist.

2.4.2 Die zeitliche Präzision in bewegungsempfindlichen Neuronen der Fliege wird durch auf gradierte Membranpotenzialänderungen aufgelagerte Aktionspotenziale vermittelt

Precise timing in fly motion vision is mediated by fast components of combined graded and spike signals

VS-Zellen im visuellen System von Fliegen kodieren Information durch ein kombiniertes Signal aus gradierten Membranpotenzialänderungen und aufgelagerten aktionspotenzialartigen Depolarisationen variabler Amplitude (siehe Abschnitt 2.1 und Exkurs 1). Die postsynaptisch zu den VS-Zellen gelegene V1-Zelle kodiert Signale durch Aktionspotenziale. Diese kombinierte Signalkodierung kann die Informationskapazität maximieren (Haag und Borst 1998; de Polavieja et al. 2005; Juusola et al 2007). In der vorausgegangenen Studie (siehe Abschnitt 2.4.1) wurde gezeigt, dass die VS-V1-Synapse Signale über einen großen Amplituden- und Frequenzbereich weitgehend linear überträgt. Der lineare Übertragungsbereich umfasst einen Arbeitsbereich, der die durch visuelle Bewegungsreize präsynaptisch induzierbare gradierte Signalkomponente deutlich übertrifft. Eine zeitliche Korrelation zwischen dem Auftreten prä- und postsynaptischer Aktionspotenziale wurde bei der Präsentation von weiß rauschenden Bewegungsreizen gezeigt (Warzecha et al. 2003). In dieser Arbeit habe ich den Einfluss der präsynaptischen aktionspotenzialartigen Depolarisationen auf das postsynaptische Signal betrachtet. Vor allem die zeitliche Präzision der synaptisch übertragenen Signale wurde systematisch untersucht. An Hand der synaptischen Übertragung konnten Rückschlüsse auf die an der Signalübertragung beteiligten Synapsentypen gezogen werden.

Den Ausgangspunkt der Studie lieferte ein Befund aus den Voltage-Clamp-Experimenten der vorangegangenen Arbeit. Der Klemmstrom der präsynaptischen Zelle ist auf einer groben Zeitskala in etwa konstant. Treten postsynaptisch jedoch Aktionspotenziale auf (teilweise wurden Aktionspotenzialraten >200 Hz registriert), so finden sich in einem schmalen Zeitfenster (4,5 ms) zu diesen postsynaptischen Aktionspotenzialen korrelierte negative Transienten im Klemmstrom. Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Beziehung dieser beobachteten Stromtransienten und postsynaptischer Aktionspotenziale analysiert. Da außer dem Voltage-Clamp keine weitere Stimulation der Zellen vorlag, liegt die Vermutung nahe, dass die Stromtransienten eine direkte Folge einer möglichen elektrischen Kopplung der prä- und postsynaptischen Zelle sein könnten. Dieser Vermutung widerspricht der in dieser Arbeit gezeigte Befund, dass zwar die meisten (96,9%), aber nicht alle postsynaptischen Aktionspotenziale mit einer negativen Transiente im Klemmstrom korreliert sind. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Amplituden der Klemmstromtransienten eine variable Größe aufweisen, bei einigen Zellen finden sich Transienten mit einem kontinuierlich verteilten

2. ABHANDLUNG

Amplitudenbereich, bei anderen Zellen findet sich eine bimodale Verteilung der Amplituden. Da die Amplitude der postsynaptischen Aktionspotenziale weitgehend konstant sein sollte, müsste das präsynaptische Potenzial über elektrische Synapsen von jedem postsynaptischen Aktionspotenzial ähnlich beeinflusst werden. Insbesondere die in einigen Zellen beobachtete bimodale Amplitudenverteilung ist mit ausschließlich elektrischer synaptischer Kopplung kaum zu erklären.

Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die beobachteten Klemmstromtransienten durch die Aktivität der Nachbar-VS-Zellen ausgelöst werden. Da VS-Zellen untereinander elektrisch gekoppelt sind (Haag und Borst 2004), wirken sich Membranpotenzialänderungen in einer VS-Zelle in einem geringeren Maße auch in den benachbarten VS-Zellen aus. Die obige Hypothese wurde insofern erweitert, dass die Aktivität benachbarter VS-Zellen sich wechselseitig beeinflusst und die Signalübertragung an der VS-V1-Synapse dem Prinzip folgt, dass die gradierte Membranpotenzialkomponente die postsynaptische Aktionspotenzialrate im wesentlichen vorgibt, die tatsächlichen Momente des Auslösens der postsynaptischen Aktionspotenziale aber an die präsynaptischen depolarisierenden Potenzialtransienten gekoppelt sind. Diese Hypothese wird durch die Analyse der postsynaptischen Spontanaktivität bei unbeeinflusster bzw. manipulierter Spontanaktivität der präsynaptischen VS-Zellen gestützt. Dabei wurde die Spontanaktivität manipuliert, indem eine VS-Zelle während der Aufnahme auf dem Niveau des Ruhepotenzials geklemmt wurde. Die Analyse der postsynaptischen Aktionspotenziale zeigt, dass bei unbeeinflusster Spontanaktivität der V1-Zelle häufig zwei Aktionspotenziale in sehr enger Zeitfolge auftreten. Die Versuche, bei denen eine VS-Zelle auf das Ruhepotenzial geklemmt wurde, weisen eine praktisch unveränderte postsynaptische Aktionspotenzialrate auf. Die zeitliche Verteilung der Aktionspotenziale bei diesen Versuchen zeigt aber einen Unterschied auf: die Häufigkeit der in sehr enger Folge auftretenden Aktionspotenziale ist deutlich und signifikant reduziert.

Die Übertragung präsynaptischer Aktionspotenziale auf die postsynaptische Zelle wurde untersucht, indem in Abwesenheit visueller Bewegungsreize durch Injektion kurzer Strompulse in eine VS-Zelle präsynaptische Aktionspotenziale ausgelöst wurden. Die Größe der Strompulse wurde so gewählt, dass nicht immer ein präsynaptisches Aktionspotenzial ausgelöst wurde. Die Analyse der postsynaptischen Aktionspotenzialfolgen ergab, dass präsynaptische Aktionspotenziale mit großer Wahrscheinlichkeit ein postsynaptisches Aktionspotenzial auslösen. Die Amplitude der präsynaptischen Aktionspotenziale ist variabel, und es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Amplitude des präsynaptischen Aktionspotenzials die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines postsynaptischen Aktionspotenzials steigt. Auch die nicht überschwelligeren Depolarisationsfolgen bewirken eine höhere Auftrittswahrscheinlichkeit eines postsynaptischen Aktionspotenzials. Dieses Übertragungsverhalten steht in hoher Übereinstimmung mit den in Abschnitt 2.4.1 dargestellten Ergebnissen.

