

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Fakultät für Biologie

Institut Biologie I (Zoologie - Neurobiologie und Verhalten)

Informationsskript zum

Bachelorlormodul

Diplomkurs

Bewegungssensitive Neurone im Gehirn

der Fliege -

Bewegungsdetektion und Adaptation

WS 2010/2011

Betreuer: Dr. Ulrich Beckers

Oktober 2010

Ganz kurzes Vorwort

In diesem Skript ist ein wenig Information für den Kurs zusammengetragen. Es ist dabei kein Arbeitsskript, die praktische Durchführung und auch die eigentlichen Fragestellungen Veruche ergeben sich im Kurs. An Hand des Skriptes soll in erster Linie ein wenig Hintergrundinformation vermittelt werden.

Ziele des Kurses/Schlagworte

Grundkenntnisse und beispielhaftes Wissen über die Funktionsweise einzelner Neurone und der Verschaltungen.

Neuronale Informationsprozessierung in Netzwerken und auf Einzelzellbasis.

Bedeutung der Bewegungsinformation innerhalb der visuellen Wahrnehmung

Prinzipien der Adaptation. Adaptation kann die Kodierungsfähigkeit von beliebigen Systemen steigern.

Bewegungsadaptation

Kontrast (Photokontrast, Bewegungskontrast)

Elektrophysiologische Methoden, praktisch: Extrazellulärableitung

Qualitative Auswertung von Versuchsergebnissen

Simulation biologischer Experimente (praktischer Nutzen, Grenzen)

Blackbox-Analyse

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 graduerter 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).

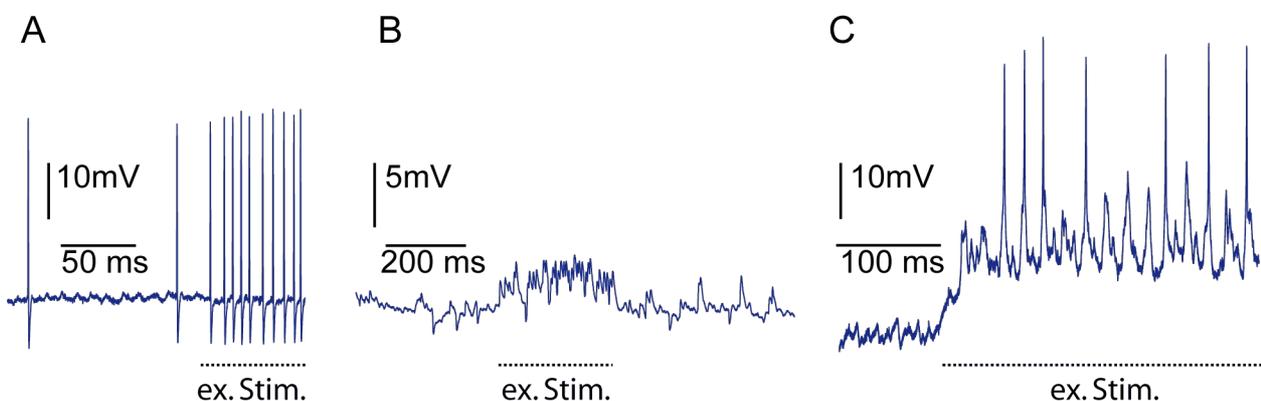


Abbildung 1: Membranpotenzialverläufe der verschiedenen neuronalen Kodierungsarten. Die Beispiele wurden von Zellen in der Fliegenlobulaplatte aufgenommen, die gepunktete Linie zeigt die Präsentation eines exzitatorischen Stimulus an. A: Aktionspotenziale einer H1-Zelle, $RP = -38$ mV. B: Graduiertes Signal einer VCH-Zelle, $RP = -45$ mV. C: Mischpotenzial aus graduierten Signalen und aufgelagerten aktionspotenzialartigen Transienten, $RP = -55$ mV.

Blackbox-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. Die Funktion F bedingt dabei A in Abhängigkeit von E.

Ist der Aufbau und die Funktion von F unbekannt, kann F aus der Beobachtung von E und A rekonstruiert werden. Solange F nicht charakterisiert ist, wird F in einem Ersatzschaltbild als schwarz gefülltes Schaltzeichen, einer *Black Box*, dargestellt.

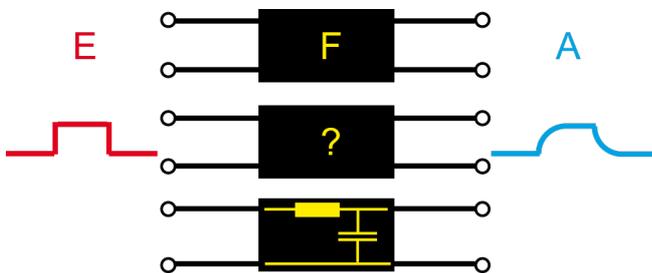


Abbildung 2: Rekonstruktion eines unbekanntes Systems (*F*) mit zwei Eingangspolen (*E*) und zwei Ausgangspolen (*A*).

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 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 erforderte die Messung aller theoretischen Eingangswerte und der zugehörigen Ausgangswerte, 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.

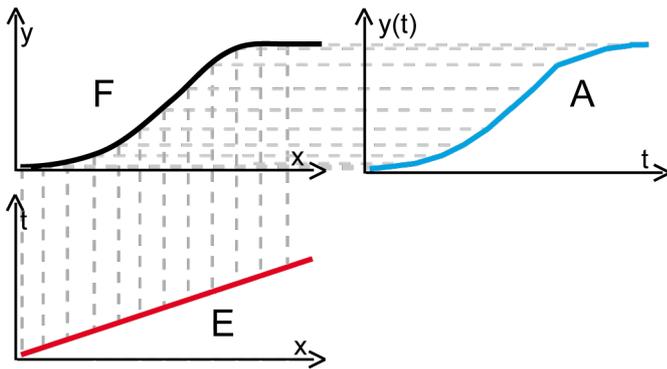


Abbildung 3: Rekonstruktion einer Kennlinie

Räumliche Wahrnehmung und visueller Fluss

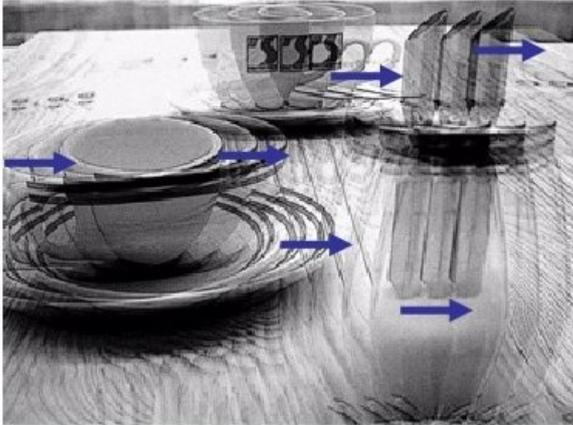
Die visuelle Wahrnehmung der Umwelt und schnelle und zuverlässige Extraktion relevanter Information ist ein wichtiger Faktor, ganz besonders für Tiere die sich fliegend fortbewegen (Objektkollisionsvermeidung, Abfangen/ausweichen fliegender Beute/Beutegreifer/Geschlechtspartner, Landung).

Die visuelle Information besteht dabei einerseits aus statischer Information wie Texturbeschaffenheit, Helligkeit und Farbwerten, andererseits aus einer räumlichen Veränderung der optischen Eindrücke.

Räumliche Veränderung kann dabei sowohl durch Eigenbewegungen (ich gehe die Straße entlang) als auch durch Bewegungen der Objekte (ich sehe ein Auto die Straße entlang fahren) hervorgerufen werden. In beiden Fällen verändert sich die Position der Umweltreize auf der Retina.

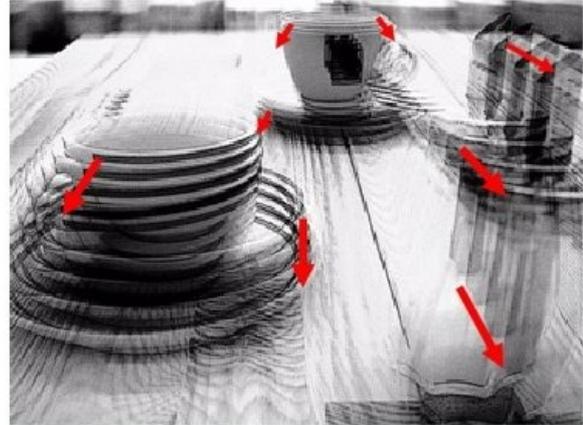
Während Eigenbewegung verschiebt sich die Bildinformation auf der Retina großflächig. Die Bewegung visueller Information auf der Retina wird optischer Fluss (optic flow) genannt.