2.4.3 Adaptation in bewegungsempfindlichen Neuronen der Fliege wird durch Depolarisierung bewirkt

Der begrenzte Arbeitsbereich einer Nervenzelle wird häufig durch Adaptationsmechanismen funktional erweitert und auf die Stimulushistorie optimiert (siehe Exkurs 5). In zahlreichen

Mechanisms of afterhyperpolarization following activation of fly visual motion-sensitive neurons

Nervenzellen zeigen sich nach Reizende Adaptationseffekte in Form einer einige Sekunden fortdauernden Nachhyperpolarisierung (AHP, Afterhyperpolarization). Bei manchen der bewegungsempfindlichen Neuronen im visuellen System der Fliege wird das neuronale Signal durch graduierte Potenzialänderungen, teilweise mit aufgelagerten Aktionspotenzialen, kodiert (siehe Abschnitt 2.1 und Exkurs 1). Exzitatorische Reize führen zu Depolarisation, inhibitorische Reize zu Hyperpolarisation des Membranpotenzials. Bei diesen Zellen wird ein AHP-Effekt nur nach der Präsentation eines exzitatorischen Stimulus beobachtet, inhibitorische Reize zeigen keine entsprechende Beeinflussung des Membranpotenzials⁵ nach Reizende (Harris et al. 2000; Kurtz et al. 2000).

Diese Studie zeigt, dass Nachhyperpolarisation in Tangentialzellen der Fliege allein durch vornehmlich im dendritischen Eingangsbereich lokalisierte, spannungsabhängige intrinsische Effekte induziert werden kann. Für dieses Projekt wurden VS-, HS- und CH-Zellen elektrophysiologisch untersucht. In Abwesenheit eines bewegten visuellen Stimulus wurde ein konstanter Strom (5 nA) in HS und CH-Zellen über den gleichen Zeitraum injiziert⁶, der benötigt wird, um durch exzitatorische Bewegungsreizpräsentation eine AHP hervorzurufen (in allen Versuchen 4 s). Nach Strominjektionsende wurde ein ähnlicher AHP-Effekt wie nach visueller Reizung beobachtet.

Um die elektrischen Eigenschaften der Zelle während einer künstlichen Depolarisation und während visueller Bewegungsreizung zu untersuchen, wurden Voltage-Clamp-Experimente durchgeführt. Das Membranpotenzial wurde in Abwesenheit eines visuellen Bewegungsreizes über einen Zeitraum von 4 Sekunden konstant um 25 mV depolarisiert. Der benötigte Klemmstrom wird über die Zeit größer; das heißt, der Eingangswiderstand nimmt spannungsabhängig ab. Im Anschluss an die Depolarisation nimmt der Klemmstrom, um die Zelle auf dem Ruhepotenzial zu halten, noch über Sekunden weiter ab. Diese Abnahme setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: einem schnellen, wahrscheinlich spannungsgesteuerter Kaliumstrom und einer langsamen Komponente, deren Zeitverlauf dem der visuell induzierten AHP entspricht.

5 Es würde in diesem Fall keine Nachhyperpolarisierung, sondern eine Nachdepolarisierung erwartet.

6 Die Strominjektionsversuche an CH- und HS-Zellen wurden von Benjamin Hundsdörfer und Dr. Rafael Kurtz durchgeführt.

2. ABHANDLUNG

Wird während der Präsentation eines exzitatorischen visuellen Bewegungsreizes die Zelle auf das Ruhepotenzial geklemmt, ist ein AHP-Effekt nach Stimulusende zu beobachten. Dieser ist nicht geringer als bei den nicht-geklemmten Kontrollversuchen. Wird die Zelle nach Reizende auf das Ruhepotenzial geklemmt, zeigt der Klemmstrom etwa den gleichen Verlauf einer invertierten visuell induzierten AHP. Der Verlauf des Klemmstroms ist weitgehend unabhängig davon, ob die Zelle bereits während der Reizpräsentation auf das Ruhepotenzial geklemmt wurde. Dieser Befund erscheint zunächst kontraindikativ zu den AHP-induzierenden Strominjektionsversuchen. Da der Strom in der axonalen Region injiziert wird, kann nicht davon ausgegangen werden, dass in der fein verzweigten dendritischen Eingangsregion das Membranpotenzial durch den Voltage-Clamp exakt kontrolliert wird. Die AHP beruht folglich wahrscheinlich auf einer Einganswiderstandserniedrigung im dendritischen Bereich.

Durch visuelle Bewegungsreize induzierte cytosolische Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen folgen einem ähnlichen Zeitverlauf wie die AHP (Kurtz et al 2000). Da Ca^{2+} durch spannungsgesteuerte Kanäle einströmt (Borst und Egelhaaf 1992; Haag und Borst 2000), lag die Vermutung nahe, dass Ca^{2+} die AHP regulieren könnte. Eine künstlich erhöhte Ca^{2+} -Konzentration verstärkt die Adaptation auf bewegte Stimuli jedoch nicht (Kurtz 2007). In der vorliegenden Studie wurde geprüft, ob ein Entfernen cytosolischen Ca^{2+} die visuell induzierte AHP beeinflusst⁷. Dafür wurde Ca^{2+} sensitiver Fluoreszenzfarbstoff und ein durch UV-Licht aktivierbarer Calcium-Chelator in die Zelle eingebracht. Nach Aktivierung des Chelators durch einen UV-Lichtblitz wurde Ca^{2+} rasch aus dem Cytosol entfernt. Nach einem Bewegungsreiz wurde, trotz deutlich geringerer Ca^{2+} Verfügbarkeit im Cytosol, eine ähnlich starke AHP registriert wie bei den Vergleichsdaten derselben Zelle vor dem Entfernen des freien Ca^{2+} durch Aktivierung des Chelators. Dieser Befund zeigt, dass die AHP nicht durch Änderungen der Calciumkonzentration innerhalb der Zelle bedingt wird.

Die Nachhyperpolarisation beruht wahrscheinlich auf direkt spannungsabhängigen Leitfähigkeitsänderungen im dendritischen Bereich der Zellen.

⁷ Die Versuche zum Einfluss einer verminderten cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf die AHP wurden von Dr. Rafael Kurtz durchgeführt.

2.5 Diskussion

In meiner Doktorarbeit habe ich im visuellen System der Fliege die synaptische Übertragung an der VS-V1-Synapse charakterisiert und Mechanismen aktivitätsabhängiger Adaptation verschiedener bewegungssensitiver Neuronen untersucht. Mit einer Analyse der Beziehung zwischen Eingangs- und Ausgangssignal konnte ich im ersten Teil der Arbeit zeigen, dass die VS-V1-Synapse über einen großen Arbeitsbereich verfügt und ein weitgehend lineares Übertragungsverhalten aufweist. Dieser Arbeitsbereich übertrifft in der Amplitude und Dynamik den durch visuelle Reize induzierbaren Bereich der graduierten Komponente des präsynaptischen Membranpotenzials. Im zweiten Teil meiner Arbeit zeigte ich Evidenzen dafür, dass der exakte Zeitpunkt des Auftretens postsynaptischer Aktionspotenziale durch präsynaptische aktionspotenzialartige Depolarisationen bewirkt wird. Die qualitative und quantitative Analyse des prä- und postsynaptischen Signals zeigte, dass die Signalübertragung an der VS-V1-Synapse nicht exklusiv durch elektrische Synapsen realisiert sein kann. Im Rahmen des dritten Teilprojekts meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine aktivitätsabhängige Plastizität des neuronalen Signals von VS-, HS- und CH-Zellen spannungsgesteuert durch intrinsische Mechanismen realisiert wird. Im Zeitrahmen von wenigen Sekunden findet eine Adaptation in Form einer Verringerung des Eingangswiderstandes statt, die auf der vorausgegangenen mittleren Membranpotenzialdepolarisation basiert.

In der Diskussion gehe ich zunächst detailliert auf die Arbeit zur synaptischen Übertragung ein. Ein Schwerpunkt bildet dabei die Betrachtung des präsynaptischen Signals. Viele der in diesem Teil erörterten Aspekte sowie methodische Gemeinsamkeiten leiten zum dritten Teilprojekt über.

Warum habe ich in meiner Doktorarbeit die synaptische Übertragung an der VS-V1-Synapse im visuellen System der Fliege untersucht? Die Fliege stellt ein exzellentes Modellsystem für die Erforschung neurowissenschaftlicher Fragestellungen dar (siehe Abschnitt 2.1), und einzelne Neuronen können elektrophysiologisch am weitgehend intakten Tier⁸ untersucht werden. Neben diesen experimentellen Vorteilen der Fliege stellt die VS-V1-Synapse unter dem Aspekt der synaptischen Signalverarbeitung ein besonders interessantes Zellensemble dar. Das präsynaptische Signal besteht aus einer graduierten Potenzialkomponente mit aufgelagerten aktionspotenzialartigen Depolarisationen. Postsynaptisch wird Information allein durch Aktionspotenziale kodiert.

8 Während der elektrophysiologischen Experimente ist das Tier immobilisiert und die Kopfkapsel geöffnet, um Zugang zum Gehirn zu ermöglichen.

2. ABHANDLUNG

Die an dieser Synapse vorliegende komplexe Signalstruktur stellt auch für Nicht-Fliegenforscher einen interessanten Forschungsgegenstand dar. Während bei Invertebraten seit langem bei einer Vielzahl von Nervenzellen graduierte Membranpotenziale beschrieben und analysiert wurden, war dieses bei Vertebraten bislang ein nur bei wenigen Zelltypen beachteter Aspekt. In den vergangenen Jahren wurde jedoch in einigen Studien gezeigt, dass auch bei Wirbeltieren in zahlreichen Zellen graduierte Signalkomponenten auftreten, oder die Form der Aktionspotenziale nicht so konstant ist, wie zuvor häufig angenommen (Übersichtsartikel: Marder 2006; Juusola et al 2007; Alle und Geiger 2008). Diese „analogen“ Signalkomponenten sind nicht nur Rauschen, sondern tragen zur Informationsverarbeitung bei. So wurde z.B. eine graduierte Signalkomponente in Zellen des auditorischen Cortex (Calyx of Held) der Ratte nachgewiesen. Diese beeinflusst die präsynaptische Ca^{2+} -Konzentration und somit direkt die Freisetzung von Transmitter (bzw. das Verschmelzen von Vesikeln an der präsynaptischen Membran) (Awatramani et al. 2005). In Neuronen im Hippocampus und in neocortikalen Pyramidenzellen bei Ratten wurde gezeigt, dass dendritische unterschwellige Depolarisationen über das Axon weitergeleitet werden und die Amplitudengröße und -form dieser Depolarisationen die präsynaptische Transmitterfreisetzung beeinflussen (Alle und Geiger 2006; Shu et al. 2006).

Das präsynaptische Potenzial wird von der VS-V1-Synapse linear übertragen

Die Übertragung zwischen spikenden Zellen (z.B. Redman 1990; Wadiche und Jahr 2001) oder zwischen graduiert kodierenden Zellen (Field und Rieke 2002; Simmons 2002; Simmons und de Ruyter van Steveninck 2005) wurde bereits untersucht. Aus diesen Studien ist ersichtlich, dass die Übertragung von Aktionspotenzialen und graduierten Signalen unterschiedliche Anforderungen an die Synapse stellt. Bei der Übertragung graduierter Signale müssen geringe Potenzialänderungen rauscharm übertragen werden, die Synapsen arbeiten weitgehend linear. Bei der Übertragung von Aktionspotenzialen ist es wichtig, diese zuverlässig und zeitlich präzise vom Rauschhintergrund unterscheiden zu können. Es wurden nicht lineare, große Signale verstärkende Mechanismen dokumentiert (Dodge und Rahamimoff 1967; Smith et al. 1985; Borst und Sakmann 1998). Für die VS-V1-Synapse konnte ich zeigen, dass die postsynaptische Aktionspotenzialrate weitgehend linear vom graduierten präsynaptischen Potenzial abhängt (siehe Kapitel 3, Abbildung 2). Ein überraschender Befund ist, dass der Arbeitsbereich der Synapse deutlich größer ist, als dieses zur Übertragung visuell induzierter graduierter Membranpotenzialänderungen notwendig ist. Das VS-Membranpotenzial weist gewöhnlich zwar auch eine zusätzliche aktionspotenzialartige Komponente auf, die ähnlich große Spitzendepolarisationen erreicht wie hier getestet, doch wurden die in dieser Arbeit mittels der Voltage-Clamp-Technik angelegten Potenziale aufgrund ihrer zeitlichen Charakteristik als der graduierten Signalkomponente entsprechend betrachtet. Das Potenzial

wurde über einen um Größenordnungen längeren Zeitraum konstant gehalten (600 ms) als bei den natürlich auftretenden schnellen Depolarisationen (wenige ms). Auch wurde gezeigt, dass hohe postsynaptische Feuerraten über die geklemmte Zeitspanne auf einem ähnlichen Niveau verbleiben, also keine Potenzialtransienten notwendig sind. Allerdings ist bei tonischer präsynaptischer Depolarisation eine geringe signifikante Abnahme der postsynaptischen Aktionspotenzialrate zu beobachten (diese Beobachtung wird weiter unten eingehender diskutiert).

Die postsynaptische Aktionsspotenzialrate folgt dem präsynaptischen Potenzial linear, bis Raten erreicht sind, wie sie durch starke visuelle Bewegungsreize hervorgerufen werden können. Dies deutet darauf hin, dass nicht die synaptische Übertragung im experimentell überprüften Potenzialbereich der limitierende Faktor bei der postsynaptischen Reaktion ist, sondern eine Sättigung erreicht wird, die der maximalen Feuerfrequenz der V1-Zelle entspricht.