rotational self-motion



rotational flow component

translational self-motion



translational flow component

Abbildung 4: Eigenbewegung induziert optischen Fluss. Die Art der Bewegung beeinflusst dabei den optischen Fluss. Rotation (blau): Optischer Fluss unabhängig von der Entfernung, Translation (rot): abhängig von der Entfernung (hieraus kann Information über die Position verschiedener Objekte gewonnen werden).

Es ergeben sich u. a. folgende Fragen: Welche Strategien für räumliches sehen gibt es und was sind die jeweiligen Vor- und Nachteile? Warum haben die meisten Tiere zwei Augen? Ist es riskant nach Verlust eines Auges am Straßenverkehr teilzunehmen oder ist es dann sinnvoll im Kino Avatar in 3D zu sehen? Was ist Kontrast?

Bewegungsdetektion

Der optische Fluss ist ein retinales Phänomen (bzw. ein Projektionsphänomen). Implizit beinhaltet der optische Fluss Information über Bewegung.

Wie kann diese mit minimalem Aufwand detektiert werden?

Um dieser Frage nachzugehen wird im Kurs mit einem Black-Box-Modell am Rechner gearbeitet. Durch Beobachtung wie sich das System verhält soll auf den funktionalen Aufbau geschlossen werden.

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 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.

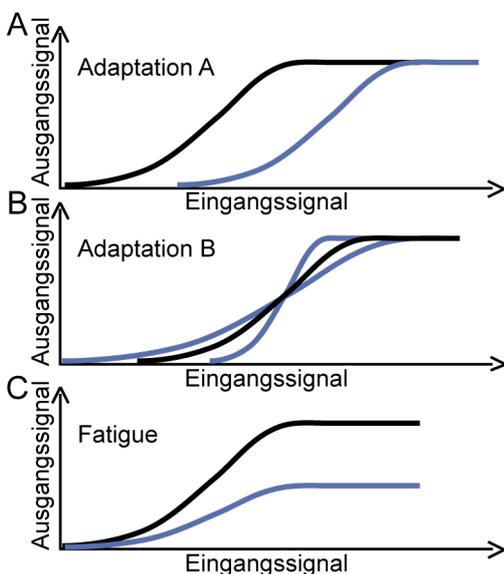


Abbildung 5: Veränderung der Kennlinie eines Systems bei Adaptation (A,B) und Ermüdung (C) eines Systems. Schwarz dargestellt ist die Kennlinie F_x des Systems zum Zeitpunkt nach der Stimulushistorie X_a . Die Kennlinie F_y nach Stimulushistorie Y_a ist blau dargestellt. Adaptation kann als Verschiebung (A), Stauchung oder

Schrumpfung (B) der Kennlinie in der Horizontalrichtung dargestellt werden. Die in A und B dargestellten Veränderungen der Kennlinie treten häufig auch in kombinierter Weise auf. Nicht adaptative 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.

In sensorischen Systemen spielt Adaptation eine sehr große Rolle. Der Wertbereich 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.

Die Fliege als Modellorganismus

Gehirne stellen die komplexesten Strukturen dieser Welt dar und bilden die Grundlage für alle Verhaltensleistungen. Ein Gehirn besteht aus aus einem Netzwerk dicht gepackter Neuronen die vielfach miteinander verbunden sind. Die Größe von Gehirnen kann dabei stark variieren, das menschliche Gehirn besteht aus etwa 10^{11} bis 10^{12} Neuronen mit insgesamt 10^{15} synaptischen Verbindungen und ist somit bei weitem zu komplex um als Gesamtheit analysiert werden zu können.

Daher nutzt man in der Grundlagenforschung idealerweise ein System, das möglichst einfach ist und dennoch die Betrachtung der geforderten Fragestellungen erlaubt.