Präsynaptische Aktionspotenziale lösen mit hoher Wahrscheinlichkeit postsynaptisch ein Aktionspotenzial aus (Kapitel 4, Abbildung 5B). Die Auswertung des Zusammenhangs zwischen der Größe des präsynaptischen Aktionspotenzials (es sei hier noch einmal darauf hingewiesen, dass VS-Zellen Aktionspotenziale variabler Größe aufweisen) und der Wahrscheinlichkeit eines zeitlich korreliert auftretenden postsynaptischen Aktionspotenzials zeigte folgenden Trend auf: die Wahrscheinlichkeit, ein postsynaptisches Aktionspotential auszulösen, nimmt zu, je größer das präsynaptische Aktionspotenzial ist (Kapitel 4, Abbildung 6). Zusammengenommen mit den obigen Befunden deutet dies darauf hin, dass die synaptische Übertragung in erster Linie, wenn nicht sogar exklusiv, von der Amplitude des präsynaptischen Membranpotenzials abhängt; unabhängig davon, ob die Membranpotenzialänderung durch ein Aktionspotenzial oder die gradierte Signalkomponente hervorgerufen wird. Diese Überlegung wird durch einen weiteren Befund gestützt: Obschon Photorezeptorzellen Lichtintensitätsänderungen bis etwa 100 Hz detektieren (siehe z.B. Laughlin 1981), kann richtungsempfindliche Bewegungsinformation nur bis ca. 20 Hz kodiert werden (Warzecha et al. 1998). Die Detektion der Bewegung erfordert die Integration von Lichtintensitätsänderungen mehrerer, räumlich getrennter Photorezeptorzellen. Das heißt, die durch eine Bewegung hervorgerufene Lichtintensitätsänderung muss mehrere Photorezeptorzellen überstreichen, um detektiert werden zu können und erfordert somit, je nach Geschwindigkeit des Bewegungsreizes, eine gewisse Zeit (Borst und Egelhaaf 1989; Egelhaaf und Borst 1989). Die postsynaptische Aktionspotenzialfolge spiegelt die Dynamik des präsynaptischen gradierten Potenzials jedoch deutlich präziser wider, als dieses für die Übertragung der Dynamik visuell induzierter Bewegungsreize notwendig wäre. Ich konnte eine Kopplung des postsynaptischen Signals an den Phasenverlauf des präsynaptischen Signals über den gesamten analysierten Frequenzbereich bis zum Maximum von 64 Hz feststellen (Kapitel 3, Abbildung 6).

2. ABHANDLUNG

Das Signal an der VS-V1-Synapse wird chemisch und elektrisch übertragen

Das lineare Übertragungsverhalten über einen großen Arbeitsbereich lässt sich auf den ersten Blick gut mit elektrischen Synapsen erklären. Elektrische Synapsen zwischen VS und V1 können als sehr wahrscheinlich angesehen werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden Evidenzen für eine bidirektionale elektrische Kopplung von VS1 und V1 gezeigt (Haag und Borst 2008). Bereits zuvor favorisierten Kalb et al. (2006) eine elektrische synaptische Verbindung zwischen VS1 und V1, jedoch chemische Synapsen zwischen VS2/3 und V1. Die in meiner zweiten Studie präsentierten Ergebnisse sind mit einer exklusiven elektrischen Kopplung aller VS-Zellen mit V1, wie von Haag und Borst (2008) vorgeschlagen, jedoch nicht gänzlich kompatibel. Die Analyse der zeitlich korreliert mit V1 auftretenden Transienten im Klemmstrom der im Voltage-Clamp-Modus abgeleiteten präsynaptischen Zelle birgt zwei Befunde, die gegen eine ausschließliche elektrische Kopplung sprechen. Nicht jedes postsynaptische Aktionspotenzial ist von einer Klemmstromtransiente der präsynaptischen Zelle begleitet (siehe Kapitel 4, Abbildung 3). Die Quote dieser „Failures“ ist zwar nur gering, jedoch sollte bei einer elektrischen Synapse jedes Aktionspotenzial präsynaptisch registrierbar sein. Als kritisch anzusehen bei dieser Analyse ist, dass die Auswertung des Klemmstroms nicht in allen Fällen eindeutig war, da manche Klemmstromverläufe sehr transient verliefen und nicht auszuschließen ist, dass in einzelnen Fällen kleine Stromtransienten von Strömen gegenläufiger Richtung maskiert wurden.

Ein zweiter Befund der Analyse des Klemmstromes stützt die Annahme, dass die synaptische Verbindung nicht ausschließlich über elektrische Synapsen realisiert sein kann.

Bei einigen Zellen finden sich Klemmströme mit einem kontinuierlich verteilten Amplitudenbereich, bei anderen Zellen findet sich eine bimodale Verteilung. Da die Amplitude der postsynaptischen Aktionspotenziale auch im dendritischen Bereich als weitgehend konstant angesehen werden kann (vgl. Haag und Borst 2008, Abbildung 1), müsste das präsynaptische Potenzial über elektrische Synapsen bei jedem postsynaptischen Aktionspotenzial ähnlich beeinflusst werden. Insbesondere die in einigen Zellen beobachtete bimodale Amplitudenverteilung der Stromtransienten (siehe Kapitel 4, Abbildung 4) ist mit ausschließlich elektrischer synaptischer Kopplung kaum zu erklären, während eine leichte Variabilität der Stromtransienten eventuell auch durch einen von Aktionspotenzial zu Aktionspotenzial nicht immer exakt identischen Generierungsort erklärt werden könnte. Eine elektrische Kopplung zwischen VS und V1 wird nicht ausgeschlossen, allerdings auf Grund der hier präsentierten Ergebnisse als eher schwach eingestuft.

In einer nicht veröffentlichten Studie habe ich durch Doppelableitungen von einzelnen VS-Zellen und V1 vor und nach der Zugabe des Calciumkanal-Blockers Kobalt in die das Fliegenhirn umspülende Lösung versucht zu klären, ob die Kopplung zwischen VS und V1 chemischer oder elektrischer Natur ist. Bei diesen Versuchen stellte sich jedoch erst nach

langer Inkubationszeit, und nicht in jedem Fall, eine Beeinflussung des VS- und V1-Signals ein. Nach 10 - 30 Minuten nahm die Reaktion von VS und V1 auf visuelle Reizung ähnlich stark ab. Die Reaktionsabnahme von V1 war zudem unabhängig davon, ob ein visueller Stimulus in Vorzugsrichtung präsentiert wurde oder depolarisierender Strom in VS injiziert wurde. Auch wenn unklare Effekte durch die unspezifische Kobaltgabe (das ganze Gehirn wurde von der Kobaltlösung umspült) nicht ausgeschlossen werden, so kann dieser Befund als ein Indiz gegen eine starke elektrische Kopplung angesehen werden, da in diesem Fall bei Strominjektion in die VS-Zelle V1 vor und nach Kobaltgabe eine gleichbleibend hohe Reaktion zeigen sollte.