Insekten sind verhältnismäßig einfache Tiere, die dennoch ein großes Verhaltensrepertoire zeigen und evolutionär sehr erfolgreich sind. Die Gruppe der Fluginsekten (Pterygota), zu denen die hier betrachteten Fliegen (Brachycera) gehören, ist seit dem Unterkarbon vor ca. 320 Mio Jahren bekannt.

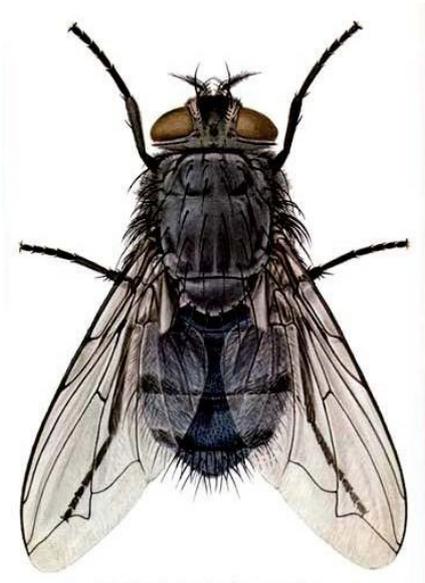


Abbildung 6: Weibchen der Art *Calliphora*. Männchen und Weibchen können am einfachsten an der Augenstellung unterschieden werden. Bei Männchen berühren sich die Augen im dorso-frontalen Bereich, bei Weibchen nicht.

Im Kurs wird mit Weibchen der Art *Calliphora vicina* (blaue Fleischfliege), einer Schmeißfliege, gearbeitet. Gegenüber *Drosophila* hat *Calliphora* für elektrophysiologische Versuche u.a. den Vorteil, dass sie nicht so klein ist und Versuche praktisch gut durchgeführt werden können. Weibchen werden wegen des etwas einfacher aufgebauten visuellen Zentrums genutzt.

Insektengehirne bestehen aus einigen Hunderttausend Nervenzellen. Das sind deutlich weniger als bei z.B. einem Menschen, aber für eine Gesamtanalyse eine noch immer nicht praktikable Menge. Man muss das Gehirn daher in weitere Untereinheiten abnehmender Komplexität unterteilen.

Häufig werden diese Untereinheiten isoliert *in vitro* betrachtet, z.B. Gewebekulturen oder Schnittpräparate aus Gehirnen. Die Fliege erlaubt einen guten Zugang zu übersichtlich großen Untereinheiten unter *in vivo*-Bedingungen, also am weitgehend intakten Tier (was sind die Vorteile der verschiedenen Ansätze?).

Bewegungssensitive Zellen im Fliegenhirn

Einen großen Teil des Fliegenhirns nimmt das visuelle System ein. Dieses ist aus verschiedenen anatomisch und funktional unterscheidbaren Schichten aufgebaut (siehe Abb. 7).

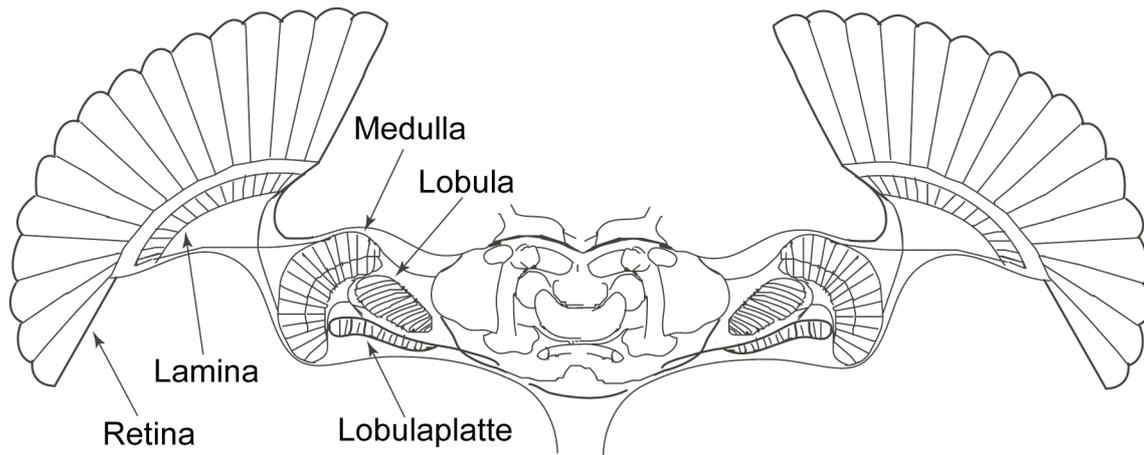


Abbildung 7: *Schema des visuellen Systems der Fliege. In der Retina wird Lichtsinnesinformation von Photorezeptorzellen einzelner Ommatidien des Komplexauges aufgenommen. In der Lamina und Medulla werden die visuellen Signale zeitlich gefiltert und Bewegung auf Ebene der Signale von Photorezeptorzellen 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).*

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).