Die gradierte Komponente und die aktionspotenzialartige Komponente des präsynaptischen Signals haben unterschiedlichen Einfluss auf die Frequenz und die zeitliche Verteilung postsynaptischer Aktionspotenziale

In der zweiten Studie (Kapitel 4) wird die Hypothese aufgestellt, dass das präsynaptische gradierte Signal im wesentlichen die postsynaptische Aktionspotenzialrate bestimmt und die aufgelagerten präsynaptischen Aktionspotenziale den genauen Zeitpunkt bestimmen, wann ein postsynaptisches Aktionspotenzial ausgelöst wird. Dies wurde aus der Analyse der präsynaptischen Klemmströme der Voltage-Clamp-Experimente, der Auswertung der zeitlichen Verteilung der postsynaptisch spontan auftretenden Aktionspotenziale und der gezielten Generierung präsynaptischer Aktionspotenziale geschlossen. Ich konnte zeigen, dass fast alle postsynaptischen Aktionspotenziale von präsynaptischen, transienten Signalen in Nachbar-VS-Zellen eines spannungs-geklemmten Neurons begleitet wurden. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, wie der in der ersten Studie gezeigte Befund, dass das gradierte präsynaptische Membranpotenzial in linearer Abhängigkeit zur postsynaptischen Aktionspotenzialrate steht, zu bewerten sind, und ob eventuell die postsynaptischen Aktionspotenziale sogar einzig durch präsynaptische Aktionspotenziale ausgelöst werden. Doch welche Rolle spielte dann die gradierte Signalkomponente in den VS-Zellen? Da die VS-Zellen untereinander schwach gekoppelt sind (Haag und Borst 2004), kann eine VS-Zelle nicht gänzlich isoliert betrachtet werden. Die Depolarisation einer VS-Zelle depolarisiert unweigerlich auch die Nachbar-VS-Zellen in geringem Maße. Die elektrische VS-VS-Kopplung könnte als eine Art Verstärkung fungieren, indem in den Nachbar-VS-Zellen durch leichte Depolarisation die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Aktionspotenzialen erhöht wird. Diese Überlegung ist auch mit der Abnahme der Antwort auf einen visuellen Stimulus nach Ablation von Nachbar-VS-Zellen (Farrow et al. 2005) kompatibel. Es ist aber als unwahrscheinlich anzusehen, dass die synaptische Übertragung von VS auf V1 nur durch VS-Aktionspotenziale vermittelt wird. Dagegen spricht z.B. die gleichbleibende

2. ABHANDLUNG

Aktionspotenzialrate von V1, wenn eine präsynaptische Zelle an aktionspotenzialartiger Spontanaktivität gehindert wird (Kapitel 4, Abbildung 7).

Die lineare Abhängigkeit der postsynaptischen Aktionspotenzialrate (Kapitel 3, Abbildung 2) vom graduierten präsynaptischen Potenzial lässt sich vor diesem Hintergrund so verstehen, dass die graduierte Signalkomponente V1 tonisch leicht depolarisiert und somit die Wahrscheinlichkeit zur Generierung eines Aktionspotenzials erhöht. Die zusätzlich auftretenden transienten Depolarisationen der Nachbar-VS-Zellen benötigen mit zunehmender Depolarisation eine immer geringere Amplitude, um V1 überschwellig werden zu lassen. So lösen in der Kombination mit der graduierten Signalkomponente auch kleinere transiente Depolarisationen in V1 ein Aktionspotenzial aus, und es kommt zu einer zeitlichen Korrelation zwischen präsynaptischen Transienten und postsynaptischen Aktionspotenzialen.

Wird das graduierte und aktionspotenzialartige Signal über die gleichen Synapsentypen übertragen?

Eine physiologisch getrennte Übertragung der schnellen und langsamen Signalkomponente kann an der VS-V1-Synapse mit den derzeitigen Befunden nicht ausgeschlossen werden. Für Signale ähnlicher Struktur in Blutegelneuronen wurde zwar gezeigt, dass die schnellen und langsamen Signale unterschiedliche Ca^{2+} -Kanäle aktivieren, jedoch liegen diese in einer räumlich gemeinsamen Synapsenstruktur vor (Ivanov und Calabrese 2006). Bei *Drosophila* sind Mutanten (*shaking-B²*) mit einem defekten Protein zur Ausbildung von gap junctions bekannt. Es wurde für elektrisch-chemisch gemischte Synapsen gezeigt, dass bei den Mutanten nur noch eine langsame Signalkomponente synaptisch übertragen wird, die elektrischen Synapsen also für die Übertragung transienter Signale benötigt wird (Thomas und Wymann 1984; Trimarchy und Murphey 1997; Allen und Murphey 2007). Ein solcher Befund kann mit dieser Arbeit für die VS-V1-Synapse von *Calliphora* jedoch weder bestätigt noch widerlegt werden. Bei Exzitation beträgt der Anteil der aktionspotenzialartigen Depolarisationen weniger als 30% der Summe des gesamten Membranpotenzials⁹. Aus energetischer Sicht wäre daher eine genau umgekehrte Übertragung plausibel.

Eine solche Auftrennung der Übertragung des präsynaptischen Signals könnte auch Adaptationsprozesse begünstigen. Für chemisch-elektrisch gemischte Synapsen wurde

⁹ Die Berechnung des Hochfrequenzanteils am Gesamtpotenzial erfolgte nach folgender Vereinfachung: Zunächst wurde vom Gesamtsignal das tiefpassgefilterte Signal abgezogen. Von dem erhaltenen Differenzsignal wurde der Mittelwert der negativen Werte ermittelt und der Betrag dieses Mittelwertes dem Differenzsignal als Offset hinzuaddiert. Von dieser Summe wurde das Integral gebildet. Im Beispiel aus Abbildung 4 beträgt der Anteil am des hochfrequenten Differenzsignals am Gesamtpotenzial etwa 28%. Diese Ermittlung lässt viele Parameter unberücksichtigt und dient lediglich einer groben Abschätzung.

gezeigt, dass die chemisch übertragene Signalkomponente eine stärkere Plastizität bei aktivitätsabhängiger Adaptation aufweist als die elektrisch übertragene Komponente (Galarreta und Hestrin 1999; Galarreta und Hestrin 2001; Gibson et al. 1999; Tamas et al. 2000). Diese Beobachtung könnte auch energetische Effekte widerspiegeln. Anhaltende Transmitterfreisetzung ist aus energetischer Sicht teuer. Die stärker ausgeprägten Adaptationseffekte bei der chemischen Signalkomponente könnten eine Strategie zu einer energetisch günstigen Adaptation widerspiegeln: da die elektrische Übertragung energetisch günstig ist, ist es unter diesen Gesichtspunkten sinnvoll, die „teure“ chemisch vermittelte Signalkomponente so stark wie möglich zu reduzieren. Das chemische Signal kann bei anhaltender Aktivität stärker reduziert werden, während die elektrische Signalkomponente weniger stark reduziert wird. So kann der Gesamtarbeitsbereich energetisch günstig verschoben werden. Dieser Überlegung entspricht auch die Beobachtung, dass bei anhaltender exzitatorischer Stimulation von HS- und VS-Zellen eine stärkere Abnahme der aktionspotenzialartigen Signale als der gradierten Signalkomponente beobachtet wurde (HS-Zellen: persönliche Mitteilung Pei Liang; VS-Zellen: eigene Beobachtung). Aufgrund dieser präsynaptischen Adaptation müssen weniger schnelle Signale über die Synapse übertragen werden. Unter der Annahme, dass die aktionspotenzialartigen Signale chemisch übertragen werden, führt diese präsynaptische Adaptation bereits zu einer energetisch besonders günstigen Übertragung an der Synapse.

Funktionale und energetische Aspekte der membranpotenzialabhängigen Adaptation

Die Abnahme des Eingangswiderstandes von VS-, HS- und CH-Zellen bei anhaltender exzitatorischer Reizung stellt eine Form der Adaptation dar. Gleichgroße Eingangsströme an der Synapse führen zu geringerer Depolarisation der Zelle. Die Lokalisation des Adaptationsmechanismus auf großflächige Bewegungsreize in den VS- und HS-Zellen ist auch energetisch plausibel. Je früher Adaptation in der Signalkaskade auftritt, desto energetisch günstiger. Da die HS- und VS-Zellen großflächig retinotopen Input integrieren, ist es bei diesen Zellen funktional sinnvoll, bis zu dieser Verarbeitungsstufe möglichst wenig Bewegungsinformation zu verlieren. Wie sollte eine HS- oder VS-Zelle vom Adaptationszustand eines Inputelements „wissen“ - es bestünde keine Information über den zeitlichen Verlauf des Stimulus auf Tangentialzell-Ebene. Es wäre nicht unterscheidbar, ob die Eingangselemente kontinuierlich gleichen visuellen Eingang bekämen und dieser konstante Reiz bereits seit einiger Zeit bestünde, oder ob die Stimulusstärke gerade abnähme. In beiden Fällen wäre der Tangentialzell-Eingang identisch, im ersten Fall beruhte die Abnahme des Eingangssignals auf Adaptationseffekten der Eingangselemente, im zweiten Fall auf der Abnahme des visuellen Reizes.

2. ABHANDLUNG

Die Voltage-Clamp-Versuche mit gleichzeitiger visueller Reizung legen den Schluss nahe, dass die Adaptation vornehmlich im dendritischen Bereich der VS-Zellen stattfindet. Das Klemmen des Potentials während visueller Reizung wirkte sich nicht oder kaum auf die AHP aus. Da die Ableitungen im axonalen Bereich des Neurons stattfanden und der Dendrit von VS-Zellen sehr stark verzweigt ist (siehe Abbildung 3), kann nicht angenommen werden, dass das Potential in allen dendritischen Verästelungen dem axonalen Klemmpotential entsprach. Ursache dafür ist das bei Voltage-Clamp-Ableitungen auftretende Problem des Space-Clamp: der Strom wird punktuell an der Elektrode injiziert und muss von dort in das ganze Neuron propagieren. Downstream vom Injektionspunkt ist dieses ein geringeres Problem, da das Axon relativ dick und nicht verzweigt ist und nur terminal weitere Eingänge bekommt¹⁰. Der Dendrit hingegen ist schwierig zu klemmen. In Modellberechnungen wurde gezeigt, dass die Potentialänderung im Dendriten auf eine punktuelle axonale Strominjektion zu 70% geringer ausfällt als am Injektionspunkt (Haag und Borst 1997). Die präsynaptischen Elemente können auch während des Voltage-Clamps zu lokaler Depolarisation in den dendritischen Verästelungen führen und somit einen Adaptationseffekt bewirken.

Die Adaptation auf dendritischer Ebene ist funktional plausibel. Das rezeptive Feld der VS-, HS- und CH-Zellen ist sehr ausgedehnt¹¹. Ein konstant großer, aber sich im rezeptiven Feld der Zelle räumlich verschiebender, Bewegungsreiz führt so zu einer schwächeren Adaptation als ein sich räumlich nicht verschiebender Reiz. Das heißt, ein sich gleich bewegendes Reiz, der über den gesamten Zeitraum des Reizes den gleichen Ausschnitt des rezeptiven Feldes ausfüllt, depolarisiert über den Reizzeitraum konstant die gleichen Eingangselemente der Zelle, diese dendritische Region adaptiert auf den Bewegungsreiz. Verändert der Reiz hingegen seine Position innerhalb des rezeptiven Feldes, führt dieses zu einer Depolarisation anderer lokaler, noch nicht adaptierter Eingangselemente und ruft so eine stärkere Reaktion vor. Eine retinotopische Adaptation auf dendritischer Ebene ermöglicht so eine Unterscheidbarkeit dieser Reize.

Für V1 kann auf Basis der vorliegenden Versuchsdaten ein potenzialabhängiger Adaptationsmechanismus weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Tonische präsynaptische Depolarisation führt zwar zu einer über die Zeit geringfügig abnehmenden postsynaptischen Aktionspotentialrate (siehe Kapitel 3, Abbildung 3). Da die postsynaptische Aktivität nur extrazellulär registriert wurde, kann jedoch keine Aussage zur Änderung der elektrischen Eigenschaften getroffen werden. Die bei den Voltage-

¹⁰ Die elektrische Kopplung der VS-Zellen ist axonal. In den in Kapitel 3 und 4 dargestellten Voltage-Clamp-Versuchen wird der Einfluss dieser Kopplung auf die Qualität des Voltage-Clamps aber als gering betrachtet. Die Kopplung zwischen den VS-Zellen ist schwach. Auch wurden während der in Kapitel 3 und 4 dargestellten Experimente keine visuellen Stimuli präsentiert, die in den nicht geklemmten VS-Zellen zu starker Aktivität geführt hätten, die ihrerseits das Potential der geklemmten Zelle stärker beeinflusst hätte.

¹¹ CH-Zellen bekommen keinen direkten retinotopischen Input, und das Membranpotential weist keine Aktionspotentialkomponente auf.

Clamp-Versuchen beobachtete Abnahme der Aktionspotenzialrate ist auch nicht zu einem Adaptationsmechanismus wie in den VS-, HS- und CH-Zellen kompatibel: Eine Abnahme des Eingangswiderstandes auf Basis der konstant-tonischen Depolarisation der Eingangselemente (VS-Zellen) würde über die Zeit (d.h. mit zunehmender Adaptation im dendritischen Bereich von V1) zu einem geringfügig weniger depolarisierten postsynaptischen Potenzial führen. Es ist zu erwarten, dass die spannungsgesteuerten Natriumkanäle durch die konstante Depolarisation von V1 durch die geklemmte VS-Zelle inhibiert werden und zur Auslösung eines Aktionspotenzials eine relativ große Depolarisation benötigt wird. Käme es aufgrund einer anhaltenden Depolarisation zu einer Veränderung des Eingangswiderstandes von V1 und somit zu einer Abnahme der Depolarisation, würden mit zunehmender Zeit der Anteil der inaktivierten Natriumkanäle abnehmen und es würden geringere, durch die Spontanaktivität der anderen VS-Zellen hervorgerufene Depolarisationen ausreichen, um ein Aktionspotenzial zu generieren (der Adaptationseffekt in V1 ist um so stärker, je stärker die präsynaptische Depolarisation ist).

Die Inaktivierung der Natriumkanäle durch die tonische Depolarisation kann auch eine Ursache für die nicht quantifizierte Beobachtung sein, dass Klemmstromtransienten-Failures mit zunehmender Depolarisation seltener auftreten. Bei geringer Depolarisation sind nur wenige Natriumkanäle inaktiviert und Aktionspotenziale können bereits durch geringste Depolarisationen oder die statistische Öffnung einiger Natriumkanäle ausgelöst werden, die im Verlauf des Klemmstroms nicht detektierbar sind. Bei stärkerer tonischer Depolarisation, und dadurch mehr inhibierten Natriumkanälen, nimmt die Wahrscheinlichkeit der statistisch-zufällig, oder durch geringste Depolarisationen ausgelösten Aktionspotenziale ab.