Einige Zellen in der Lobulaplatte erhalten ihren Eingang von anderen Zellen der Lobulaplatte. Z.B. ist V1 eine Zelle die Eingang von mehreren VS-Zellen bekommt.

Wichtige Zellen im Kontext dieses Kurses sind vor allem die V1, V2 und H1-Zellen, diese kommen in jeder Hirnhälfte einmal vor (H1 findet man zweimal in jeder Hirnhälfte, da die Axone der Zellen von der einen zu anderen Hälfte ziehen). Die Zelltypen können aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktion auf präsentierter Reize unterschieden werden.

Den Schwerpunkt der Versuche im Kurs stellt die Überprüfung und Analyse von Adaptationseffekten auf Bewegungsreize verschiedener Geschwindigkeiten auf unterschiedliche Zelltypen dar. Was ist in diesem Zusammenhang Adaptation? Wie kann man Adaptation auslösen? Wie kann man diese erkennen?

Elektrophysiologie

Die grundlegende Eigenschaft von Nervenzellen ist ihre Erregbarkeit (siehe "Neuronale Signalkodierung"). Da Membranpotenzialänderungen physikalisch messbar ist es möglich die Signale einzener Zellen zu erfassen. Grundsätzlich kann dieses durch zwei Methoden passieren:

- direkte Messung des Membranpotenzials
- indirekte Messung des Membranpotenzials.

Für die direkte Messung ist es notwendig eine Messelektrode in die Zelle einzubringen deren Potenzial man messen will (intrazelluläre Messung). Abhängig von der Größe und Zugänglichkeit der Zelle ist dieses mit viel oder

wenig Aufwand verbunden. Der Vorteil dieser Methode ist eine hohe Messgenauigkeit und die Möglichkeit zur Manipulation des Membranpotenzials.

Einfacher in der Durchführung ist die extrazelluläre Messung. In diesem Fall wird die Messelektrode nicht in die Zelle eingebracht, sondern misst in der Nähe der Zelle Potenzialänderungen, die durch die Membranpotenzialänderungen induziert werden.

Es ist möglich Einzelzellaktivität zu messen oder Ensembleaktivität (z.B. beim EKG - hier wird die Summenaktivität verschiedener Herzmuskelzellen gemessen). Extrazelluläre Messungen eignen sich praktisch nur für Zellen, die das Signal durch Aktionspotenziale kodieren. Es ist nicht möglich quantitative Aussagen über das Membranpotenzial zu treffen (warum?).

In diesem Kurs wird die Aktivität einzelner Neurone extrazellulär gemessen. Dafür werden als Elektroden feine, elektrolytgefüllte (1M KCl) Glaskapillaren in das Fliegenhirn so eingebracht, dass sie im Gewebe möglichst dicht an den zu untersuchenden Zellen positioniert sind und möglichst keine Aktivität anderer Zellen detektieren. Mit einem Mikromanipulator können die Elektroden sehr präzise bewegt werden. Das detektierte Signal wird verstärkt und sowohl grafisch (Oszilloskop) und akustisch (Lautsprecher) überwacht.

Simulation biologischer Modelle und Experimente

Am Computer können biologische Modelle und Versuche simuliert werden. Dieses hat mehrer Aspekte. Zum einen können Modelle, die auf Grund von Beobachtungen postuliert wurden nachgebaut und überprüft werden. So lassen sich Parameteränderungen im Modell schnell auf ihre Auswirkung überprüfen.

Im Lehrbereich ist es auch ein Ansatz, dass Simulationsversuche effizient durchgeführt werden können und bei Tierversuchen die Versuchstiermenge deutlich reduzieren werden kann.

Im Kurs wird ein Teil der Versuche am Rechner durchgeführt.