Literatur:

Allen MJ, Murphey RK (2007): The chemical component of the mixed GF-TTMn synapse in *Drosophila melanogaster* uses acetylcholine as its neurotransmitter. *Eur J Neurosci* 26: 439-445.

Alle H und Geiger JR (2006): Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. *Science* 311: 1290-1293.

Alle H und Geiger JR (2008): Analog signalling in mammalian cortical axons. *Curr Opin Neurobiol.* 18(3): 314-20.

Awatramani GB, Price GD und Trussell LO (2005): Modulation of transmitter release by presynaptic resting potential and background calcium levels. *Neuron* 48: 109-121.

Beckers U, Egelhaaf M und Kurtz R (2007): Synapses in the fly motion pathway: Evidence for a broad range of signal amplitudes and dynamics. *J Neurophysiol* 97: 2032-2041.

Boeddeker N, Lindemann JP, Egelhaaf M, Zeil J (2005): Responses of blowfly motion-sensitive neurons to reconstructed optic flow along outdoor flight paths. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 191(12): 1143-55.

Borst A., Egelhaaf M (1987): Temporal modulation of luminance adapts time constant of fly movement detectors. *Biol. Cybern.* 56: 209-215.

Borst A und Egelhaaf M (1989): Principles of visual motion detection. *Trends Neurosci:* 12: 297-306.

Borst A und Egelhaaf M (1992): In vivo imaging of calcium accumulation in fly interneurons as elicited by visual motion stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9): 4139-43.

Borst A und Haag J (2002): Neural networks in the cockpit of the fly. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 188(6): 419-37.

Borst JG und Sakmann B (1998): Facilitation of presynaptic calcium currents in the rat brainstem. *J Physiol* 513: 149-155.

Brauckmann C und Schneider J (1996): Ein unterkarbonisches Insekt aus dem Raum Bitterfeld/Delitzsch (Pterygota, Arnsbergium, Deutschland). *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie Monatshefte*, 1996: 17-30, Abb. 1-5; Stuttgart.

Brenner N, Bialek W, und de Ruyter van Steveninck R (2000): Adaptive rescaling maximizes information transmission. *Neuron* 26(3): 695-702.

De Polavieja GG, Harsch A, Kleppe I, Robinson HP und Juusola M (2005): Stimulus history reliably shapes action potential waveforms of cortical neurons. *J Neurosci* 25: 5657-5665.

De Ruyter van Steveninck RR und Laughlin SB (1996): The rate of information transfer at graded-potential synapses. *Nature* 379: 642– 645.

Dodge FA und Rahamimoff R (1967): Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol* 193: 419-432.

Douglass JK und Strausfeld NJ (1995): Visual motion detection circuits in flies: peripheral motion computation by identified small-field retinotopic neurons. *J Neurosci* 15(8): 5596-611.

Du Bois-Reymond EH (1848): *Untersuchungen über thierische Elektrizität*. Reimer, Berlin

Eccles JC (1953): *The Neurophysiological Basis of Mind*. Oxford: Clarendon

Egelhaaf M (2006): The neural computation of visual motion information. In: *Invertebrate vision* (Herausgeber: Warrant E und Nielsson D E), Cambridge University Press, Cambridge, pp 399 – 461.

Egelhaaf M und Borst A (1989): Transient and steady-state response properties of movement detectors. *J Opt Soc Am* 6:116-127.

Egelhaaf M, Kern R, Krapp Holger G, Kretzberg J, Kurtz R und Warzecha AK (2002): Neural encoding of behaviourally relevant visual-motion information in the fly. *Trends in Neurosciences* 24: 96 – 102.

Egelhaaf M, Grewe J, Karmeier K, Kern R, Kurtz R und Warzecha AK (2004): Novel approaches to visual processing in insects: Case studies on neuronal computations in the blowfly. In: *Methods in insect sensory neuroscience*. (Herausgeber: Christensen TA), pp. 185-212. CRC Press, Boca Raton, London, New York.

Elyada YM, Haag J und Borst A (2009): Different receptive fields in axons and dendrites underlie robust coding in motion-sensitive neurons. *Nat Neurosci* 12(3): 327-32.

2. ABHANDLUNG

Farrow K, Borst A und Haag J (2005): Sharing receptive fields with your neighbors: Tuning the vertical system cells to wide field motion. *J Neurosci* 25(15): 3985-3993.

Fatt P und Katz B (1951): An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol* 115: 320-370.

Field GD und Rieke F (2002): Nonlinear signal transfer from mouse rods to bipolar cells and implications for visual sensitivity. *Neuron* 34: 773-785.

Galarreta M und Hestrin S (1999): A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402(6757): 72-5.

Galarreta M und Hestrin S (2001): Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science* 292(5525): 2295-9.

Gibson JR, Beierlein M und Connors BW (1999): Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402: 75-79.

Haag J und Borst A (1997): Encoding of visual motion information and reliability in spiking and graded potential neurons. *J Neurosci* 17: 4809-4819.

Haag J und Borst A (1998): Active membrane properties and signal encoding in graded potential neurons. *J Neurosci* 18: 7972-7986.

Haag und Borst (2000) Spatial distribution and characteristics of voltage-gated calcium signals within visual interneurons. *J Neurophysiol* 83(2): 1039-51.

Haag J und Borst A (2004): Neural mechanism underlying complex receptive field properties of motion-sensitive interneurons. *Nat Neurosci* 7: 628-634.

Haag J und Bost A (2008): Electrical coupling of lobula plate tangential cells to a heterolateral motion-sensitive neuron in the fly. *J Neurosci* 28: 14435–14442.

Harris RA, O'Carroll DC und Laughlin SB (1999): Adaptation and the temporal delay filter of fly motion detectors. *Vision Res* 39(16): 2603-13.

Harris RA, O'Carroll DC und Laughlin SB (2000): Contrast gain reduction in fly motion adaptation. *Neuron* 28: 595-606.

Hausen K (1976): Functional characterization and anatomical identification of motion sensitive neurons in the lobula plate of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Z Naturforsch*

31c: 629-633.

Hausen K, Egelhaaf M (1989): Neural mechanisms of visual course-control in insects. In: Facets in Vision, Herausgeber: Hardie R, Stavenga D, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 391-424.

Hausen K, Wolburg-Buchholz W und Ribi WA (1980): The synaptic organization of visual interneurons in the lobula complex of flies. A light and electron microscopical study using silver-intensified cobalt-impregnations. *Cell Tiss Res* 208(3): 371-87.

Hausen K (1982): Motion sensitive interneuron in the optomotor system of the fly. II. The horizontal cells: Receptive field organization and response characteristics. *Biol Cybern* 46: 67-79.

Hengstenberg R, Hausen K und Hengstenberg B (1982): The Number and Structure of Giant Vertical Cells (VS) in the Lobula Plate of the Blowfly *Calliphora erythrocephala*. *J Comp Physiol* 149: 163-177

Hodgkin AL und Huxley AF (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117: 500-544.

Ivanov AI und Calabrese RL (2000): Intracellular Ca²⁺ dynamics during spontaneous and evoked activity of leech heart interneurons: low-threshold Ca currents and graded synaptic transmission. *J Neurosci* 20: 4930-4943.

Ivanov AI und Calabrese RI (2006): Spike-mediated and graded inhibitory synaptic transmission between leech interneurons: evidence for shared release sites. *J Neurophysiol* 96: 236-251.

Johnston D und Miao-Sin S (1995): Foundations of cellular neurophysiology. The MIT Press, Cambridge.

Juusola M (1994): Measuring complex admittance and receptor current by single electrode voltage-clamp. *J Neurosci Methods* 53(1): 1-6.

Juusola M, Uusitalo RO und Weckström M (1995) Transfer of graded potentials at the photoreceptor-interneuron synapse. *J Gen Physiol* 105: 117-148.

Juusola M, Robinson HPC und de Polavieja GG (2007) Coding with spike shapes and graded potentials in cortical networks. *BioEssays* 29: 178-187.

2. ABHANDLUNG

Juusola M und French AS (1997) The efficiency of sensory information coding by mechanoreceptor neurons. *Neuron* 18: 959-968.

Kalb J, Egelhaaf M und Kurtz R (2006) Robust Integration of motion information in the fly visual system revealed by single cell photoablation. *J Neurosci* 26: 7898-7906.

Krapp HG, Hengstenberg B und Hengstenberg R (1998) Dendritic structure and receptive-field organization of optic flow processing interneurons in the fly. *J Neurophysiol* 79: 1902-1917.

Kurtz R, Dürr V und Egelhaaf M (2000): Dendritic calcium accumulation associated with direction-selective adaptation in visual motion-sensitive neurons in vivo. *J Neurophysiol* 84(4): 1914-23.

Kurtz R, Warzecha AK und Egelhaaf M (2001) Transfer of visual motion information via graded synapses operates linearly in the natural activity range. *J Neurosci* 21: 6957-6966.

Kurtz R (2007) Direction-selective adaptation in fly visual motion-sensitive neurons is generated by an intrinsic conductance-based mechanism. *Neuroscience* 11;146(2): 573-83.

Laughlin S (1981): Neural principles in the peripheral visual systems of invertebrates. *Handbook of sensory physiology*. Vol VII/6B Editor: H. Autrum. Berlin, Heidelberg, New York: Springer S. 133-280.

Luksch H, Khanbabaie R und Wessel R (2004): Synaptic dynamics mediate sensitivity to motion independent of stimulus details. *Nat Neurosci* 7: 380-388.

Maddess T und Laughlin SB (1985): Adaptation of the motion-sensitive neuron H1 is generated locally and governed by contrast frequency. *P Roy Soc Lond B Bio* 228: 251-275.

Marder E (2006): Extending influence. *Nature* 441: 702-703.

Menzel R und Giurfa M (2001): Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cog Sci* 5: 62-71.

Müller B und Reinhardt J (1990): *Neural Networks -- An Introduction*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Springer.

Redman S (1990): Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiol Rev* 70: 165-198.

Ribi WA (1978): Gap junctions coupling photoreceptor axons in the first optic ganglion of the fly. *Cell Tiss. Res.* 195: 299-308.

Rohdendorf BB (1964): Historical Development of Dipteran Insects. *Tr. Paleontol. Inst.* 100: 1–311.

Rose GJ and Fortune ES (1999): Frequency-dependent PSP depression contributes to low-pass temporal filtering in *Eigenmannia*. *J Neurosci* 19: 7629-7639.

Schilstra C und van Hateren JH (1999): Blowfly flight and optic flow. I. Thorax kinematics and flight dynamics *J Exp Biol* 202 (Pt 11): 1481-90.

Shcherbakov DE, Lukashevich ED und Blagoderov VA (1995): *Triassic Diptera and initial radiation of the order*, *Int. J. Dipterol. Res.*, 6(2): 75—115.

Shu Y, Hasenstaub A, Duque A und McCormick DA (2006): Modulation of intracortical synaptic potentials by presynaptic somatic membrane potential. *Nature* 441: 761-765.

Simmons PJ (2002): Signal processing in a simple visual system: the locust ocellar system and its synapses. *Microsc Res Techniq* 56: 270-280.

Simmons PJ und de Ruyter van Stevenick R (2005): Reliability of signal transfer at a tonically transmitting, graded potential synapse of the locust ocellar pathway. *J Neurosci* 25: 7529-7537.

Smith SJ, Augustine GJ und Charlton MP (1985): Transmission at voltage-clamped giant synapse of the squid: evidence for cooperativity of presynaptic calcium action. *P Natl Acad Sci USA* 82: 622-625.

Strausfeld NJ und Bassemir UK (1985): Lobula plate and ocellar interneurons converge onto a cluster of descending neurons leading to neck and leg motor neuropil in *Calliphora erythrocephala*. *Cell Tissue Res* 240: 617-640.

Tamás G, Buhl EH, Lorincz A, Somogyi P (2000): Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci* 3: 366-371.

Thomas JB und Wyman RJ (1984): Mutations altering synaptic connectivity between identified neurons in *Drosophila*. *J Neurosci* 4: 530-538.

2. ABHANDLUNG

Thoreson WB, Rabl K, Townes-Anderson E und Heidelberger R (2004) A highly Ca²⁺-sensitive pool of vesicles contributes to linearity at the rod photoreceptor ribbon synapse. *Neuron* 42: 595-605.

Trimarchi JR und Murphey RK (1997): The shaking-B2 mutation disrupts electrical synapses in a flight circuit in adult *Drosophila*. *J Neurosci* 17: 4700-4710.

Uusitalo RO, Juusola M und Weckström M (1995): Graded responses and spiking properties of identified first-order visual interneurons of the fly compound eye. *J Neurophysiol* 73(5): 1782-92.

van Hateren JH und Schilstra C (1999): Blowfly flight and optic flow. II. Head movements during flight. *J Exp Biol* 202 (Pt 11): 1491-500.

Wadiche JI und Jahr CE (2001): Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron* 32(2): 301-13.

Warzecha AK und Egelhaaf M (2001): Neural encoding of visual motion in real-time. In: *Vision: computational, neural, and ecological constraints*, edited by Zanker JM and Zeil J. Berlin, Heidelberg: Springer pp. 239-277.

Warzecha AK, Kretzberg J und Egelhaaf M (1998): Temporal precision of the encoding of motion information by visual interneurons. *Curr Biol* 26: 359-368.

Warzecha AK, Kurtz R und Egelhaaf M (2003): Synaptic transfer of dynamic motion information between identified neurons in the visual system of the blowfly. *Neuroscience* 119: 1103-1112.

Witkovsky P, Schmitz Y, Akopian A, Krizaj D und Tranchina D (1997): Gain of rod to horizontal cell synaptic transfer: relation to glutamate release and a dihydropyridine-sensitive calcium current. *J Neurosci* 17: 7297-7306.

